



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

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C, MAYO DE 2018.



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

CATALINA IBAÑEZ GALVIS

Asesor interno

DRA. MARCELA GÓMEZ GARZÓN. MSc.

Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud

Asesor externo

DRA. LILIAN ANDREA TORRES. MSc.

Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA

TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ D.C, MAYO DE 2018.

DEDICATORIA.

La presente tesis la dedico a mi familia, quienes fueron apoyo y guía en el sendero de la vida y especialmente a mi madre, quien ha sido mi fortaleza en cada paso que doy.

AGRADECIMIENTOS

En la realización de este proyecto de grado la participación de distintas personas y entidades fue de vital importancia para la culminación de este mismo, por esto le agradezco primeramente a Dios quien fue compañía, fortaleza y esperanza en los momentos más difíciles.

Le agradezco profundamente a la Dra. Marcela Gómez quien confió en mí este trabajo desde el principio, también por su paciencia, incondicionalidad, apoyo, guía y conocimientos brindados en mi proceso profesional.

A la Dra. Lilian Torres que me dio su apoyo y confianza, siempre enmarcadas en su orientación y rigurosidad, que han sido la clave para este trabajo. Le agradezco también el haberme facilitado los medios para el desarrollo de esta tesis.

A la FUCS por dejarme ser parte de esta institución, y en especial al Instituto de

Ciencias Básicas donde conocí personas maravillosas que enriquecieron mi paso por allí.

Al grupo de Dermatología Fundación Sociedad de Cirugía de Bogotá, Hospital San José, que antecedieron mi trabajo y las compañeras de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, quienes en un primer momento obtuvieron toda la información y procesaron las muestras aquí analizadas.

A Bryan que me ha dado fortaleza para seguir mis sueños, por ser un acompañante incondicional en mi crecimiento personal y profesional, también le agradezco infinitamente por cada consejo y ayuda que me brindó con amor siempre que lo necesite.

A mis amigas, Wendy Martinez, Paula Zambrano y Natalia Castro que ocupan un lugar en mi corazón y siempre me acompañaron con una voz de aliento.

Por último, pero no menos importante, a mi familia, especialmente a mi abuela, mis tíos (as) maternos, mi hermana, mi sobrina y mi mamá, que me han dado la fortuna de compartir tanto amor y felicidad, les agradezco por darme los valores y principios con los que guio mi vida y acciones. Les agradezco por pensar siempre primero en mi bienestar a pesar de las circunstancias, y sé que, así como han dado todo de cada uno de ellos, esperan mucho de mí, prometo no defraudarlos.

GRACIAS

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo general	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. ANTECEDENTES	18
4. MARCO REFERENCIAL	25
4.1 La piel	25
4.2 <i>Cutibacterium acnes</i> .	28
4.2.1 Generalidades	28
4.2.2 Clasificación	30
4.2.3 Diagnóstico	35
4.3 Acné vulgar	39
5. METODOLOGÍA.	44
5.1 Obtención de cepas	44
5.2 Biotipificación	45
5.3 Filotipificación	46
5.3.1 Extracción de ADN	46
5.3.2 Cuantificación de ADN	46
	7

5.3.3 Selección de Primer's	47
5.3.4 Estandarización de la PCR.	49
5.3.5 Electroforesis	50
5.3.6 Interpretación de Corridos Electroforéticos.	51
6. RESULTADOS	52
6.1 Descripción de la población.	52
6.2 Biotipificación	54
6.3 Descripción de biotipos y tipos de acné.	56
6.4 Condiciones finales de la PCR TD múltiple.	57
6.5 Filotipificación	62
6.6 Descripción del filotipo y tipo de acné.	64
6.7 Comparación de biotipificación, filotipificación por PCR TD múltiple y MALDI-TOF	64
7. DISCUSIÓN	66
8. CONCLUSIONES	71
9. BIBLIOGRAFÍA	73
10. ANEXOS	79
10.1 Protocolo de extracción de ADN (E.Z.N.A. ® Bacterial DNA Kit)(64).	79
10.2 Análisis bioinformática en BLAST ®.	80
10.2.1 PArA 1/2.	80
10.2.2 PAMp 1/2.	81
10.2.3 PAMp 3/4.	81
10.2.4 PAMp 5/6.	82
10.2.5 PAMp 7/8.	82

10.2.6 PAMp 9/10	83
10.3 Ensayos a diferentes Temperatura de anillamiento en PCR TD múltiple.	83
10.3.1 Temperatura de anillamiento 62°C.	83
10.4 Ensayos con presencia y ausencia de BSA.	85
10.4.1 PCR TD sin BSA.	85
10.4.2 PCR TD con BSA.	85
10.5 Secuenciación de fragmentos y alineamiento en BLAST ®n.	86
10.5.1 Secuenciación de fragmentos y alineamiento en BLAST ® PArA 1.	86
10.5.2 Secuenciación de fragmentos y alineamiento en BLAST ® PArA 2.	87
10.5.3 Secuenciación de fragmentos y alineamiento en BLAST ® PAMp 1.	88
10.5.4 Secuenciación de fragmentos y alineamiento en BLAST ® PAMp 2.	89
10.5.6 Secuenciacion de fragmentos y alineamientos en BLAST ® de PAMp 4.	90
10.6 Protocolo PCR.	91
10.6.1 Primer's PArA 1 y 2	91
10.6.2 Primer's PAMp 1 y 2.	92
10.6.3 Primer's PAMp 3 y 4	92
10.7 Protocolo lonza GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain.	93

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Biotipificación de C. acnes	33
Tabla 2. Identificación de Biotipos de C. acnes	46
Tabla 3. Publicaciones para evaluar los Primer's de la PCR para la filoclasificación.	47
Tabla 4. Datos de pacientes con acné vulgaris	53
Tabla 5. Resultados biotipificación.....	55
Tabla 6. Primer's usados en la PCR TD múltiple.	58
Tabla 7. Concentraciones y volúmenes usados en la PCR TD múltiple.	60
Tabla 8. Condiciones del ciclaje PCR TD múltiple en sistema StepOnePlus™. ...	61
Tabla 9. Filotipificación de C. acnes, mediante PCR TD múltiple.	63
Tabla 10. Filotipificación de C. acnes por PCR TD múltiple, espectrometría de masas (MALDI-TOF) (50), (resultados inconsistentes se muestran con la casilla en blanco) y biotipificación.....	65
Tabla 11. Protocolo de Primer's PArA 1 y 2.....	91
Tabla 12. Protocolo de Primer's PAMp 1 y 2	92
Tabla 13. Protocolo para Primer's PAMp 3 y 4	92

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Acné leve	Ilustración 2. Acné severo	40
Ilustración 3. Patrón de bandeado para cada uno de los filotipos.....		52
El cambio de color de los carbohidratos (Ilustración 4, 5 y 6) se reportó para cada cepa de <i>C. acnes</i> , encontrándose que el 56% correspondió al BI y el 44% al BIII, datos presentados en la tabla 5 (20). <i>Ilustración 4. Fermentación negativa de Eritritol</i>		
		54
Ilustración 5. Fermentación positiva de Ribosa		54
Ilustración 6. Fermentación positiva de Sorbitol.....		55
<i>Ilustración 7. Biotipos de C. acnes encontrados en acné leve, moderado y severo.</i>		57
Ilustración 8. Corrido electroforesis PCR TD		62
Ilustración 9. Filotipos encontrados en grado de acné.....		64
Ilustración 10. Protocolo de extracción de ADN (E.Z.N.A. ® Bacterial DNA Kit)....		79
Ilustración 11. Análisis bioinformático en BLAST ® PArA 1/2		80
Ilustración 12. Análisis bioinformático en BLAST ® PAMp ½		81
Ilustración 13. Análisis bioinformático en BLAST ® PAMp 3/4		81
<i>Ilustración 14. Análisis bioinformático en BLAST ® PAMp 5/6</i>		82
Ilustración 15. Análisis bioinformático en BLAST ® PAMp 7/8.		82
Ilustración 16. Análisis bioinformático en BLAST ® PAMp 9/10		83
Ilustración 17. Electroforesis en gel de Agarosa, de PCR a Temperatura de anillamiento 62°C.....		83
Ilustración 18. Electroforesis en gel de poliacrilamida, de PCR a Temperatura de anillamiento 64°C.....		84
Ilustración 19. Electroforesis en gel de poliacrilamida, de PCR TD multiple a Temperatura de anillamiento 66°C.		84

Ilustración 20. Electroforesis en gel de poliacrilamida de PCR TD primer individual sin BSA.	85
Ilustración 21. Electroforesis en gel de poliacrilamida de PCR TD con BSA	85
Ilustración 22. Secuenciación fragmento amplificado cepa ATCC con Primer PArA 1.....	86
Ilustración 23. Alineamiento en BLAST ®, fragmento amplificado primer PArA 1 .	87
Ilustración 24. Secuenciación fragmento amplificado cepa ATCC con Primer PArA 2.....	87
Ilustración 25. Alineamiento en BLAST ®, fragmento amplificado primer PArA 2 .	88
Ilustración 26. Alineamiento en BLAST ®, fragmento amplificado primer PAMp 1	89
Ilustración 27. Secuenciación fragmento amplificado cepa ATCC con Primer PAMp 2.....	89
Ilustración 28. Alineamiento en BLAST ®, fragmento amplificado primer PAMp 2	89
Ilustración 29. Protocolo lonza GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain	93



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA

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

RESUMEN

El acné es una enfermedad inflamatoria crónica de los folículos pilo sebáceos que afecta principalmente, adolescentes y adultos jóvenes. Su etiología es multifactorial, incluyendo componentes, como la función hormonal alterada, aumento en la producción de sebo, la hiperqueratinización folicular, la proliferación de *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*), antes denominado *Propionibacterium acnes* y la activación de diversas cascadas inflamatorias (1,2).

Existen diferentes metodologías para clasificar a *C. acnes*, las basadas en el genoma, en el proteoma y en sus características bioquímicas (3–7). Desafortunadamente, las que se basan en las características bioquímicas han generado muchas discrepancias, pero son utilizadas debido a sus bajos costos, las pruebas basadas en el análisis proteómico constituyen una herramienta útil en la tipificación y clasificación de las especies; sin embargo, estas no son del todo confiables; y por último las pruebas genómicas existentes comprometen altos costos, maquinaria y personal especializado. En este trabajo se estandarizó la prueba de reacción en cadena de la polimerasa tipo “*Touchdown*” múltiple (PCR-TD múltiple) para determinar los filotipos de *C. acnes* circulantes en una población de Bogotá. Se evidencio una mayor prevalencia del filotipo IA2 (96%), seguido de los filotipo IB (4%), siendo IA1 asociado con formas de acné inflamatorio frecuentemente aislado en otros estudios (8).

Palabras clave: *acné, C. acnes, filotipo, biotipo.*

Estudiante Catalina Ibañez Galvis

Docentes

Dra. Marcela Gómez Garzón

Dra. Lilian Torres Tobar

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

16 de marzo de 2018.

1. INTRODUCCIÓN

La presente investigación se enfocó en determinación de los filotipos de *C. acnes* aislados a partir de acné vulgaris, con el fin de encontrar relación entre sus características fenotípicas, genotípicas y carácter patogénico. El acné se encuentra dentro de las diez enfermedades con mayor prevalencia en el mundo, alrededor del 85% de los adultos jóvenes entre 12 y 25 años presentan esta patología (9). Además, es considerado una de las principales causas de consulta en el servicio de dermatología, debido a las secuelas cutáneas, que afecta la autoestima de quien lo padece.

El acné vulgar, se define como una enfermedad inflamatoria crónica de la unidad pilo sebácea, su etiología está asociada con varios factores, como la función hormonal alterada, aumento en la producción de sebo, la hiperqueratinización folicular (consecuente obstrucción del canal pilosebáceo o comed génesis), la proliferación de *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) y la activación de diversas cascadas inflamatorias (2,10).

La filotipificación (clasificación según la secuencia de ADN) de *C. acnes* se ha incrementado debido al papel emergente y la necesidad de relacionar los filotipos con las enfermedades reportadas. Estos, varían en la producción de factores de virulencia, el potencial inflamatorio, las propiedades bioquímicas, agregativas, y características morfológicas.

La escasa información de los filotipos de *C. acnes* en Colombia, e incluso en Latinoamérica, sobre el comportamiento molecular de resistencia, la severidad de la patología adquirida, dada por los filotipos produce la administración de terapias antimicrobianas no específicas, generando así mayor resistencia. Por lo cual, es de gran importancia revisar a *C. acnes* en la práctica clínica del acné, discutir los aspectos moleculares de la filogenia, la tipificación molecular y las características bioquímicas (3,4).

En la presente investigación se analizaron cepas previamente aisladas de *C. acnes* tomadas de lesiones inflamatorias de acné en pacientes que consultaron al servicio de Dermatología Fundación Sociedad de Cirugía de Bogotá, Hospital San José en el año 2016 y que fueron tipificadas con MALDI-TOF previamente, siendo esta investigación una segunda etapa con los datos e información obtenida de ellos (50).

Se empleó la reacción en cadena de la polimerasa tipo Touchdown múltiple (PCR TD múltiple), para la determinación de filotipos y biotipificación a través de pruebas de fermentación de carbohidratos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

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.

2.2 Objetivos 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*.

3. ANTECEDENTES

Según el grupo latinoamericano de estudio del Acné, las primeras referencias al acné en la literatura médica, se encuentra en el “papiro de Ebers”, considerado como uno de los tratados médicos más antiguos en la civilización ya que fue escrito en Egipto en el año 1500 a.C, en el cual según la traducción de Budge, la palabra *Aku-t* hace referencia a forúnculo, inflamación, llaga, pústula, o alguna hinchazón (11). Igualmente grandes filósofos de la edad antigua como Hipócrates y Aristóteles reconocen también la existencia de esta enfermedad, conocida entonces en Grecia como “*ionthus*” que significa en plural “el primer crecimiento de barba” y en Roma como “*vari*”; Por lo tanto, aunque no se definía bien la patología, si se sabía que estaba relacionada con la pubertad, y que aquellos síntomas que no cumplían con esta condición eran identificados como Rosácea (12).

El acné es probablemente la enfermedad dermatológica más común en la historia de la humanidad, en 1992 en lo que podría ser el descubrimiento más importante de la arqueología egipcia, se descubrió la tumba del faraón Tutankamón, de la XVIII dinastía (1339-1329 a.C) a cargo del arqueólogo y egiptólogo inglés Howard Carter en el valle de los Reyes, frente a Luxor, Egipto; los restos del rey evidenciaban huellas de acné y en su tumba medicamentos utilizados para el

tratamiento de esta patología (13).

En cuanto a la evolución de la palabra acné, aún se encuentra en discusión, sin embargo, la primera vez que aparece el término “*ionthus*” es en el Siglo II a.C en *Onomasticon*, un diccionario de la época, escrito por *Julius Pollux*, profesor griego de retórica en la Academia platónica, siendo esta la única obra que se conserva en la actualidad de *Pollux* (11).

Para el siglo V d.C el médico y escritor Bizantino, Aetius Amidenus, escribió una enciclopedia médica llamada el Tetrabiblion, donde aparece por primera vez la palabra acné. Aunque este hecho es muy confuso dado que en una de seis ediciones fue escrita como “acmé” y en las cinco restantes como “acné” esto pudo deberse, según Grant, a los intentos del editor de acomodar el término en la medicina griega que dio como resultado una variedad ortográfica, “acnas”, “acnæ”, “acmas” y “acmé” sin embargo no se puede descartar, error del copista (11,12).

Geoffrey Chaucer hizo importantes aportes a este padecimiento en el siglo VII d.C, como fue implementar tratamientos diferentes para el acné y la Rosácea además de asociar el consumo de alimentos picantes o bebidas fuertes con la aparición del acné, basados en esto, posteriormente Theocritus, Thomas Elyot y Rhodiginus, asocian la adiposidad en la parte superior del cuerpo con forúnculos y puntos negros al mismo tiempo que de una posible disfunción endocrina. En 1638, Riolanus relaciona el acné con trastornos menstruales.

Durante las siguientes décadas, la literatura sobre el acné se vuelve extensa, enfocados en temas de clasificación y nomenclatura, según Grant, “*todas las condiciones pustulosas de la cara deben ser llamado acné; necesariamente para cualquier lesión que tenga una aureola roja* (traducción propia)” (11).

Robert Willan publicó en 1808 el primer volumen de “*On cutaneous diseases*”, sin embargo murió 3 años después; su sucesor, Thomas Bateman recopiló y añadió los conocimientos que había adquirido con Willan y publicó el segundo volumen de “*On cutaneous diseases*”, donde designa cuatro formas de acné, (acné simplex, acné punctata, acné indurata y acné rosácea)(14).

En 1857, Erasmus Wilson expresó en su libro “*On Diseases of the Skin*” que en la clasificación de Willan, las primeras tres formas de acné son meras modificaciones de la misma forma de la enfermedad, por lo tanto, la misma elevación, ocurre en diferentes periodos de su desarrollo. En efecto, Erasmus decide separar el acné rosáceo del acné vulgaris y establece las diferencias para diagnosticar las variedades de este, como la ausencia de cualquier folículo excretor en acné vulgaris, la presencia de una apertura excretora en acné punctata, el curso indolente de acné indurata y la distribución en general de todas estas formas sobre la superficie del cuerpo. En el caso de acné rosácea es distinguible de las anteriores por la gran vascularidad de sus elevaciones, la congestión y el grosor de la piel que la rodea (15). Igualmente al describir las causas del acné vulgaris,

afirmó que se da con mayor frecuencia en personas jóvenes o que están en la pubertad, debido a un estilo de vida sedentario, fatiga mental y amenorrea en mujeres (15).

