



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y SUSCEPTIBILIDAD A
ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE PROPIONIBACTERIUM
ACNES AISLADAS DE PERSONAS CON ACNÉ**

EVELYN CRUZ AVILÉS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva
Animal

PROFESOR GUÍA: DRA. MARÍA ANGÉLICA MARTÍNEZ T.

SANTIAGO, CHILE
2010



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE PROPIONIBACTERIUM ACNES AISLADAS DE PERSONAS CON ACNÉ

EVELYN CRUZ AVILÉS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva
Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : M ^a ANGÉLICA MARTÍNEZ TAGLE
PROFESOR CONSEJERO: CONSUELO BORIE POLANCO
PROFESOR CONSEJERO: JOSÉ PIZARRO LUCERO

SANTIAGO, CHILE
2010

*"Todos los hombres son sabios, unos
antes, los otros después"*

Dedicada a mis padres y hermana con cariño.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero expresar mis agradecimientos a todos quienes de una u otra forma participaron en la elaboración de este documento.

Agradezco a los médicos Vicky Royzen, Fernanda Martin, Walter Gûbelin, quienes ayudaron en la recolección de las muestras clínicas.

Agradezco también a los pacientes que aceptaron participar del estudio voluntariamente, a mis profesores de carrera, María A. Morales y María L. Sánchez, a mis compañeros Carlos Maturana y George Ayala quienes me apoyaron en el proceso, mi ex jefe Alex Urban que insistió en que terminara mi tesis frente a la adversidad, a mi profesor guía Dra. María Angélica Martínez quien con su apoyo y buena disposición me ayudó a concluir esta memoria.

Agradezco también a mis familiares y amigos que se preocuparon siempre por proporcionarme la ayuda necesaria requerida.

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE GENERAL.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
RESUMEN.....	v
SUMMARY.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
Hipótesis.....	15
Objetivo General.....	15
Objetivos Específicos.....	15
III. MATERIALES Y METODOS.....	16
Obtención de muestras.....	16
Criterios de selección.....	16
Aislamiento en medios de cultivo.....	16
Identificación de <i>P. acnes</i>	17
Caracterización bioquímica convencional.....	17
Caracterización bioquímica mediante sistema comercial.....	18
Tipificación bacteriana.....	18
Sensibilidad antimicrobiana.....	18
Caracterización molecular de la resistencia a macrólidos.....	20
IV. RESULTADOS.....	22
V. DISCUSIÓN.....	28
VI. CONCLUSIONES.....	34
VII. PROYECCIONES DEL TRABAJO.....	34
VIII. REFERENCIAS.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

		Páginas
Figura 1	Folículo Pilosebáceo	2
Figura 2	Comedón	7
Figura 3	Progresión de las lesiones en acné	9
Figura 4	Manifestaciones clínicas de acné vulgar	9
Figura 5	Patogenia del acné vulgar	10
Figura 6	Distribución de los casos clínicos de acuerdo a la severidad del acné y al biotipo aislado	23
Figura 7	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación mediante PCR del gen <i>erm</i> (X)	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla Nº 1	Grado de severidad de lesiones de acné inflamatorio	9
Tabla Nº 2	Biotipificación de <i>P. acnes</i> , basado en el test de fermentación de azúcares	11
Tabla Nº 3	Relación entre biotipo y serotipo de <i>P. acnés</i> , basado en la detección de galactosa en la pared celular	11
Tabla Nº 4	Distribución de biotipos de <i>P. acnes</i> obtenidos de personas y pacientes con acné vulgar	22
Tabla Nº 5	Diversidad sacarolítica de biotipos de <i>P. acnes</i> obtenidos en la Región Metropolitana	24
Tabla Nº 6	Actividad lipolítica <i>in vitro</i> de cepas de <i>P. acnes</i> demostrada por medio de su actividad Fosfolipasa C	24
Tabla Nº 7	Perfiles de resistencia encontrados en las 25 cepas estudiadas	25
Tabla Nº 8	Susceptibilidad antimicrobiana <i>in vitro</i> de cepas de <i>P. acnes</i>	25
Tabla Nº 9	Resumen de resultados de alineamientos encontrados	27

RESUMEN

Con el objeto de determinar la presencia relativa de los biotipos, propiedades bioquímicas y susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Propionibacterium acnes* aisladas de personas con diagnóstico de acné vulgar, se realizó un estudio microbiológico. Las muestras fueron obtenidas de lesiones faciales, efectuándose posteriormente cultivo, análisis bioquímico, prueba de susceptibilidad a antimicrobianos y en cepas resistentes se buscó las bases moleculares de esta resistencia.

De un total de 42 muestras, se aislaron 25 cepas de *P. acnes* de diferentes pacientes. Todas ellas fueron biotipificadas, de acuerdo a su capacidad sacarolítica, encontrándose con mayor frecuencia el biotipo III y en orden decreciente los biotipos IV, V y I. El biotipo III fue asociado también con los casos más severos de acné vulgar.

Las cepas del biotipo III presentaron mayor capacidad sacarolítica que los otros biotipos. Por otra parte, el 90% de las cepas presentó actividad proteolítica sobre prolina, leucina y fenilalanina, independiente del biotipo de pertenencia. Además, el 20% de las cepas del estudio reaccionó con el sustrato fluorescente fosfato (biotipos I, III y IV).

En el estudio de susceptibilidad antimicrobiana fueron halladas dos cepas (8%) resistentes a macrólidos, con un patrón de resistencia fenotípica del tipo MLS_B. La CIM de eritromicina y clindamicina fue mayor a 2 µg/ml, en ambas cepas. No se encontraron cepas resistentes a tetraciclina.

Finalmente en las cepas resistentes se buscó la presencia del gen de resistencia *erm* (X). En ambas cepas se encontró un producto de amplificación, el cual fue confirmado mediante secuenciación del ADN de las cepas.

En conclusión, el biotipo III de *P. acnes* se aísla con mayor frecuencia en pacientes afectados por acné; tiene una mayor capacidad metabólica que los otros biotipos detectados y fue uno de los biotipos en que se encontró gen de resistencia, todo lo cual indica que este puede ser el biotipo más prevalente en la población chilena, lo que es preocupante por su relación con los casos más severos de acné vulgar.

SUMMARY

BIOCHEMICAL AND ANTIMICROBIAL STUDIES IN *PROPIONIBACTERIUM ACNES* STRAINS ISOLATED FROM ACNE LESIONS IN HUMANS

In order to determine the relative presence of the biotypes, biochemical properties and antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* strains isolated from individuals diagnosed with acne vulgaris, we performed a microbiological study with clinical specimens obtained from the facial skin. Microorganisms were isolated by culture and then characterized biochemically and subjected to antimicrobial susceptibility testing. The molecular basis of the resistance was also searched in resistant isolates.

Of 42 samples analysed, a total of 25 strains of *P. acnes* were isolated from different patients. All of them were biotyped according to their saccharolytic properties. Biotype III was the most frequent biotype isolated, being found in more of 50% of patients, followed in decreasing order by biotypes IV, V and I. Biotype III was also associated with more severe cases of *acne vulgaris*.

Biotype III isolates exhibited a more saccharolytic capacity than the other biotypes found. On the other hand, 90% of the strains showed proteolytic activity on proline, leucine and phenylalanine, independent of the biotype of belonging. Furthermore, 20% of these strains reacted with the fluorescent substrate phosphate (biotypes I, III and IV).

In the antimicrobial susceptibility analysis two macrolide resistant strains (8%) were found with a MLS_B phenotypic resistance pattern. Their minimal inhibitory concentrations to erythromycin and clindamycin was $\geq 2 \mu\text{g/ml}$. None tetracycline resistant strain were found.

Finally, resistant strains were searched for the presence of the gene *erm* (X) by PCR, detecting the resistance determinant in both isolates. The identity of the *erm* (X) gene was confirmed by DNA sequencing of amplification products.

In conclusion, *P. acnes* biotype III *was the most* frequent biotype isolated in patients affected by *acne vulgaris*. Isolates belonging to this biotype III had a major metabolic capacity to carbohydrates than the other isolated biotypes, and the *erm* (X) resistance gene was identified in two resistant isolates belonging to this biotype. All these findings suggest that biotype III isolates could be the most prevalent biotype in Chilean people, what is worrisome since it is related with more severe cases of acne.

I. INTRODUCCIÓN

La piel como órgano superficial del cuerpo humano y de los mamíferos en general, cumple importantes funciones de protección que requieren la integridad de su estructura. Las enfermedades que afecten a este órgano inducirán la disminución de su capacidad para mantener esta barrera defensiva. Por otro lado y en particular para los seres humanos, la visibilidad de las enfermedades cutáneas involucra una importante dimensión psicosocial. Estos dos aspectos hacen que en la actualidad exista una mayor preocupación por las patologías de la piel, tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de ellas.

Diversos métodos han profundizado en el estudio de la estructura y función de la piel, tales como microscopía electrónica, biología molecular y celular, bioquímica, genética, inmunología y microbiología. Estos han permitido conocer sus características y la forma en que interactúa con el medio interno y externo del organismo.

Los estudios microbiológicos realizados en piel humana describen la existencia de una pequeña proporción de bacterias anaerobias estrictas respecto de las bacterias aerobias, siendo *Propionibacterium acnes* el anaerobio más significativo, especialmente a nivel de las glándulas sebáceas. Esta bacteria tiene un importante rol en la patogénesis del acné, donde contribuye a la formación de lesiones inflamatorias debido a su capacidad de producir enzimas y factores quimiotácticos.

Durante más de 20 años se han utilizado antibióticos, principalmente las tetraciclinas, en el tratamiento del acné, pero ya a fines de los años noventa, se informa un aumento creciente de la resistencia a tetraciclinas en cepas de *P. acnes* en el mundo.

En Chile existe escasa información acerca de la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *P. acnes* aisladas de pacientes con acné y las cepas aisladas no han sido caracterizadas. Es por ello que este trabajo constituye un aporte al conocimiento de las características bioquímicas y susceptibilidad antimicrobiana de este agente bacteriano en la población chilena.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Estructura y función de la piel. La piel es un órgano superficial (no compacto) que reviste y protege la superficie externa del organismo. La superficie global (en el adulto) varía entre 1,6 - 2 m² y su espesor oscila entre 1,5 y 4 mm (sin tejido subcutáneo). Se compone de tres capas: epidermis, dermis y tejido subcutáneo.

La epidermis está constituida en un 90% por queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel. La dermis está constituida por fibroblastos y matriz extracelular y en ella se sitúa el sistema vascular, nervios cutáneos y sistema inmune celular. Finalmente el tejido subcutáneo, el cual se compone de células grasas y tejido conectivo (Rassner, 1999 a).

La piel forma además distintos anexos cutáneos, como uñas, pelos y glándulas. La glándula sebácea es una prolongación del folículo piloso, cuyo conducto secretor drena lateralmente en el folículo. El número y densidad de las glándulas sebáceas se corresponde con el de folículos pilosos (Rassner, 1999 a).

La glándula sebácea y el folículo piloso constituyen por lo tanto un folículo sebáceo, también llamado unidad pilosebácea localizándose sobre el rostro, el pecho y la espalda (Figura 1) (Brown y Shalita, 1998).

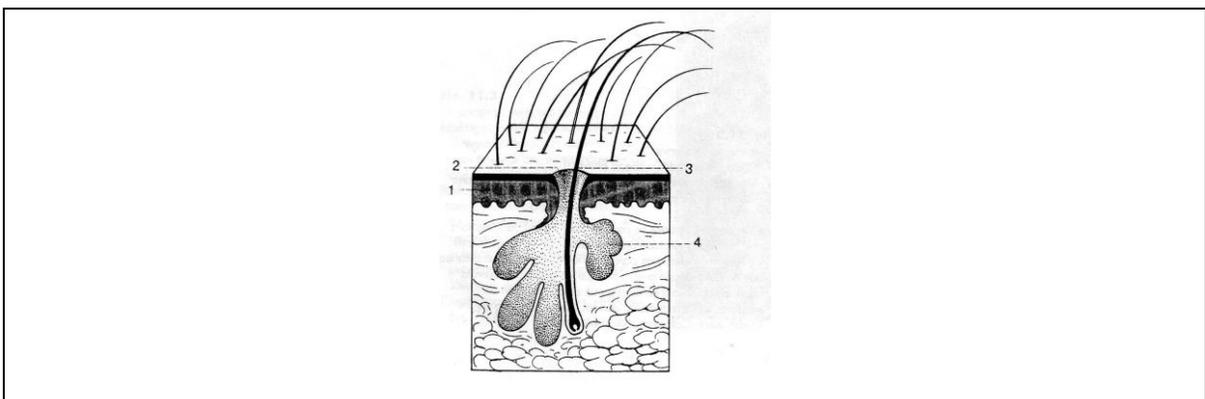


Figura 1. Folículo pilosebáceo. 1. Epidermis; 2. Infundíbulo; 3. Pelo velloso; 4. Lobulillos de las glándulas sebáceas. Fuente: Rassner, 1999 b.

