



UNIVERSIDAD COLEGIO
MAYOR DE CUNDINAMARCA

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

Paola Andrea Sánchez Díaz
Leidy Katherine Sepúlveda Cubillos
Estudiantes

Lucia Constanza Corrales
Asesor interno. MSc. UCMC

Sandra Consuelo Henao Riveros
Asesora externa. MSc. UNAL

CONTENIDO

- ◆ 1. Fundamentación Teórica.....●
- ◆ 2. Problema de Investigación.....●
- ◆ 3. Objetivos.....●
- ◆ 4. Metodología.....●
- ◆ 5. Resultados.....●
- ◆ 6. Discusión.....●
- ◆ 7. Conclusiones y recomendaciones.....●

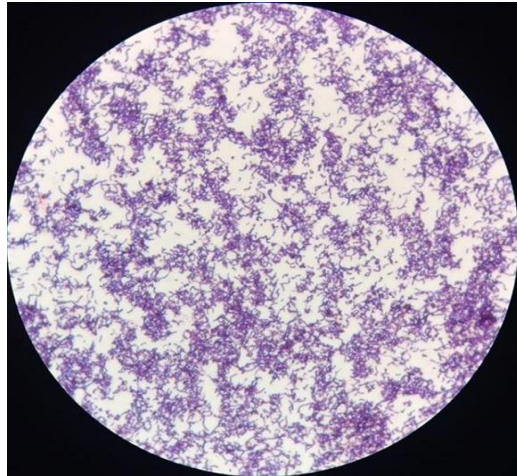
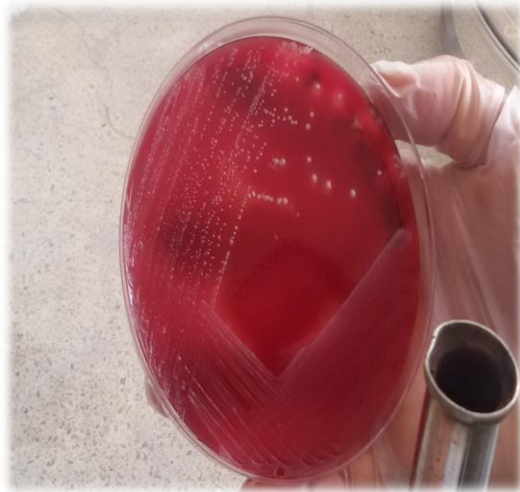
MARCO TEÓRICO

Cutibacterium acnes

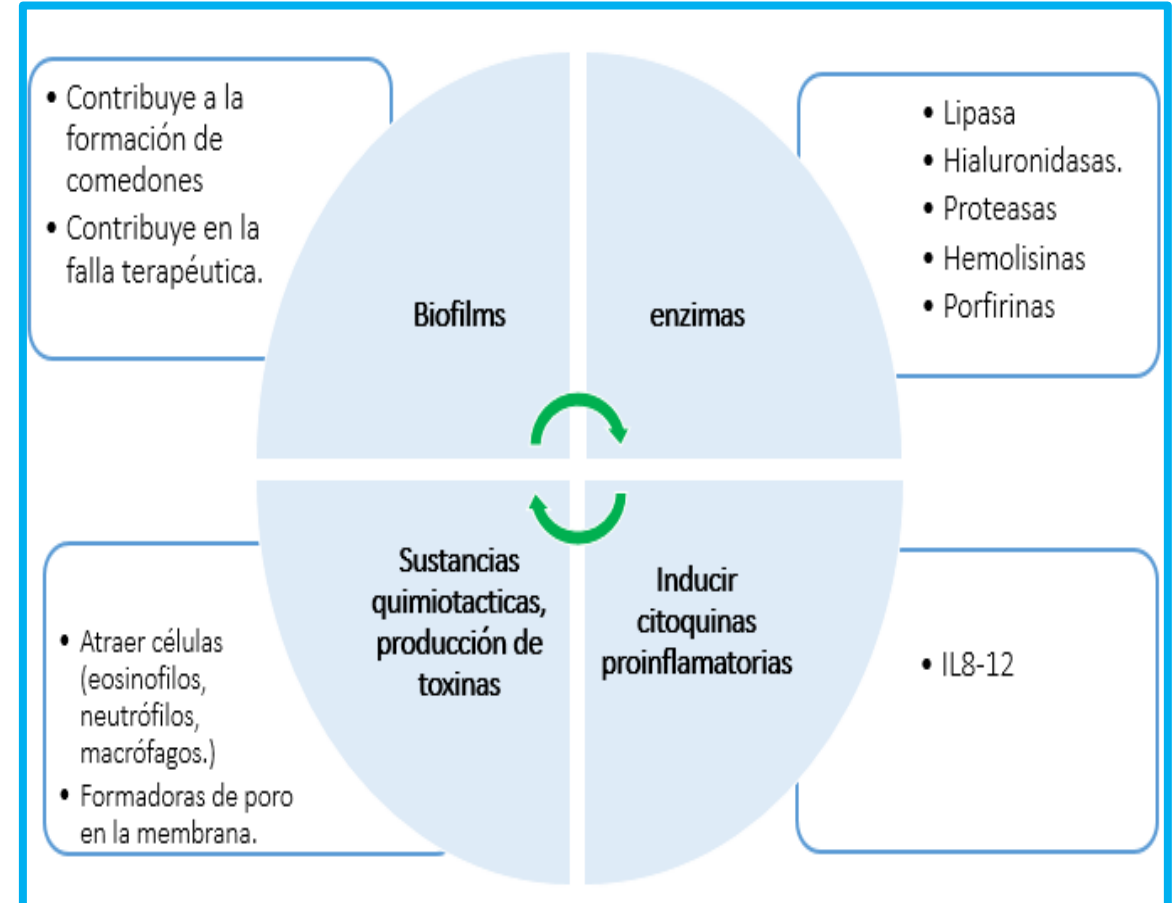
- **Anaerobias estrictas:** ausencia total de oxígeno.
- **Anaerobias facultativas:** presencia o ausencia de oxígeno.
- **Microaerófilas :** bajas cantidades de oxígeno.

MORFOLOGÍA

- Bacilo Gram positivo.
- Anaerobio facultativo .
- Flora comensal de la piel, 70%
- Inmóvil, no esporulado, sin capsula.
- β hemolítico – algunas especies
- Catalasa positivo.
- crecimiento lento de 7-14 días.
- Cinco biotipos(eritritol, sorbitol, ribosa).