El bacilo del acné fue visto por primera vez en 1891 por Paul Gerson Unna, médico alemán conocido por implementar la histología en enfermedades dermatológicas, quien no pudo cultivar este microorganismo, sin embargo, lo responsabiliza de la aparición del comedón (grano sebáceo que se forma generalmente en la piel del rostro o de la espalda debido a la obstrucción del conducto excretor de una glándula sebácea) y la supuración consecuente (16).

En 1897, Sabouraud cultivó los bacilos y los asignó también como el agente causante en la producción del comedón, no obstante afirmó que la supuración se debe a *Staphylococcus* porque histológicamente encontró estos microorganismos fagocitados, caso diferente de los bacilos, donde no encontró señales aparentes de haber sido capturados por los fagocitos (14,17). El cultivo hecho por Sabouraud, resultó en un crecimiento rápido de *Staphylococcus*, seguido en cuatro días por la aparición de un botón café que, se incrementó gradualmente, por lo tanto, los bacilos podían ser obtenidos después de un mes de crecimiento y lo llamó “bacilo de grasa seborreica” (*bacille de seborrhee grasse*). Esta connotación cambió según investigaciones posteriores de Gilchrist (1900, 1903), Halle y Civatte (1907), Hartwell y Streeter (1909), Fleming (1909) (16), Südmerson

y Thompson (1909) y Molesworth (1910) (18), quienes demostraron que el “microbacilo” tenía un crecimiento óptimo en condiciones anaerobias y su morfología era similar al género *Corynebacterium*, por lo que se determinó que hacía parte de este género y fue nombrado *Corynebacterium acnes* (*C. acnes*). Sin embargo, en 1946 Douglas y Gunter, presentaron dudas acerca de la clasificación taxonómica y la presencia de este microorganismo en piel sana, por lo que realizaron un ensayo que incluía cepas previamente aisladas de *C. acnes*, sometidas a diferentes pruebas bioquímicas, concluyendo con esto, que *C. acnes* tiene más afinidad por el género *Propionibacterium*. Es así que se transfiere el organismo anteriormente conocido como *Corynebacterium acnes* al Género *Propionibacterium*, como *P. acnes*, sobre la base de su relación con el oxígeno y la naturaleza de su proceso catabólico (19).

La subdivisión de *P. acnes* en los tipos I y II fue descrito por Johnson y Cummins en 1972 basado en pruebas de aglutinación de carbohidratos presentes en la pared celular y la capacidad de fermentarlos. Las cepas de Tipo I y II pueden ser discriminadas, siendo esta última carente de galactosa en la pared celular e incapaz de fermentar el sorbitol (6,20). En los años posteriores la detección de filotipos, filogrupos y subtipos ha tenido múltiples aportes según rasgos fenotípicos y/o moleculares, como pruebas bioquímicas basadas en la hemólisis producida

por distintos filogrupos, perfiles de fermentación, desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF), tipificación con anticuerpos monoclonales, ribotipificación basado en el estudio de ARNr 16s (21,22), múltiples análisis por PCR, que incluyen variaciones de esta misma (4,23–25), codificación de proteínas y secuenciación genética.

Sin embargo, muchas de estas técnicas no cuentan con la especificidad necesaria para determinar cada uno de los tipos, lo que dificulta su diagnóstico y el análisis de asociaciones a distintas patologías.

Los ensayos de PCR convencionales no diferenciaban IA1 del tipo IA2, IC o cepas de tipo II (22,26), es hasta el año 2015 que se estandarizó una técnica de PCR TD múltiple, obteniendo una especificidad del 100% (4).

La secuenciación de nucleótidos de locus único, se ha basado principalmente en los genes *recA* y *tly* (metil-transferasa / hemolisina), esta técnica es eficiente para identificar los tipos I, II y III pero muestra una especificidad reducida para diferenciar el tipo IB del tipo IA2 y algunas cepas dentro del clado del tipo IA1, ya que comparten alelos idénticos debido a la transferencia horizontal de genes (5, 21,27). Más recientemente, la tipificación con anticuerpos dirigidos a los tipos IA, IC y II combinados con el análisis de la secuencia *recA*, evito este problema, facilitando la diferenciación de tipo IB de todas las cepas del tipo IA (28). MALDI-

TOF también ha sido descrito como un enfoque valioso para la identificación de filogrupos con alto rendimiento, a excepción de los tipo IA1 de los IA2 (29).

En la actualidad, la tipificación con secuencia multilocus (MLST) es la prueba *Gold estándar* ya que ha logrado la diferenciación de cada uno de los filogrupos con alto rendimiento y especificidad, está basado en secuencias de nueve (30), ocho, siete (5) y cuatro genes (31) según reportan diferentes autores respectivamente sin embargo esta técnica es costosa y laboriosa, también existe amplificación de ADN polimórfico (RAPD) que ha sido usado para la diferenciación del tipo I y II (32).

Históricamente la clasificación de *P. acnes* ha evidenciado una evolución, desde la detección de serogrupos según los carbohidratos presentes en la pared celular (serogrupo I y II), hasta análisis filogenéticos de alto rendimiento que logra agrupar las cepas en complejos clonales según los patrones evolutivos. En la actualidad se propone una nueva clasificación basados en propiedades morfológicas, bioquímicas y proteogenómicas, clasificando los filotipos I y II en la subespecie, *Propionibacterium acnes* subs *P. acnes* subsp. nov. y *Propionibacterium acnes* subsp. *elongatum* subsp. nov. para tipo III sin embargo esta no ha tenido gran acogida(33) .

Por último, la reclasificación de las especies de la familia *Propionibacteriaceae*, por parte de Scholz *et. al*, agrupando a *P. acnes*, *P. granulosum* y *P. avidium* en el género *Cutibacterium*, debido a discrepancias filogenéticas que existían en la familia, renombra las especies según el género acuñado, *Cutibacterium acnes*, *Cutibacterium avidium* y *Cutibacterium granulosum* (34).

4. MARCO REFERENCIAL

4.1 La piel

La piel constituye una barrera de defensa del cuerpo y uno de los principales canales de comunicación de nuestro organismo con el medio ambiente que nos rodea; está integrada por dos capas, la dermis y la epidermis, esta última siendo la más superficial, se encuentra compuesta por una matriz extracelular que separa el tejido epitelial, del tejido conjuntivo; sobre la cual, se apoyan células especializadas en la producción de queratina principalmente (queratinocitos), que estimula el crecimiento de células epiteliales en la piel (35).

Los queratinocitos son las células predominantes de la epidermis, en donde según su morfología se pueden evidenciar cinco capas diferentes, desde el interior hasta el exterior, la primera capa es la germinativa, que está constituida por una sola franja de células cilíndricas con puentes intercelulares poco visibles; la segunda

capa denominada espinosa debido a que las células que lo componen, tienen prolongaciones con forma de espinas, con alta concentración de nutrientes y está dispuesto en capas entre dos y seis células; después se encuentra el estrato granuloso que contiene células aplanadas en capas de hasta tres células, éstas, no se multiplican, envejecen y pierden el núcleo a diferencia de las capas anteriores, éste, estrato también puede ser llamado queratohialino ya que en sus células se pueden ver gran cantidad de gránulos de queratohialina, sustancia precursora de la queratina. Seguidamente el estrato lúcido, demarca la zona de transición entre el estrato granuloso y el córneo, sus células se encuentran muertas, con bordes poco definidos, sin núcleo y con muchos filamentos de queratina. Por último, se encuentra la capa córnea, siendo esta la más externa en la piel, constituida por células muertas, queratinizadas y anucleadas (corneocitos) que se descaman continuamente, esta capa, constituyen las tres cuartas partes de la epidermis siendo más gruesa en áreas sometidas a mayores presiones o continuos roces como, las zonas palmo plantares, además de ser una fuerte barrera mecánica contra el ingreso de microorganismos al cuerpo e impermeable al agua.

La dermis, capa más interna de la piel, está irrigada por una gran cantidad de vasos sanguíneos y canales linfáticos, así como de colágeno, células del sistema inmune (polimorfonucleares, linfocitos, neutrofilos, macrófagos, etc.), glándulas sebáceas y folículos pilosos (10,35).

La dermis está conformada por dos capas, una papilar o dermis superior, conectada con la lámina basal, cuyas fibras de colágeno y elásticas se organizan de forma perpendicular al epitelio, aquí encontramos de igual manera los corpúsculos de Meissner (terminaciones nerviosas responsables de la sensibilidad). La segunda capa, reticular o dermis profunda, está constituida por tejido conectivo con fibras elásticas dispuestas en todas las direcciones, formando una estructura compacta que le da resistencia y elasticidad a la piel.

La piel tiene un pH ácido (5.0 y 6.0), lo que evita un ambiente propicio para muchos microorganismos, además, la presencia de glándulas sebáceas productoras de antimicrobianos, la producción de péptidos antimicrobianos (defensinas) por parte de los queratinocitos, la melanina, proteína encargada de la protección del ADN, secretada por los melanocitos y por último la presencia de células de Langerhans como células presentadoras de antígeno constituyen una barrera innata en la defensa de la piel (35).

En la piel, se sitúan virus, hongos, bacterias y microparásitos, la mayoría de estos son considerados comensales, es decir, que se alimentan de la descamación o de nutrientes que llegan a través de la dieta y el aire inspirado; unos pocos son mutualistas, que le brindan al organismo, vitaminas y enzimas que no puede sintetizar, también están encargados de ocupar nichos biológicos que, de estar libres, serían colonizados por patógenos.

La microbiota de la piel, interactúa con los queratinocitos, ubicándose en microambientes, con diferente pH, humedad, temperatura y contenido de sebo; los hábitats de la piel tienden a ser muy diferentes entre los segmentos corporales; sin embargo son muy similares entre individuos de la misma edad y sexo, pues estos poseen propiedades físicas, químicas y fisiológicas comunes que facilitan la colonización de microorganismos con las mismas características (36).

En general el hábitat cutáneo es deficiente en péptidos, está embebido en sudor rico en sal y proteínas antimicrobianas, las glándulas sebáceas, secretan un sebo abundante en lípidos que le proporcionan a la piel una capa hidrófoba.

Se han descrito 19 filos en la microbiota cutánea, lo más frecuentes son: actinobacteria (52%), firmicutes (24%), proteobacteria (16%) y bacteroides (6%). Siendo parte *C. acnes* del filo actinobacteria que también envuelve géneros como *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, entre otros (36).

4.2 *Cutibacterium acnes*.

4.2.1 Generalidades

C. acnes es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, de crecimiento lento, no esporulado, que produce ácido propiónico como subproducto metabólico, perteneciente a la familia *Propionibacteriaceae* y el género *Cutibacterium*. Coloniza las glándulas sebáceas, obtiene energía de los ácidos grasos del sebo,

considerándose así un microorganismo lipofílico, y es ocho veces más frecuente que las otras propionibacterias; su colonización se inicia poco tiempo después del nacimiento y se incrementa entre uno y tres años antes de la madurez sexual, especialmente en la cara y el tórax. Aunque se relaciona con las enfermedades dermatológicas, también posee efectos beneficiosos sobre el huésped al modular la respuesta inmune y hacerla más eficaz ante determinados patógenos; produce bacteriocinas que protegen el nicho pilosebáceo de otros patógenos y, a cambio de esta protección, utiliza los nutrientes presentes en el sebo, desarrollando así una relación mutualista con el huésped (36).

C. acnes forma parte de la piel, la cavidad oral, intestino delgado, aparato genitourinario y conducto externo auditivo, *in vitro*, es capaz de sobrevivir hasta 8 meses bajo condiciones anaeróbicas sin subcultivo, sugiriendo que también podría sobrevivir en tejidos a bajos potenciales de oxidación (36). Además, *C. acnes* puede resistir la fagocitosis y persistir intracelularmente dentro de los macrófagos, esta resistencia puede ser atribuible a la vía de la arginina deiminasa (ADI) (37), sistema que convierte la arginina en ornitina, generando amoníaco (NH₃) y adenosin trifosfato (ATP) que neutraliza la acidificación del fagosoma. Otra posibilidad es un escape fagosomal, debido a que el factor CAMP se asocia como una toxina formadora de poros (7,38).

C. acnes se considera un patógeno oportunista, así como su asociación con una

serie de condiciones inflamatorias. Es reconocido principalmente por su papel en el acné vulgaris donde se cree que contribuye a la fase inflamatoria de la condición. Otras condiciones donde se ha sugerido la participación de *C. acnes* incluyen sinovitis, hiperostosis, osteitis (SAPHO) y sarcoidosis, una enfermedad granulomatosa sistémica de etiología desconocida, esta última debido a que el ADN de *C. acnes* se ha aislado de ganglios linfáticos de pacientes con sarcoidosis (39,40).

4.2.2 Clasificación

Descifrar el genoma de *C. acnes* permitió una mejor comprensión de sus características, tanto la inducción y la distribución de la inflamación en el folículo pilosebáceo, como su rol en la fisiopatología del acné u otras afecciones (1).

La secuenciación genética de *C. acnes* fue dada a conocer en 2004, por Holger Brüggemann *et al.*, su genoma es un cromosoma circular con 2.560.265 pares de bases que codifican alrededor de 2.333 genes putativos. Así, en la actualidad, ya se han identificado múltiples genes implicados en la inmunopatogénesis del acné (41).

Se han empleado diversas técnicas para clasificar a *C. acnes* y sus fenotipos, la más reciente utilización de análisis de secuencias del gen *recA* y, un gen putativo de hemolisina *tly* reveló la existencia de polimorfismos específicos en líneas

filogenéticamente distintos. Se han descrito seis grupos filogenéticos de la especie *C. acnes* (IA1, IA2, IB, IC, II, III) (5,6).

Entre ellos, un pequeño subgrupo de cepas tipo I, con una expresión distinta de la proteína CAMP factor 5, fue definido como tipo IB. Estos tipos filogenéticos difieren en su asociación con la enfermedad, producción de genes putativos determinantes de virulencia, sus propiedades inmunogénicas e inflamatorias, así como en sus características bioquímicas, agregativas y morfológicas (7).

Los aislamientos de tipo III son positivos para la actividad lipasa, variable en su producción de hialuronidasa y proteinasas. Sin embargo, negativo para la actividad lecitinasa, así como α y β -hemólisis (hemólisis parcial y total de glóbulos rojos respectivamente). Sabiendo que los aislados tipo I son variables para la α y β -hemólisis, aislamientos de tipo II son negativos para la hemólisis β , y variable para actividad α -hemolítica. La producción de lipasa, lecitinasa, proteinasas y hialuronidasas fue variable para el tipo I y II. Análisis por PCR de aislados de tipo III reveló la presencia de una co-hemolisina (factor CAMP), así como el *tly* gen que codifica una hemolisina/citotoxina putativa que ya se han descrito en los tipos I y II (42).

Para el año 2012 se identificó un nuevo filogrupo (IC), gracias al análisis filogenético en secuencias de genes "*housekeeping*". Todos los aislamientos de este grupo presentan resistencia a los antibióticos anti-acné que resultan de

mutaciones puntuales en el gen 16S (1058 G → C) y 23S rRNA (2058 / 2059 A → G) además, muestran una reacción dual con anticuerpos monoclonales anti IA y II, expresan adhesinas de unión al dermatán sulfato, son hemolíticos, y no fermentan sorbitol, en comparación con las cepas de los tipo IA1 , IA2 , IB y II, este grupo contiene una serie de 1 suprimidas, incluyendo proteínas hipotéticas y varias enzimas metabólicas(6).

Por otro lado, *C. acnes* puede ser clasificado igualmente por biotipos, ribotipos (RT), secuencias tipo (ST) y complejos clonales (CC). Los biotipos son determinados de acuerdo a la capacidad de fermentación de tres carbohidratos: ribosa, eritritol y sorbitol. Existen 6 biotipos de *C. acnes* agrupados en dos serotipos. El serotipo I (presencia de galactosa en la pared celular) está subdividido en cinco biotipos, I (ribosa (+), eritritol (+), sorbitol (+)), II (++-), III (+-+), IV (+--), y V (---) y el serotipo II (ausencia de galactosa en la pared celular) solo consiste en el biotipo II (++-) (3,20) (ver Tabla 1).

Tabla 1. Biotipificación de *C. acnes*

Serotipo	Biotipo	Ribosa	Eritritol	Sorbitol
I Galactosa (+)	I	+	+	+
	II	+	+	-
	III	+	-	+
	IV	+	-	-
	V	-	-	-
II Galactosa (-)	I	+	+	+
	II	+	+	-

Fuente: *Biotyping of Propionibacterium acnes isolated from normal human facial* Kishishita *et.al*, 1979

La ribotipificación consiste en el secuenciamiento del ADN ribosómico 16S (rDNA), para lo cual se determina cada secuencia única del ADNr 16S y se le asigna un Ribotipo (RT), existen diez ribotipos principales encontrados en la piel de individuos con acné y sanos. La secuencia de *C. acnes* más abundante fue definido como ribotipo 1 (RT1); todos los otros ribotipos definidos tienen una identidad de secuencia >99% con respecto al RT1. El análisis de los 10 ribotipos muestra, asociaciones con la salud y/o enfermedad específica. Los RT 1, 2, y 3 están uniformemente distribuidos entre el acné y los individuos normales. Los RT

4, 5, 7, 8, 9 y 10 se encuentran predominantemente en pacientes con acné (21).