La piel, como órgano externo del organismo, se enfrenta a una diversidad de factores ambientales y a microorganismos frente a los cuales cumple una función de protección y frontera. Pero también es capaz de impedir el intercambio incontrolado de sustancias entre el cuerpo y el entorno, contribuyendo así a mantener la homeostasis interna. La piel cumple, además, con una función sensitiva, una importante función metabólica, debido a que puede acumular agua y grasa y además participa en la síntesis de la vitamina D; por último desempeña un papel esencial en la comunicación psicosocial, sobretodo a nivel facial. Su aspecto será valorado para obtener conclusiones acerca de su edad, estado anímico, salud y carácter (Rassner, 1999 a).

Microbiota de la piel humana. La piel constituye el nicho ecológico más extenso del ser humano. Está colonizada por un número limitado de microorganismos residentes, los que son capaces de soportar el estrés asociado con las características físicas de la piel; tensión de oxígeno, concentración iónica y exposición a radiaciones U.V. (Allaker y Noble, 1993).

La microbiota cutánea residente está constituida por un predominio de bacterias grampositivas anaerobias facultativas, destacando las especies de los géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Corynebacterium*, mientras que entre las bacterias anaerobias estrictas destacan especies del género *Propionibacterium* (Funke *et al.*, 1997).

Cuatro grupos de microorganismos colonizan las áreas ricas en sebo: *Propionibacterium* (*P. acnes* y *P. granulosum*), *Staphylococcus*, *Micrococcus*, y la levadura *Malassezia furfur* (*Pityrosporum*), estando presentes tanto en la superficie de la piel como en los folículos sebáceos (Holland, 1989).

P. acnes. El género *Propionibacterium* está conformado por bacterias corineformes grampositivas, inmóviles, no esporuladas, que se agrupan en empalizada o "letras chinas". Las especies más significativas son *P. acnes*, *P. granulosum* y *P. avidum*. Crecen en forma óptima en anaerobiosis a 35° C. Se encuentran en la piel, cavidad oral, tracto gastrointestinal y urogenital (Bojar y Holland, 2004). Se distinguen por la formación de propionato y acetato como principales metabolitos de la degradación de la glucosa (Funke *et al.*, 1997).

En la piel, las propionibacterias habitan la superficie de las áreas sebosas y los folículos pilosebáceos contribuyendo a mantener el ecosistema cutáneo saludable al ocupar un nicho que, de otro modo, podría ser colonizado por microorganismos patógenos. *P. acnes* y *P. granulosum* son comúnmente aislados en áreas de la piel ricas en sebo (cabeza, pecho y espalda) con reservorio en el folículo pilosebáceo, (Puhvel *et al.*, 1975; Leeming *et al.*, 1984) mientras que *P. avidum* es localizado principalmente en la axila (Leyden *et al.*, 1975; McGinley *et al.*, 1978). Si bien *P. acnes* predomina sobre otros constituyentes de la microbiota normal en el folículo pilosebáceo, coloniza sólo aproximadamente el 20% de ellos. El microorganismo aparece en la pubertad y alcanza aproximadamente 10^5 U.F.C. (unidades formadoras de colonias) por folículo (Funke *et al.*, 1997).

P. acnes produce varias enzimas destacando proteasas, hialuronidasa, lipasa, fosfolipasa C, neuraminidasa, fosfatasa ácida, histamina y triptamina (Eady e Ingham, 1994), que actuarían como factores de virulencia al promover la lisis celular.

El producto de las glándulas sebáceas holocrinas (sebo) se compone de triglicéridos y ácidos grasos (Rassner, 1999 a). Se ha propuesto que los ácidos grasos libres producidos por la actividad de la lipasa de *P. acnes* sobre el sebo, contribuyen a la multiplicación bacteriana y a la colonización del folículo sebáceo (Higaki, 2003).

Los folículos sebáceos pueden dilatarse por factores del hospedero acumulándose corneocitos descamados en forma anormal, dando origen a una lesión denominada comedón que es posteriormente invadido por *P. acnes* (Kligman y Strauss, 1960).

La lipasa de *P. acnes* hidroliza simultáneamente las posiciones α y β de los triglicéridos, produciendo ácidos grasos libres y glicerol. Esta enzima es estable y activa a pH entre 5 y 8; si el pH es menor que 5, la actividad de la lipasa es más débil. Además, la lipasa aislada de cepas de reciente aislamiento muestra una mayor actividad catalítica que aquella obtenida de subcultivos. La actividad de esta lipasa puede ser inhibida por las tetraciclinas (Eady *et al.*, 1993), macrólidos y lincosamidas (Gemmell y Unkles, 1982; Greenwood *et al.*, 1986) pero no por streptomina, neomicina o penicilina G (Shalita y Wheatley, 1970).

La particular composición de la pared celular de las propionibacterias las hace resistentes a la degradación intracelular (Dawes *et al.*, 1974; Ko *et al.*, 1981; Quinn, 1990) y además tiene un efecto estimulante sobre el sistema inmune (Epstein y Sugiyama, 1978; Hirt *et al.*, 1978; Kirchner *et al.*, 1978; Okamura *et al.*, 1982; Roszkowski *et al.*, 1990)

Con respecto a su efecto inmunoestimulante se describen las siguientes propiedades:

- Activación y proliferación de macrófagos en bazo, pulmones, hígado y nódulos linfáticos.
- Incremento de la habilidad presentadora de antígenos de los macrófagos induciendo una respuesta humoral, tanto de manera dependiente como independiente de linfocitos T, aumentando significativamente los títulos de anticuerpos al ser usado como adyuvante.
- Incremento en la actividad de las células NK.
- Inducción de respuesta inmune celular, causando el aumento en la producción de $TNF\alpha$ e INF, incrementando la resistencia antivírica y antibacteriana.
- Actividad antitumoral reduciendo el crecimiento de tumores.

Por estos efectos, se han utilizado en medicina humana y veterinaria como tratamiento complementario en pacientes con cáncer (Gialdroni-Grassi y Grassi, 1985; Quinn, 1990), para incrementar la resistencia frente a enfermedades víricas y bacterianas (Kirchner *et al.*, 1977; Kirchner *et al.*, 1978; Quinn, 1990; Markowska-Daniel *et al.*, 1993; Blecha, 2001) y para producir incremento de la actividad de fagocitos y maduración de granulocitos (Ko *et al.*, 1981; Roszkowski *et al.*, 1990; Quinn, 1990; Markowska-Daniel *et al.*, 1992).

A partir de la década de 1990 se ha reconocido la capacidad de *P. acnes* de ser un patógeno primario en pacientes con factores predisponentes (Brook y Frazier, 1991). Entre los factores de riesgo más importantes destacan los procedimientos quirúrgicos que involucran la inserción de dispositivos médicos, especialmente prótesis de rodilla, válvulas cardíacas y conexiones ventrículo - peritoneales y la diabetes (Brook y Frazier, 1991; Jakab *et al.*, 1996; Funke *et al.*, 1997; Tunney *et al.*, 1999). Este microorganismo ha sido también asociado con el síndrome de SAPHO (sinovitis, acné pustular, hiperostosis y osteomielitis), provocando cambios inflamatorios agudos en el hueso afectado (Kirchhoff *et al.*, 2003). *P.acnes* fue reconocido como patógeno primario en el 25% (8/32 casos) de

mediastinitis post quirúrgica (PSM) (Tammelin *et al.*, 2002). Sin embargo, su rol patógeno principal está representado por su participación en la patogénesis del acné vulgar.

Acné vulgar. El acné vulgar es una enfermedad endógena limitada a la piel que afecta al folículo sebáceo con limitación topográfica (cara, parte superior del cuerpo) y temporal (pubertad, adolescencia). Casi todos los jóvenes tienen síntomas de acné, pero las formas graves sólo aparecen en ocasiones y sobretodo en varones. La enfermedad puede (sobretodo en sus formas más severas) determinar graves consecuencias psicosociales en una etapa lábil del desarrollo físico y psíquico. Además, pueden producirse importantes cicatrices por acné. Se divide en tres estadios (Rassner, 1999 b):

1. Estadio no inflamatorio: con comedones cerrados y abiertos en cantidad variable, sin o con escasas lesiones inflamatorias. Frecuente (pero no constante) evolución a la fase inflamatoria.
2. Estadio inflamatorio: donde en función del nivel de gravedad y de la extensión de la inflamación se distinguen dos formas:
 - Acné papuloso: papulas o papulopústulas inflamatorias enrojecidas.
 - Acné nodoso: con formación de nódulos inflamatorios, enrojecidos, de hasta 1cm de diámetro, aislados o confluentes, no abscesificantes, que sólo regresan lentamente.

Las formas más graves de acné inflamatorio evolucionan al estadio residual; si no es así, a la curación progresiva.

3. Estadio residual: con formación de quistes y cicatrices de distintos tipos y tamaños (a veces atróficos y otras hipertróficos).

Múltiples estudios realizados hasta la fecha coinciden en que son cuatro las alteraciones básicas que se producen en la patogenia del acné:

- Alteración en la producción de sebo, tanto cuantitativa como cualitativamente.
- Hiperqueratosis folicular, con la consecuente obstrucción del canal pilosebáceo: comedogénesis.
- Cambios en la microbiota bacteriana, con proliferación de *P. acnes*.

- Inflamación como respuesta del organismo para defenderse de los factores que alcanzan la dermis.

La comedogénesis, una anomalía en el proceso de descamación de los corneocitos foliculares en los conductos de los folículos sebáceos, es un hecho central en la patogenia del acné. La comedogénesis 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 (Figura 2) (Kligman y Strauss, 1960).

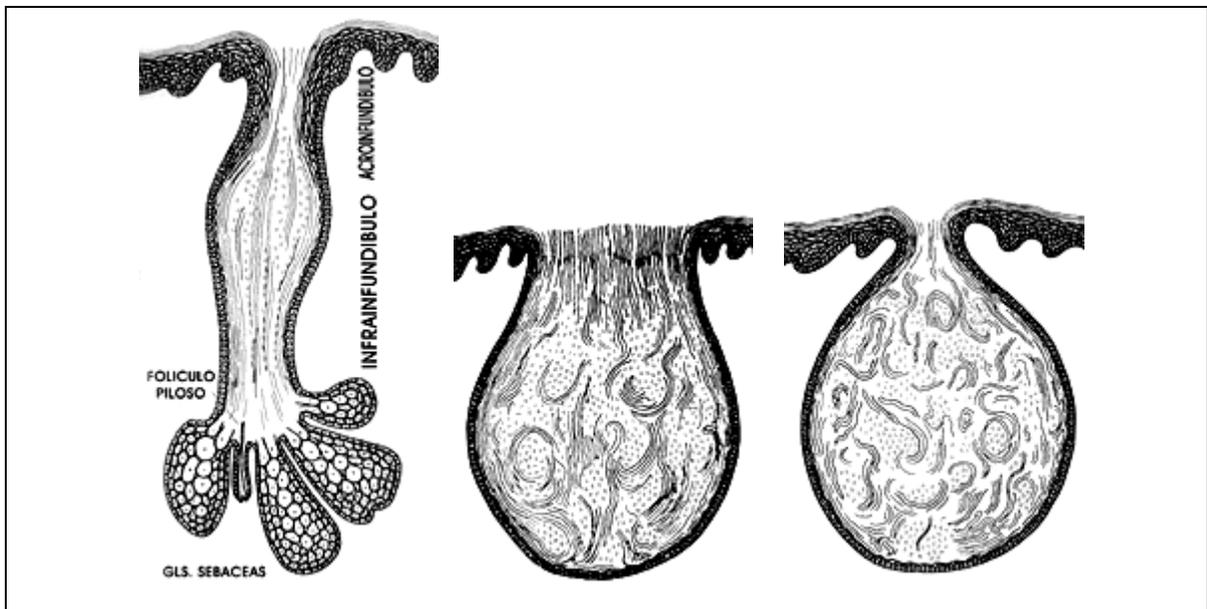


Figura 2. Comedón. Izquierda microcomedón, centro comedón abierto, derecha comedón cerrado. Fuente: James, 1995.