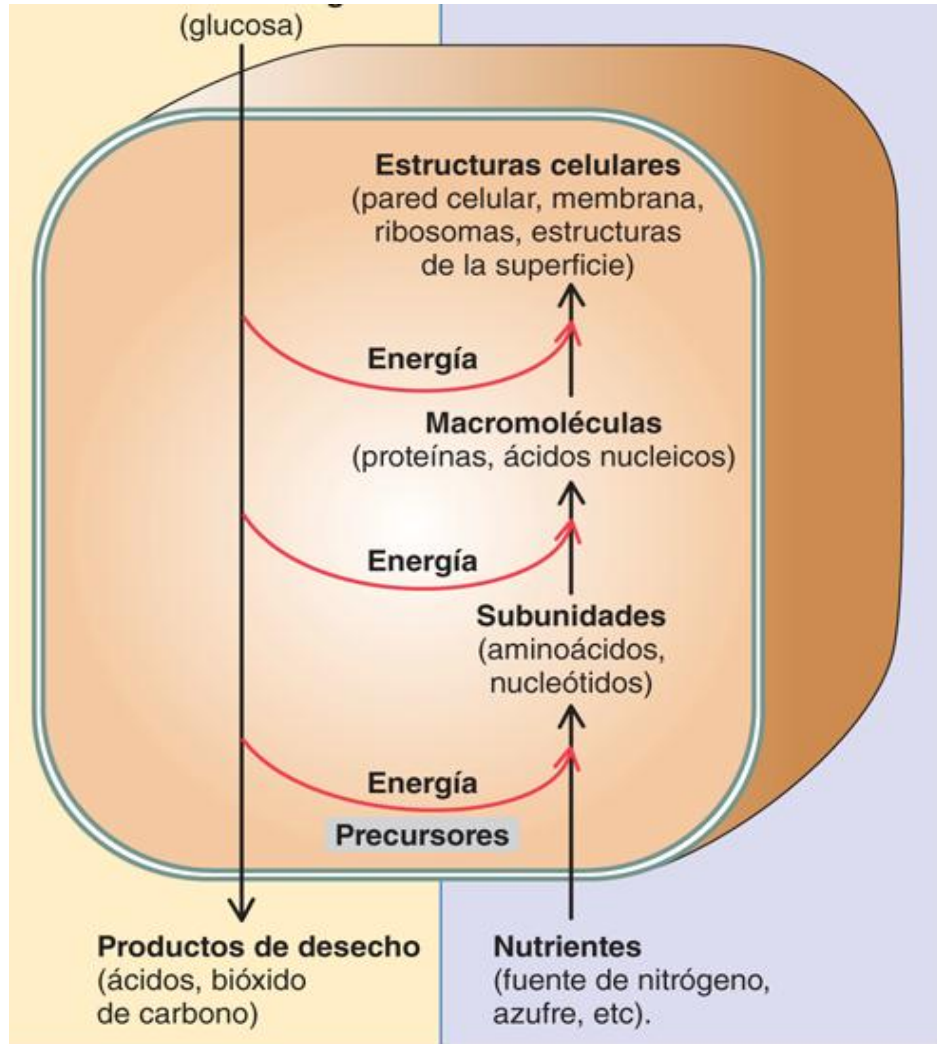


FACTORES DE VIRULENCIA

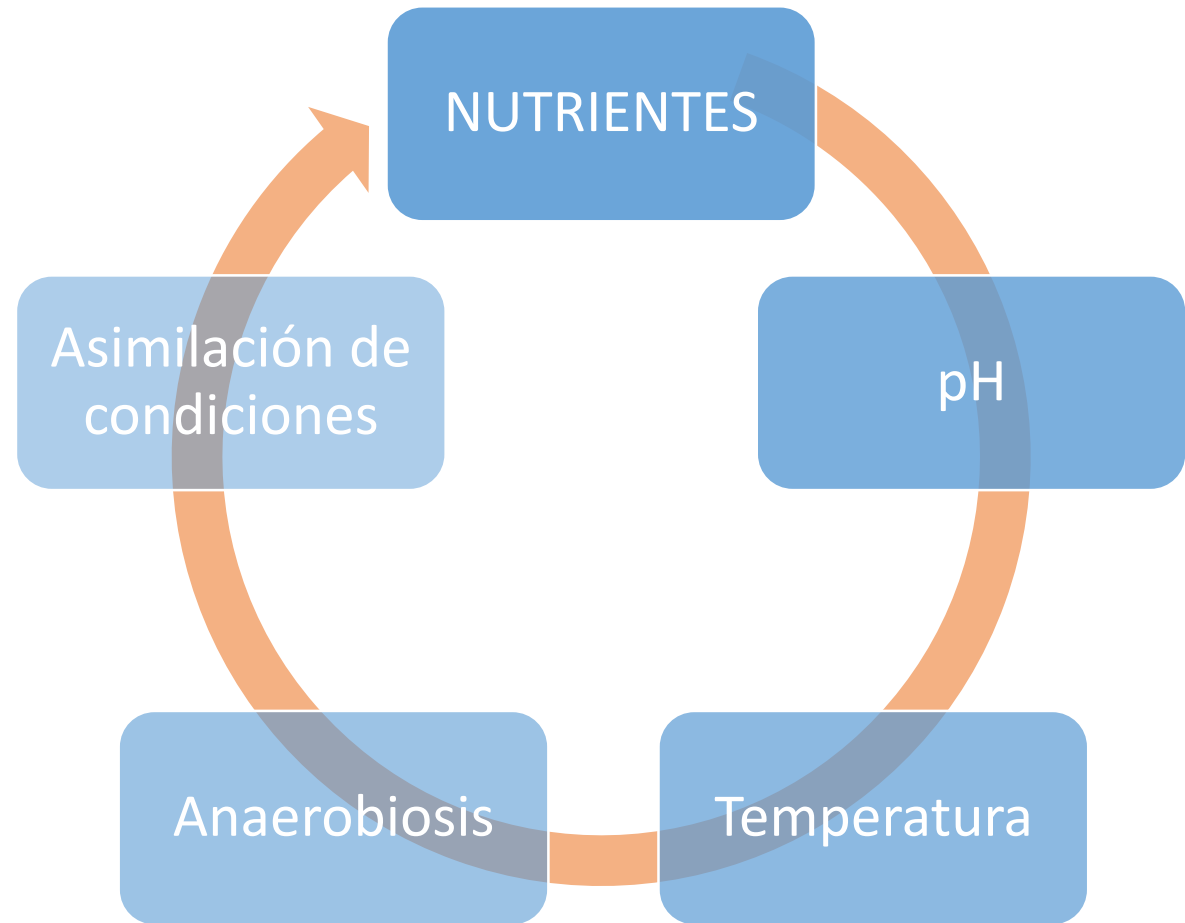


Beylot C, et al. 2013 – Bipul Kumar, et al. 2016.

MEDIOS DE CULTIVOS



nte: Karen C. Carroll, Stephen A. Morse, Timothy A. Mietzner, Steve Miller:
robiología médica, 27e: www.accessmedicina.com
echos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.



Agar CDC con sangre de cordero al 5%
Agar Columbia
Agar Wilkins
Agar Schaedler

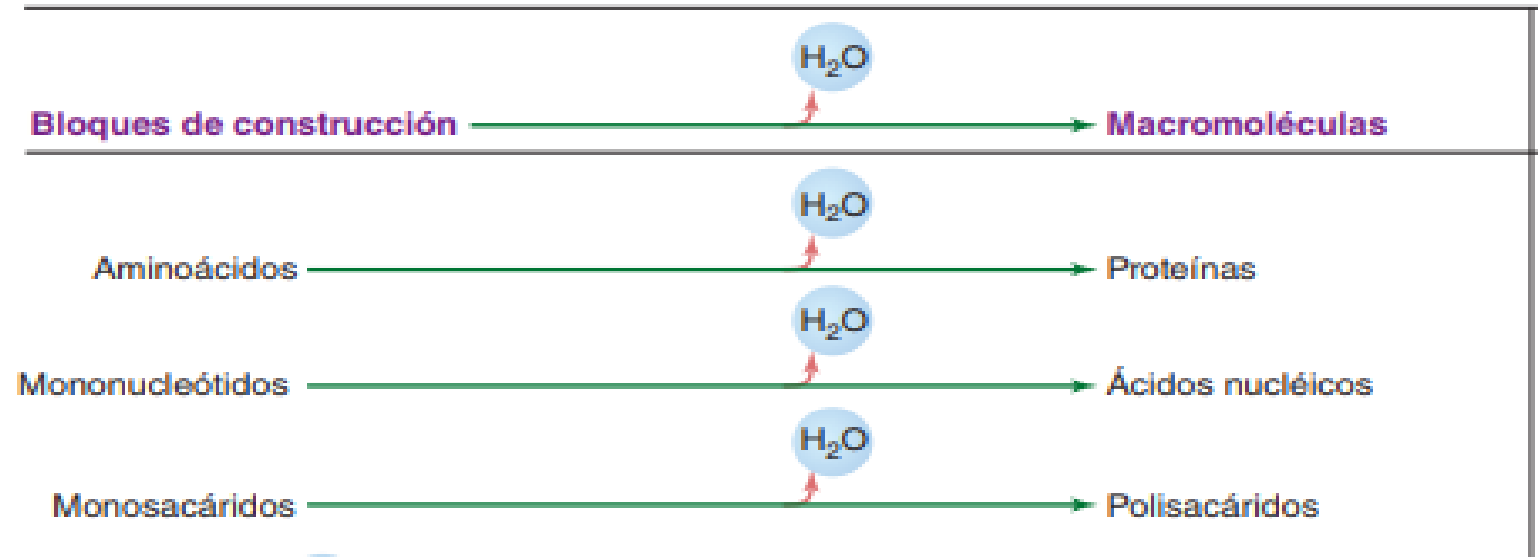
METABOLISMO

Carbohidratos Aminoácidos

- Glucosa
- Lactosa
- Manosa
- Galactosa
- Fructosa
- Eritritol
- Adonitol
- Arabinosa
- Serina
- Arginina
- Fenilalina
- Metionina
- L-alanina
- Glutamato

*Glicerol.