Por último, los esquemas de secuenciación multilocus y locus único (MLST y SLST) para la tipificación de *C. acnes*, se basan en la secuenciación de genes “*housekeeping*”, que codifican factores de virulencia putativos y antígenos de superficie celular en *C. acnes*. Los genes seleccionados son proteínas asociadas a la invasión (pamce, pap60), hidrolasa de glicerol-éster (gehA), antígenos de superficie celular altamente inmunorreactivos (htaA; hsp20), hemolisina/ citotoxina (tly), familia de cinco factores CAMP, además de una siquimato deshidrogenasa (aroE), cadena β de ATP-sintetasa (atpD), guanilato quinasa (gmk), sintetasa GMP (guaA), proteína de unión al GTP (lepA), recombinasa (recA) y superóxido dismutasa (sodA).

Se debe tener en cuenta el esquema a realizar, ya que está documentada la utilización de cuatro, siete, ocho y nueve genes “*housekeeping*”, para lo cual se asigna un número particular de alelo a cada secuencia única que se encuentre. Cada muestra se caracteriza por las secuencias únicas de alelos en cada uno de los loci (MLST4, MLST7, MLST8 y MLST9), lo cual constituye su perfil alélico o tipo de secuencia (ST), que por medio de un algoritmo diseñado para analizar los resultados (eBURST), permite inferir patrones evolutivos y así agrupar las STs en complejos clonales (CC) (5,27,31,43,44).

4.2.3 Diagnóstico

El diagnóstico de *C. acnes*, en primera instancia dependerá de la afección, sintomatología y lugar anatómico de infección, después se obtiene una muestra (líquido sinovial, pericárdico, pus, etc.); donde la observación de bacilos Gram positivos presentes en la muestra o aislados a partir de un subcultivo y pruebas bioquímicas componen el diagnóstico microbiológico en sus primeras fases.

La morfología de *C. acnes* corresponde a bacilos pleomórficos, ramificados o no, formas cocoides o bífidas, no filamentosas (a excepción del filotipo III). Las células son a menudo "en forma de garrote" con un extremo redondeado y el otro cónico. Las células se producen de forma individual, en pares o en cadenas cortas, dispuestas en "V" o "Y", o con un arreglo de "carácter chino". El cultivo es recomendable en medio tripton extracto de levadura o agar sangre, las colonias en este último son convexas, semi opacas y brillantes; se han visto pigmentadas en una gama de colores del blanco al rojo. Las condiciones de incubación hacen referencia a una cámara de anaerobiosis, donde se asegura una atmósfera con 80% nitrógeno, 10% dióxido de carbón y 10% hidrógeno, a 37°C por 48 horas.

Las características bioquímicas o metabólicas de este microorganismo, presentan gran similitud con géneros como *Corynebacterium sp.* o *Actinomyces sp.*, lo cual dificulta su determinación por pruebas bioquímicas, sin embargo, kits comerciales han logrado determinar *C. acnes* con gran especificidad, como es el caso de

sistemas de identificación miniaturizados API (sistema API 20 A, Rapid ID 32 A, API ® Coryne (bioMérieux®, Marcy) (52).

Estos kits se basan en la capacidad de *C. acnes* de producir catalasa (100%), β -Galactosidasa (89%), N-Acetil- β -Glucosaminidasa (100%), indol (100%) también su capacidad por fermentar especialmente glucosa (89%), otras pruebas que se pueden usar son, la reducción de nitratos (24%), presencia de Pírolidonil Arilamidasa (63%), Fosfatasa Alcalina (36%), β -Glucuronidasa (54%), α -Glucosidasa (63%) y Ribosa (63%) entre otras, las nombradas aquí son aquellas que presentan un porcentaje de pruebas positivas para el género mayor al 20%, sin embargo aquellas pruebas que tienen porcentajes menores también servirán para la discriminación adecuada del género (45).

Las pruebas proteogenómicas tienen mayor rendimiento y sensibilidad para la determinación de género y variaciones intraespecie, sin embargo, estas técnicas no son usadas para la detección rutinaria de los microorganismos, debido a su alto costo y dedicación, siendo utilizadas por investigadores con el fin de discernir características, factores de patogenicidad, patrones evolutivos, entre otros, que logre una mejor comprensión del microorganismo y todo lo que lo rodea; algunas de estas técnicas son:

- MALDI-TOF: La espectrometría de masas (desorción láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo) se ha convertido en un

recurso de referencia para la identificación de microorganismos en los servicios de microbiología clínica. Dicha metodología permite la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales, a partir de bacterias completas; este análisis conduce a la creación de un espectro de masas que es específico para cada especie. No obstante, los datos publicados en relación con *C. acnes* revelan buena capacidad para discriminar entre géneros, pero no, entre los filotipos especialmente el IA1 de IA2 y IB (46).

- PCR: La reacción en cadena de la polimerasa, es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células.

La filotipificación de *C. acnes* por alguna de estas técnicas son utilizadas con gran especificidad, sin embargo, el costo y esfuerzo necesario, hacían de estas técnicas difíciles de reproducir y financiar; Beverley *et. al* reporta uno de los primeros ensayos de PCR para *C. acnes*, sin embargo, esta no es capaz de diferenciar los filogrupos IA1 del IA2, IB, IC ni el III.

- PCR Touchdown (PCR TD): Esta es una técnica de PCR modificada, la

cual consisten en establecer una temperatura de anillamiento (temperatura en la que los cebadores se unen al ADN molde) inicial mayor que la temperatura de fusión o “*melting*” (temperatura en la cual la mitad de los cebadores se encuentran unidos al ADN molde), reduciéndose gradualmente por ciclo entre 1 y 2°, hasta que alcanza la temperatura “*melting*” calculada. Esta técnica se puede incorporar como una parte estándar de cualquier PCR para mejorar especificidad y la formación de producto, también tiene el potencial de superar en gran medida los problemas asociados con las altas temperaturas de anillamiento necesarias y es particularmente útil para amplificar secuencias con estructuras secundarias extensas o con alto porcentaje G + C en islas genómicas. Es, especialmente importante en la realización de PCR múltiple, obtener cebadores con temperaturas de anillamiento similares, para no afectar los productos amplificados, esto puede ser algo difícil de lograr, por lo tanto, se deben utilizar temperaturas en diferentes rangos, que aseguren el anillamiento eficaz de todos los pares de oligonucleótidos con la secuencia blanco.

Para el año 2015, Barnard *et.al* define nuevas secuencias blancos, en el diseño de primer's de los genes *atpD*, *recA*, toxina de la familia FIC, *ATPasa*, *sod A* y 16s rRNA en un ensayo múltiple de PCR TD, esta tuvo una especificidad del 100% en comparación con la MLST considerada la prueba “*Gold standar*” (4,26)

4.3 Acné vulgar

El acné es una enfermedad inflamatoria crónica de la unidad pilosebácea que afecta, principalmente, adolescentes y adultos jóvenes. Se calcula que antes de los 21 años entre el 80 y el 90% de esta población ha estado expuesta a la enfermedad.

Se ha demostrado que el acné tiene una heredabilidad del 78% en parientes de primer grado así como su relación en la aparición de este a edades más tempranas o su severidad(2). A nivel económico en los Estados Unidos, se invierten más de 3 mil millones de dólares al año en los costos directos e indirectos del tratamiento y la pérdida de productividad. Sin embargo, el acné puede persistir después de los 21 años y se sabe que 12% de las mujeres mayores de 25 años aún sufren de acné facial (1).

Esta enfermedad se caracteriza por la obstrucción al flujo del sebo por el conducto pilosebáceo debido a una queratinización anormal, que se manifiesta fundamentalmente en la cara y parte superior del tórax; y se puede clasificar según:

1. Edad de presentación: En neonatal de 0 a 30 días de nacimiento, lactante de 1 a 24 meses, infantil de 2 a 7 años, preadolescente de 8 a 11 años, adolescente de 11 a 25 años y adulto después de los 25 años.
2. Lesión predominante:

- a. Comedónico: Considerado la forma más frecuente, se caracteriza por lesiones hiperqueratinizadas en los folículos pilosos y tradicionalmente se conocen como espinillas y/o barros o como comedón abierto y cerrado respectivamente en el ámbito clínico.
 - b. Pápulo-pustuloso: Caracterizado por la aparición de pápulas (elevaciones cutáneas, inflamatorias y enrojecida) con presencia de pus, grasa y bacterias y agravan el cuadro.
 - c. Nódulo-quístico: Las lesiones predominantes son elevaciones inflamatorias en las capas más profundas de la piel y quistes de diverso tamaño. Con frecuencia dejan cicatrices y requiere tratamientos por vía oral con antibióticos.
3. Grado de severidad: Se clasifica por el número lesiones en una hemicara del cuerpo, en leve con menos de 20 (Ilustración 1.), moderado de 20 a 50 y severo con más de 50 lesiones (Ilustración 2).

Ilustración 1. Acné leve



Ilustración 2. Acné severo



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

4. Formas especiales:

- a. Fulminans: Es una forma infrecuente, severa, generalizada (tórax, espalda y cara) y aguda de acné que se presenta en varones de 13 a 16 años. Comienza con la aparición de lesiones pustulosas, sinus y pueden evolucionar a úlceras necróticas dolorosas con secreción purulenta, causar costras hemorrágicas y cicatrices residuales severas. La aparición de comedones, quistes o pápulas-pústulas es inusual.
- b. Conglobata: Afección inflamatoria, crónica y severa que, conforma el síndrome de oclusión folicular. El cuadro clínico se caracteriza por comedones, la mayoría con varias aberturas (poliporados), pápulas, pápulo-pústulas, nódulos y quistes. Es característico que muchas de estas lesiones, evolucionan hacia formas muy inflamatorias, intensamente dolorosas y con tendencia a la supuración que dejan secuelas desfigurantes. Las lesiones exceden las localizaciones típicas del acné como, miembros superiores, cuello, abdomen, axilas, glúteos entre otros, por lo general afecta a hombres adultos de 18 a 30 años y aparece de *novo*. (47).

El acné presenta una etiología multifactorial, asociado con varios factores, como la

función hormonal alterada, aumento en la producción de sebo, la hiperqueratinización folicular (consecuente obstrucción del canal pilosebáceo: comedogénesis) y la proliferación del *C. acnes*, junto a la activación de diversas cascadas inflamatorias (1).

La comedogénesis, hace referencia a una anomalía en el proceso de descamación de los corneocitos foliculares en los conductos de los folículos sebáceos esta, comienza con la dilatación de los folículos sebáceos como resultado de la acumulación de los corneocitos descamados en forma anormal. Se denomina comedogénesis porque se forma un microcomedón, lesión precursora microscópica, clínicamente inaparente. El microcomedón evoluciona hacia una lesión clínicamente aparente, no inflamatoria tales como el comedón abierto o punto negro, o bien, comedón cerrado o punto blanco (55). La lesión principal es el comedón abierto o cerrado. Sobre este último, en mayor medida, acontecen fenómenos inflamatorios que ocasionan pápulas, pústulas y nódulos; la enfermedad puede (sobre todo en sus formas más severas) determinar graves consecuencias psicosociales en una etapa frágil del desarrollo físico y psíquico. Además, pueden producirse importantes cicatrices dermatológicas.

Los tres géneros más comúnmente observados en el microbioma cutáneo son *Corynebacteria*, *Propionibacteria* y *Staphylococci*. Los cambios en la composición natural de las comunidades microbianas cutáneas, como la pérdida de diversidad,

se han relacionado con enfermedades inflamatorias crónicas de la piel, incluyendo dermatitis atópica, psoriasis y acné (48). *C. acnes* es conocido por desencadenar la liberación de citoquinas proinflamatorias y la expresión de péptidos antimicrobianos. La sobre colonización de *C. acnes* provoca la activación de TLR 2 en monocitos, resultando en la producción de interleucina (IL) 12 e IL-8. La IL-12 es la citoquina proinflamatoria que más se produce en los monocitos en respuesta a la invasión por organismos Gram-positivos. Se ha demostrado que diferentes filotipos de *C. acnes* activan la inmunidad innata. Por esto se puede decir que los filotipos de *C. acnes* están más implicados en la severidad del acné, que su proliferación (49). Además, la comparación del genoma de diferentes cepas *C. acnes*, identificaron diferentes subtipos comensales de *C. acnes* entre las áreas de piel con y sin lesiones de acné. Estudios demuestran la presencia de los RT 5, 4, 8 y 532 en lesiones de acné severo, siendo parte todos del IA1; en los grados más leves de acné, hay una variación mayor en los filotipos encontrados, IB, IA2 y IA1, y en piel normal los RT6 y RT16, correspondientes al filotipo II y IA2 respectivamente, esto indica efectivamente que el desarrollo severo de acné involucra filotipos específicos (21,27).

Aunque la asociación entre *C. acnes* y el acné vulgar está bien establecida, muy pocos estudios han investigado toda la microbiota de la piel facial de los pacientes con acné. Los análisis topográficos tridimensionales y la caracterización de microbiomas cutáneos, han mostrado diferencias entre la composición de la

microbiota en la piel sana y en la piel con acné, así como diferencias naturales en la colonización microbiana entre la glándula sebácea y la superficie de la piel (48).

C. acnes desempeña un papel fisiológico en la inhibición de la invasión de bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) haciendo la piel inhóspita para estos patógenos; mientras que permite que otras cepas de *Staphylococcus* comensales tales como *S. epidermis* crezcan. *C. acnes* mantiene el pH natural de la piel y el de las glándulas sebáceas por hidrólisis de los triglicéridos, la liberación de ácidos grasos libres y la secreción de ácido propiónico. Los estudios sugieren que *S. epidermidis* posee diferentes mecanismos para inhibir la proliferación de *C. acnes* que participan en el equilibrio de la microbiota y en un sistema inmune equilibrado, lo que permite una piel sana.

5. METODOLOGÍA.

5.1 Obtención de cepas

Las cepas usadas en este estudio, fueron previamente aisladas a partir de lesiones de acné vulgaris de pacientes que consultaron al servicio de

Dermatología de la Fundación Sociedad de Cirugía de Bogotá, Hospital San José en el año 2016. Las cepas de *C. acnes* objeto de estudio, fueron identificadas y caracterizadas por medio de MALDI-TOF en una primera etapa del proyecto (50).

Las cepas se encontraron en criopreservación de acuerdo al protocolo descrito por Sanchez *et. al* (51). Se recuperaron en caldo tioglicolato y se sub cultivaron en agar Schaedler suplementado con 5% sangre de cordero en atmósfera anaeróbica. La pureza de las cepas fue evaluada por coloración de Gram.

5.2 Biotipificación

Para realizar la biotipificación de *C. acnes* se evaluaron tres carbohidratos eritritol, sorbitol y ribosa, basados en los protocolos de Kishishita *et.al*, McDowell *et.al* entre otros (6,20,52) de la siguiente forma: se preparó un agar con extracto de levadura y peptona (1.0 g de Tripticasa, 0.3 g de extracto de levadura, 0.2 g de NaCl, 0.1 g de agar agar, 1% de cada uno de los carbohidratos, 0.025 mL de Tween 80 en 100 mL de agua destilada) y púrpura de bromocresol como indicador de pH, el cual tiene un intervalo de transición de pH que oscila entre 5.2 y 6.8, virando de púrpura (negativo) a amarillo (positivo). Los cultivos fueron sembrados por agotamiento y se incubaron por 48 horas en anaerobiosis.

Se evaluó la acidificación del medio (3,6) y para determinar el biotipo correspondientes se tuvo en cuenta la Tabla 2 propuesta por Kishishita *et al*.

Tabla 2. Identificación de Biotipos de *C. acnes*

Biotipo	Ácido desde:		
	Ribosa	Eritritol	Sorbitol
I	+	+	+
II	+	+	-
III	+	-	+
IV	+	-	-
V	-	-	-

Tomado de: *Biotyping of Propionibacterium acnes isolated from normal human facial skin*. Kishishita *et al.* 1979 (3, 6, 20,52).

5.3 Filotipificación

5.3.1 Extracción de ADN

Se tomaron cepas clasificadas como *C. acnes* por la técnica de MALDI-TOF y se realizó la extracción de ADN empleando el kit comercial E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit, basado en la obtención de ADN por medio de columnas de sílice (Anexo 10.1). En total se procesaron 27 cepas de *C. acnes* procedentes de pacientes y la cepa de *C. acnes* ATTC 6919 de (cepa control perteneciente al filotipo IA2).

5.3.2 Cuantificación de ADN

Para la cuantificación de ADN de las muestras extraídas se utilizó el Fluorómetro Qubit® 2.0 de Life Technologies con rango de excitación azul (430–495 nm),

emisión verde (510–580 nm), con el kit Qubit dsDNA BR Assay el cual tiene un rango de cuantificación entre 2-1000 ng/ul. Las muestras obtenidas debían tener una concentración mínima de 15 ng/ul para obtener resultados óptimos en la PCR TD.

5.3.3 Selección de Primer's

Se realizó la búsqueda de diferentes en primer's en la literatura para la filotipificación de *C. acnes*, lo cual se evidencia en la Tabla 3.

Tabla 3. Publicaciones para evaluar los Primer's de la PCR para la filoclasificación.