Los folículos sebáceos conteniendo microcomedones, proveen un medio anaeróbico rico en lípidos en el cual *P. acnes* se multiplica. La inflamación es el resultado directo o

indirecto de la proliferación de *P. acnes*. El microorganismo produce una lipasa extracelular que hidroliza los triglicéridos del sebo a glicerol y ácidos grasos libres; el glicerol es usado por él, como un sustrato de crecimiento, y los ácidos grasos tienen propiedades proinflamatorias y comedogénicas (Brown y Shalita, 1998).

P. acnes también libera factores quimiotácticos, los cuales atraen neutrófilos al lumen folicular. La ingestión de *P. acnes* por los neutrófilos al interior del folículo, produce la liberación de enzimas hidrolíticas intracelulares, pero no la muerte de la bacteria. Se ha demostrado que existen anticuerpos específicos contra *P. acnes* en los microcomedones; la interacción entre estos anticuerpos y el *P. acnes* produce la liberación de proteasas hidrolíticas que tienen importancia en el daño del epitelio folicular, eventualmente causando la expulsión del contenido folicular en la dermis. Con la ruptura del epitelio folicular, lípidos sebáceos, pelos, *P. acnes* y células epiteliales cornificadas son vaciados en la dermis, provocando inflamación. Los lípidos, pelos y células cornificadas producen una reacción no inmune, tipo cuerpo extraño asociada primero con células mononucleares y más tarde con macrófagos y células gigantes. *P. acnes* activa tanto la vía clásica como la vía alterna del complemento y se produce un factor quimiotáctico de neutrófilos derivados de C5 (C5 a), mientras que simultáneamente aumenta la liberación de enzimas hidrolíticas desde neutrófilos (James, 1995). Varias enzimas extracelulares producidas por el *P. acnes*, tales como hialuronidasas y proteasas pueden ser también importantes en la inflamación asociada con el acné (Voss, 1970).

La ruptura folicular y la extensión del proceso inflamatorio dentro de las profundidades de la dermis resultan en la formación de las lesiones inflamatorias del acné vulgar: pápulas, pústulas y nódulos (Brown y Shalita, 1998).

La figura 3 esquematiza la progresión de las lesiones en acné no inflamatorio e inflamatorio.

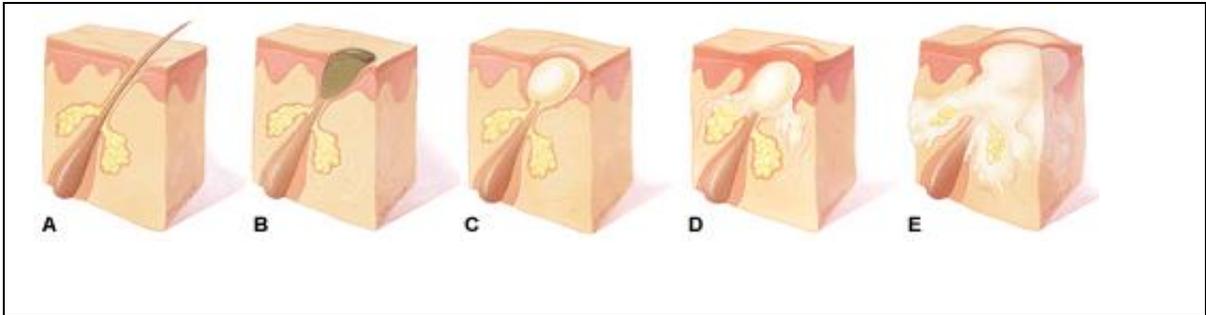


Figura 3. Progresión de las lesiones en acné. A: folículo normal; B: comedón abierto (punto negro); C: comedón cerrado (punto blanco); D: pápula; E: pústula. Fuente: Russell, 2000 b.

En la figura 4 se aprecian las manifestaciones clínicas mas frecuentemente encontradas en los tres estadios de acné vulgar.



Figura 4. Manifestaciones clínicas de acné vulgar. Izquierda: acné comedogénico; centro: acné inflamatorio (pápulas y pústulas); derecha: acné nódulo quístico. Fuente: Russell, 2000 b.

Según el tipo y extensión de las lesiones, el acné inflamatorio se ha subdividido en 3 grados (Tabla 1) (Pochi *et al.*, 1991 citado por Molgó, 1993):

Tabla 1. Grado de severidad de lesiones de Acné Inflamatorio

Severidad	Pápulas/pústulas	Nódulos
Leve	Pocas o varias	No
Moderado	Varias a muchas	Pocos a varios
Severo	Numerosas y/o extensas	Muchos

Por otro lado, los pacientes con acné tienen una concentración significativamente más baja de ácido linoleico en los lípidos de la superficie de su piel que las personas sin acné. En otras palabras, a medida que la secreción sebácea aumenta, existe una correspondiente disminución del contenido de ácido linoleico de los ésteres de la cera, triglicéridos y ácidos grasos libres de los lípidos superficiales. El papel esencial del ácido linoleico es la mantención de la integridad y función del estrato córneo; y también probablemente del epitelio folicular (Figura 5). Existe una disminución de las ceramidas lo que conduce a una alteración de la barrera del agua en el estrato córneo. El colesterol también está disminuido, produciendo de esta manera una mayor adhesión de los corneocitos. En personas con acné la secreción sebácea es alta y la concentración de linoleato es consecuentemente baja; por lo tanto, la mezcla de lípidos que rodean el epitelio folicular es deficiente en ácidos grasos esenciales. El escualeno y los ácidos grasos libres tienen propiedades comedogénicas (Gonzalez-Serva, 1996).

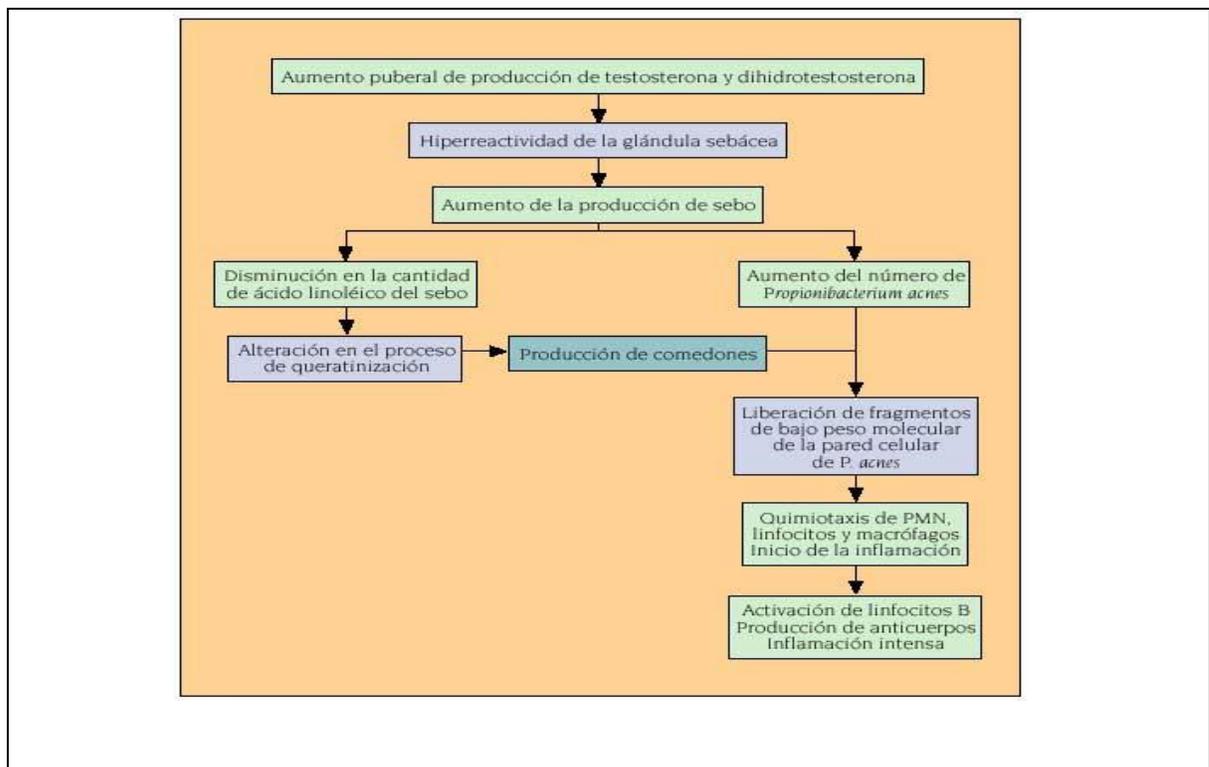


Figura 5. Patogenia del acné vulgar. Fuente: Gonzalez-Serva, 1996

Tipificación de *P. acnes*. *P. acnes* puede ser subdividido en 5 biotipos y en 2 serotipos. La división en biotipos (I, II, III, IV o V) está basada en la fermentación de tres azúcares: ribosa, eritritol y sorbitol (Kishishita *et al.*, 1979) (Tabla 2).

La clasificación en serotipos se basa en la detección de galactosa en la pared celular de las bacterias. El serotipo I tiene galactosa y el serotipo II carece de ella (Cummins y Johnson, 1972; Kishishita *et al.*, 1979).

Los biotipos I y II pertenecen a los serotipos I o II de *P. acnes*, mientras que los biotipos III, IV y V pertenecen al serotipo I de *P. acnes* (Tabla 3) (Cummins y Johnson, 1972; Higaki, 2003).

Tabla 2. Biotipificación de *P. acnes*, basado en el test de fermentación de azúcares.

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

Tabla 3. Relación entre biotipos y serotipos de *P. acnés*, basado en la detección de galactosa en la pared celular.

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

Existen estudios que señalan que la actividad de la lipasa de *P. acnes* estaría influenciada por el biotipo de la bacteria. El biotipo III es aislado de lesiones más severas de acné que otros biotipos. También se ha reconocido que un cambio proporcional en la actividad de la lipasa de *P. acnes* se relaciona con un aumento tanto de las colonias de *P. acnes* como del grado de las lesiones de los pacientes con acné y además, las más fuertes actividades de lipasa fueron vistas en el biotipo III de *P. acnes* (Higaki, 2003).

Susceptibilidad antimicrobiana de *P. acnes*. Como consecuencia de la compleja patogenia, no existe un tratamiento habitual del acné. Se debe tener en cuenta el estadio del acné y el nivel de gravedad, junto con los factores individuales. Los objetivos terapéuticos son las alteraciones de la queratinización y los comedones, la seborrea y la colonización bacteriana del folículo, junto con la inflamación (Rassner, 1999 b), para lo cual se emplean dos tipos de medicamentos: antimicrobianos y drogas anticomedogénicas.

Los antimicrobianos que han demostrado mayor actividad contra *P. acnes* son las tetraciclinas y los macrólidos, tanto por su actividad bactericida como inmunomoduladora.

En cuanto a las terapias tópicas, además de sus propiedades bactericidas, el peróxido de benzoilo muestra una marcada actividad queratolítica y promueve el recambio de las células epiteliales por lo que es, desde hace varios años, uno de los fármacos más usados para controlar el acné (Russell, 2000 a).

El uso de antibióticos tópicos es efectivo en el tratamiento del acné vulgar inflamatorio; clindamicina y eritromicina son los agentes más comúnmente usados (Brown y Shalita, 1998).

En el tratamiento sistémico, los antibióticos más usados son las tetraciclinas y la eritromicina. Tienen una acción antiinflamatoria, disminuyen el contenido de ácidos grasos libres del sebo, mediante la inhibición de la producción de la lipasa de *P. acnes* o bien por sus efectos bacteriostáticos. Lincomicina y clindamicina también podrían inhibir la lipasa de *P. acnes* con pequeños efectos sobre su crecimiento (Higaki, 2003).