Wood – Werkman : pirúvico \longrightarrow ácido propionico.



Serie de reacciones , donde hay intercambio de electrones, con el fin de volver la estructura inicial en una estructura más sencilla

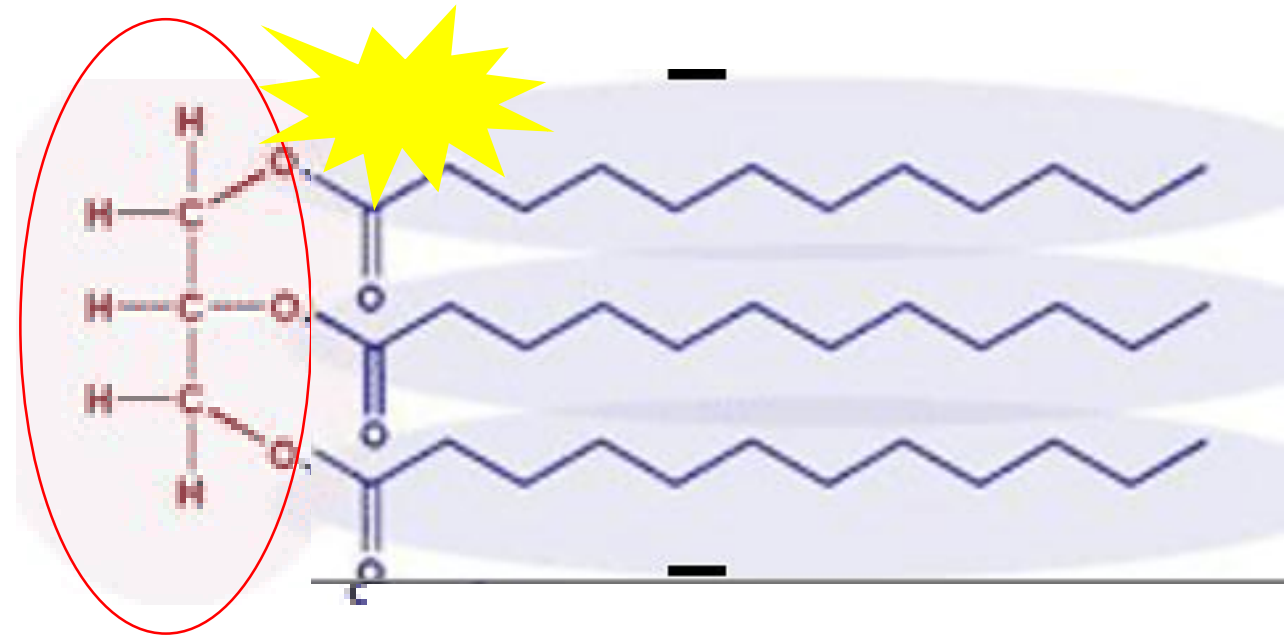
Utilización de moléculas para la formación de nuevas macromoléculas para la proliferación

METABOLISMO

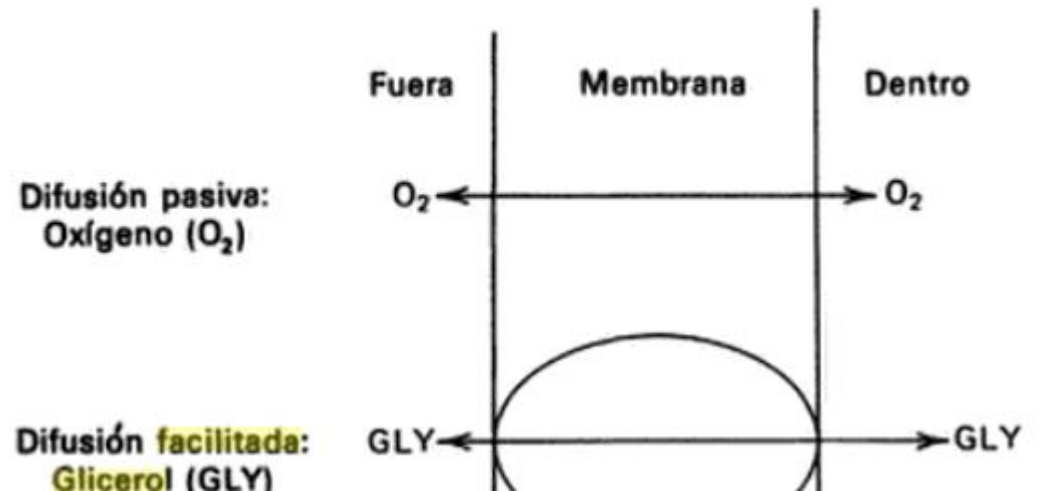
Lipasa

Desdobla triglicéridos presentes en piel.

- Restringir el crecimiento de otros Microorganismo
- Como fuente de carbono para la generación de energía.



Efecto del medio sobre el crecimiento microbiano



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

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

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

Primer reporte de resistencia fue en EE.UU 1997

*Gallitano M, et al.2018

*Kvich L, et al.2016 - *Lavergne V, et al. 2017.

PREGUNTA PROBLEMA

¿Cuál es el medio de cultivo más adecuado para realizar el aislamiento del *Cutibacterium acnes* a partir de muestras biológicas?

OBJETIVOS

General

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

Específicos

Analizar los diferentes medios descritos en protocolos encontrados en la literatura científica para el aislamiento bacteriológico de *Cutibacterium acnes*.

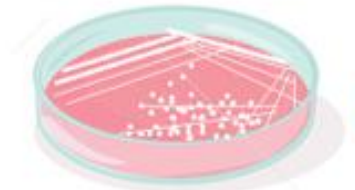
Proponer tres medios de cultivo para el aislamiento de *C.acnes* usando como control la cepa ATCC 11827.

Evaluar la recuperación, viabilidad, pureza y rendimiento bacteriano de *Cutibacterium acnes* en el medio de cultivo seleccionado a partir de las muestras de comedones en piel.

METODOLOGIA

C. acnes ATCC 11827 en Agar

Wilkins Chalgren.