Nombre del Primer	Gen blanco	Especificidad	Referencia
PR-264	Rec A	Tipos IA, IB y II	(Shannon <i>et. al</i> 2006)
PAR- 2			(McDowell <i>et. al</i> 2005; Cohen <i>et. al.</i> 2005)
MMF+ MMR+	y	<i>C. acnes</i>	(Shannon <i>et. al</i> 2006)
PR213 PR216	y	Proteína de unión a soluto de un operón de captación de péptido	Tipos IA (Shannon <i>et. al</i> 2006)
PR256 PR257	y	Y4OU	Tipos IB (Shannon <i>et. al</i> 2006)
PR245 PR247	y	Proteínas de la familia RHS	Tipos IA,IB y II (Shannon <i>et. al</i> 2006)

PAtig-2F y PAtig-C	Patig	Asociaciones de clusters	(Furukawa <i>et. al</i> 2009)
PArA ½	rRNA 16S	<i>C. acnes</i>	(Sampedro <i>et. al</i> 2009)
PAR ½	Rec A	Tipos IA,IB y II	(Sampedro <i>et. al</i> 2009; McDowell <i>et. al</i> 2005)
PAT ½	tly	Tipos IA,IB y II	(McDowell <i>et. al</i> 2005)
PAMp-1/2	ATPase	Tipo IA1/IA2/IC	(McDowell <i>et. al</i> 2005; Barnard <i>et. al.</i> 2015; McDowell <i>et. al</i> 2012)
PAMp-3/4	sodA	Tipo IA2/IB	
PAMp-5/6	Toxina familia Fic	tipo IC	
PAMp-7/8	atpD	Tipo II	
PAMp-9/10	recA	Tipo III	

Continuación Tabla 3. Fuente: Ibañez *et.al* 2018.

Finalmente, al escoger los primer's con mejor especificidad según la literatura, se hizo el análisis de estos mismos por medio del programa bioinformático "*Primer-BLAST*" del "*National Center for Biotechnology Information*" (NCBI), donde se buscó la especificidad por especie (*C. acnes*) y por filotipo (IA1, IA2, IB, IC, II y III), además de constatar las características individuales de cada primer (Tm, %GC y tamaño del amplicón) (anexo 10.2). Los primer's fueron sintetizados por

Invitrogen™ y los productos amplificados individualmente se verificaron por secuenciación (anexo 10.5).

Adicionalmente se realizaron sondas moleculares de los fragmentos que no tiene la cepa control (ATCC 6919) con el fin de tener secuencias blanco como controles positivos para los primer's de amplificación.

5.3.4 Estandarización de la PCR.

Se tuvieron en cuenta diferentes puntos críticos que pudieran interferir con la reacción de amplificación, dado el número de primer's, se tiene en cuenta lo siguiente:

- PCR de un solo fragmento.

Se hicieron ensayos de tipo PCR convencional con cada juego de primer's, utilizando master mix (TaqMan™ Universal Master Mix II, with UNG) y ensayo con PCR TD, basado en el protocolo descritos por Barnard et.al (4).

- Temperatura de anillamiento.

Debido a las diferencias en las temperaturas de anillamiento de cada primer, se realizó variaciones en la temperatura de 62°C, 64° C y 66°C (Ver anexo 10.3).

- Inhibidores presentes en las muestras

Este paso es de vital importancia si las muestras no tienen un grado de pureza óptimo (260/280, aproximadamente 1.8-2.0), para ello se realizó un ensayo con ausencia de Albúmina Sérica Bovina (BSA) y otro con presencia de esta, a una concentración de 0.2 mg/ml debido a que aumenta la eficiencia de la PCR, actuando como una proteína estabilizante de la Taq polimerasa (Ver anexo 10.4).

5.3.5 Electroforesis

Los resultados obtenidos en las PCR (amplificación) fueron revelados en gel de poliacrilamida al 12%, utilizando patrones de peso molecular (0.5ul) de 100pb y 50 pb (New England Biolabs Inc. ®) adicionado en 2ul de Loading Buffer para los productos amplificados se añadieron 6 ul de muestra y 2 ul de Loading Buffer en cada pozo. La electroforesis vertical, se realizó a 250V durante una hora.

- Tinción del gel.

Los geles fueron teñidos con GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain 10,000X (catalogo No. 50535), colorante fluorescente altamente sensible para detección de ácidos nucleicos en geles de agarosa y poliacrilamida. Proporciona una detección de alta sensibilidad de ADN y ARN bicatenario o monocatenario. La coloración se hizo, sumergiendo el gel en una disolución 1X de GelStar con TBE 1X.

Las condiciones bajo las cuales fueron teñidos los geles se tuvieron en cuenta según el protocolo de la casa comercial LONZA para el colorante Gel Star™

Nucleic Acid Gel Stain 10,000X (catalogo No. 50535), utilizando el procedimiento allí sugeridos. (Anexo 10.6)

5.3.6 Interpretación de Corridos Electroforéticos.

La lectura de los geles se realizó en el sistema de documentación “*BioRAD GelDoc™ XR Molecular Imager*”, controlado por el software Image Lab™ para optimizar el rendimiento de la cámara, capturar y analizar imágenes de forma rápida, integrada y automática.

El patrón de pesos moleculares esperado para cada uno de los filotipos se basó en el artículo de Barnard *et. al.* 2015, como se muestra a continuación. (Ver ilustración 3)(4):

Filotipo IA1: presencia de dos bandas, a: 677 pb y b: 494 pb.

Filotipo IA2: presencia de tres bandas, a: 677 pb y b: 494 pb y c: 145 pb.

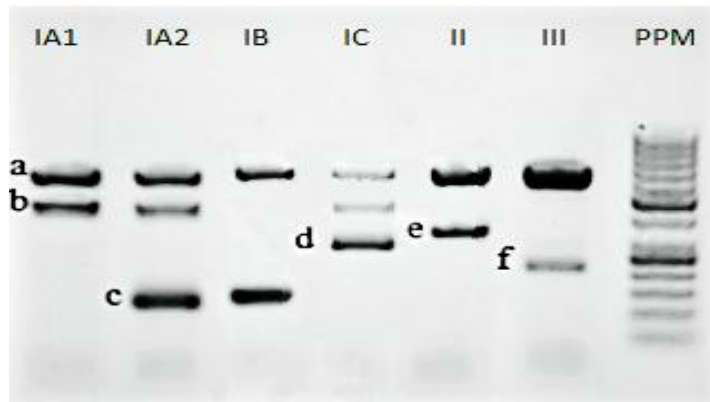
Filotipo IB: presencia de tres bandas, a: 677 pb y c: 145 pb.

Filotipo IC: presencia de dos bandas, a: 677 pb y b: 494 pb y d: 305 pb.

Filotipo II: presencia de dos bandas, a: 677 pb y e: 351 pb.

Filotipo III: presencia de dos bandas, a: 677 pb y f: 225.

Ilustración 3. Patrón de bandeado para cada uno de los filotipos.



De izquierda a derecha cada una de las bandas representan: a, 16S rRNA; b, ATPase; c, sod A; d, toxina; e, atpD; f, RecA. Cada una de las líneas son cepas representantes de diferentes filotipos de *C. acnes*. Marcador de peso molecular (PPM). Fuente: Modificado de Barnard et al. 2015.

6. RESULTADOS

6.1 Descripción de la población.

Las muestras trabajadas corresponden a pacientes que consultaron al servicio de Dermatología de Fundación Sociedad de Cirugía de Bogotá, Hospital San José, por sufrir lesiones patognomónicas de acné vulgaris, evaluados por Dermatólogos del Hospital. Se recolectaron datos acerca del tipo de acné que padecían los pacientes, edad, sexo, y antecedentes genéticos, entre otros. La información recolectada es presentada en la tabla 4.

Tabla 4. Datos de pacientes con acné vulgaris

CONSECUTIVO	EDAD	SEXO	EDAD DE INICIO DEL ACNÉ	AUTOMEDICACIÓN	ANTECEDENTE FAMILIAR DE ACNÉ	ESCALA DE SEVERIDAD GLOBAL DEL ACNÉ
3	21	M	15	SI	SI	Leve
16	18	M	14	NO	SI	Severo
18	17	M	14	NO	SI	Severo
19	19	F	16	NO	NO	Casi sin lesiones
25	43	F	--	NO	NO	Severo.
30	20	F	16	NO	NO	Severo
37	15	F	14	NO	NO	Moderado
38	20	M	15	SI	SI	Moderado
39	21	F	16	SI	SI	Moderado
40	22	F	14	NO	SI	Leve
42	26	F	26	NO	SI	Moderado
45	12	M	12	NO	NO	Leve
46	50	F	13	SI	NO	Moderado
50	19	F	18	NO	NO	Leve
51	28	F	22	SI	NO	Leve
54	42	F	16	NO	SI	Moderado
57	32	F	15	NO	SI	Moderado
59	18	M	17	NO	NO	Severo
60	15	M	14	NO	SI	Moderado
64	21	M	13	SI	NO	Severo
71	17	M	14	NO	NO	Severo
72	16	M	15	NO	SI	Severo
80	28	F	23	NO	SI	Moderado
81	20	M	14	NO	SI	Leve
83	35	F	25	SI	NO	Casi sin lesiones
88	24	F	23	NO	SI	Severo
90	22	F	18	NO	NO	Moderado

Fuente: Grupo de investigación Fundación Sociedad de Cirugía de Bogotá, Hospital San José - FUCS. Servicio de Dermatología (resultados pendientes de publicación).

6.2 Biotipificación

El cambio de color de los carbohidratos (Ilustración 4, 5 y 6) se reportó para cada cepa de *C. acnes*, encontrándose que el 56% correspondió al BI y el 44% al BIII, datos presentados en la tabla 5 (20).

Ilustración 4. Fermentación negativa de Eritritol



Ilustración 5. Fermentación positiva de Ribosa



Ilustración 6. Fermentación positiva de Sorbitol.



Tabla 5. Resultados biotipificación.

Muestra	Ribosa	Eritritol	Sorbitol	Biotipo
3	POS	NEG	POS	III
16	POS	POS	POS	I
18	POS	POS	POS	I
19	POS	POS	POS	I
25	POS	POS	POS	I
30	POS	NEG	POS	III
37	POS	NEG	POS	III
38	POS	NEG	POS	III
39	POS	NEG	POS	III
40	POS	NEG	POS	III
42	POS	NEG	POS	III

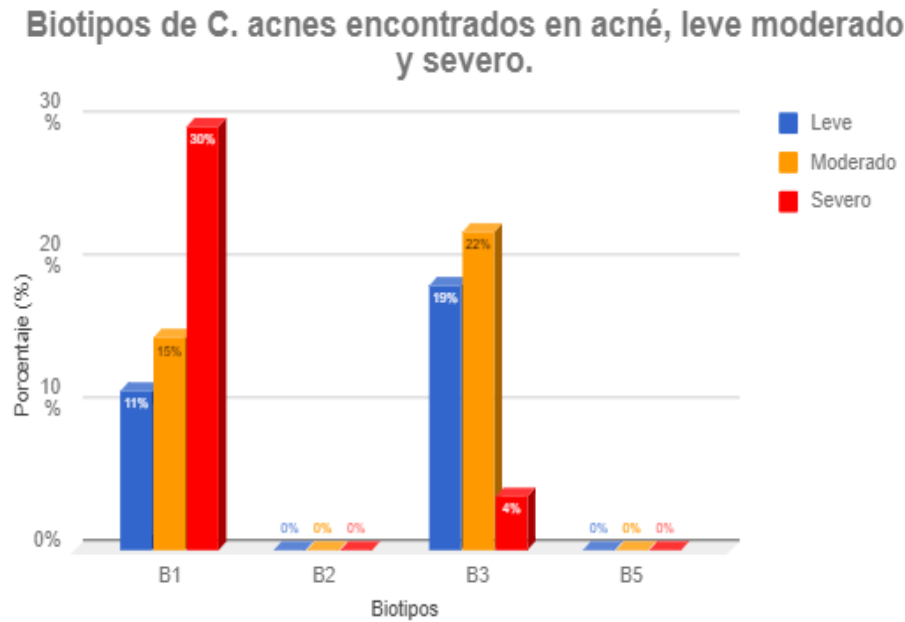
45	POS	NEG	POS	III
46	POS	NEG	POS	III
50	POS	NEG	POS	III
51	POS	NEG	POS	III
54	POS	POS	POS	I
57	POS	NEG	POS	III
59	POS	POS	POS	I
60	POS	POS	POS	I
64	POS	POS	POS	I
71	POS	POS	POS	I
72	POS	POS	POS	I
80	POS	POS	POS	I
81	POS	POS	POS	I
83	POS	POS	POS	I
88	POS	POS	POS	I
90	POS	POS	POS	I
ATCC 6919	POS	NEG	POS	III

Continuación Tabla 5. Fuente: Ibañez *et.al* 2018.

6.3 Descripción de biotipos y tipos de acné.

Para los diferentes tipos de acné que presentaban los pacientes se establecieron los biotipos que presentaban, Ilustración 7. El biotipo III fue más común en acné leve (19%) y moderado (22%) y el biotipo I en acné severo (30%).

Ilustración 7. Biotipos de *C. acnes* encontrados en acné leve, moderado y severo.



Fuente: Ibañez *et.al* 2018

6.4 Condiciones finales de la PCR TD múltiple.

La filotipificación se realizó a partir de la PCR TD múltiple. Los primer's usados se desarrollaron contra el componente de unión a ATP (ATPasa), presente en los tipos IA1, IA2 y IC. Para el tipo IC, un conjunto de cebadores dirigidos al gen de la toxina de la familia Fic localizada en un fragmento genómico de aproximadamente 7,3 kb presente en las secuencias de genoma del proyecto de las cepas de tipo IC de *C. acnes* PRP-38 y HL097PA1.

El gen *sodA* (superóxido dismutasa) específico para los tipos IA2 y IB. El gen que codifica una ATP sintasa (*atpD*) específico del filotipo II, una recombinasa (*recA*), para el filotipo III y primer dirigidos al gen 16S rRNA específico de *C. acnes* (4).

Los primer's, su especificidad para cada filotipo, gen blanco, secuencia, temperatura de anillamiento y tamaño del amplicón son presentados en la tabla 6.

Tabla 6. Primer's usados en la PCR TD múltiple.

Primer	Especificidad	Gen target	Secuencias 5'a 3'	Temperatura de anillamiento (C°)	Tamaño del amplicón (pb)
PArA-1	Todos los <i>C. acnes</i>	16S rRNA	AAGCGTGAGTGACGGTAAT GGGTA	66	677
PArA-2	Todos los <i>C. acnes</i>	16S rRNA	CCACCATAACGTGCTGGCA ACAGT	66	
PAMp-1	Tipo IA1/IA2/IC	ATPase	GCGTTGACCAAGTCCGCCG A	66	494
PAMp-2	Tipo IA1/IA2/IC	ATPase	GCAAATTCGCACCGCGGAG C	66	
PAMp-3	Tipo IA2/IB	<i>sodA</i>	CGGAACCATCAACAAACTCG AA	62	145

PAMp-4	Tipo IA2/IB	sodA	GAAGAACTCGTCAATCGCA GCA	62	
PAMp-5	tipo IC	Toxina familia Fic	AGGGCGAGGTCCTCTTCTA CCAGCG	66	305
PAMp-6	tipo IC	Toxina familia Fic	ACCCTCCAAGTCAACTCTC CGCCT	66	
PAMp-7	Tipo II	atpD	TCCATCTGGCCGAATACCAG G	66	351
PAMp-8	Tipo II	atpD	TCTTAACGCCGATCCCTCCA T	66	
PAMp-9	tipo III	recA	GCGCCCTCAAGTTCTACTCA	66	225
PAMp-10	Tipo III	recA	CGGATTTGGTGATAATGCCA	66	

Continuación tabla 6. Fuente: Barnard *et. al* 2015

La concentración y volumen por reactivo se utilizó, para un volumen final de 25 uL por tubo de reacción, se añadió una concentración final de ADN de 5 ng/ul y se completó el volumen con agua grado biología molecular Tabla 7.

Tabla 7. Concentraciones y volúmenes usados en la PCR TD múltiple.

REACTIVO	UNIDAD	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN INICIAL POR TUBO (uL)
Buffer	X	10	1	2,50
Primer PArA 1	μM	10	0,2	0,50
Primer PArA 2	μM	10	0,2	0,50
Primer PAMp 1	μM	10	0,25	0,63
Primer PAMp 2	μM	10	0,25	0,63
Primer PAMp 3	μM	10	0,6	1,50
Primer PAMp 4	μM	10	0,6	1,50
Primer PAMp 5	μM	10	0,1	0,25
Primer PAMp 6	μM	10	0,1	0,25
Primer PAMp 7	μM	10	0,15	0,38
Primer PAMp 8	μM	10	0,15	0,38
Primer PAMp 9	μM	10	0,25	0,63
Primer PAMp 10	μM	10	0,25	0,63
DNTPS	mM	10	0,2	0,50
Taq Pol	U	5	1,25	6,25
MgCl ₂	mM	50	1,5	0,75
BSA	mg/mL	2	0,2	2,50
			Volumen total de la master mix	17,75

Fuente: Protocolo modificado, basado en Barnard *et. al* 2015; Cebrián *et. al* 2017.

La amplificación se realizó en el sistema StepOnePlus y las condiciones de ciclaje se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Condiciones del ciclaje PCR TD múltiple en sistema StepOnePlus TM.