Resistencia antimicrobiana de *P. acnes*. En los últimos 20 años ha habido un aumento significativo en la resistencia antimicrobiana de cepas de *P. acnes*,

incrementando desde 20% en 1978 a 62% en 1996. La resistencia ha afectado especialmente a eritromicina, clindamicina, tetraciclina, doxiciclina, y trimetoprim; aunque la resistencia a minociclina es menor (Cooper, 1998). Un estudio Europeo sobre la susceptibilidad a antibióticos de *P. acnes* encontró 2,6% de cepas resistentes a tetraciclina, 15,1% a clindamicina y 17,1% a eritromicina, no observando resistencia a linezolid, benzylpenicilina o vancomicina (Oprica *et al.*, 2005 a). Estos últimos antimicrobianos son activos contra *P. acnes* pero su uso está indicado en infecciones severas post quirúrgicas o septicemias, en casos de alergia a otros antibióticos, o en casos de resistencia a otros antimicrobianos. Además, linezolid y vancomicina son de administración parenteral.

Un estudio Japonés encontró un 10,4% de cepas resistentes a eritromicina, cuatro de las cuales tuvieron resistencia cruzada con clindamicina. En este estudio no encontraron el gen *erm* (X), como determinante de resistencia, sino que mutaciones en el gen 23S del ARNr (Ishida *et al.* 2008).

Las cepas de *P. acnes* resistentes a eritromicina han sido clasificadas en cuatro categorías fenotípicas basándose en sus patrones de resistencia a los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLS_B). El mecanismo más frecuente de resistencia son las mutaciones en distintos sitios del gen que codifica la región peptidil transferasa del dominio V de la subunidad 23S del ARNr. Una transición 2058 A→G, determinó la emergencia de cepas altamente resistentes a eritromicina y resistencia variable a otros macrólidos y clindamicina (fenotipo I), mientras que la transición 2057 G→A está asociada con un bajo nivel de resistencia a eritromicina (fenotipo III). Por su parte, la transición 2059 A→G está asociada con un alto nivel de resistencia a todos los macrólidos y elevada pero variable resistencia a clindamicina (fenotipo IV) (Ross *et al.*, 1997; Oprica *et al.*, 2005 b).

Respecto a la resistencia a tetraciclinas de *P. acnes* se ha determinado que la transición G→C, equivalente a la base 1058 de *Escherichia coli*, en la subunidad 16S del ARNr, es responsable de la resistencia clínica a este antimicrobiano (Ross *et al.*, 1998; Oprica *et al.*, 2005 b).

Con respecto a la adquisición de genes de resistencia, se ha observado en las bacterias grampositivas el determinante de resistencia *erm*. El gen *erm* (erythromycin ribosome

methylase) codifica una enzima que dimetila un residuo específico de adenina en la subunidad 23S del ARNr, produciendo un cambio conformacional en el ribosoma que disminuye la afinidad a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B, fármacos químicamente distintos pero con similar mecanismo y sitio de acción. Esta resistencia cruzada se conoce como resistencia fenotípica MLS_B (Camponovo, 2002).

Se ha demostrado que cepas de *P. acnes* portadoras del mecanismo de resistencia MLS_B, presentan el transposón Tn 5432, que contiene el gen de resistencia *erm* (X), descrito inicialmente en Corinebacterias (Ross *et al.*, 2002).

En Chile, un estudio efectuado con cepas aisladas de pacientes con acné antes del año 2001 encontró un bajo porcentaje de resistencia a macrólidos (3,8%) y lincosamidas (1,9%). No obstante, las cepas no fueron caracterizadas más allá de especie y el problema de la resistencia podría haber cambiado en los últimos años (Gübelin *et al.*, 2006).

HIPÓTESIS

Dado que las cepas de *P. acnes* estudiadas provienen de pacientes con diversos grados de acné (Higaki, 2003) y de diferentes lugares de la Región Metropolitana y que la resistencia antimicrobiana comunicada en un estudio anterior es menor a la informada en el extranjero, se plantea la siguiente hipótesis:

“Las cepas de *Propionibacterium acnes* aisladas de personas con acné, presentan diversos biotipos y mayor resistencia antimicrobiana que la documentada anteriormente”.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar los biotipos y susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Propionibacterium acnes* aislados de pacientes con acné.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Conocer los biotipos de *Propionibacterium acnes* que se aíslan en pacientes con acné
2. Describir las propiedades bioquímicas en las cepas aisladas de diferentes biotipos
3. Caracterizar la actividad lipolítica de las cepas de *P. acnes*
4. Determinar la susceptibilidad antimicrobiana a tetraciclina, eritromicina y clindamicina
5. Determinar la presencia del gen *erm* (X) en las cepas resistentes a macrólidos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. *Obtención de muestras.*

Los médicos dermatólogos de turno en el Hospital San José, Hospital Clínico de la Universidad de Chile y un centro dermatológico privado localizado en Las Condes tomaron muestras cutáneas de 42 pacientes con acné, entre Marzo y Octubre del 2006. Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes y se abrió una ficha clínica en la que se registraron los antecedentes demográficos, grado de acné, tipo de tratamiento (oral o tópico), duración de éste y droga utilizada en el caso de haber tomado antimicrobianos. Para la toma de muestras se eligió las lesiones pustulares, las que se desinfectaron externamente en la superficie con alcohol de 70°. Posteriormente se descabezó la pústula con un bisturí estéril recogiendo el contenido con tórula, la cual fue inoculada de inmediato en el medio de transporte anaeróbico AMIES (Copan, Italia) y llevada al laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, dentro de las próximas 24 horas.

Los pacientes por medio de su médico tratante fueron informados oportunamente de los resultados del estudio.

2. *Criterios de selección.*

Se seleccionó las lesiones pustulares por su fácil acceso y mínima invasión. Se excluyó del estudio a los pacientes inmunosuprimidos. No fueron excluidos del estudio aquellos pacientes que se encontraban en tratamiento antimicrobiano al momento de tomar la muestra.

3. *Aislamiento en medios de cultivo.*

Las muestras clínicas fueron inoculadas cada una en dos placas de agar anaerobio, uno comercial Wilkins & Chalgrens (Oxoid®) y uno preparado en laboratorio llamado agar anaerobio selectivo. El agar comercial se preparó con 5% de sangre ovina desfibrada obtenida en el Instituto de Salud Pública (ISP) de Chile y el agar anaerobio selectivo, fue suplementado con hemina (Oxoid®) 5 µg/ml, vitamina K (Farmacias Ahumada®) 1µg/ml, piruvato de sodio (Merck®) 1mg/ml, ácido nalidíxico (Merck®) 5µg/ml y 5% de sangre

ovina desfibrinada. Los medios inoculados fueron incubados en jarra de anaerobiosis (Oxoid®) a 36°C por 72 horas. (Forbes *et al.*, 1998; Valenzuela, 1998).

4. *Identificación de P. acnes.*

La bacteria fue identificada por el aspecto macroscópico y microscópico de las colonias (1 a 2 por paciente) y mediante pruebas bioquímicas. Los microorganismos dan origen a colonias blancas, de 1-3 mm, de bordes redondos y superficie levantada, generalmente rodeadas de un halo de β -hemólisis. En la tinción Gram, se caracterizan por ser bacilos grampositivos con agrupación en empalizada (Forbes *et al.*, 1998). La identificación bioquímica incluyó la demostración de su actividad catalasa, producción de burbujas de O₂ al mezclar la colonia con H₂O₂ de 10 volúmenes (Farmacias Ahumada®), producción de indol (kit SDA®, Andes Import), reducción de nitratos a nitritos (kit SDA®, Andes Import) y ausencia de hidrólisis de la esculina (kit SDA®, Andes Import).

5. *Caracterización bioquímica convencional.*

De cada colonia sospechosa se obtuvieron cultivos puros y frescos incubados en agar sangre anaerobio (48-72hrs). Colonias características fueron suspendidas en suero fisiológico (Mc Farland 0,5) y utilizadas para estudiar las siguientes propiedades:

5.1 Fermentación de azúcares

Esta prueba mide la capacidad de los microorganismos de fermentar azúcares específicos. (Kishishita *et al.*, 1979). El ensayo se efectuó en tubos conteniendo 3 ml de caldo base de fermentación (CHO medio, Difco®) y 0,25% del azúcar correspondiente en cada tubo rotulado. Se usó eritritol 10%, sorbitol 10% y ribosa 10% (Merck®). Como control positivo se utilizó glucosa 10% (Merck®) en uno de los tubos sembrados e incubados. Como control negativo se incubaron tubos sin inocular junto a los demás, en anaerobiosis a 36°C por 72 horas. Al cabo de este tiempo, se agregó 3 gotas de indicador Azul de Bromotimol 1% (Merck®) a cada tubo y se observó el cambio de coloración indicativo de reacción (amarillo reacción positiva, verde-azul, reacción negativa).

5.2 Hidrólisis de la gelatina.

Esta prueba fue determinada en medio gelatina en placa (Valenzuela, 1998) conteniendo 0,4% de gelatina (Difco®), Peptona 1% (Difco®), cloruro de sodio 0,5% (Merck®), extracto de carne 0,5% (Difco®) y 2% de agar (Difco®). La suspensión bacteriana fue inoculada efectuando una estría sobre el agar gelatina e incubada en anaerobiosis a 36°C por 72 hrs. Al cabo de este tiempo, se agregó a la placa 3 ml del reactivo Frazier (Frazier, 1926) preparado con cloruro mercurico (Merck®) y ácido clorhídrico concentrado (Merck®) el cual tiene la capacidad de hacer precipitar todas las proteínas del medio de cultivo. La presencia de un halo transparente alrededor de la colonia, evidenció la producción de la enzima.

5.3 *Presencia de Fosfolipasa C en Agar Yema de huevo*

Esta prueba detecta la capacidad de *P. acnes* de hidrolizar los triglicéridos de la yema de huevo. El medio, agar (Difco®) 2% suplementado con caseína 2% (Biokar Diagnostics ®), extracto de levadura 0,5% (Difco®), cloruro de sodio (Merck®) 0,25%, dextrosa (Merck®) 0,20%, Tween 20 (Difco®) 0,1%, L-Cistina (Merck®) 0,04%, fosfato de sodio (JTBaker®) 0,5%, cloruro de magnesio (Merck®) 0,08% y 10 ml de yema de huevo e inoculado en superficie fue incubado en anaerobiosis a 36° C por 72 horas. La presencia de una prueba positiva está dada por la aparición en la superficie de las colonias de un brillo iridescente. La actividad lipásica fue clasificada bajo los siguientes criterios: prueba positiva, en presencia de brillo iridescente en la superficie del cultivo, prueba negativa en ausencia de brillo iridescente en la superficie del cultivo (Forbes *et al.*, 1998; Valenzuela, 1998).

6. *Caracterización bioquímica mediante sistema comercial.*

Se efectuó una caracterización bioquímica mucho más completa mediante el sistema comercial BD BBL Crystal (Andes Import®). Este sistema detecta la presencia de enzimas bacterianas que son capaces de metabolizar sustratos sacáridos, aminoácidos y fosfato

presentados en diferentes conformaciones y enlaces Ej: metil α glucósido, metil β glucósido, etc.

El sistema comercial contiene:

- 6.1 11 sustratos cuya utilización produce un derivado cumarínico fluorescente, mas un control positivo y negativo de fluorescencia.
- 6.2 Utilización de azúcares (trehalosa, lactosa, metil- α y β -glucósido, sacarosa, manitol, maltotriosa, arabinosa, glicerol y fructosa)
- 6.3 Utilización de otros sustratos (glucosido, celobiósido, prolina y leucina, fosfato, maltósido, galactósido, úrea, esculina y arginina).

7. *Tipificación bacteriana*

La tipificación de las cepas bacterianas se realizó mediante el test de fermentación de 3 carbohidratos: ribosa, eritritol y sorbitol el cual permite la clasificación de *P. acnes* dentro de cinco biotipos (B1 a B5) (Kishishita *et al.*, 1979). Esta prueba se realizó de la misma manera explicada en el ítem 5.1 y se asignó un biotipo al resultado de la fermentación de cada cepa según lo indicado en la tabla 2.