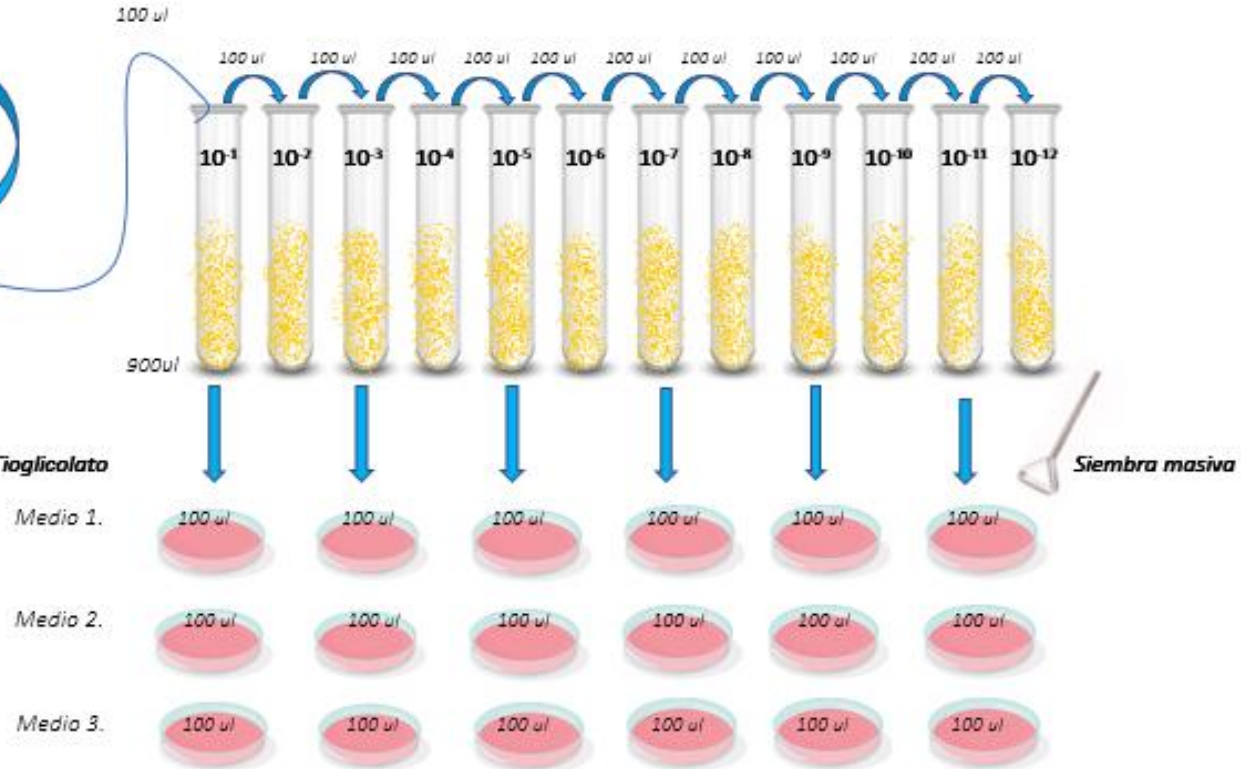


Tubo 3 McF



Caldo Tioglicolato

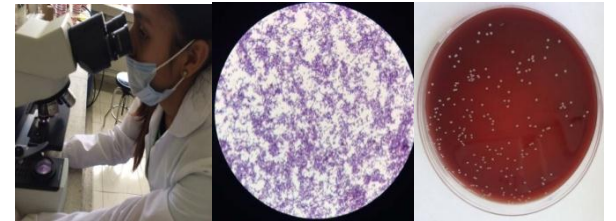
Diluciones seriadas en Caldos Tioglicolatos



Medios de cultivo propuestos

Medio No.3

ya agar	16g
evadura	5.5 g
odio	5.5 g
>	0.005g
rdero	0.1ml
	5%



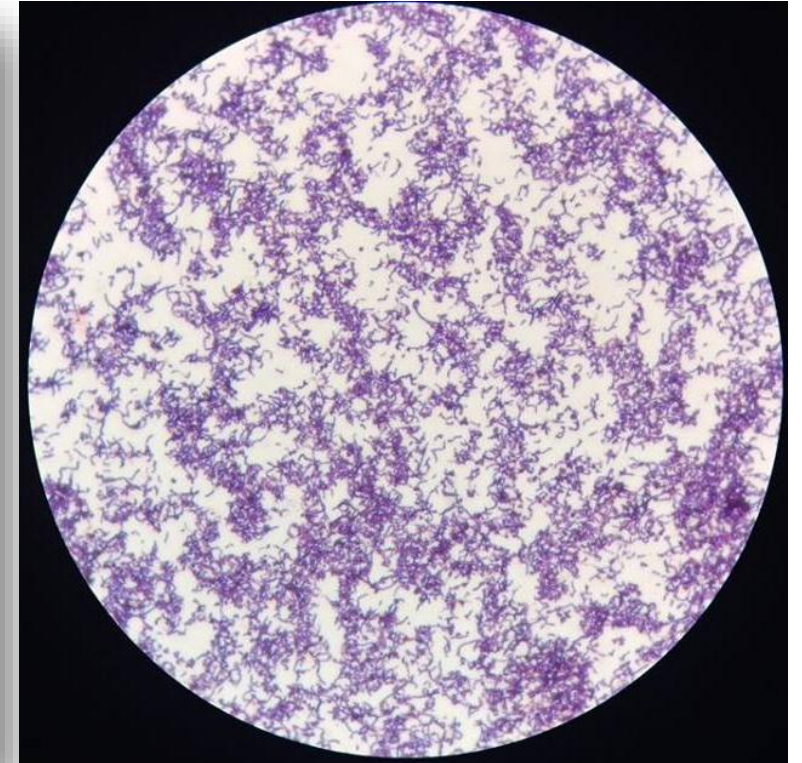
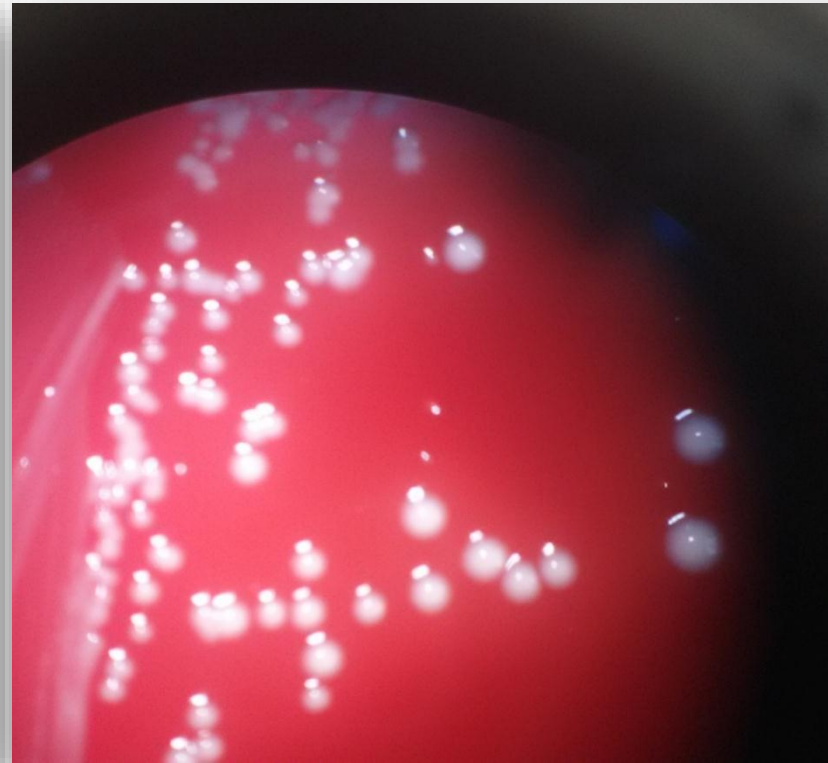
RESULTADOS

<i>Wilkins T, Chalgren S. 1976</i>	Triptona, peptona de gelatina, extracto de levadura, glucosa , cloruro de sodio , L-arginina , piruvato de sodio , menadiona , hemina, agar, sangre.
<i>Brazier J, Goldstein E. 1990</i>	Digerido pancreático de caseína, digerido péptico de tejido animal, glucosa, extracto de levadura, cloruro sódico, bisulfito sódico , agar, sangre de caballo.
Becton Dickinson.	Digerido pancreático de caseína, L-cistina, digerido péptico de tejido animal, Hemina, digerido papaico de harina de soja, vitamina K1, glucosa , extracto de levadura, agar, Cloruro sódico, Fosfato dipotásico, sangre de cordero desfibrinada 5%.

Agar-agar
Extracto de levadura
Glucosa
Peptona
Cloruro de Sodio
Hemina
Vitamina K
Triptona
Tripticasa de soya
Glicerol
Sangre de cordero

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS Y MICROSCOPICAS DE *C. acnes* ATCC 11827 en MEDIO WILKINS CHALGREN.

La cepa creció luego de 7 días de incubación, sus características microscópicas y macroscópicas fueron acordes con *C. acnes*.