PROTOCOLO PCR TD múltiple			
CICLO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
Inicio I	94	1 min	
Denaturación I	94	30 seg	14
Anillamiento I	66 con descenso por ciclo de 0.3°C	30 seg	
Elongación I	72	1 min	
Denaturación II	94	30 seg	11
Anillamiento II	62	30 seg	
Elongación II	72	1 min	
Terminación	72	10 min	

Fuente: Protocolo modificado, basado en Barnard *et. al* 2015; Cebrián *et. al* 2017.

6.5 Filotipificación

Para la filotipificación de *C. acnes* se analizaron los geles de poliacrilamida, se determinaron las bandas y el peso molecular de cada uno de los fragmentos amplificados. Los filotipos fueron discriminados según el patrón de bandeo preestablecido (ilustración 3), obteniéndose los filotipos IA2 96% (26/27), y IB 4% (1/27) (Tabla 9).

Ilustración 8. Corrido electroforesis PCR TD

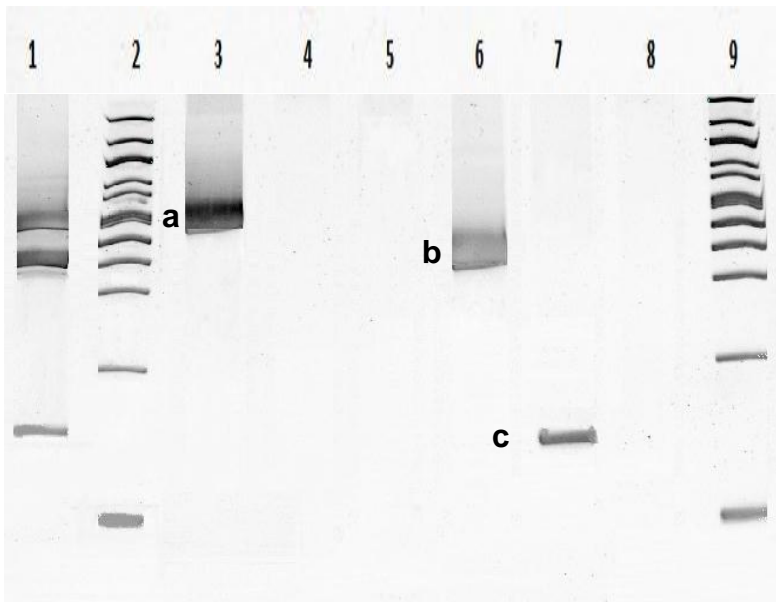


Ilustración 8. Gel de poliacrilamida 12%: De izquierda a derecha; línea 1, cepa 60; línea 2, Patrón de peso molecular 100 pb; línea 3, PArA 1/2 cepa ATCC; línea 4, blanco; línea 5, blanco; línea 6, PAMp 1/2 cepa ATCC; línea 7, PAMp 3/4 cepa ATCC; línea 8, blanco; línea 9, Patrón de peso molecular 100 pb. Fuente: Ibañez *et.al* 2018

Tabla 9. Filotipificación de *C. acnes*, mediante PCR TD múltiple.

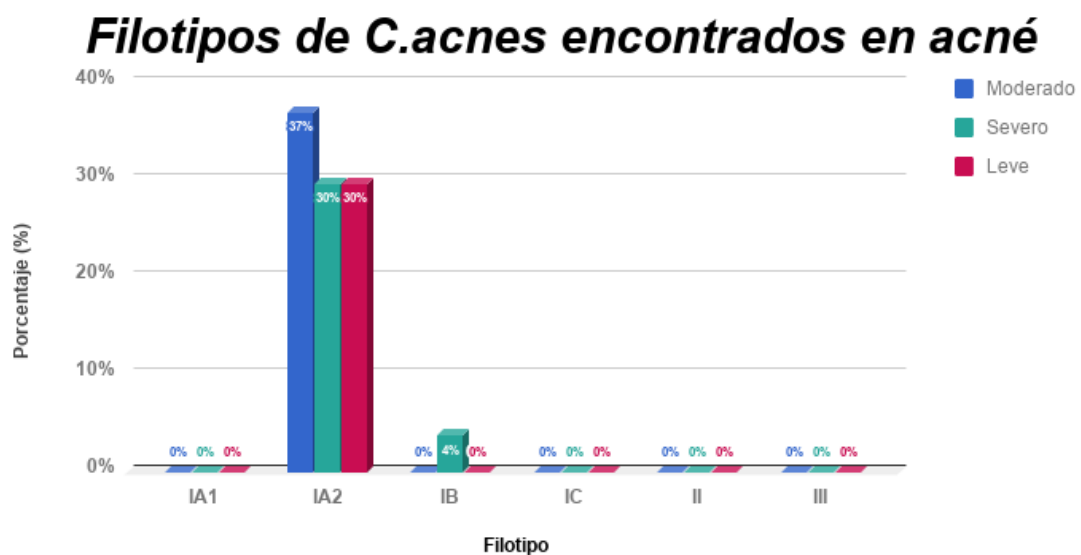
Cepa	Banda a	Banda b	Banda f	Banda e	Banda g	Banda c	FILOTIPO
ATCC 6919	X	X				X	IA2
3	X	X				X	IA2
16	X					X	IB
18	X	X				X	IA2
19	X	X				X	IA2
25	X	X				X	IA2
30	X	X				X	IA2
37	X	X				X	IA2
38	X	X				X	IA2
40	X	X				X	IA2
42	X	X				X	IA2
45	X	X				X	IA2
46	X	X				X	IA2
50	X	X				X	IA2
51	X	X				X	IA2
54	X	X				X	IA2
57	X	X				X	IA2
59	X	X				X	IA2
60	X	X				X	IA2
83	X	X				X	IA2
80	X	X				X	IA2
90	X	X				X	IA2
72	X	X				X	IA2
81	X	X				X	IA2
88	X	X				X	IA2
39	X	X				X	IA2
64	X	X				X	IA2
71	X	X				X	IA2

Continuación Tabla 9. Fuente: Ibañez *et.al* 2018

6.6 Descripción del filotipo y tipo de acné.

El porcentaje de filotipos encontrado según el tipo de acné, es presentado en la Ilustración 9. El filotipo IA2 fue el más frecuente en acné leve (30%), moderado (41%) y severo (33%).

Ilustración 9. Filotipos encontrados en grado de acné.



Fuente: Ibañez *et.al* 2018

6.7 Comparación de biotipificación, filotipificación por PCR TD múltiple y MALDI-TOF

Realizamos la comparación de los resultados obtenidos de la filotipificación con MALDI-TOF y PCR TD Múltiple trabajada en este proyecto, ya que se observaron variaciones, se determinó el índice de concordancia del 82%, el cual consiste en

analizar los puntos en común de las dos técnicas, estos datos se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Filotipificación de *C. acnes* por PCR TD múltiple, espectrometría de masas (MALDI-TOF) (50), (resultados inconsistentes se muestran con la casilla en blanco) y biotipificación.

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

Fuente: Ibañez *et.al* 2018

7. DISCUSIÓN

Cutibacterium acnes es un microorganismo de gran importancia en dermatología debido al papel beneficioso que cumple sobre el huésped al modular la respuesta inmune y hacerla más eficaz ante determinados patógenos, produciendo bacteriocinas que protegen el nicho folicular, a cambio de esto, utiliza los nutrientes presentes en el sebo desarrollando así, una relación mutualista con el huésped. Sin embargo es más conocido por ser uno de los factores desencadenantes del acné vulgaris e infecciones oportunistas (35,36).

Con respecto a la población, se evidenció mayor tasa de consultas por parte mujeres con formas de acné leve y moderado, pertenecientes al grupo de edad fértil (20-39 años), mientras que en hombres la mayor asistencia a consultas fue en edad adolescente (12-19), sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las formas de acné presentados.

En el mundo hay diversos estudios sobre la prevalencia de acné en la comunidad, en los cuales se encuentra concordancia en la persistencia de esta enfermedad ya que, después de los años de la adolescencia, las mujeres son más afectadas y presentan más asistencia a consultas con un especialista que los hombres. En la adolescencia la prevalencia del acné es mayor en hombres, como demostró Pereira Duquia *et. al* 2017 y Lello *et. al* 1995, disminuye con la edad en ambos sexos, pero un número significativo de personas experimenta un empeoramiento

de los síntomas o no experimenta una mejoría después de la adolescencia (10,54–57).

Este análisis solo incluyó pacientes que buscaron asesoramiento para su acné, por lo tanto, puede subestimar la presencia de *C. acnes* en la población, y es difícil comparar estos resultados con otros estudios ya que el método de clasificación del acné y el área de la piel evaluada son diferentes.

La biotipificación de *C. acnes* muestra predominio del Biotipo III en lesiones de acné leve y moderado seguido del biotipo I, esto puede ser por la elevada actividad de la lipasa en el B III, según Higaki *et. al* 2000; estos resultados también los obtuvo Cebrián *et. al* 2017, quien compara pruebas moleculares como PCR TD, RAPD, biotipificación entre otras, y Kishishita *et. al* 1979, siendo uno de los precursores del método de clasificación por biotipos. Sin embargo, el aumento de la presencia en acné severo del BI puede deberse a sesgos estadísticos o a otros factores patogénicos intrínsecos aún no descritos en nuestra población (3, 5, 20, 52,58).

La filotipificación de *C. acnes* en Colombia es importante para conocer los tipos circulantes en la población y su carácter patogénico; en nuestro estudio el filotipo IA2 fue el más frecuente, con el 96% de los aislamientos totales, predominante en todas las formas de acné, sin embargo en la literatura se encuentra con mayor frecuencia el filotipo IA1 tanto en el acné (74%) como en piel sana (39%), seguido

del IA2, IC, II Y III (5). En otro estudio de McDowell *et.al* del 2012, tomó muestras del Reino Unido, Estados Unidos, Suecia, Australia, Grecia, Japón entre otros; el filotipo más frecuente fue el IA1 (77%) con respecto al 9% del filotipo IA2. Para Paugam la frecuencia del filotipo IA1 es aproximadamente el 67% en lesiones de acné severo, seguido del filotipos II , IB y IA2 (5,8); esto puede deberse a la diferencia poblacional que hay en los individuos de estudio ya que, condiciones socio-culturales como la etnia han demostrado que la prevalencia de acné varía: afroamericano, 37%; Hispano, 32%; Asiático, 30%; Caucásico 24%; y mujeres hindú, 23% (59), condiciones ambientales, condiciones genéticas como polimorfismos en genes, HSD3B1 y HSD17B3 (necesarios para la producción de progesterona y el metabolismo de andrógenos), aumentan la susceptibilidad para desarrollar acné vulgar (60); y la dieta, ya que un bajo consumo de carbohidratos disminuye la actividad y el tamaño de las glándulas sebáceas, así como el número de lesiones, pudiendo afectar la población de *C. acnes* (61) . Por lo tanto, hacer un estudio con una muestra representativa podría dar un mejor acercamiento al entendimiento de esta problemática.

En cuanto a las diferencias de género se observó que en mujeres la edad fértil representa una mayor prevalencia el acné moderado y severo, siendo persistente en un pequeño porcentaje (18%) hasta la edad adulta, la totalidad de los aislamientos en mujeres corresponden al filotipo IA2. En hombres se observó el caso contrario que en mujeres, pues en estos las formas de acné severas se

encuentran en la adolescencia y disminuyeron después de esta etapa, se recuperó el filotipo IA2 en ellos y en un caso el IB. Lo anterior está dado por los cambios hormonales durante la vida, como lo son los picos de andrógenos, que aumentan la producción de sebo, obstruyendo el folículo piloso y favoreciendo la aparición del acné. También se puede decir que los filotipos encontrados en acné son consistentes con los reportados, pues está demostrado la relación del filotipos IA2 y algunas cepas del filotipo IB con formas de acné leve, moderado y severo. Las cepas pertenecientes al filotipo II según la literatura son encontradas en piel sana, lo que es consistente con nuestros hallazgos, ya que solo se obtuvieron muestras de pacientes con diagnóstico de acné (21).

La espectrometría de masas (MALDI-TOF) es una técnica ampliamente utilizada para la determinación de especies de bacterias y hongos en laboratorios de microbiología, y se ha utilizado para la subtipificación de algunos microorganismos con éxito. Para *C. acnes* se demostró que cada subtipo expresó un perfil proteómico diferente, y estos se categorizaron en los siguientes grupos: cepas de tipo I, tipo II, y III. Según Dekio *et. al* 2013 esta técnica presenta congruencia entre los datos genómicos y proteómicos, teniendo un poder de discriminación del 86,4% en la identificación de bacterias anaerobias (género), con 80% de identificación a nivel de especie (62); estas discrepancias se pueden deber al perfil de expresión de proteínas con variaciones según el ambiente al que esté sometido el microorganismo o fallas en el procesamiento que dan como resultados

espectros de baja calidad, por lo tanto el análisis genético, se hace indispensables en estos casos, con el fin de tipificar correctamente a *C. acnes* (63); dado lo anterior la estandarización y realización de una PCR TD Múltiple con un poder de discriminación equiparable a MLST (Tipificación multilocus de secuencias) fue clave para evaluar las cepas anteriormente tipificadas por MALDI-TOF.

Las discrepancias obtenidas corresponden a los filotipos IA1, IA2, IB e incluso una variación entre IA2 y II, esto dado que, aunque el MALDI-TOF discrimine correctamente la mayoría de las muestras, deja un porcentaje de error que con lleva a problemas de identidad en las cepas como reporta Dekio *et.al* y colaboradores.

La microbiota cutánea ha sido objeto de estudios para muchos investigadores, quienes consideran esta como posible causante de diversas enfermedades, ya que la microbiota cambia frecuentemente a nivel poblacional, ambiental e individual, este estudio nos da un acercamiento a elementos de la microbiota no estudiados antes en nuestra población y que estan relacionados con la salud y/ o enfermedad.

Por el contrario, la PCR como técnica de detección rápida puede ayudar al descubrimiento de nuevos taxones a través modificaciones en el protocolo. Por ejemplo, una reacción con el conjunto de cebadores del gen rRNA 16S PArA-1 / PArA-2 puede indicar una nueva especie estrechamente relacionada con

Cutibacterium, dado el porcentaje de identidad alto para el gen ya mencionado o una nueva filogenia.

Esta técnica ya fue realizada por varios autores, los cuales confirman un porcentaje de especificidad y sensibilidad del 100%, con respecto al MLST, considerado la prueba Gold estándar para la filotipificación de *C. acnes* (3, 4,63), sin embargo nunca se había empleado el análisis filogenético en nuestra población lo que puede explicar la variabilidad en los filotipos obtenidos en comparación a otras poblaciones ya estudiadas..

8. CONCLUSIONES

En conclusión, la tipificación de *C. acnes* es posible por medio de la PCR TD multiple aquí realizada, con el fin de clasificar los filotipos en nuestra población y su asociación con la evolución del acné; las técnicas basadas en la fermentación de carbohidratos, aunque son fáciles de realizar, el costo de los carbohidratos es alto, son difíciles de conseguir, y abarca errores del operador que pueden impedir la identificación correcta los biotipos.

Las características proteómicas pueden variar según el perfil de expresión por lo tanto no son 100% específicas y confiables, por último, la PCR TD múltiple descrita aquí facilita la identificación molecular rápida de *C. acnes* junto con la

filotipificación, datos que mejoraran nuestra comprensión del papel de los filotipos en condiciones clínicas, este estudio nos da una aproximación técnica y clínica de los filotipos circulantes en la población Bogotana, y su relación con la severidad del acné.

A diferencia de la mayoría de artículos revisados donde se evidenciaba un predominio del filotipo 1A1, en pacientes con lesiones inflamatorias de acné, aquí se mostró el predominio del filotipo IA2, lo que se podría deber a la diferencial poblacional analizada en otros estudios, por lo tanto, es importante realizar un estudio más amplio con muestras poblacionales representativas para determinar la frecuencia de *C. acnes* circulantes en nuestra población.

Para finalizar, los estudios subsecuentes a este podrán revelar factores genéticos en *C. acnes* que estén relacionados con las diversas patologías en nuestra población que ayudarán en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los pacientes afectados.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Quintero Y, Asuaje L, Franco F, Roye R. Propionibacterium acnes: pasado, presente y futuro. Dermatología Venezolana. 2015; 53(2).
2. Cardona-Arias JA, Álvarez-Medina MC, Martínez-Valencia DM, Cruz-Tobón AM, Vallejo-Patiño MM. Prevalencia de acné en estudiantes de octavo a undécimo grado de El Retiro-Antioquia y percepciones asociadas. Archivos de medicina [Internet]. 2014;10(1). Available from: <http://www.archivosdemedicina.com/medicina-de-familia/prevalencia-de-acn-en-adolescentes-de-un-municipio-colombiano-y-percepciones-asociadas.pdf>
3. 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.
4. Barnard E, Nagy I, Hunyadkurti J, Patrick S, McDowell A. Multiplex touchdown PCR for rapid typing of the opportunistic pathogen Propionibacterium acnes. J Clin Microbiol. 2015; 53(4):1149–55.
5. McDowell A, Barnard E, Nagy I, Gao A, Tomida S, Li H, *et. al*/ An expanded multilocus sequence typing scheme for propionibacterium acnes: investigation of “pathogenic”, “commensal” and antibiotic resistant strains. PLoS One. 2012; 7(7):e41480.