8. *Sensibilidad antimicrobiana*

Los estudios de sensibilidad antimicrobiana fueron efectuados mediante la técnica de dilución en agar. Este método permite obtener la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cada aislado. Los estudios de susceptibilidad fueron realizados de acuerdo a las técnicas recomendadas por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2004), en agar Brucella (Difco, USA) suplementado con hemina (5 μ g/ml), vitamina k (1 μ g/ml) y 5% (v/v) de sangre de cordero.

Las soluciones de antimicrobianos (recetario magistral, Farmacias Ahumada) fueron preparadas utilizando como solvente y diluyente agua destilada. Las concentraciones utilizadas fueron: 0.06 a 4 μ g/ml para clindamicina y eritromicina y 1 a 32 μ g/ml para tetraciclina.

Las placas fueron incubadas en anaerobiosis a 36°C por 48 hrs. y leídas a simple vista. Como control positivo se utilizó la cepa *Bacteroides fragilis* ATCC 25285. Como control negativo, se usó agua destilada.

Los puntos de corte para susceptibilidad a los antimicrobianos estudiados, correspondieron a los proporcionados por los Comités de susceptibilidad antimicrobiana (NCCLS, 2004). Estos fueron: CIM ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ para eritromicina, CIM ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ para clindamicina y CIM ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ para tetraciclina. Cepas con CIM superiores a estas cifras, fueron consideradas resistentes.

9. *Caracterización molecular de la resistencia a macrólidos.*

La caracterización molecular de la resistencia fue realizada a partir de cultivos frescos, suspendiendo 3 colonias en 100 μl de agua destilada. Se buscó como determinante de resistencia el gen *erm* (X) que otorga resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (Ross *et al.*, 2002).

La extracción del ADN de los microorganismos fue efectuada mediante el sistema comercial de extracción de ADN E.Z.N.A. blood DNA (OMEGA Bio-Tek, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, eluyéndose el ADN obtenido en 70 μl de agua destilada.

Las reacciones de amplificación fueron efectuadas en un volumen de 50 μl conteniendo: buffer de amplificación 1 X, 2.5 U Taq polimerasa (Gibco®), 10 μl de templado, 200 μM de cada nucleótido trifosfato y 1 μM de cada uno de los partidores. Como partidador con sentido se empleó 5' ATA ACG GCA GTT GAA GTG GA 3' mientras que como partidador anti sentido se utilizó 5' CGA AGA ATG GCA GTG GTG 3' (Oprica, *et al.*, 2005 b). Las condiciones de amplificación fueron: denaturación inicial a 94°C (4 min), seguido por 40 ciclos de 94°C (1 min.), 53°C (1 min.) y 72°C (1 min.) y una extensión final a 72°C (10 min.). Las amplificaciones fueron efectuadas en un termociclador MJ Research, modelo MiniCycler. Los productos de amplificación fueron separados en función de su tamaño por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, conteniendo 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio. Este reactivo fue inactivado con una mezcla de permanganato de potasio, ácido clorhídrico e hidróxido de sodio (Lunn y Sansone, 1987 citado por Sambrook, 1989). Posteriormente se visualizaron los productos en transiluminador de luz ultravioleta. Como patrón de comparación del tamaño del ADN se utilizó ADN ladder de 100 pb. La amplificación del gen *erm* (X) con los partidores utilizados generó un producto de 167pb., de acuerdo a lo esperado.

Con el objeto de confirmar que el gen de resistencia presente en las cepas resistentes a macrólidos era efectivamente el gen *erm* (X), los amplicones de la PCR de 2 aislamientos

fueron secuenciados en ambas hebras del ADN. Para ello, los amplicones fueron purificados mediante el sistema comercial QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Alemania). Las reacciones de secuenciación fueron efectuadas por el Centro de Síntesis y Análisis de Biomoléculas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, usando el sistema comercial de secuenciación Big Dye Sequencing Terminator kit (Applied Biosystem, Ca., USA) en el secuenciador automático ABI 377 (Applied Biosystem, Ca., USA).

El ADN fue comparado mediante alineamiento con la base de datos de secuencias de GenBank usando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponible en el National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

IV. RESULTADOS

Durante el período en estudio (Marzo a Octubre del 2006) se recolectaron 42 muestras de acné vulgar, de las cuales se aislaron 25 cepas de *P. acnes* (59,5%). Cada cepa correspondió a un paciente. El 52% de los pacientes correspondieron a mujeres y 48% a hombres.

Distribución de biotipos de *P. acnes*. La totalidad de las cepas fueron asignadas a un biotipo. Catorce cepas (56%) correspondieron al biotipo III, 5 cepas (20%) fueron clasificadas como biotipo IV, 4 (16%) correspondieron al biotipo V y 2 (8%) al biotipo I. No se encontraron cepas pertenecientes al biotipo II (Tabla 4).

Tabla 4. Distribución de biotipos de *P. acnes* obtenidos de pacientes con acné vulgar. Región Metropolitana.

Biotipo	Nº de cepas	% de cepas del biotipo
I	2	8
II	0	0
III	14	56
IV	5	20
V	4	16
Total	25	100

La mayoría de los pacientes presentó acné de los grados 1 y 2 y solamente 16% de ellos presentó acné grado 3. De las 14 cepas pertenecientes al biotipo III, 9 de ellas (64%) fueron aisladas de pacientes con grado 2 de acné. En la figura 6 se muestra la relación entre la severidad del acné y el biotipo de *P. acnes* detectado.

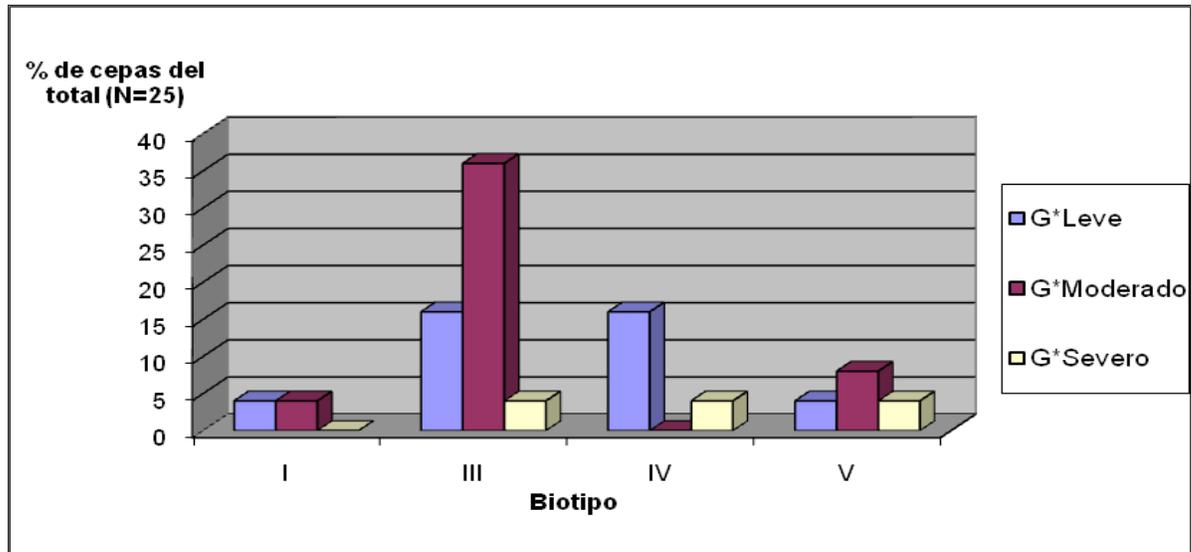


Figura 6. Distribución de los casos clínicos de acuerdo a la severidad del acné y al biotipo aislado. * G= Grado de severidad de acné.

Propiedades bioquímicas de cepas de *P. acnes*. Las características de los cultivos y las pruebas bioquímicas convencionales identificaron claramente las cepas como *P. acnes*. El empleo del sistema comercial BD BBL Crystal, permitió demostrar diferencias en su actividad metabólica tanto sacarolítica como proteolítica (Tabla 5). Con respecto a su capacidad sacarolítica, las cepas del biotipo III, predominante en este estudio, se caracterizaron por una mayor capacidad sacarolítica, que las cepas pertenecientes a otros biotipos, lo que se demostró por la fermentación de otros azúcares además de la glucosa. Las cepas del biotipo IV se caracterizaron por fermentar glicerol y fructosa, las cepas del biotipo I fermentaron arabinosa y las cepas pertenecientes al biotipo V sólo fermentaron la glucosa.

Ninguna cepa utilizó trehalosa, manitol o esculina.

Con respecto a la actividad proteolítica de los microorganismos, destaca su actividad sobre prolina, leucina y fenilalanina, actividad que fue demostrada en más del 90% de las cepas, independiente del biotipo de pertenencia.

No se detectó utilización de valina e isoleucina en *P. acnes*.

Finalmente, en 23 (92%) cepas se observó la capacidad de hidrolizar la gelatina.

Tabla 5. Diversidad sacarolítica de biotipos de *P. acnes* obtenidos de pacientes con acné vulgar en la Región Metropolitana.

Biotipo	Azúcares													
	Glucosa*		Lactosa		Sacarosa		Maltotriosa		Arabinosa		Fructosa		Glicerol	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
I	2	100	0	0	0	0	0	0	1	50	0	0	0	0
III	14	100	2	14,2	1	7,1	1	7,1	2	14,2	2	14,2	1	7,1
IV	5	100	1	20	0	0	0	0	0	0	3	60	1	20
V	4	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Glucosa incluida como control de fermentación

Nº = número de cepas del biotipo

% = porcentaje de cepas del biotipo

Caracterización de la actividad lipolítica de *P. acnes*. Se caracterizó la actividad lipolítica *in vitro* de *P. acnes* mediante la presencia o ausencia de la actividad fosfolipasa C en agar yema de huevo (Tabla 6). Veintitrés (92%) de las cepas presentaron algún grado de actividad. De las 23 cepas con actividad fosfolipasa C, 5 (20%) se caracterizaron por su alto grado de actividad lipolítica, donde más de la mitad del cultivo presentó brillo iridescente.

Tabla 6. Actividad lipolítica *in vitro* de 25 cepas de *P. acnes*, demostrada por medio de su actividad fosfolipasa C.

Resultado	Nº de cepas	% de cepas
Prueba positiva	23	92
Prueba negativa	2	8
Total	25	100

Susceptibilidad antimicrobiana. En el estudio de susceptibilidad antimicrobiana fueron hallados 2 perfiles de resistencia para los tres antibióticos probados. Ambos perfiles fueron iguales para el caso de las dos cepas encontradas resistentes. La tabla 7 muestra el perfil de resistencia encontrado en el estudio.

Tabla 7. Perfil de resistencia encontrado en las 25 cepas estudiadas.

Antimicrobianos	Perfil	Número	%
Tetraciclina	S	25	100
Eritromicina	R	2	8
Clindamicina	R	2	8

La Tabla 8 muestra la susceptibilidad antimicrobiana de las 25 cepas de *P. acnes*. La totalidad de ellas fue sensible a tetraciclina, 23 (92%) cepas fueron sensibles a eritromicina y a clindamicina y 2 (8%) cepas fueron resistentes a eritromicina y clindamicina, pero susceptibles a tetraciclina.

Tabla 8. Susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de 25 cepas de *P. acnes* aisladas de acné vulgar en la Región Metropolitana.

Antimicrobiano	Rangos	CIM 50% ($\mu\text{g/ml}$)	CIM 90% ($\mu\text{g/ml}$)	% de resistencia
Clindamicina	$\leq 0,06 - >2$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	8
Eritromicina	$\leq 0,06 - >2$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	8
Tetraciclina	$\leq 1 - \leq 32$	≤ 1	≤ 1	0

CIM = concentración inhibitoria mínima; CIM 50% = CIM que inhibe el 50% de las cepas; CIM 90% = CIM que inhibe el 90% de las cepas.

Como se observa en la Tabla 8, la CIM 90% de los tres antimicrobianos estuvo en el rango de la susceptibilidad, lo que muestra la susceptibilidad de las cepas estudiadas.

Bases moleculares de resistencia a macrólidos. Se investigó la presencia del gen *erm* (X) mediante PCR en las dos cepas resistentes a eritromicina y clindamicina obtenidas en este estudio, detectándose la presencia del gen en ambas cepas (Figura 7).