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

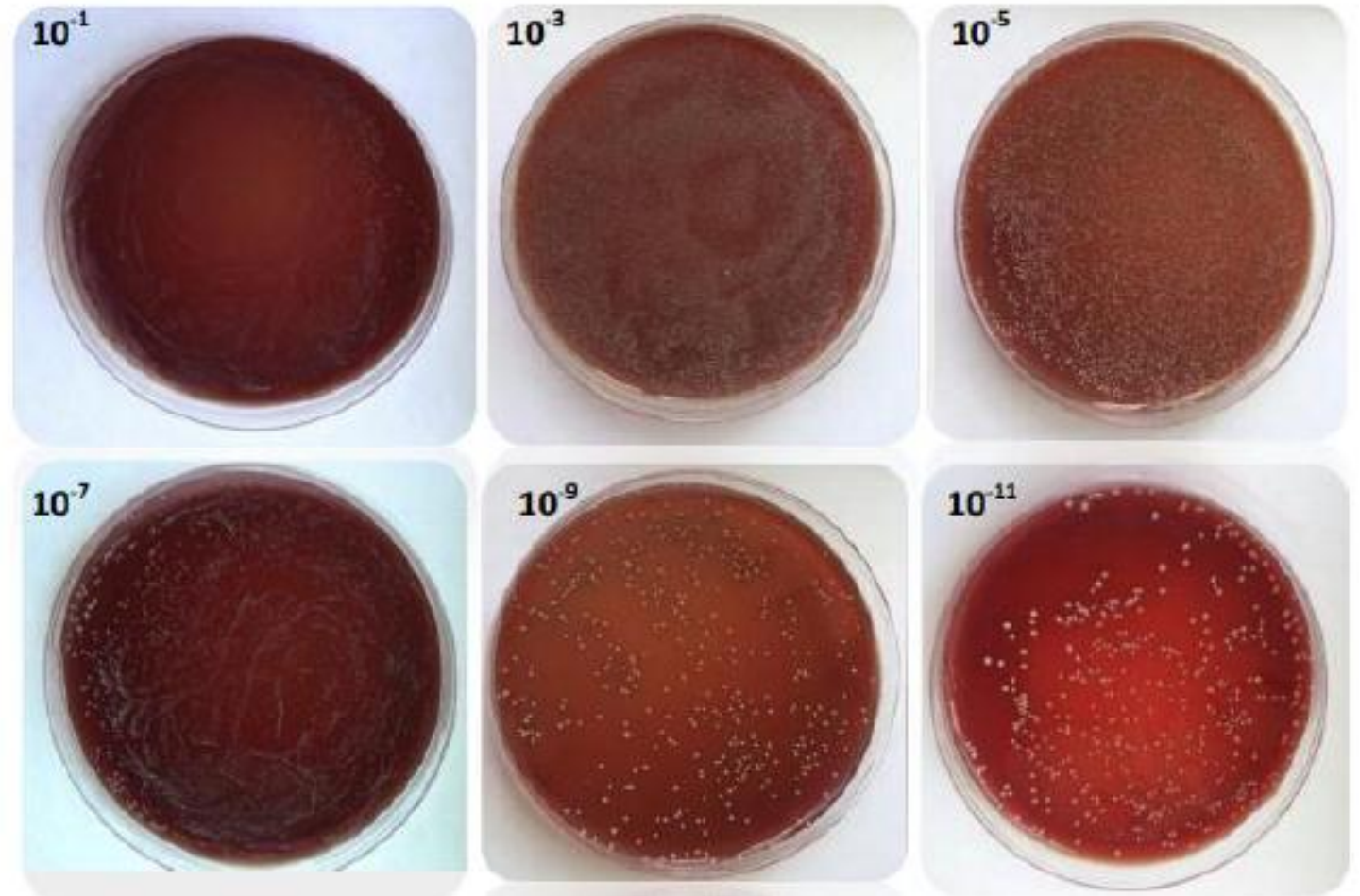
Fuente: Autoras

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

Medio No.1	
Agar-agar	16g
Extracto de levadura	5.5g
Glucosa	1.1g
Cloruro de Sodio	5.5g
Hemina	0.005g
Glicerol	11ml
Sangre de cordero	5%

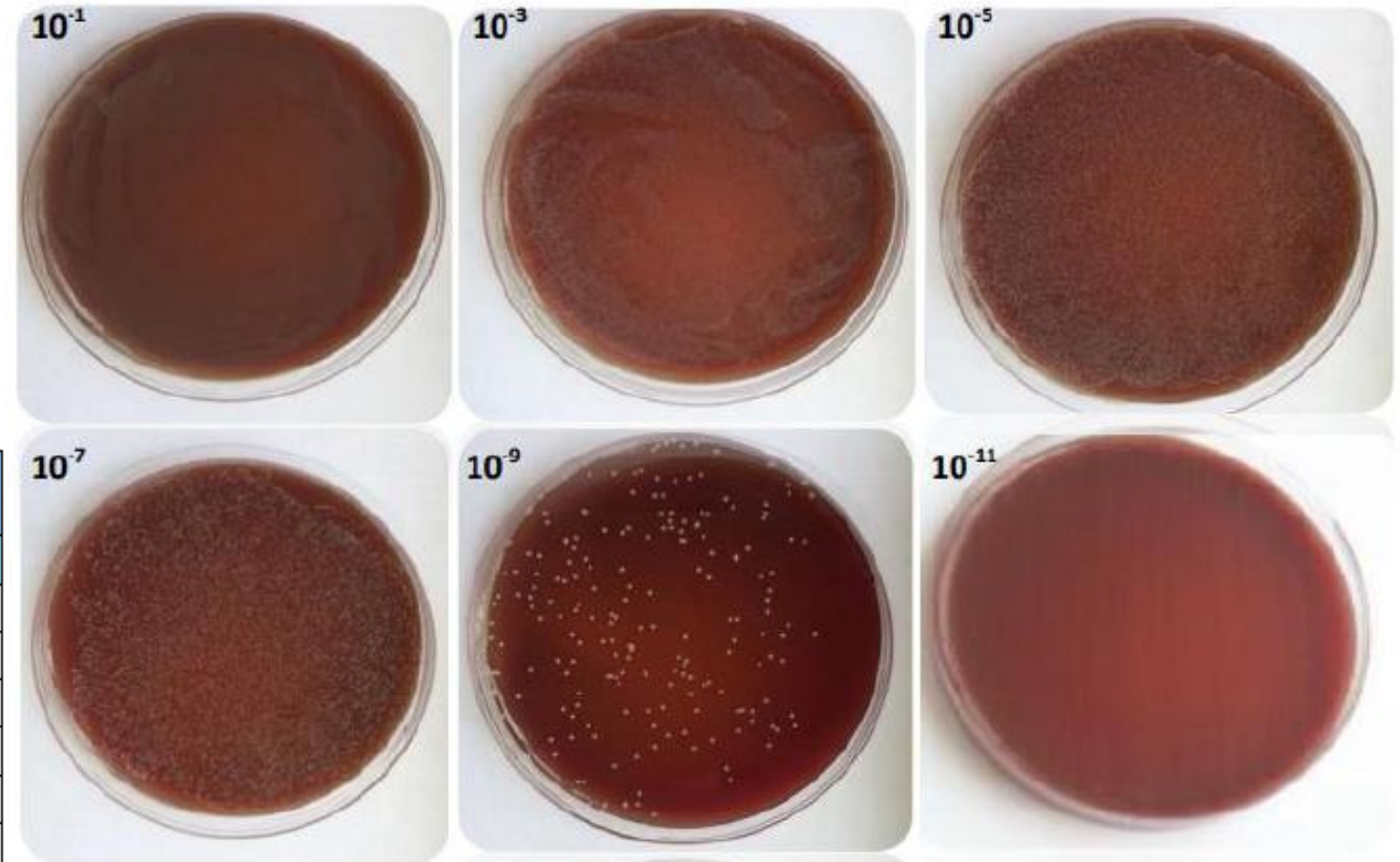
Crecimiento en UFC de la ATCC en las diferentes diluciones en el medio No. 1. Durante los 10 días de incubación.

DIA \ DIL	5 DIAS	7 DIAS	10 DIAS
	UFC	UFC	UFC
10^{-1}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-3}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-5}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-7}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-9}	303	341	341
10^{-11}	187	216	220



Crecimiento de *C. acnes* cepa ATCC 11827 en el medio de cultivo No. 2.

Medio No. 2	
Agar-agar	16g
Extracto de levadura	5.5g
Glucosa	1.1g
Peptona	11g
Cloruro de Sodio	5.5g
Hemina	0.005g
Glicerol	11ml
Sangre de cordero	5%



Crecimiento en UFC de la ATCC en las diferentes diluciones en el medio No. 2. Durante los 10 días de incubación.