6. McDowell A, Valanne S, Ramage G, Tunney MM, Glenn JV, McLorinan GC, et al. Propionibacterium acnes types I and II represent phylogenetically distinct groups. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(1):326–34.
7. Valanne S, McDowell A, Ramage G, Tunney MM, Einarsson GG, O'Hagan S, et al. CAMP factor homologues in Propionibacterium acnes: a new protein family differentially expressed by types I and II. *Microbiology*. 2005; 151(Pt 5):1369–79.
8. 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>
9. Handa S. Propionibacterium Infecti [Internet]. Francisco Talavera; 2015. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/226337-overview#showall>
10. Orozco B, Concha C, Cárdenas LF, Becerra MM, Barona MI, Balcázar LF, et al. Guías colombianas para el manejo del acné: una revisión basada en la evidencia por el Grupo Colombiano de Estudio en Acné. *Rev Asoc Colomb Dermatol Cir Dermatol*. 2011; 19(2).
11. Grant RNR. The History of Acne. *Proc R Soc Med*. 1951; 44(8):647–52.
12. Kaminsky A. Acné. Un enfoque global. 1st ed. Buenos aires; 2017. 256 p. (Dermatología CI-L de, editor. Definición, historia, epidemiología, genética).
13. Plewig G, Kligman A. ACNE and ROSACEA. 3rd ed. 2017. 744 p. (Heidelberg S-VB, editor. History of Acne and Rosacea).
14. Díaz RMD. HISTORIA DE LA DERMATOLOGÍA [Internet]. Vol. 93, Los tres grandes. Primera parte: Robert Willan (1757-1812). Madrid; 2002. p. 344. Available from: <http://www.revespcardiol.org>
15. Wilson E. On diseases of the Skin. philadelphia; 1857. 705 p.
16. Fleming A. ON THE ETIOLOGY OF ACNE VULGARIS AND ITS TREATMENT BY VACCINES. *Lancet*. 1909 Apr 10;173(4467):1035–8.
17. Rosenberg EW. Bacteriology of acne. *Annu Rev Med*. 1969;20:201–6.
18. Molesworth EH. THE CULTURAL CHARACTERISTICS OF THE

MICROBACILLUS OF ACNE. Br Med J. 1910; 1(2577):1227–9.

19. Douglas HC, Gunter SE. The Taxonomic Position of *Corynebacterium acnes*. J Bacteriol. 1946; 52(1):15–23.
20. 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.
21. 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. J Invest Dermatol. 2013; 133(9):2152–60.
22. Piper KE, Jacobson MJ, Cofield RH, Sperling JW, Sanchez-Sotelo J, Osmon DR, et al. Microbiologic diagnosis of prosthetic shoulder infection by use of implant sonication. J Clin Microbiol. 2009 Jun; 47(6):1878–84.
23. Kasimatis G, Fitz-Gibbon S, Tomida S, Wong M, Li H. Analysis of Complete Genomes of *Propionibacterium acnes* Reveals a Novel Plasmid and Increased Pseudogenes in an Acne Associated Strain. Biomed Res Int. 2013; 2013:11.
24. Lomholt HB, Kilian M. Clonality and anatomic distribution on the skin of antibiotic resistant and sensitive *Propionibacterium acnes*. Acta Derm Venereol. 2014; 94(5):534–8.
25. Sampedro MF, Piper KE, McDowell A, Patrick S, Mandrekar JN, Rouse MS, et al. Species of *Propionibacterium* and *Propionibacterium acnes* phlotypes associated with orthopedic implants. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009; 64(2):138–45.
26. 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. BJU Int. 2006; 98(2):388–92.
27. Scholz CF, Jensen A, Lomholt HB, Bruggemann H, Kilian M. A novel high-resolution single locus sequence typing scheme for mixed populations of *Propionibacterium acnes* in vivo. PLoS One. 2014; 9(8):e104199.
28. Rollason J, McDowell A, Albert HB, Barnard E, Worthington T, Hilton AC, et al. Genotypic and antimicrobial characterisation of *Propionibacterium acnes* isolates from surgically excised lumbar disc herniations. Biomed Res Int. 2013; 2013:530382.

29. 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.
30. Lomholt HB, Kilian M. Population Genetic Analysis of *Propionibacterium acnes* Identifies a Subpopulation and Epidemic Clones Associated with Acne. *PLoS One*. 2010; 5(8):e12277.
31. McDowell A, Nagy I, Magyari M, Barnard E, Patrick S. The Opportunistic Pathogen *Propionibacterium acnes*: Insights into Typing, Human Disease, Clonal Diversification and CAMP Factor Evolution. *PLoS One*. 2013; 8(9):e70897.
32. Perry AL, Worthington T, Hilton AC, Lambert PA, Stirling AJ, Elliott TS. Analysis of clinical isolates of *Propionibacterium acnes* by optimised RAPD. *FEMS Microbiol Lett*. 2003; 228(1):51–5.
33. Dekio I, Culak R, Misra R, Gaulton T, Fang M, Sakamoto M, et al. Dissecting the taxonomic heterogeneity within *Propionibacterium acnes*: proposal for *Propionibacterium acnes* subsp. *Acnes* subsp. nov. and *Propionibacterium acnes* subsp. *elongatum* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015; 65(12):4776–87.
34. Scholz CFP. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016; 66(11):4422–32.
35. Rojas W, Anaya JM, Gomez LM, Aristizabal B, Cano LE, Lopera D. *Inmunología de Rojas*. 18th ed. Medellín, Colombia.; 2017. 622 p.
36. Patiño LA, Morales CA. Microbiota de la piel: el ecosistema cutáneo. *Rev Asoc Colomb Dermatol*. 2013; 21(2):147–58.
37. Brzuszkiewicz E, Weiner J, Wollherr A, Thurmer A, Hupeden J, Lomholt HB, et al. Comparative genomics and transcriptomics of *Propionibacterium acnes*. *PLoS One*. 2011; 6(6):e21581.
38. Fischer N, Mak TN, Shinohara DB, Sfanos KS, Meyer TF, Brüggemann H. Deciphering the Intracellular Fate of *Propionibacterium acnes* in Macrophages. *Biomed Res Int*. 2013; 2013.

39. Eishi Y. Etiologic link between sarcoidosis and *Propionibacterium acnes*. *Respir Investig*. 2013; 51(2):56–68.
40. de Brouwer B, Veltkamp M, Wauters CA, Grutters JC, Janssen R. *Propionibacterium acnes* isolated from lymph nodes of patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2015; 32(3):271–4.
41. Brüggemann H, Henne A, Hoster F, Liesegang H, Wiezer A, Strittmatter A, et al. The Complete Genome Sequence of *Propionibacterium Acnes*, a Commensal of Human Skin. *Science*. 2004; 305(5684):671–3.
42. McDowell A, Perry AL, Lambert PA, Patrick S. A new phylogenetic group of *Propionibacterium acnes*. *J Med Microbiol*. 2008; 57(Pt 2):218–24.
43. Hauck Y, Soler C, Gerome P, Vong R, Macnab C, Appere G, et al. A novel multiple locus variable number of tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA) method for *Propionibacterium acnes*. *Infect Genet Evol*. 2015; 33:233–41.
44. Kilian M, Scholz CF, Lomholt HB. Multilocus sequence typing and phylogenetic analysis of *Propionibacterium acnes*. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(4):1158–65.
45. Sa B. Sistema de identificación de bacterias corineformes. Francia;
46. Zárate MS, Romano V, Nievas J, Smayevsky J. Utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias. *Rev Argent Microbiol*. 2014; 46(98):102.
47. 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.
48. Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*. 2009; 324(5931):1190–2.
49. Kistowska M, Meier B, Proust T, Feldmeyer L, Cozzio A, Kuendig T, et al. *Propionibacterium acnes* promotes Th17 and Th17/Th1 responses in acne patients. *J Invest Dermatol*. 2015; 135(1):110–8.
50. Montenegro Benavides Paola Andrea Pardo Rodríguez Mayda Gisel. Determinación de filotipos de *propionibacterium acnes* por MALDI-TOF [Internet]. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2017 [cited 2018 Mar

- 25]. Available from: <http://190.60.201.179:28080/janium-bin/detalle.pl?Id=20180325235208>
51. Leal LCS, Ramírez LCC. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *NOVA*. 2005; 3(4):21–9.
 52. Higaki S, Nakamura M, Morohashi M. *Propionibacterium acnes* biotypes and susceptibility to minocycline and Keigai- rengyo- to. *Aquat Microb Ecol* [Internet]. 2004; Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-4632.2004.01887.x/full>
 53. OMS | Organización Mundial de la Salud. 2018 Mar 14 [cited 2018 Mar 14]; Available from: <http://www.who.int/es/>
 54. 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.
 55. Yentzer BA, Hick J, Reese EL, Uhas A, Feldman SR, Balkrishnan R. Acne vulgaris in the United States: a descriptive epidemiology. *Cutis*. 2010 Aug; 86(2):94–9.
 56. Pereira Duquia R, da Silva Dos Santos I, de Almeida H Jr, Martins Souza PR, de Avelar Breunig J, Zouboulis CC. Epidemiology of Acne Vulgaris in 18-Year-Old Male Army Conscripts in a South Brazilian City. *Dermatology*. 2017 Jun 14; 233(2-3):145–54.
 57. Lello J, Pearl A, Arroll B, Yallop J, Birchall NM. Prevalence of acne vulgaris in Auckland senior high school students. *N Z Med J*. 1995 Jul 28; 108(1004):287–9.
 58. Higaki S, Kitagawa T, Kagoura M, Morohashi M, Yamagishi T. Correlation between *Propionibacterium acnes* biotypes, lipase activity and rash degree in acne patients. *J Dermatol*. 2000 Aug; 27(8):519–22.
 59. 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.
 60. Yang X-Y, Wu W-J, Yang C, Yang T, He J-D, Yang Z, et al. Association of HSD17B3 and HSD3B1 polymorphisms with acne vulgaris in Southwestern Han Chinese. *Dermatology*. 2013 Oct 19; 227(3):202–8.

61. Atkinson FS, Foster-Powell K, Brand-Miller JC. International tables of glycemic index and glycemic load values: 2008. *Diabetes Care*. 2008 Dec; 31(12):2281–3.
62. Legarraga P, Moraga M, Lam M, Geoffroy E, Zumarán C, García P. Impacto de la espectrometría de masas por MALDI-TOF MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica. *Rev Chilena Infectol*. 2013; 30(2):140–6.
63. Dekio I, Culak R, Fang M, Ball G, Gharbia S, Shah HN. Correlation between phylogroups and intracellular proteomes of *Propionibacterium acnes* and differences in the protein expression profiles between anaerobically and aerobically grown cells. *Biomed Res Int*. 2013 Jun 26; 2013:151797.
64. D3350- 5. Preps, D3350- 50 Preps, Preps 200. E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit. Available from: <http://omegabiotek.com/store/wp-content/uploads/2013/04/D3350-Bacterial-DNA-Kit-Combo-Online.pdf>

10. ANEXOS

10.1 Protocolo de extracción de ADN (E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit)(64).

Ilustración 10. Protocolo de extracción de ADN (E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit).

OMEGA Innovations in nucleic acid isolation

E.Z.N.A.® Bacterial DNA Protocol

E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit - Centrifugation Protocol
This method allows genomic bacterial isolation from up to 3 mL LB culture.

Materials and Equipment to be Supplied by User:

- Microcentrifuge capable of 13,000 x g
- Centrifuge to pellet culture capable of 4,000 x g
- Neutral, free 1.5 mL microcentrifuge tubes
- Water bath capable of 37°C
- Shaking water bath capable of 55°C
- Incubator or water bath capable of 65°C
- Vortexer
- 100% ethanol
- 100% isopropanol
- TE Buffer

Before Starting:

- Prepare HBC Buffer, DNA Wash Buffer, and Lysostzyme, as instructed in the "Preparing Reagents" section on Page 4.
- Set a water bath to 37°C.
- Set a shaking water bath to 55°C.
- Set an incubator or water bath to 65°C.
- Heat Elution Buffer to 65°C.

1. Culture bacteria in LB media to log phase. (Overnight culture can be used in many cases.)

2. Centrifuge no more than 3 mL culture or 1×10^8 cells at 4,000 x g for 10 minutes at room temperature.

3. Aspirate and discard the media.

4. Add 100 µL TE Buffer. Vortex to completely resuspend the pellet.

5. Add 10 µL Lysostzyme.
Note: Lysostzyme must be resuspended with Elution Buffer before use. Please see Page 4 for instructions.

6. Incubate at 37°C for 10 minutes.
Note: The amount of enzyme required and/or the length of incubation may need to be modified depending on the bacterial strain used. Complete digestion of the cell wall is essential for efficient lysis. Longer incubation time may yield better results.

Optional: Follow the short protocol below for difficult to lyse bacteria.

1. Add 25 mg Glass Beads 5 to a 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided).
2. Add sample to the Glass Beads 5.
3. Vortex at maximum speed for 5 minutes.
4. Let sample stand to allow the beads to settle.
5. Transfer supernatant to a new 1.5 mL microcentrifuge tube.

7. Add 100 µL TE Buffer and 20 µL Proteinase K Solution. Vortex to mix thoroughly.

8. Incubate at 55°C in a shaking water bath.
Note: Usually no more than 1 hour is required for bacterial lysis. If a shaking water bath is not available, incubate the samples and shake or briefly vortex every 20-30 minutes.

9. Add 5 µL RNase A. Invert tube several times to mix.

10. Let sit at room temperature for 5 minutes.

11. Centrifuge at 10,000 x g for 2 minutes to pellet any undigested material.

12. Transfer the supernatant to a new 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided). Do not disturb the pellet.

13. Add 220 µL BL Buffer. Vortex to mix thoroughly.

E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit

D3350-00	5 preps
D3350-01	50 preps
D3350-02	200 preps

April 2017

For research use only. Not intended for diagnostic testing.

14. Incubate at 65°C for 10 minutes.
Note: A wispy precipitate may form upon addition of BL Buffer; it does not interfere with DNA recovery.
15. Add 220 µL 100% ethanol. Vortex for 20 seconds at maximum speed to mix thoroughly.
Note: If any precipitate can be seen at this point, break the precipitate by pipetting up and down 10 times.
16. Insert a HiBind® DNA Mini Column into a 2 mL Collection Tube.
17. Transfer the entire sample to the HiBind® DNA Mini Column, including any precipitate that may have formed.
18. Centrifuge at 10,000 x g for 1 minute.
19. Discard the filtrate and the collection tube.
20. Insert the HiBind® DNA Mini Column into a new 2 mL Collection Tube.
21. Add 500 µL HBC Buffer.
Note: HBC Buffer must be diluted with 100% isopropanol before use. Please see Page 4 for instructions.
22. Centrifuge at 10,000 x g for 1 minute.
23. Discard the filtrate and reuse the collection tube.
24. Add 700 µL DNA Wash Buffer.
Note: DNA Wash Buffer must be diluted with 100% ethanol before use. Please see Page 4 for instructions.
25. Centrifuge at 10,000 x g for 1 minute.
26. Discard the filtrate and reuse the collection tube.
27. Repeat Steps 24-26 for a second DNA Wash Buffer wash step.
28. Centrifuge the empty HiBind® DNA Mini Column at maximum speed (≥13,000 x g) for 2 minutes to dry the column.
Note: This step is critical for removal of trace ethanol that may interfere with downstream applications.
29. Insert the HiBind® DNA Mini Column into a new nuclease-free 1.5 mL microcentrifuge tube.
30. Add 50-100 µL Elution Buffer heated 65°C.
Note: Make sure to add the Elution Buffer to the center of the HiBind® matrix. Each 50-100 µL elution typically yields 60-70% of the DNA bound to the HiBind® matrix. Two elutions generally yield ~90%. However, increasing elution volume reduces the concentration of the final product. To obtain DNA at higher concentrations, elution can be carried out using 50 µL Elution Buffer (which slightly reduces overall DNA yield). Volumes lower than 50 µL greatly reduce yields.
31. Let sit for 3 to 5 minutes at room temperature.
Note: Yields may be increased by incubating the column at 65°C rather than at room temperature.
32. Centrifuge at 10,000 x g for 1 minute to elute the DNA.
33. Repeat Steps 30-32 for a second elution step.
34. Store eluted DNA at -20°C.