Se secuenciaron los productos de la amplificación del gen de resistencia de las dos cepas confirmándose la identidad de la secuencia con el gen *erm* (X).

La Figura 7 muestra los productos de amplificación obtenidos mediante PCR.

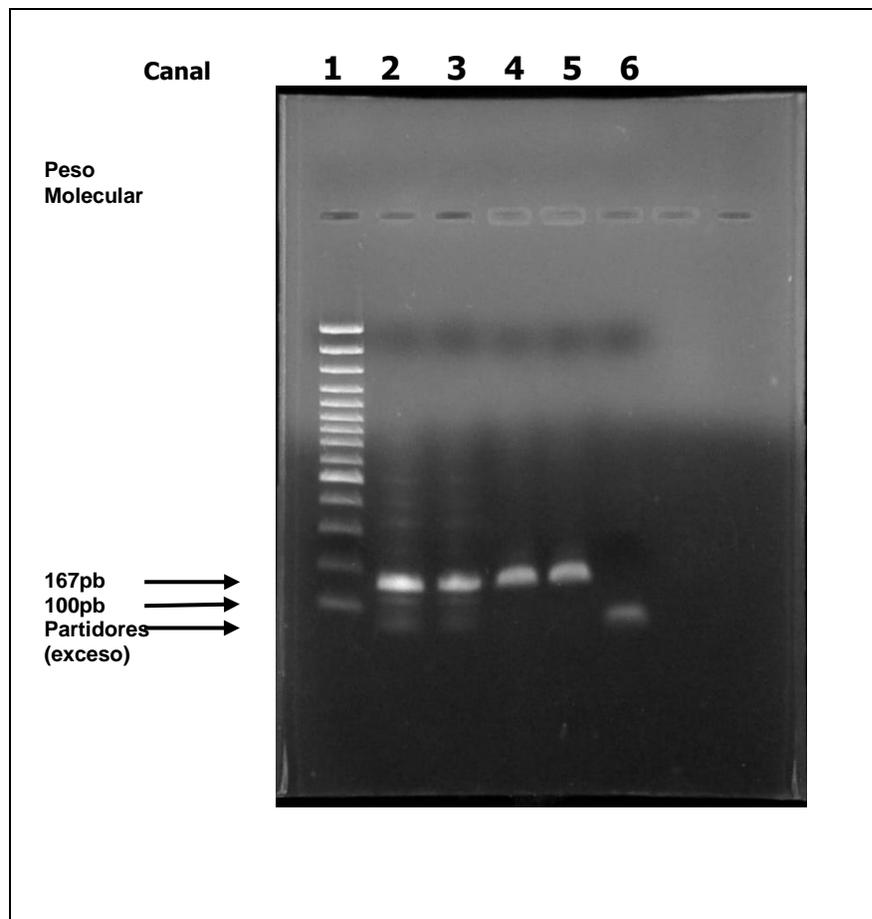


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa que muestra los productos de amplificación mediante PCR del gen *erm* (X). Canal1: Marcador de peso molecular 100pb; canal 2-3: cepas resistentes de *P. acnes*; canales 4 y 5: control positivo; canal 6: control negativo.

La consulta realizada al programa BLAST disponible online, arrojó una serie de resultados de alineamientos con aquellos disponibles en la base de datos. De ello, se realizó una tabla resumen con los 7 primeros resultados encontrados (Tabla 9).

Tabla 9. Resumen de resultados de alineamientos encontrados. Consulta realizada el 26 de julio del 2010 en programa BLAST disponible on line.

Número acceso	Descripción	% Query	% Identidad
gi 296172990 FN825254.1	Plasmidio pJA144188 de <i>Corynebacterium resistens</i>	100	96
gi 188593359 AM748803.1	Transposón Tn5432 de <i>Bifidobacterium animalis</i> , cepa B0456	100	96
gi 188593354 AM748801.1	Transposón 5432 de <i>Bifidobacterium thermophilum</i> , cepa B0225	100	96
gi 171850984 AM942444.1	Genoma completo <i>Corynebacterium urealyticum</i> DSM 7109	100	96
gi 114452125 DQ887623.1	Cds parcial, gen <i>erm</i> (X) de 1 clon de bacteria no cultivada	100	96
gi 109158262 DQ643386.1	Gen completo de secuencia de inserción IS1249a Tnp1249a y IS1249b Tnp1249b, gen <i>erm</i> (X) de <i>Corynebacterium urealyticum</i>	100	96
gi 15778307 AF338705.1	Secuencia completa de Transposón Tn5432 de <i>Propionibacterium acnes</i>	100	96

V. DISCUSIÓN

Biotipos.

Se observó una alta frecuencia de aislamiento de cepas de *P. acnes* pertenecientes al biotipo III (14 cepas, 56%). Esto concuerda con lo mencionado por Higaki, 2003 donde expresa que el biotipo III es el más prevalente y ampliamente distribuido en pacientes con acné en Japón.

No se hallaron cepas pertenecientes al biotipo II, esto podría ser explicado por el número relativamente reducido de cepas estudiadas, puesto que en los autores citados que tipificaron a *P. acnes* (Kishishita, 1979; Ko y Pulverer, 1973), siempre fue encontrado el biotipo, pero el número de cepas estudiadas superó las 72 en ambos casos. Sin embargo no se pueden descartar diferencias geográficas y temporales en la epidemiología de los microorganismos.

Con respecto a la relación biotipo y severidad del acné en los pacientes, de las 14 cepas pertenecientes al biotipo III, 9 (64%) se obtuvieron de pacientes con acné grado 2, que corresponde a acné inflamatorio moderado (Pochi *et al.*, 1991 citado por Molgó, 1993). Este biotipo ha sido relacionado con lesiones más severas de acné (Higaki, 2003). Un escaso número de cepas fueron obtenidas de lesiones severas de acné y esto se puede entender en parte, porque los tratamientos a los que se someten los pacientes son orientados a disminuir la inflamación y por lo tanto disminuyen la severidad de las lesiones y los tratamientos no fueron motivo de exclusión para este estudio.

Caracterización bioquímica

La mayoría de las cepas de *P. acnes* estudiadas hidrolizaron la gelatina, excepto dos de ellas. De acuerdo a la clasificación hecha por Voss (Voss, 1970), dentro del grupo I se encuentran aquellas cepas que hidrolizan la gelatina y en el grupo II las cepas que no la hidrolizan. En el presente estudio es posible pensar que esas dos cepas que no tuvieron actividad gelatinasa puedan pertenecer al grupo II que presenta características fermentativas diferentes al grupo I, o bien, se podría explicar por menor presencia de enzima gelatinasa, es decir, menor concentración de bacterias vivas, ya que con la técnica

de dilución de Mc Farland 0,5, utilizada en la preparación del inóculo, no es posible discriminar entre bacterias vivas y muertas.

Las cepas pertenecientes al biotipo III utilizaron un mayor número y variedad de sustratos bioquímicos que las cepas de otros biotipos, lo que podría explicar en parte su mayor prevalencia. Sin embargo, no se detectaron sustratos únicos hidrolizados por algún biotipo particular, propiedad que pudiera haber sido utilizada con fines epidemiológicos y de identificación. La mayoría de las cepas de *P. acnes* presenta actividad frente a fenilalanina, prolina y leucina y los sustratos utilizados con menor frecuencia como arginina, ácido glutámico y fructosa, son metabolizados por representantes de la mayoría de los biotipos. Estos resultados nos permiten sugerir que en futuros estudios no se considere la capacidad proteolítica de las cepas para la diferenciación de *P. acnes* en biotipos y que por el contrario se incorpore la tipificación desarrollada por Kishishita el año 1979, en base a la fermentación de azúcares.

Actividad lipolítica

La mayoría de las cepas mostró actividad de fosfolipasa C. Existen autores que relacionan al biotipo III con fuerte actividad de la enzima (Higaki, 2003) y mayor virulencia de las cepas pertenecientes a este biotipo. El grado de ésta actividad, en el presente estudio, no fue medido en forma cuantitativa, lo que no permitió relacionar el grado de actividad enzimática con la severidad de las lesiones y el biotipo aislado. Sólo podemos mencionar que se observó cualitativamente una mayor actividad de la enzima (evidenciado por la magnitud del brillo iridiscente sobre el cultivo bacteriano) en 5 de las 23 cepas positivas a la prueba y que 3 de ellas fueron aisladas de lesiones severas de acné (grado 3).

Sensibilidad antimicrobiana y mecanismos de resistencia

Las 2 cepas de *P. acnes* resistentes a eritromicina y clindamicina fueron aisladas de personas con acné grado III, las cuales habían recibido tratamientos con antibióticos por periodos prolongados de tiempo lo que habría facilitado la selección de cepas resistentes. La resistencia que presentan los microorganismos a los diferentes miembros de la familia de los macrólidos, se debe a una serie de mecanismos entre los que se encuentra la alteración del sitio blanco, degradación y expulsión del antimicrobiano (Nakajima, 1999).

La mayoría de estos mecanismos van a estar mediados por una serie de genes que codifican diversas proteínas cuya función será la de participar en alguna de estas formas de resistencia.

La modificación del sitio de unión de los macrólidos al ribosoma constituye el mecanismo de resistencia más importante. En la mayoría de los casos estos cambios estructurales son debidos a la presencia de los genes *erm* (erythromycin ribosome methylation) que se encuentran presentes tanto en bacterias gram positivas como gram negativas y de los que existen una gran variedad (Roberts *et al.*, 1999). Estos genes codifican las proteínas ARNmetilasas cuya función es introducir dos grupos metilo en la adenina de la posición 2058 del ARN ribosómico. Esta modificación va a conferir resistencia cruzada a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B, originando el fenotipo de resistencia MLS_B (Nakajima, 1999; Weisblum, 1995).

Este fenotipo puede aparecer de manera constitutiva, cuando el gen se expresa independientemente de la presencia del antibiótico o inducible, cuando aparece en presencia del macrólido. En este último caso, la eritromicina suele ser la responsable de este fenotipo de resistencia en los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus* (Gonzalez *et al.*, 2005; Levin *et al.*, 2005), mientras que en el género *Enterococcus*, la inducción puede estar producida por macrólidos de 16 átomos (Min *et al.*, 2003). La prevalencia de los diferentes genes *erm* depende de las diferentes especies bacterianas. Así, por ejemplo, los genes *erm* (A) y *erm* (C) predominan en las especies del género *Staphylococcus* (Davis *et al.* 2005; Aktas *et al.*, 2007), mientras que el gen *erm* (B), es el más habitual en *Streptococcus pneumoniae* (Morosini *et al.*, 2001), *Streptococcus pyógenes* (Yi *et al.*, 2006) y en el género *Enterococcus* (Min *et al.*, 2003). En *Streptococcus agalactiae* y en *S. pyógenes* aparte del gen *erm* (B), se ha encontrado el gen *erm* (TR), gen englobado dentro de la clase *erm* (A), como uno de los genes más prevalentes en estas especies (Gonzalez *et al.*, 2005; Seppälä *et al.*, 1998). Por otro lado, el gen *erm* (X) ha sido el más detectado en las especies del género *Corynebacterium* (Rosato *et al.* 2001; Yagüe *et al.*, 2005), aunque también se ha hallado en otras especies, como *Arcanobacterium pyogenes*, presentando una homología superior al 95% (Jost *et al.*, 2003) y en *Propionibacterium acnes* (Ross *et al.* 2002)

La mayoría de estos genes están asociados a elementos móviles que permiten su diseminación entre las diversas especies bacterianas mediante los mecanismos de

conjugación, transformación y transducción. De estos elementos genéticos, los más conocidos son los plásmidos a los que se les ha relacionado con los genes de clase *erm* y otros determinantes de resistencia de diversas especies (Roberts *et al.*, 1999; Schiller *et al.*, 1980; Liebl *et al.*, 2002). De igual modo, los transposones constituyen otra vía de movilización para estos genes sea a través de conjugación (Luna *et al.*, 1999) o a través de otro mecanismo diferente en el caso de que el gen estuviera insertado en un transposón no conjugativo (Ross *et al.*, 2002, Santagati *et al.*, 2000).

Estos mecanismos podrían favorecer la diseminación extensa a cepas de *P. acnes* e inutilizar una alternativa terapéutica muy apropiada, especialmente si el antimicrobiano se aplica como única droga terapéutica.