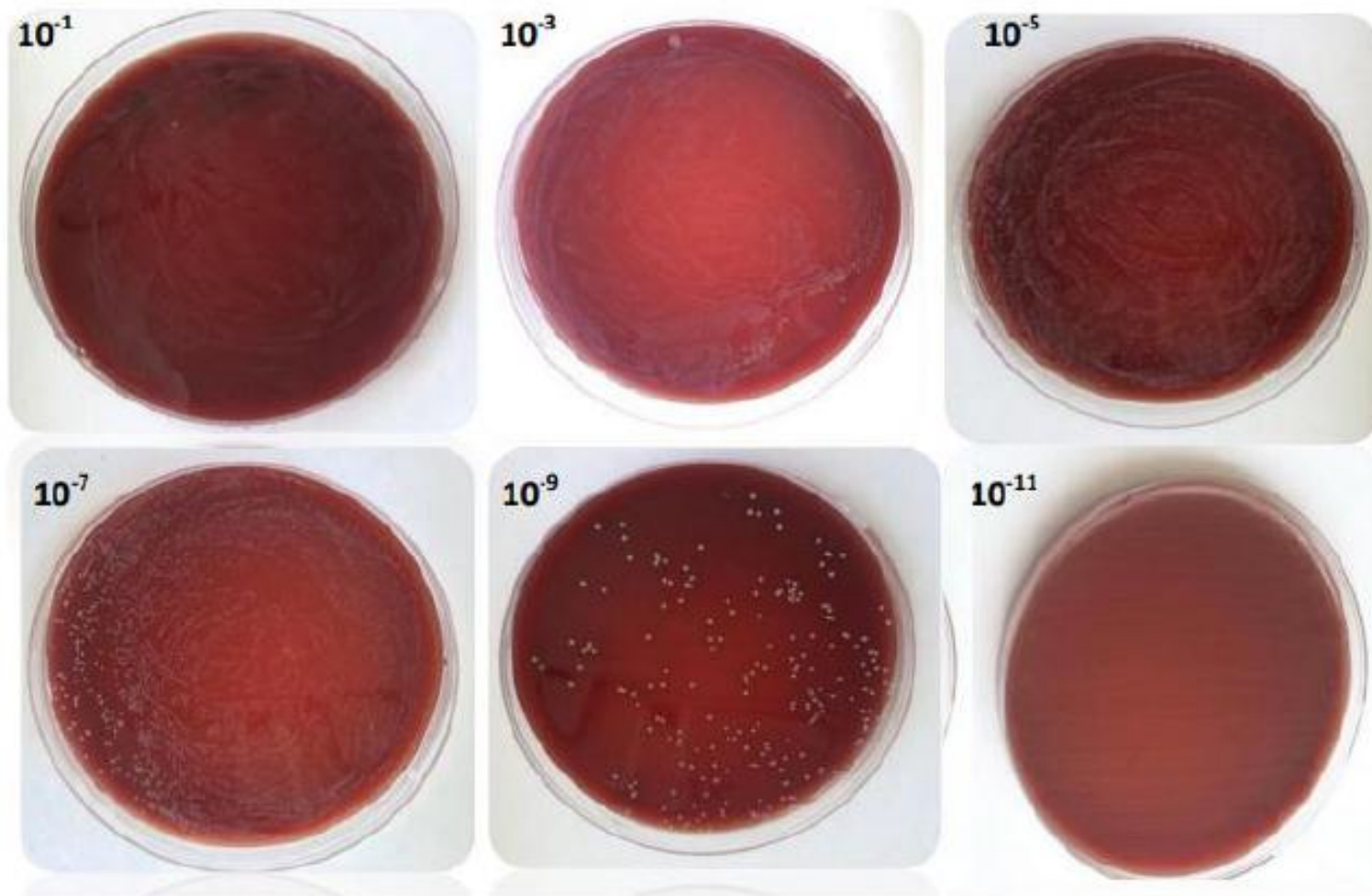
DIA \ DIL	5 DIAS	7 DIAS	10 DIAS
	UFC	UFC	UFC
10^{-1}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-3}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-5}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-7}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-9}	89	138	138
10^{-11}	0	0	0

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

Medio No.3	
Tripticasa	16g
Triptona	5.5 g
Extracto de levadura	5.5 g
Cloruro de sodio	5.5 g
Hemina	0.005g
Vitamina K	0.1ml
Sangre de cordero	5%

Crecimiento en UFC de la ATCC en las diferentes diluciones en el medio No. 2. Durante los 10 días de incubación.

DIA \ DIL	5 DIAS	7 DIAS	10 DIAS
	UFC	UFC	UFC
10^{-1}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-3}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-5}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-7}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-9}	37	85	112
10^{-11}	0	0	0



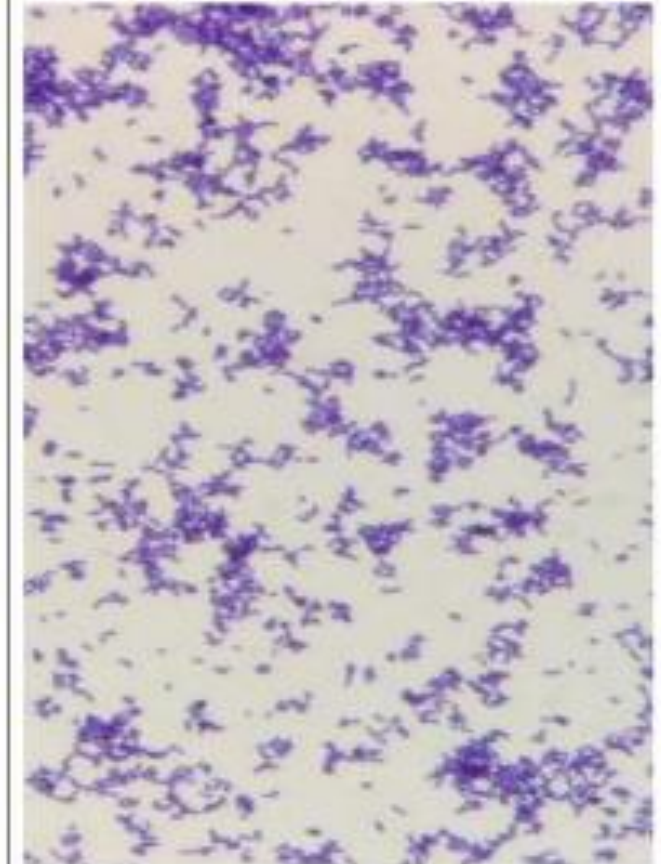
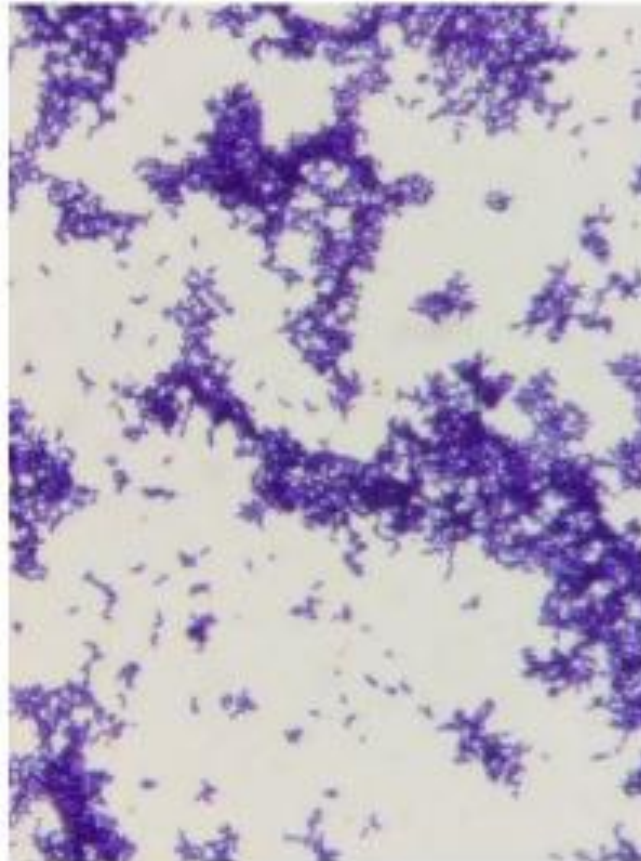
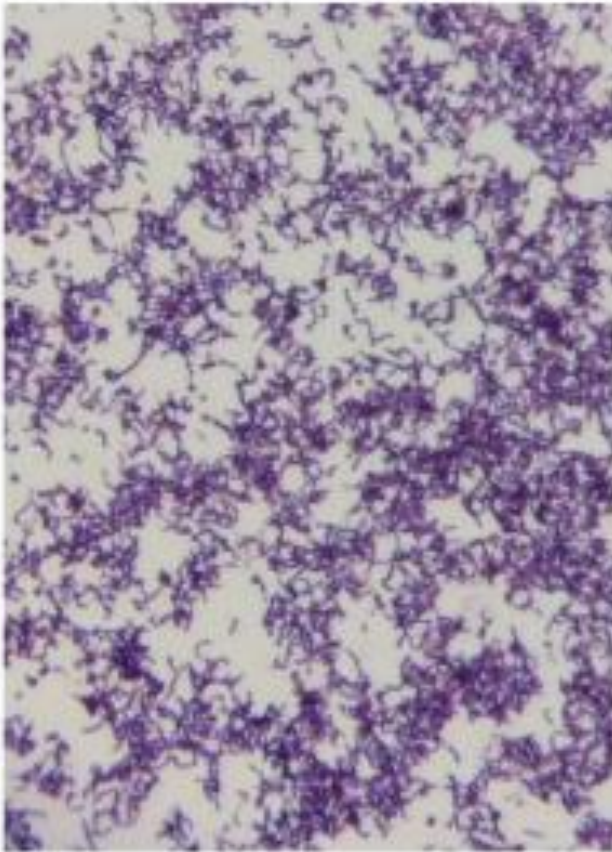
Características microscópicas mediante coloración de Gram de *C. acnes* cepa ATCC 11827 en los tres medios de cultivo propuestos.