10.2 Análisis bioinformática en BLAST ®.

10.2.1 PArA 1/2.

Ilustración 11. Análisis bioinformático en BLAST ® PArA 1/2

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAGCGTGAGTGACGGTAATGGGTA	24	63.92	50.00	5.00	2.00
Reverse primer	CCACCATAACGTGCTGGCAACAGT	24	65.89	54.17	6.00	5.00

Products on target templates

>LN998080.1 Propionibacterium acnes partial 16S rRNA gene, strain mammoth-11

```

product length = 677
Forward primer 1  AAGCGTGAGTGACGGTAATGGGTA  24
Template       436  ..... 459

Reverse primer 1  CCACCATAACGTGCTGGCAACAGT  24
Template       1112 ..... 1889

```

Fuente: Ibañez *et.al*/ 2018

10.2.2 PAMp 1/2.

Ilustración 12. Análisis bioinformático en BLAST ® PAMp 1/2

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCGTTGACCAAGTCCGCCGA	20	65.71	65.00	4.00	4.00
Reverse primer	OCAAATTCGCACCOCGAGC	20	65.76	65.00	8.00	8.00
Products on target templates						
>CP012355.1 Cutibacterium acnes strain PA_15_1_R1 chromosome, complete genome						
product length = 494						
Forward primer	1 GCGTTGACCAAGTCCGCCGA 20					
Template	1559224 1559243					
Reverse primer	1 GCAAATTCGCACCOCGAGC 20					
Template	1559717 1559698					
>CP012354.1 Cutibacterium acnes strain PA_12_1_L1 chromosome, complete genome						
product length = 494						
Forward primer	1 GCGTTGACCAAGTCCGCCGA 20					
Template	1559525 1559544					
Reverse primer	1 GCAAATTCGCACCOCGAGC 20					
Template	1568818 1559999					
>DQ208867.1 Propionibacterium acnes glycoside hydrolase gene, complete cds; ABC-type peptide uptake operon, complete sequence; and chitinase gene, complete cds						
product length = 464						
Forward primer	1 GCGTTGACCAAGTCCGCCGA 20					
Template	-9254 4373					
Reverse primer	1 GCAAATTCGCACCOCGAGC 20					
Template	-4747 4728					

Fuente: Ibañez *et.al*/ 2018

10.2.3 PAMp 3/4.

Ilustración 13. Análisis bioinformático en BLAST ® PAMp 3/4

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CGGAACCATCAACAACTCGAA	22	59.45	45.45	4.00	2.00
Reverse primer	GAAGAATCGTCAATCGCAGCA	22	61.49	50.00	4.00	1.00
Products on target templates						
>CP012351.1 Cutibacterium acnes strain PA_21_1_L1 chromosome, complete genome						
product length = 145						
Forward primer	1 CGGAACCATCAACAACTCGAA 22					
Template	1983375 1983396					
Reverse primer	1 GAAGAATCGTCAATCGCAGCA 22					
Template	1983519 1983498					
>CP003195.1 Propionibacterium acnes Type1A2 P.acn33, complete genome						
product length = 145						
Forward primer	1 CGGAACCATCAACAACTCGAA 22					
Template	1926229 1926250					
Reverse primer	1 GAAGAATCGTCAATCGCAGCA 22					
Template	1926373 1926352					
>HQ283918.1 Propionibacterium acnes strain Asn1 superoxide dismutase (sodA) gene, sodA-11 allele, partial cds						
product length = 145						
Forward primer	1 CGGAACCATCAACAACTCGAA 22					
Template	88 181					
Reverse primer	1 GAAGAATCGTCAATCGCAGCA 22					
Template	224 283					

Fuente: Ibañez *et.al*/ 2018

10.2.4 PAMp 5/6.

Ilustración 14. Análisis bioinformático en BLAST® PAMp 5/6

FW: **AGGGCGAGGTCCTCTTCTACCAGCG**
 RV: **AGGGCGAGAGTTGCAGTTGGAGGGT**

Propionibacterium acnes PRP-38 (TICEST70_07737)

GGCGTTCAGATCAAGCAGACGTTCCACGAGTTGAGATCGACGAG-
 GACTTCTTCGCATGACTGATGCTGCTA**AGGGCGAGGTCCTCTTCTACCAGCG**AGACGATAGGGCCTT
 TTCCGTCGAGGTAAGACTTGTGACGACACCCAGTGGCTGTCCCAACAGCAGATAGTG-
 GACTTGTTCAGACGTCTCGTGAGCACGCGCATCCATCTCGAGAAGCTTCTCGAGGAGGGCCAA
 CTTACGACGCGGCAACTTTCAAGGACTTCTTGGAGATTCTGCAAGAGAGTCGGCGCCCA-
 GGTGTGGCGTTCGTTGTTCACTACAAACCTCGATGCCGTATCTTGGCCAGCGTCA**AGGGCGGAGA**
GTTCAGTTGGAGGGTAAGAAATGAATCGGGTTGAACGGCTGATTGCGGAGTTGTGCCCG-
 GATGGGGCGGAGTTCAAGCCGCTGTCTGATGTCACGGTCAAGAGCAAAAGATCAATTGGAATGAA
 TGTGCTGA

Propionibacterium acnes HL097PA1 (HMPREF9344_02057)

GCGCAATCGGTACCGACGCGCATCATCTCTCATCGACGGCGAAGACTGACCCAGCT-
 CATGATCCGCTACGGCGTGGGCGTTCAGATCAAGCAGACGTTCCACGAGTTGAGATCGACGAGG
 ACTTCTTCGCATGACTGATGCTGCTA**AGGGCGAGGTCCTCTTCTACCAGCG**AGACGA-
 TAGGGCCTTTCCGTCGAGGTAAGACTTGTGACGACACCCAGTGGCTGTCCCAACAGCAGATAGT
 GGACTTGTTCAGACGTCTCGTGAGCACGCGCATCCATCTCGAGAAGCTTCTTCGAG-
 GAGGGCCAACTTCAGACGCGGCAACTTTCAAGGACTTCTTGGAGATTCTGCAAGAGAGTCGGCG
 CCAGGTGTGGCGTTCGTTGTTCACTACAAACCTCGATGCCGTATCTTGGCCAGCGTCA**A-**
GGCGGAGAGTTGCAGTTGGAGGGTAAGAAATGAATCGGGTTGAACGGCTGATTGCGGAGTTGTG
 CCCGGATGGGGCGGAGTTCAAGCCGCTGTCTGATGTCACGGTCAAGAGCAAAAGATCAATTG-
 GAATGAATGTGCTGATGAAAAATTTAGCTATATTGATCTAGG

GenBank: AIJP0100006.1 y GL878493.1 respectivamente. Fuente: Ibañez *et al* 2018

10.2.5 PAMp 7/8.

Ilustración 15. Análisis bioinformático en BLAST® PAMp 7/8.

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCCATCTGGCCGAATACCAGG	21	61.65	57.14	4.00	3.00
Reverse primer	TCTTAACGCCGATCCCTCCAT	21	61.03	52.38	4.00	2.00

Products on target templates

>CP013693.1 *Culibacterium acnes* strain A1-14 chromosome

```
product length = 351
Forward primer 1 TCCATCTGGCCGAATACCAGG 21
Template 1267635 ..... 1267655
Reverse primer 1 TCTTAACGCCGATCCCTCCAT 21
Template 1267985 ..... 1267965
```

>CP003084.1 *Propionibacterium acnes* ATCC 11828, complete genome

```
product length = 351
Forward primer 1 TCCATCTGGCCGAATACCAGG 21
Template 1782533 ..... 1782513
Reverse primer 1 TCTTAACGCCGATCCCTCCAT 21
Template 1782183 ..... 1782283
```

>HQ908383.1 *Propionibacterium acnes* strain R18473 **ATP** synthase beta chain (**atpD**) gene, **atpD**-4 allele, partial cds

```
product length = 351
Forward primer 1 TCCATCTGGCCGAATACCAGG 21
Template 384 ..... 364
Reverse primer 1 TCTTAACGCCGATCCCTCCAT 21
Template 34 ..... 54
```


Fuente: Ibañez *et.al*/ 2018

10.2.6 PAMp 9/10

Ilustración 16. Análisis bioinformático en BLAST ® PAMp 9/10

Primer pair 1						
	Sequence (5->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCGCCCTCAAGTTCTACTCA	20	59.75	55.00	4.00	1.00
Reverse primer	CGGATTTGGTGATAATGCCA	20	56.17	45.00	3.00	3.00

Products on target templates

>[KJ572585.1](#) Propionibacterium acnes strain PA47 recombinase A (recA) gene, complete cds

product length = 225
Forward primer 1 GCGCCCTCAAGTTCTACTCA 20
Template 697 716

Reverse primer 1 CGGATTTGGTGATAATGCCA 20
Template 921 902

>[LC006670.1](#) Propionibacterium acnes recA gene for recombinase A, partial cds, strain: NS6

product length = 225
Forward primer 1 GCGCCCTCAAGTTCTACTCA 20
Template 485 504

Reverse primer 1 CGGATTTGGTGATAATGCCA 20
Template 709 690

>[LC006328.1](#) Propionibacterium acnes recA gene for recombinase A, partial cds, strain: S1

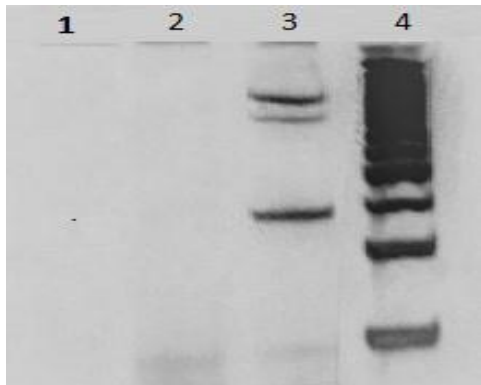
product length = 225
Forward primer 1 GCGCCCTCAAGTTCTACTCA 20
Template 485 504

Reverse primer 1 CGGATTTGGTGATAATGCCA 20
Template 709 690

10.3 Ensayos a diferentes Temperatura de anillamiento en PCR TD múltiple.

10.3.1 Temperatura de anillamiento 62°C.

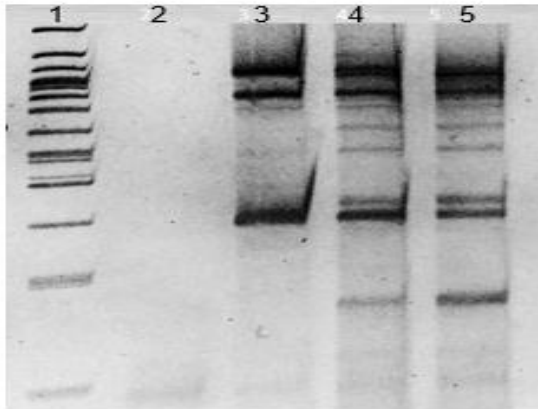
Ilustración 17. Electroforesis en gel de Agarosa, de PCR a Temperatura de anillamiento 62°C.



Línea 1, Blanco; línea 2, cepa 57; línea 3, cepa ATCC 6919; línea 4, PPM 100 pb
Fuente: Ibañez *et.al* 2018, tomada en la FUCS.

9.3.2 Temperatura de anillamiento 64°C.

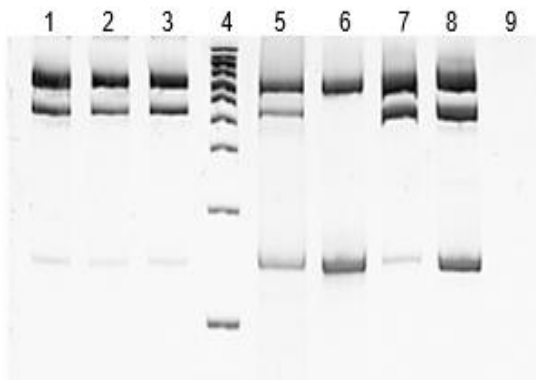
Ilustración 18. Electroforesis en gel de poliacrilamida, de PCR a Temperatura de anillamiento 64°C.



Línea 1, PPM 50 pb; línea 2, Blanco; Línea 3, cepa ATCC 6919; línea 4, cepa 54; línea 3, cepa 57. Fuente: Ibañez *et.al* 2018, tomada en el Instituto de Ciencias Básicas FUCS.

9.3.3 Temperatura de anillamiento 66° C.

Ilustración 19. Electroforesis en gel de poliacrilamida, de PCR TD multiple a Temperatura de anillamiento 66°C.

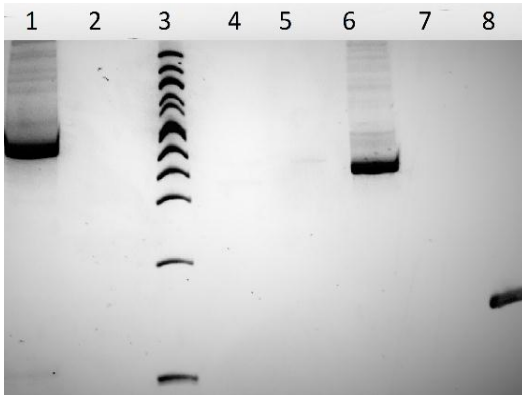


Línea 1, cepa 30; línea 2, cepa 37; línea 3, cepa 50; línea 4, PPM 100pb; línea 5; ATCC 6919; línea 6, cepa 16; línea 7, cepa 60; línea 8, cepa 83; línea 9, blanco. Fuente: Ibañez *et.al* 2018, tomada en el Instituto de Ciencias Básicas FUCS

10.4 Ensayos con presencia y ausencia de BSA.

10.4.1 PCR TD sin BSA.

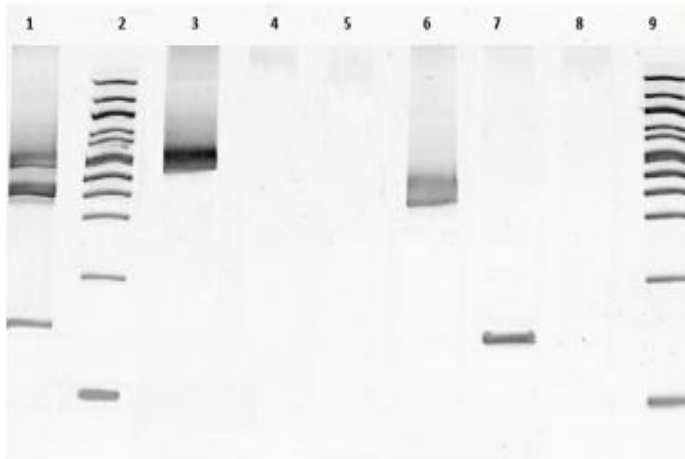
Ilustración 20. Electroforesis en gel de poliacrilamida de PCR TD primer individual sin BSA.



Línea 1, PArA $\frac{1}{2}$ ATCC 6919, línea 2, blanco; línea 3, PPM 100 pb, línea 4, blanco; línea 5, PAMp $\frac{1}{2}$ blanco, línea 6, PAMp $\frac{1}{2}$ ATCC 6919; línea 7, PAMp $\frac{3}{4}$ blanco; PAMp $\frac{3}{4}$ ATCC 6919. Fuente: Ibañez *et.al* 2018, tomada en el Instituto de Ciencias Básicas FUCS

10.4.2 PCR TD con BSA.

Ilustración 21. Electroforesis en gel de poliacrilamida de PCR TD con BSA

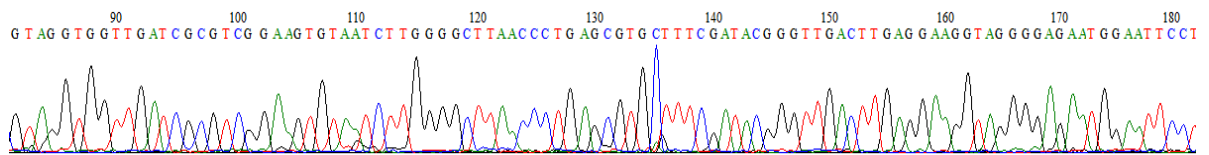


Línea 1; cepa 60; línea 2, PPM 100pb; línea 3, PArA 1/2 ATCC 6919; línea 4, Para 1/2 blanco; línea 5, PAMp 1/2 blanco; línea 6, PAMp 1/2 ATCC 6919; línea 7, PAMp 3/4 ATCC 6919; línea 8, PAMp 3/4 blanco; línea 9, 100pb. Fuente: Ibañez *et.al* 2018, tomada en el Instituto de Ciencias Básicas FUCS

10.5 Secuenciación de fragmentos y alineamiento en BLAST ®n.

10.5.1 Secuenciación de fragmentos y alineamiento en BLAST ® PArA 1.

Ilustración 22. Secuenciación fragmento amplificado cepa ATCC con Primer PArA 1.



Fuente: Ibañez *et.al* 2018. Programa bioinformático BioEdit Sequence Alignment Editor

Ilustración 23. Alineamiento en BLAST®, fragmento amplificado primer PArA 1

Propionibacterium acnes subsp. acnes strain HKG 282 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [KY674870.1](#) 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

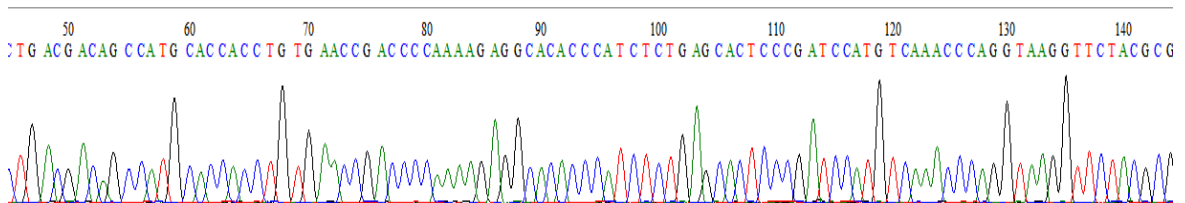
```

Query 1   GTGATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT-AAGGGCTCGTAGGTGGT 59
Sbjct 417 GTGATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGTGGT 476
Query 60  TGATCGCGTCGGAAGTGTAACTTTGGGGCTTAACCCCTGAGCGTGCTTTTCGATACGGGTTG 119
Sbjct 477 TGATCGCGTCGGAAGTGTAACTTTGGGGCTTAACCCCTGAGCGTGCTTTTCGATACGGGTTG 536
Query 120 ACTTGAGGAAGGTAGGGGAGAATGGAATTCCTGGTGGAGCGGTGGAATGCGCAGATATCA 179
Sbjct 537 ACTTGAGGAAGGTAGGGGAGAATGGAATTCCTGGTGGAGCGGTGGAATGCGCAGATATCA 596
Query 180  GGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGTTCTCTGGGCTTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAG 239
Sbjct 597 GGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGTTCTCTGGGCTTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAG 656
Query 240  CGTGGGGAGCGAACAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGGG-GGGTACTA 298
Sbjct 657 CGTGGGGAGCGAACAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGGG-TGGTACTA 716
Query 299  GGTGTGGGGTCCATCCACGGGTTCCGTGCCGTAGCTAACGCTTTAAGTACCCCGCTGG 358
Sbjct 717 GGTGTGGGGTCCATCCACGGGTTCCGTGCCGTAGCTAACGCTTTAAGTACCCCGCTGG 776
Query 359  GGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAGAG-AATTGAC-GGGCCCCGCACAAGCG 411
Sbjct 777 GGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCG 831
    
```

Fuente: Ibañez *et.al* 2018. Programa bioinformatico BLAST®

10.5.2 Secuenciación de fragmentos y alineamiento en BLAST® PArA 2.

Ilustración 24. Secuenciación fragmento amplificado cepa ATCC con Primer PArA 2



Fuente: Ibañez *et.al* 2018. Programa bioinformatico BioEdit Sequence Alignment Editor.