En Chile se han aislado cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes a macrólidos desde 1994, con porcentaje de resistencia promedio de 7% desde 1996 al 2002, en el área Metropolitana. Los fenotipos de resistencia estudiados fueron aquellos determinados por un gen *erm* (resistencia cruzada a macrólidos, lincosamida y estreptogramina B) y el fenotipo dado por el gen *Mef*, mecanismo de eflujo que otorga sólo resistencia a macrólidos. La revisión, mostró que el fenotipo del mecanismo de eflujo es el más frecuente encontrado (Camponovo, 2002).

El año 2006, se encontró una escasa resistencia antimicrobiana para 53 cepas de *P. acnes* aisladas de acné, en Chile. Ésta fue de 3,8% y 1,9% para eritromicina y clindamicina, respectivamente (Gübelin *et al.*, 2006). En el presente estudio se detectaron 2 cepas (8%) resistentes. Aunque ambos estudios no son totalmente comparables, los nuevos resultados podrían sugerir que la frecuencia de resistencia podría ir en aumento.

El gen *erm* (X) que fue detectado mediante PCR en este estudio, fue secuenciado y se comprobó su identidad según lo esperado (Ross *et al.*, 2002), pero, no se investigó si éste se encontraba inserto en el Transposón Tn452, descrito por Ross. Por otro lado la actividad del gen para la resistencia a macrólidos no fue investigada, así como tampoco se investigó la presencia de mutaciones en el ADN de estas cepas que pudieran estar involucradas con la resistencia encontrada (Ross *et al.*, 1997; Oprica *et al.*, 2005b).

Criterios de Selección

Finalmente es interesante comentar algunos criterios de selección para la realización del estudio.

Al inicio de este trabajo y considerando la variabilidad de las lesiones que puede tener el acné vulgar, se habían formulado dos tipos de toma de muestra. Uno para pústulas, que consistía en desinfectar la superficie de la lesión con alcohol y dejar secar. Cortar la superficie de la pústula e introducir la tórula estéril para remover el contenido y células de los márgenes de la lesión para luego depositarla en el medio de transporte anaerobio. En el caso de tener otras lesiones de acné (comedones, nódulos, quistes) la toma de muestras consistía en raspar la superficie de la lesión con una hoja de bisturí estéril, previa desinfección con alcohol, para luego recoger la muestra con la tórula y depositarla en el medio de transporte anaerobio. Evidentemente esta última forma de acceder a la muestra produce una destrucción de las capas superficiales de la piel que no sólo significa un proceso doloroso para el paciente sino que también una mayor facilidad de contaminación de la lesión.

Por lo tanto, existiendo dos opciones iniciales para la toma de la muestra, luego de conversaciones con los dermatólogos que realizaron la recolección, se decidió usar la forma menos invasiva y dolorosa para el paciente. Es por esto que se eligió la pústula como la lesión de la cual se obtuvieron las 42 muestras. La pústula, es una lesión presente en acné inflamatorio la cual según su extensión lo clasifica en leve moderado o severo (Pochi *et al.*, 1991 citado por Molgó, 1993). Frente a esto, la literatura menciona que el biotipo III de *P. acnes* se aísla con mayor frecuencia de lesiones severas de acné (Higaki, 2003). Por lo tanto, en los casos en que las pústulas fueron obtenidas de acné severo, eventualmente pudo existir selección de éste biotipo bacteriano por sobre los demás. Sin embargo, los resultados muestran que en los casos de acné severo, no sólo se aisló el biotipo III, sino que también se aisló el biotipo IV y V (Figura 6). Otro criterio importante de discutir es la selección de los pacientes. El criterio fue bastante amplio y se discriminó sólo el factor inmunosupresión. Esto favoreció la recolección de las muestras, sin embargo, desde el punto de vista de aislamiento bacteriológico, en muchos casos no se logró cultivar el bacilo en pacientes que se encontraban en tratamiento antimicrobiano al momento de tomar la muestra. Esto pudo incidir en esta dificultad para hallar la bacteria.

En un solo caso el paciente accedió a suspender el tratamiento por un tiempo prudente para lograr recolectar la muestra y aislar la bacteria.

Por último, el número de cepas aisladas, corresponde a un número de muestra pequeño. Este N pequeño sólo permite relacionar la distribución de las frecuencias de los resultados, pero no es capaz de soportar un estudio estadístico.

VI. CONCLUSIONES

- De 42 muestras recolectadas, se pudo aislar 25 cepas de *P. acnes* (59,5%).
- Las cepas de *P. acnes* aisladas de pacientes con acné vulgar, pertenecen a los biotipos I, III, IV y V, siendo el biotipo III el más frecuentemente detectado.
- La caracterización bioquímica proteolítica de las cepas de *P. acnes* no permite efectuar una diferenciación de biotipos bacterianos, al contrario de lo que ocurre con la capacidad sacarolítica de las cepas, en que si fue posible diferenciar claramente las cepas en 4 fenotipos.
- La enzima Fosfolipasa C está presente en el 92% de las cepas de *P. acnes*.
- En ninguna de las cepas estudiadas se detectó resistencia a tetraciclina.
- En dos cepas aisladas de *P. acnes* se observó resistencia a eritromicina y a clindamicina.
- En las dos cepas resistentes a eritromicina y clindamicina se detectó el gen de resistencia *erm* (X), lo que podría explicar este fenómeno.

VII. PROYECCIONES DEL TRABAJO

Este estudio constituye un aporte al conocimiento de las características bioquímicas y susceptibilidad antimicrobiana de *P. acnes* en Chile y permitió corregir o mejorar, en algunos casos, los tratamientos que los dermatólogos efectuaban en sus pacientes antes del estudio, pero además facilitará estudios posteriores que permitan relacionar la gravedad de las lesiones en la enfermedad con determinados biotipos ó con cepas con propiedades metabólicas particulares. Estas propiedades podrían ser también utilizadas en el seguimiento epidemiológico de algunos biotipos en la población.

VIII. REFERENCIAS

1. **AKTAS, Z.; ARIDOGAN, A.; KAYACAN, C.B.; AYDIN, D.** 2007. Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in staphylococci isolated in Istanbul; Turkey. *J. Microbiol.* **45**: 286-290.
2. **ALLAKER, R.P.; NOBLE, W.C.** 1993 *Microbial interactions on the skin. In: The skin microflora and microbial skin disease.* Cambridge, U.K.: Cambridge University Press pp 331-354.
3. **BLECHA, F.** 2001. Inmunomodulators for prevention and treatment of infectious diseases in food-producing animals. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, **17(3)**: 621-633.
4. **BLAST** (Basic local alignment search tool). 2007. National Center for Biotechnology Information (NCBI). [en línea]. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/sequence-analysis/> > [consulta: 26-06-2010].
5. **BOJAR, R.A.; HOLLAND, K.T.** 2004. Acné and *Propionibacterium acnes*. *Clin. Dermatol.* **22(5)**: 375-379.
6. **BROOK, I.; FRAZIER, E.H.** 1991. Infectious caused by *Propionibacterium* species. *Rev. Infect. Dis.* **13(5)**: 819-822.
7. **BROWN, S.K.; SHALITA, A.R.** 1998. Acné vulgaris. *Lancet.* **351(9119)**:1871-1876.
8. **CAMPONOVO, R.** 2002. Problemas de resistencia en *Streptococcus pyogenes*. *Rev. Chil. Infectol.* **19(2)**: 107-110.

- 9. COOPER, A.J.** 1998. Systematic review of *Propionibacterium acnes* resistance to systemic antibiotics. Med. J. Aust. **169(5)**: 259-261.
- 10. CUMMINS C.S.; JOHNSON, J.L.** 1972. Cell wall composition and deoxyribonucleic acid similarities among the anaerobic coryneforms, classical propionibacteria, and strains of *Arachnia propionica*. J. Bacteriol. **109(3)**: 1074-1066.
- 11. DAVIS, K.A.; CRAWFORD, S.A.; FIEBELKORN, K.R.; JORGENSEN, J.H.** 2005. Induction of telitromycin resistance by erythromycin in isolates of macrolide-resistant *Staphylococcus spp.* Antimicrob. Agents Chemother. **49**: 3059-3061.
- 12. DAWES, J.; SHEENA, J.T.; McBRIDE, W.H.** 1974. Properties of an antigenic polysaccharide from *Corynebacterium parvum*. J. Bacteriol. **120(1)**: 24-30.
- 13. EADY, E.A.; JONES, C.E.; GARDNER, K.J.; TAYLOR, J.P.; COVE, J.H.; CUNLIFFE, W.J.** 1993. Tetracycline-resistant propionibacteria from acne patients are cross-resistant to doxycycline, but sensitive to minocycline. Br. J. Dermatol. **128(5)**: 556-560.
- 14. EADY, E.A.; INGHAM, E.** 1994. *Propionibacterium acnes*: friend or foe?. Rev. Med. Microbiol. **5(3)**: 163-173.
- 15. EPSTEIN, L.B.; SUGIYAMA, M.** 1978. Effect of *Corynebacterium parvum* on human T-lymphocyte interferon production and T-lymphocyte proliferation *in vitro*. Cancer Res. **38(12)**: 4467-4473.
- 16. FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A.S.** 1998. Bailey & Scott's Diagnostic microbiology. Tenth Edition. Copyright, USA pp 689-713.
- 17. FUNKE, G.; VON GRAEVENITZ, A.; CLARRIDGE III, J.E.; BERNARD, K.A.** 1997. Clinical microbiology of coryneform bacteria. Clin. Microbiol. Rev. **10(1)**: 125-159.

- 18. GEMMELL, C.G.; UNKLES, S.E.** 1982. Effect of clindamycin, erythromycin, lincomycin and tetracycline on growth and extracellular lipase production by propionibacteria in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **21(1)**: 39.
- 19. GIALDRONI-GRASSI, G.; GRASSI, C.** 1985. Bacterial product as immunomodulating agents. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **76(1)**: 119-127.
- 20. GONZALEZ, J.J.; ANDREU, A.; SPANISH GROUP FOR THE STUDY OF PERINATAL INFECTION FROM THE SPANISH SOCIETY FOR CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES** 2005. Multicenter study of the mechanisms of the resistance and clonal relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated resistant to macrolides, lincosamides and ketolides in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 2525 – 2527.
- 21. GONZALEZ-SERVA A.** 1996. La patogénesis del acné: de un paradigma hiperqueratósico (comedón) a uno de calciosis folicular (sebolito). *Medicina Cutanea.* **24(1)**: 11-25.
- 22. GREENMAN J.** 1984. Effects of sub-lethal concentrations of the antimicrobial agent propylene phenoxetol on the growth and extracellular enzymes of *Propionibacterium acnes*. *Microbios.* **39(156)**: 101-108.
- 23. GREENWOOD, R.; BURKE, B.; CUNLIFFE, W.J.** 1986. Evaluation of a therapeutic strategy for the treatment of acne vulgaris with conventional therapy. *Br. J. Dermatol.* **114(3)**: 353-358.
- 24. GÜBELIN, W.; MARTINEZ, M.A.; MOLINA, M.T.; ZAPATA, S.; VALENZUELA, M.E.** 2006. Antimicrobial susceptibility of strains of *Propionibacterium acnes* isolated from inflammatory acne. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **48(1)** : 14-16.
- 25. HIGAKI, S.** 2003. Lipase inhibitors for the treatment of acne. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* **22**: 377-384.