MEDIO 1

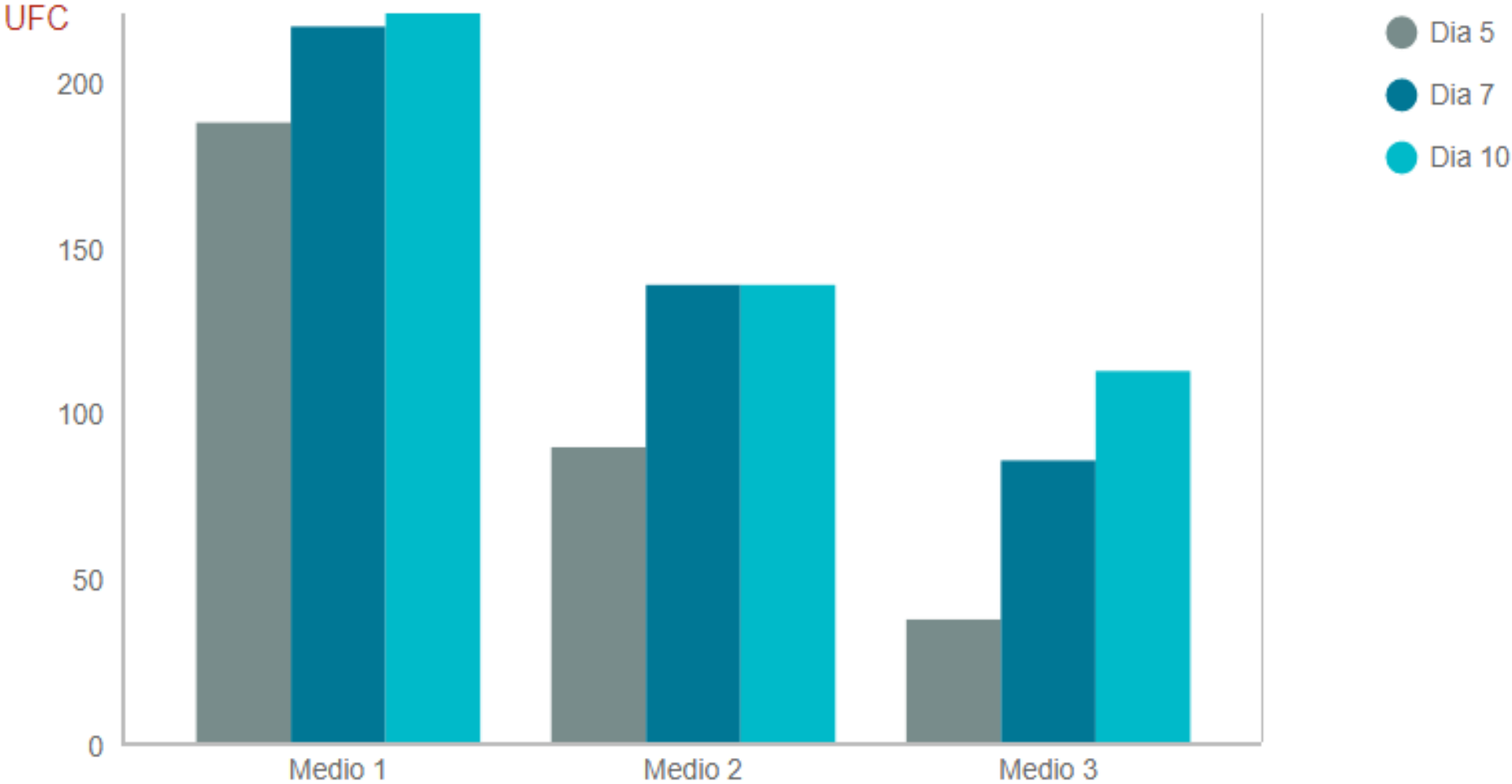
MEDIO 2

MEDIO 3

Bacilos curvos Gram positivos pleomórficos (Agrupados como letras chinas).



Recuperación de la cepa *C. acnes* ATCC 11827 en los tres medios de cultivo propuestos durante los días de incubación.



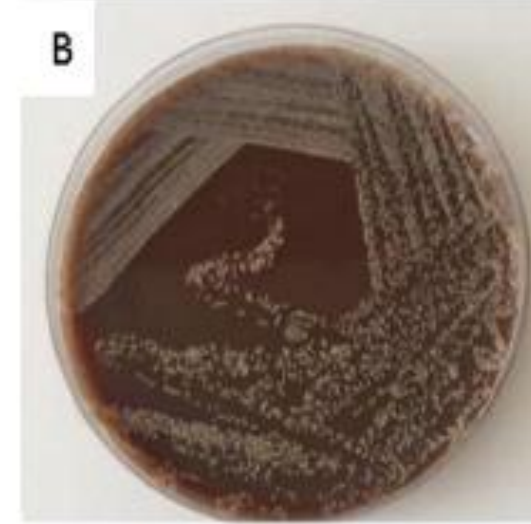
Crecimiento en el medio No. 1 de *C. acnes* a partir de muestras de comedones en piel

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

Crecimiento en el medio No. 1, de mu de paciente

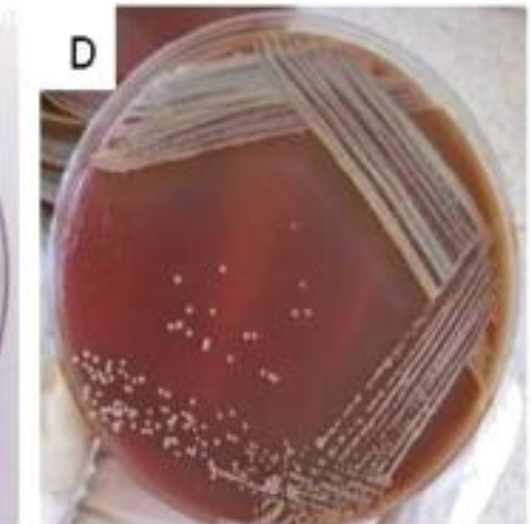
MUESTRA	DESCRIPCIÓN
Paciente 1 2017121401	Colonias pequeñas blanco.
Paciente 2 2017121402	Colonias pequeñas blanco.
Paciente 3 2017121403	Colonias pequeñas blanco.
Paciente 4 2017121404	Colonias grandes redondas aplanadas
Paciente 5 2017121405	Colonias pe
Paciente 6 2017121406	Colonias pe
Paciente 7 2017121407	Colonias gr
Paciente 8 2017121408	Colonias pe
Paciente 9 2017121409	Colonias pe
Paciente 10 2017121410	Colonias pe

MUESTRA	RECUPERACION DIRECTA EN PLACA	RECUPERACION DESDE EL CALDO
2017121401	<i>Cutibacterium acnes</i>	No fue necesario
2017121402	<i>Cutibacterium acnes</i>	No fue necesario
2017121403	<i>Cutibacterium acnes</i>	No fue necesario
2017121404	No Recuperado	No Recuperado.
2017121405	<i>Cutibacterium acnes</i>	No fue necesario
2017121406	<i>Cutibacterium acnes</i>	No fue necesario
2017121407	No recuperado	No Recuperado.
2017121408	<i>Cutibacterium acnes</i>	No fue necesario
2017121409	<i>Cutibacterium acnes</i>	No fue necesario
2017121410	<i>Cutibacterium acnes</i>	No fue necesario



Identificación de *C. acnes* recuperado de comedones con el sistema BBL CRYSTAL Anaerobe ID System.