Ilustración 25. Alineamiento en BLAST®, fragmento amplificado primer PARa 2

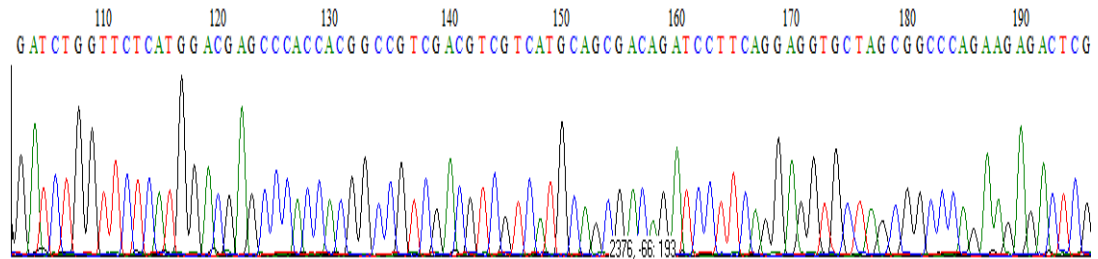
Propionibacterium acnes strain ChDC KB81 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [KF933807.1](#) Length: 1456 Number of Matches: 1

Range 1: 803 to 1035 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
431 bits(233)	5e-117	233/233(100%)	0/233(0%)	Plus/Minus
Query 1	CGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTGAACCGACCCCAAAAAGAGGCACACCCATCTC	60		
Sbjct 1035	CGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTGAACCGACCCCAAAAAGAGGCACACCCATCTC	976		
Query 61	TGAGCACTCCCCGATCCATGTCAAACCCAGGTAAGGTTCTACGCGTTGCATCGAATTAATC	120		
Sbjct 975	TGAGCACTCCCCGATCCATGTCAAACCCAGGTAAGGTTCTACGCGTTGCATCGAATTAATC	916		
Query 121	CGCATGCTCCGCGCTTGTGCGGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCC	180		
Sbjct 915	CGCATGCTCCGCGCTTGTGCGGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCC	856		
Query 181	GTACTCCCAGGCGGGGTACTTAAAGCGTTAGCTACGGCACGGAAACCCGTGGA	233		
Sbjct 855	GTACTCCCAGGCGGGGTACTTAAAGCGTTAGCTACGGCACGGAAACCCGTGGA	803		

Fuente: Ibañez *et.al* 2018 . Programa bioinformatico BLAST®

10.5.3 Secuenciación de fragmentos y alineamiento en BLAST® PAMp 1.



Fuente: Ibañez *et.al* 2018. Programa bioinformatico BioEdit Sequence Alignment Editor.

Ilustración 26. Alineamiento en BLAST®, fragmento amplificado primer PAMp 1

Propionibacterium acnes glycoside hydrolase gene, complete cds; ABC-type peptide uptake operon, complete sequence; and chitinase gene, complete cds
 Sequence ID: [DQ208967.1](#) Length: 8691 Number of Matches: 1

Range 1: 4334 to 4557 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

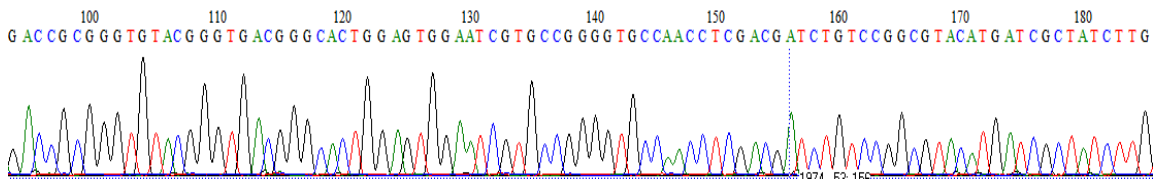
[Related Information](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
414 bits(224)	5e-112	224/224(100%)	0/224(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGGTGGCATGCAGCAGCGTCCCTCATCGCGCTGCTTGGTGTGCGAGCCGGATCTGGT	60		
Sbjct 4334	AGGTGGCATGCAGCAGCGTCCCTCATCGCGCTGCTTGGTGTGCGAGCCGGATCTGGT	4393		
Query 61	TCTCATGGACGAGCCCAACACGGCGTCGACGTCGTCATGCAGCGACAGATCCTTCAGGA	120		
Sbjct 4394	TCTCATGGACGAGCCCAACACGGCGTCGACGTCGTCATGCAGCGACAGATCCTTCAGGA	4453		
Query 121	GGTGCTAGCGGGCCAGAAAGAGACTCGGATTCTCGATCGTCTTCGTACCCACGACCTGTC	180		
Sbjct 4454	GGTGCTAGCGGGCCAGAAAGAGACTCGGATTCTCGATCGTCTTCGTACCCACGACCTGTC	4513		
Query 181	CCTCCTCATGGAGATCTCGGACAAGATAGCGATCATGTACGCCG	224		
Sbjct 4514	CCTCCTCATGGAGATCTCGGACAAGATAGCGATCATGTACGCCG	4557		

Fuente: Ibañez et.al 2018. Programa bioinformatico BLAST®

10.5.4 Secuenciación de fragmentos y alineamiento en BLAST® PAMp 2.

Ilustración 27. Secuenciación fragmento amplificado cepa ATCC con Primer PAMp 2



Fuente: Ibañez et.al 2018. Programa bioinformatico BioEdit Sequence Alignment Editor.

Ilustración 28. Alineamiento en BLAST®, fragmento amplificado primer PAMp 2

Propionibacterium acnes glycoside hydrolase gene, complete cds; ABC-type peptide uptake operon, complete sequence; and chitinase gene, complete cds
 Sequence ID: [DQ208967.1](#) Length: 8691 Number of Matches: 1

Range 1: 4500 to 4679 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

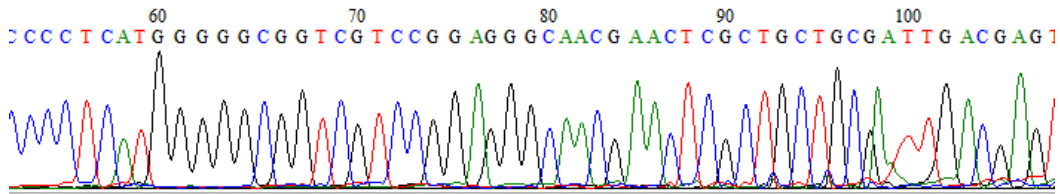
[Related Information](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
327 bits(177)	5e-86	179/180(99%)	0/180(0%)	Plus/Minus
Query 1	GATGCCTTCGAGTCGACGCAAGTGGCTCGCTCAGCGGGCGGAAGGCCAGACGACGACCGCG	60		
Sbjct 4679	GATGCCTTCGAGTCGACGCAAGTGGCTCGCTCAGCGGGCGGAAGGCCAGACGACGACCGCG	4620		
Query 61	GGGTACGGGTGACGGGCACTGGAGTGGAAATCGTGCCGGGGTGC CAACCTCGACGATCTG	120		
Sbjct 4619	GGGTACGGGTGACGGGCACTGGAGTGGAAATCGTGCCGGGGTGC CAACCTCGACGATCTG	4560		
Query 121	TCCGGCGTACATGATCGCTATCTTGTCCGAGATCTCCATGAGGAGGGACAGGTCTGGGGT	180		
Sbjct 4559	TCCGGCGTACATGATCGCTATCTTGTCCGAGATCTCCATGAGGAGGGACAGGTCTGGGGT	4500		

Fuente: Ibañez et.al 2018. Programa bioinformatico BLAST®.

9.5.5 Secuenciación de fragmentos y alineamientos en BLAST®, PAMp 3.

Ilustración 29. Secuencia del fragmento amplificado por primer PAMp 3



Fuente: Ibañez et.al 2018. Programa bioinformático BioEdit Sequence Alignment Editor.

Ilustración 30. Alineamiento en BLAST®, fragmento amplificado primer PAMp 3

Propionibacterium acnes strain Asn1 superoxide dismutase (sodA) gene, sodA-11 allele, partial cds
Sequence ID: [HQ283918.1](#) Length: 450 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
113 bits(61)	1e-25	61/61(100%)	0/61(0%)	Plus/Plus

Range 1: 137 to 197 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

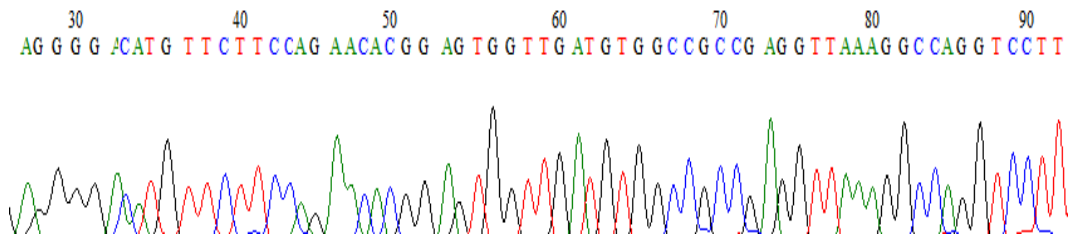
```

Query 1   CCACTCCGTGTTCTGGAAGAACATGTCCCCTCATGGGGCGGTCGTCGGAGGGCAACGA 60
Sbjct 137 CCACTCCGTGTTCTGGAAGAACATGTCCCCTCATGGGGCGGTCGTCGGAGGGCAACGA 196
Query 61   A 61
Sbjct 197  A 197
    
```

Fuente: Ibañez et.al 2018. Programa bioinformático BLAST®.

10.5.6 Secuenciación de fragmentos y alineamientos en BLAST® de PAMp 4.

Ilustración 31. Secuencia del fragmento amplificado por primer PAMp 4



Fuente: Ibañez et.al 2018. Programa bioinformatico BioEdit Sequence Alignment Editor.

Ilustración 32. Alineamiento en BLAST®, fragmento amplificado primer PAMp 4

Propionibacterium acnes strain Asn1 superoxide dismutase (sodA) gene, sodA-11 allele, partial cds
 Sequence ID: [HQ283918.1](#) Length: 450 Number of Matches: 1

Range 1: 100 to 166 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
124 bits(67)	7e-29	67/67(100%)	0/67(0%)	Plus/Minus

```

Query 1  GGGGACATGTTCTTCCAGAACACGGAGTGGTTGATGTGGCCGCCGAGGTTAAAGGCCAGG 60
          |||
Sbjct 166 GGGGACATGTTCTTCCAGAACACGGAGTGGTTGATGTGGCCGCCGAGGTTAAAGGCCAGG 107

Query 61  TCCTTTT 67
          |||
Sbjct 106 TCCTTTT 100
  
```

Fuente: Ibañez et.al 2018. Programa bioinformatico BLAST®.

10.6 Protocolo PCR.

10.6.1 Primer's PArA 1 y 2

Tabla 11. Protocolo de Primer's PArA 1 y 2

REACTIVO	UNIDAD	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN INICIAL
Buffer	X	10	1	2,50
primer PArA 1	µM	10	0,2	0,50
Primer PArA 2	µM	10	0,2	0,50
DNTPS	µM	10	0,2	0,50
Taq pol	U	5	0,20	1,00
MgCl2	mM	50	1,5	0,75
BSA	mg/mL	2	0,2	2,50
			Volumen de la solución sin agua y sin ADN	8,25

Cálculos para realizar 25 μ L de solución total por tubo de reacción, Fuente: Ibañez et.al 2018.

10.6.2 Primer's PAMp 1 y 2.

Tabla 12. Protocolo de Primer's PAMp 1 y 2

REACTIVO	UNIDAD	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN INICIAL
Buffer	X	10	1	2,50
Primer PAMp 1	uM	10	0,25	0,63
Primer PAMp 2	uM	10	0,25	0,63
DNTPS	uM	10	0,2	0,50
Taq pol	U	5	0,20	1,00
MgCl ₂	mm	50	1,5	0,75
BSA	mg/ml	2	0,2	2,50
			Volumen de la solución sin agua y sin ADN	8,50

Cálculos para realizar 25 μ L de solución total por tubo de reacción, Fuente: Ibañez et.al 2018.

10.6.3 Primer's PAMp 3 y 4

Tabla 13. Protocolo para Primer's PAMp 3 y 4

REACTIVO	UNIDAD	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN INICIAL
Buffer	X	10	1	2,50
Primer PAMp 3	uM	10	0,6	1,50
Primer	uM	10	0,6	1,50

PAMP 4				
DNTPS	uM	10	0,2	0,50
Taq pol	U	5	0,20	1,00
MgCl2	mm	50	1,5	0,75
BSA	mg/ml	2	0,2	2,50
			Volumen de la solución sin agua y sin ADN	10,25

Cálculos para realizar 25 µL de solución total por tubo de reacción, Fuente: Ibañez et.al 2018.

10.7 Protocolo Ionza GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain.

Ilustración 33. Protocolo Ionza GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain

Lonza

Detection of Nucleic Acids on Vertical Gels by Post-Staining

- Separate the samples by electrophoresis as normal.
- Remove GelStar™ Stain from -20°C storage and thaw at room temperature for 10 to 20 minutes.
- Stain the stain vial briefly in a microcentrifuge to deposit the solution in the bottom of the vial.
- Add stock GelStar™ Stain to buffer (TE, TAE, MOPS, or TBE) to give a final concentration of 1X, e.g., 5 µl of stain stock added to each 50 ml of buffer. Prepare enough stain solution to cover the surface of the gel during staining.
- Mix the stain solution by swirling, stirring, or inversion to distribute the stain thoroughly into the solution.
- Open the cassette, and leave the gel in place on one plate.
- Place the plate, gel side up, in a staining container.
- Gently pour the stain over the surface of the gel; a disposable pipette may be used to help distribute the stain evenly over the gel surface. Do not submerge the gel and plate in staining solution.
- Inoculate for 30 minutes. No destaining is required, although we recommend a brief rinse with buffer to minimize deposition of stain on work surfaces.
- Visualize the results by photography, scanning, or image capture as described above. For highest sensitivity the gel should be carefully removed from the plate and placed directly on the transilluminator or scanning stage. Alternatively, if a relatively low fluorescence plate is used, the results may be visualized by placing the gel and plate gel side down on the transilluminator and photographing or by scanning the gel directly on the plate.

NOTES:

- As an alternative to the protocol presented for staining gels on the cassette plate, smaller gels such as minigels may be removed from both plates then stained using the protocol for post-staining agarose gels.
- Treatment of one plate with a "release" agent, such as Gel Slick™ Solution (Lonza Catalog No. 50640), increases the ease of separation the glass plates while keeping the gel in place on the other plate for staining.
- Handling or compression of gels (particularly polyacrylamide-type gels) can lead to regions of high background after staining. If possible gels should not be handled directly; use a spatula (or other tool) and a squirt bottle to slide the gel off the plates and into the stain or onto the light box.
- Addition of 50% glycerol to the staining buffer is recommended when using GelStar™ Stain with MPE™ Gels (Lonza Catalog No. 40600) for heteroduplex or SSCP analyses. This minimizes swelling of the gel during staining, and improves gel handling and staining intensity.

Excitation of GelStar™ Stained Nucleic Acids

Either:
Illuminate the gel with a standard UV transilluminator (302 or 312 nm).
Or:
Illuminate the gel with a blue-light transilluminator such as the ChemiChem Dark Reader® Transilluminator.
Or:
Excite the GelStar™ Stain with an argon laser scanning system. Systems compatible with the detection of EYBRS Green Stain should also be compatible with GelStar™ Stain.

Visualization by Photography

Photograph the gel with the filter and film in the table below. Polaroid® type 55 positive-negative film can be used for photography of gels having relatively strong signals.

Exposure time varies with the strength of the illumination source and the filter used for photography.

Suggested Exposure Conditions For Different Film Types

Film	f-stop	Filter	Exposure
Type 57 or 607	4.5	GelStar™ Filter	2-5 seconds
Type 55	4.5	GelStar™ Filter	15-45 seconds

Visualization by Image Capture systems
GelStar™ Stain is compatible with most CCD and video imaging systems. Due to variations in the filters for these systems you may need to purchase a new filter. Lonza does not sell filters for this type of camera. Contact your systems manufacturer and using the excitation and emission information listed they can guide you to an appropriate filter. The excitation and emission maxima of GelStar™ Stain are 495 nm and 527 nm (532 nm for RNA) respectively.