- 26. HIRT, H.M.; SCHWENCK, M.; BECKER, H.; KIRCHNER, H.** 1978. Interferon production and lymphocyte stimulation in human leucocyte cultures stimulated by *Corynebacterium parvum*. Clin. Exp. Immunol. **32(3)**: 471-476.
- 27. HOLLAND, K.I.** 1989. Microbiology of acne. In: Cunliffe, W.J. Acne. Martin Dunitz Ltda., London. pp 178-210.
- 28. ISHIDA, N.; NAKAMINAMI, H.; NOGUCHI, N.; KUROKAWA, I.; NISHIYAMA, S.; SASATSU, M.** 2008. Antimicrobial susceptibilities of *Propionibacterium acnes* isolated from patients with acne vulgaris. Microbiol. Immunol. **56(12)**: 612-614.
- 29. JAKAB, E.; ZBINDEN, R.; GUBLER, J.; RUEF, C.; VON GRAEVENITZ, A.; KRAUSE, M.** 1996. Severe infections caused by *Propionibacterium acnes*: an underestimated pathogen in late postoperative infections. Yale J. Biol. Med. **69(6)**: 477-482.
- 30. JAMES J.L.** 1995. New understanding of the pathogenesis of acne. J. AM. Acad. Dermatol. **32**: 15-25.
- 31. JOST, B.H.; FIELD, A.C.; TRINH, H.T.; SONGER, J.G.; BILLINGTON, S.J.** 2003 Tylosin resistance in *Arcanobacterium pyogenes* is encoded by an *erm X* determinant. Antimicrob. Agents Chemother. **47**: 3519-3524.
- 32. KIRCHNER H.; HIRT, H.M.; MUNK, K.** 1977. Protection against herpes simplex virus infection in mice by *Corynebacterium parvum*. Infect. Immun. **16(1)**: 9-11.
- 33. KIRCHNER, H.; SCOTT, M.T.; HIRT H.M.; MUNK, K.** 1978. Protection of mice against viral infection by *Corynebacterium parvum* and *Bordetella pertussis*. J. Gen. Virol. **41(1)**: 97-104.

- 34. KIRCHHOFF, T.; MERKESDAL, S.; ROSENTHAL, H.; PROKOP, M.; CHAVAN, A.; WAGNER, A.; MAI, U.; HAMMER, M.; ZEIDLER, H.; GALANSKI, M.** 2003. Diagnostic management of patients with SAPHO syndrome: use of MR imaging to guide bone biopsy at CT for microbiological and histological work-up. *Eur. Radiol.* **13(10)**: 2304-2308.
- 35. KISHISHITA, M.; USHIJIMA, T.; OZAKI, Y.; ITO, Y.** 1979. Biotyping of *Propionibacterium acnes* isolated from normal human facial skin. *Appl. Environ. Microbiol.* **38(4)**: 585-589.
- 36. KLIGMAN, A.M. ; STRAUSS, J.S.** 1960. The pathologic dynamics of acne vulgaris. *Arch. Dermatol.* **82**: 779-790.
- 37. KO, H.L.; PULVERER, G.** 1973. Fermentative and serological studies on *Propionibacterium acnes*. *Appl. Microbiol.* **25(2)**: 222-229.
- 38. KO, H.L.; ROSZKOWSKI, W.; JELJASZEWICZ, J.; PULVERER G.** 1981. Comparative study on the immunostimulatory potency of different *Propionibacterium* strains. *Med. Microbiol. Immunol.* **170(1)**: 1-9.
- 39. LEEMING, J.P.; HOLLAND, K.T.; CUNLIFFE, W.J.** 1984. The microbial ecology of pilosebaceous units isolated from human skin. *J. Gen. Microbiol.* **130(4)**: 803-807.
- 40. LEVIN, T.P.; SUCH, B.; AXELROD, P.; TRUANT, A.L.; FEKETE, T.** 2005. Potential clindamicyn resistance in clindamicyn-susceptible, erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus*: report of a clinical failure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 1222-1224.
- 41. LEYDEN, J.J.; MCGINLEY, K.J.; MILLS, O.H.; KLIGMAN, A.M.** 1975. Age-related changes in the resident bacterial flora of the human face. *J. Invest. Dermatol.* **65(4)**: 379-381.

- 42.LIEBL, W.; KLOOS, W.E.; LUDWING, W.** 2002. Plasmid-borne macrolide resistance in *Micrococcus luteus*. *Microbiology* **148**: 2479-2487.
- 43.LUNA, V.A.; COATES, P.; EADY, E.A.; COVE, J.H.; NGUYEN, T.T.; ROBERTS, M.C.** 1999 A variety of gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**: 19-25.
- 44.LUNN, G.; SANSONE, E.B.** 1987. Ethidium bromide: destruction and decontamination of solutions. *Anal Biochem.* 162(2): 453-458 (citado por Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989 Decontamination of dilute solutions of ethidium bromide. **In:** *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, U.S.A. v. 3).
- 45.MARKOWSKA-DANIEL, I.; PEJSAK, Z.; SZMIGIELSKI, S.; JELJASZEWICZ, J.; PULVERER, G.** 1992. Adjuvant properties of *Propionibacterium avidum* KP-40 in vaccination against endemic viral and bacterial infections. I. Swine immunized with live attenuated Aujeszky's disease virus vaccine and experimentally infected with virulent viruses. *Zentralbl. Bakteriol.* **277(4)**: 529-537.
- 46.MARKOWSKA-DANIEL, I.; PEJSAK, Z.; SZMIGIELSKI, S.; JELJASZEWICZ, J.; PULVERER, G.** 1993. Prophylactic application of *Propionibacterium avidum* KP-40 in swine with acute experimental infections. I. Viral infections Aujeszky's disease and classical swine fever. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **100(4)**: 149-151.
- 47.McGINLEY, K.J.; WEBSTER, G.F.; LEYDEN, J.J.** 1978. Regional variations of cutaneous propionibacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **35(1)**: 62-66.
- 48.MIN, Y.H.; JEONG, J.H.; CHOI, Y.J.; YUN, H.J.; LEE, K.J.; SHIM, M.J.; KWAK, J.H.; CHOI, E.C.** 2003. Heterogenicity of macrolide –lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes in enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 3415-3420.

- 49. MOROSINI, M.I.; CANTON, R.; LOZA, E.; NEGRI, M.C.; GALAN, J.C.; ALMARAZ, F.; BAQUERO, F.** 2001 In Vitro activity of telithromycin against Spanish *Streptococcus pneumoniae* isolated with characterized macrolide resistance mechanisms. Antimicrob. Agents Chemother. **45**: 2427 – 2431.
- 50. NAKAJIMA, Y.** 1999. Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics. J. Infect. Chemother. **5**: 61-74.
- 51. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS).** 2004. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved Standard. Sixth Edition. NCCLS document M11-A6, Pe, USA. pp 1-21.
- 52. OKAMURA, H.; KAWAGUCHI, K.; SHOJI, K.; KAWADE, Y.** 1982. High-level induction of gamma interferon with various mitogens in mice pretreated with *Propionibacterium acnes*. Infect. Immun. **38(2)**: 440-443.
- 53. OPRICA, C.; NORD, C.E.; ESCMID STUDY GROUP ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN ANAEROBIC BACTERIA** 2005 a. European surveillance study on the antibiotic susceptibility of *Propionibacterium acnes*. Clin. Microbiol. Infect. **11(3)**: 204-213.
- 54. OPRICA, C.; LÖFMARK, S.; LUND, B.; EDLUND, C.; EMTESTAM, L.; NORD, C.E.** 2005 b. Genetic basis of resistance in *Propionibacterium acnes* strains isolated from diverse types of infection in different European countries. Anaerobe. **11(3)**: 137-143.
- 55. POCHI, P.E.; SHALITA, A.R.; STRAUSS, J.S.; WEBSTER, S.B.** 1991. Report of the consensus conference on acne classification. J. Am. Acad. Dermatol. **24(3)**: 495 – 500 (citado por **MOLGO, M.** 1993. Clasificación del Acné. Dermatología. **9(4)**: 293-294).

- 56. PUHVEL, S.M.; REISNER, R.M.; AMIRIAN, D.A.** 1975. Quantification of bacteria in isolated pilosebaceous follicles in normal skin. *J. Invest. Dermatol.* **65**: 525-531.
- 57. QUINN, P.J.** 1990. Mechanisms of actions of some immunomodulators used in veterinary medicine. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* **35**: 43-99.
- 58. RASSNER, G.** 1999 a. Estructura y función de la piel. **In:** Manual y Atlas de Dermatología. 5ª ed. Harcourt. Madrid, España. pp 5-9.
- 59. RASSNER, G.** 1999 b. Enfermedades de las glándulas sebáceas. **In:** Manual y Atlas de Dermatología. 5ª ed. Harcourt. Madrid, España. pp 277-284.
- 60. ROBERTS, M.C.; SUTCLIFFE, J.; COURVALIN, P.; JENSEN, L.B.; ROOD, J.; SEPPALA, H.** 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 2823-2830
- 61. ROSATO, A.E.; LEE, B.S.; NASH, K.A.** 2001. Inducible macrolide resistance in *Corynebacterium jeikium*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **45**: 1982-1989.
- 62. ROSS, J.I.; EADY, E.A.; COVE, J.H.; JONES, C.E.; RATYAL, A.H.; MILLER, Y.W.** 1997. Clinical resistance to erythromycin and clindamycin in cutaneous propionibacteria isolated from acne patients is associated with mutations in 23S rRNA. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **41(5)**: 1162-1165.
- 63. ROSS, J.I.; EADY, E.A.; COVE, J.H.; CUNLIFFE, W.J.** 1998. 16S rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a Gram-positive bacterium. *Antimicrob. Agent. Chemother.* **42(7)**: 1702-1705.
- 64. ROSS, J.I.; EADY, E.A.; CARNEGIE, E.; COVE, J.H.** 2002. Detection of transposon Tn5432-mediated macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB)

resistance in cutaneous propionibacteria from six european cities. J. Antimicrob. Chemother. **49(1)**: 165-168.

65. ROSZKOWSKI, W.; ROSZKOWSKI, K.; KO, H.L.; BEUTH, J.; JELJASZEWICZ, J. 1990. Immunomodulation by propionibacteria. Zentralbl. Bacteriol. **274(3)**:289-298.

66. RUSSELL, J.J. 2000 a. Topical therapy for acne. Am. Fam. Physician. **61(2)**: 357-366.

67. RUSSELL, J.J. 2000 b. Topical therapy for acne. [en línea] <<http://www.aafp.org/afp/20000115/357.html>> [consulta: 27-07-2010].

68. SANTAGATI, M.; IANNELLI, F.; OGGIONI, M.R.; STEFANI, S.; POZZI, G. 2000 Characterization of a genetic element carrying the macrolide efflux gene *mef(A)* in *Streptococcus pneumoniae*.

69. SEPPALA, H.; SKURNIK, M.; SOINI, H.; ROBERTS, M.C.; HUOVINEN, P. 1998 A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. Antimicrob. Agents Chemother. **42**: 257-262.

70. SHALITA, A.R.; WHEATLEY, V. 1970. Inhibition of pancreatic lipase by tetracyclines. J. Invest. Dermatol. **54(5)**: 413-415.

71. SCHILLER, J.; GROMAN, N.; COLEY, M. 1980 Plasmids in *Corynebacterium diphtheriae* and diphtheroids mediating erythromycin resistance. Antimicrob. Agents Chemother. **18**: 814-821.

72. TAMMELIN, A.; HAMBRAEUS, A.; STAHL, E. 2002. Mediastinitis after cardiac surgery: improvement of bacteriological diagnosis by use of multiple tissue samples and strain typing. J. Clin. Microbiol. **40(8)**: 2936-2941.

- 73. TUNNEY, M.M.; PATRICK, S.; CURRAN, M.D.; RAMAGE, G.; HANNA, D.; NIXON, J.R.; GORMAN, S.P.; DAVIS, R.I.; ANDERSON, N.** 1999. Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* **37(10)**: 3281-3290.
- 74. VALENZUELA, M. M.** 1998. Identificación de bacterias anaeróbicas a nivel intrahospitalario. Instituto de Salud Pública de Chile p: 1-31.
- 75. VOSS, J.G.** 1970. Differentiation of the two groups of *Corynebacterium acnes*. *J. Bacteriol.* **101(2)**: 392-397.
- 76. WEISBLUM, B.** 1995 Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 577-585.
- 77. YAGÜE, G.; MORA, B.; MARTÍNEZ-TOLDOS, M.; RODRIGUEZ, T.; VALERO, P.; SEGOVIA, M.** 2005. Implicación de los genes *erm X* en la resistencia a los macrólidos y la telitromicina de *Corynebacterium jeikium* y *Corynebacterium amycolatum*. *Rev Esp Quimioterap* **18(11º 3)**: 236-242.
- 78. YI, Y.H.; CHOI, J.H.; LEE, H.K.; LEE, K.J.; BAE, S.M.; YU, J.Y.** 2006. Characterization of erythromycin resistance of *Streptococcus pyogenes* isolated from pharyngitis patients in Korea. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **59**: 192-194.