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



DISCUSIÓN

Disponibilidad de nutrientes de los medios de cultivo

Glicerol

Actividad lipolitica → *Cutibacterium acnes*.

Medio de cultivo 1

Tessio Rebello et al.1978

Puhvel M. et al. 1975

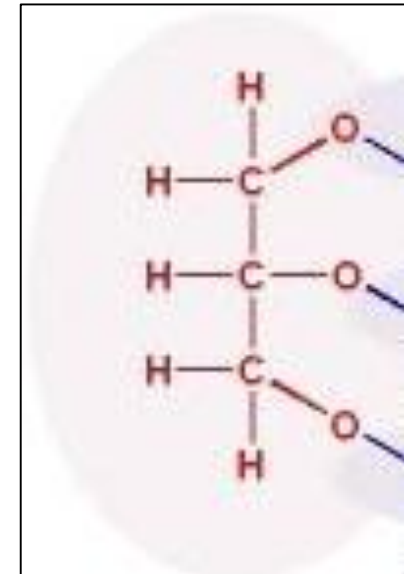
Medio de cultivo 2

L. Corrales, D Romero et al. 2015

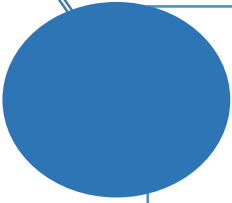
Medio de cultivo 3

Karl J. et al. 2017

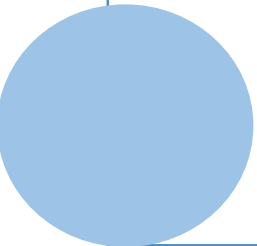
Glicerol



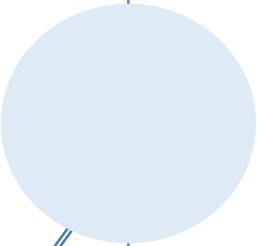
CONCLUSIONES



Se observó que la adición del glicerol al medio optimiza la recuperación de *C. acnes* porque al adicionarle la molécula libre el microorganismo hace un ahorro de energía.



El medio de cultivo numero 1 presento una eficacia del 100% en la recuperación del microorganismo, ya que se recupero *C. acnes* en la totalidad de muestras.



El medio de cultivo propuesto se considera una Herramienta útil en el diagnostico microbiológico de infecciones por *C. acnes* debido a que ofrece un periodo de recuperación mas rápido donde el microorganismo conserva las caracterices microscópicas y macroscópicas descritas lo que facilita su identificación.

RECOMENDACIONES

Se recomienda seguir realizando estudios mas avanzados que permitan estudiar el metabolismo de *C. acnes*; de igual manera seguir los ensayos del medio con un número de muestras mayor, preferiblemente de orígenes clínicos diferentes en las que se vea implicado *C. acnes*.

AGRADECIMIENTOS

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

Agradecemos a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y a cada uno de los docentes que nos formaron todos estos años integralmente, por brindarnos las herramientas que nos permitirán desenvolvemos en el campo profesional.

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

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

Gracias!

REFERENCIAS

1. Mendoza N, Hernandez P, et al. Antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolates from acne patients in Colombia. *International Journal of Dermatology* 2013, 52: 688–692
2. Lavergne V, Malo M, et al. Clinical impact of positive *Propionibacterium acnes* cultures in orthopedic surgery. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*. 2017,103 :307–314. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.otsr.2016.12.005>
3. Kvich L, et al. Incidence of *Propionibacterium acnes* in initially culture-negative thioglycollate broths a prospective cohort study at a Danish University Hospital. *Rev Clinical Microbiology and Infection*. 2016,22:941-945. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.07.036>
4. Dow R, et al. *Laboratory Methods in Anaerobic Bacteriology* CDC laboratory manual. public health service centers for disease control atlanta, georgia 30333 [Internet]. 2015. [citado 6 abril 2017], disponible en : https://stacks.cdc.gov/view/cdc/7666/cdc_7666_DS1
5. Dessinioti C, Katsambas A. The role of *Propionibacterium acnes* in acne pathogenesis: facts and controversies. *Clinics in Dermatology* [Internet]. 2010 [cited 4 April 2017];28(1):2-7. Available from: <http://10.1016/j.clindermatol.2009.03.012>
6. Capoor M, Ruzicka F, Machackova T, Jancalek R, Smrcka M, Schmitz J et al. Prevalence of *Propionibacterium acnes* in Intervertebral Discs of Patients Undergoing Lumbar Microdiscectomy: A Prospective Cross-Sectional Study. *PLOS ONE*. 2016;11(8):e0161676.
7. Butler-Wu S, Burns E, Pottinger P, Margaret A, Rakeman J, Matsen F et al. Optimization of Periprosthetic Culture for Diagnosis of *Propionibacterium acnes* Prosthetic Joint Infection. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 2011 [cited 10 February 2017];49(7):2490-2495. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3147880/>
8. Wilkins T, Chalgren S. Medium for Use in Antibiotic Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1976;10(6):926-928.
9. Kishishita M, Ushijima T, Ozaki Y, Ito Y. Biotyping of *Propionibacterium acnes* isolated from normal human facial skin. [Internet]. *Aem.asm.org*. 1979 [cited 10 March 2017]. Available from: <http://aem.asm.org/content/38/4/585.short>
10. Brazier J, Goldstein E, Citron D, Ostovari M. Fastidious anaerobe agar compared with Wilkins-Chalgren agar, brain heart infusion agar, and brucella agar for susceptibility testing of *Fusobacterium* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1990;34(11):2280-2282.

10. Brazier J, Goldstein E, Citron D, Ostovari M. Fastidious anaerobe agar compared with Wilkins-Chalgren agar, brain heart infusion agar, and brucella agar for susceptibility testing of Fusobacterium species. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1990;34(11):2280-2282.
11. Kishishita M, Ushijima T y et al. New Medium for Isolating Propionibacteria and Its Application to Assay of Normal Flora of Human Facial Skin. Applied and Environmental Microbiology, 1980,40:1100-1105.
12. Perr A, Lambert A. Propionibacterium acnes. Journal compilation . The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology 42 (2006) 185–188. disponible en: doi:10.1111/j.1472-765X.2006.01866.
13. Kishishita M,Ushijima T,Ozaki Y,Ito Y. Biotyping of Propionibacterium acnes Isolated from Normal Human Facial Skin. Environmental Microbiology, oct. 1979, p. 585-589
14. Avilés E. Caracterización Bioquímica y Susceptibilidad a Antimicrobianos de Cepas de *Propionibacterium Acnés* Aisladas de Personas con Acné. Universidad de Chile (pregrado). Santiago de Chile 2010.
15. Csukas, Z., Banizs, B. and Rozgonyi, F. (2004) Studies on the cytotoxic effects of Propionibacterium acnes strains isolated from cornea. Microb Pathog 36, 171–174
16. W. Noble, The skin microflora and microbial skin disease Cambridge University Press 1993,390pp, editorial 2004. Disponible en: <https://books.google.com.co/books>
17. Kumar B, Pathak R. Nuevas ideas sobre la patogénesis del acné: Explorando el papel de las poblaciones microbianas asociadas al acné. ScienceDirect. 2017; 34: 67 - 73.
18. Mahto A. Acné común. ScienceDirect. 2017; 48: 386 – 389
19. Mahto A. Acné vulgar. ScienceDirect. 2017; 45 (6): 386 - 389.
20. Grupo Colombiano del Estudio en Acné. Guías colombianas para el manejo del acné: una revisión basada en la evidencia. Rev Aso Colomb Dermatol 2011;19:129–58.
21. Aubin GG et al. Propionibacterium acnes, an emerging pathogen: from acne to implant-infections, from phylotype to resistance. - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2014 [cited 3 May 2017]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24656842>
22. Iseki H, Kayaba Y, Tamura T, Uzawa H, Suko Y, Miyamoto K. Localized pericarditis with calcifications mimicking a pericardial tumor. Intern Med.