



UNIVERSITAT  
ROVIRA i VIRGILI



Vall d'Hebron  
Hospital

**ESTRUCTURA POBLACIONAL DE ESPECIES DE  
ACHROMOBACTER SPP. AISLADAS DE PACIENTES CON  
FIBROSIS QUÍSTICA Y PERFILES DE SENSIBILIDAD  
ANTIMICROBIANOS**

Adriana Ferre Giraldo

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA 2020

Tutora académica y supervisora: M<sup>a</sup> Teresa Martín Gómez, Unidad de Bacteriología Respiratoria y Micología Clínica del Hospital Vall d'Hebron, [mtmartin@vhebron.net](mailto:mtmartin@vhebron.net)

En colaboración con: Departamento de Microbiología

Supervisora: M<sup>a</sup> Jesús Torija Martínez, [mjesus.torija@urv.cat](mailto:mjesus.torija@urv.cat)

4 de septiembre

Yo, Adriana Ferre Giraldo, con DNI 46088067-T, soy concedora de la guía de prevención del plagio de la URV Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes (aprobada en julio 2017) ([http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio\\_competencies-nuclears/plagi/](http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio_competencies-nuclears/plagi/)) afirmo que este TFG no constituyen ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 1 de septiembre de 2020

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Adriana', with a large circular flourish at the end.

## AGRADECIMIENTOS

---

En primer lugar, quisiera agradecer de forma especial a mis padres, por sus sabios consejos, su apoyo incondicional y por enseñarme a no rendirme.

A Pilar Alcobilla, por prestarme su atención en todo momento, por su paciencia y cariño para transmitirme sus conocimientos y sobre todo por animarme con sus palabras.

Finalmente, me gustaría mostrar mis agradecimientos a mi tutora la Dra M<sup>a</sup> Teresa Martín Gómez por ofrecerme la gran oportunidad de trabajar en este proyecto. Su apoyo y consejos han sido esenciales durante esta experiencia, guiándome a lo largo de mi formación. Su inestimable dedicación y confianza depositada en mí en todo momento me han permitido adquirir nuevos conocimientos, haciendo que esta experiencia resultara muy enriquecedora. Gracias a la Dra Martín, esta oportunidad no solo me ha ofrecido experiencias profesionales, también me ha hecho crecer personalmente, descubriéndome el mundo de la investigación.

# ÍNDICE

1	DATOS DEL CENTRO .....	2
2	RESUMEN.....	3
3	INTRODUCCIÓN.....	4
3.1	Achromobacter spp.....	4
3.2	La Fibrosis Quística como enfermedad sistémica .....	7
3.3	Los patobiones bacterianos en Fibrosis Quística: emergencia de <i>Achromobacter</i> .....	9
3.4	Resistencia a antibióticos .....	11
4	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	13
5	METODOLOGÍA .....	14
5.1	Recogida de las muestras y aislamiento de las cepas .....	14
5.2	Selección de los genes a amplificar .....	14
5.3	Materiales .....	15
5.4	Amplificación y secuenciación del ADN .....	16
5.5	Electroforesis.....	17
5.6	Purificación de los amplificados .....	18
5.7	Reacción de secuenciación .....	18
5.8	Precipitación ADN.....	19
5.9	Secuenciación .....	19
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	21
6.1	Análisis de las secuencias .....	21
6.2	Optimización de la amplificación.....	21
6.3	Asignación de los perfiles alélicos .....	23
6.4	Identificación de las especies .....	24
6.5	Colonización crónica.....	27
6.6	Identificación de secuenciotipos (ST) .....	28
6.7	Perfiles de sensibilidad a antimicrobianos .....	29
7	CONCLUSIONES .....	30
8	BIBLIOGRAFÍA.....	32
9	AUTOEVALUACIÓN.....	35
10	ANEXO 1 .....	36
11	ANEXO 2.....	37
12	ANEXO 3.....	38
13	ANEXO 4.....	39
14	ANEXO 5.....	40

## 1 DATOS DEL CENTRO

---

El presente trabajo se ha realizado en base a las prácticas realizadas en la Unidad de Bacteriología Respiratoria y Micología Clínica perteneciente al Departamento de Microbiología del Hospital Vall d'Hebron.

El grupo de investigación en Microbiología está dedicado al estudio de los aspectos microbianos implicados en las enfermedades infecciosas. Forma parte de la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI) y tiene la categoría de Grupo de investigación consolidado en Catalunya.

Los estudios llevados a cabo en las diferentes líneas de investigación del grupo se centran en los mecanismos patógenos de los microorganismos que causan enfermedades infecciosas y que pueden desarrollar resistencias antimicrobianas. Además, se evalúan nuevos sistemas para el diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas.

## 2 RESUMEN

---

Las especies del género *Achromobacter* corresponden a bacilos Gram negativos no fermentadores de la glucosa de distribución ubicua en el entorno. Estos microorganismos se aíslan ocasionalmente en muestras clínicas, siendo más frecuente el hallazgo en secreciones del tracto respiratorio que en otro tipo de especímenes. La detección de bacterias de este género en aislados de pacientes con fibrosis quística es cada vez más frecuente. Sin embargo, su significado clínico sigue siendo controvertido, probablemente por la escasez de casos reportados en la literatura.

Este trabajo se centra en el estudio de la distribución y características principales asociadas al aislamiento de especies de *Achromobacter* recuperadas de muestras de tracto respiratorio en pacientes con fibrosis quística. Para la discriminación entre distintas especies se llevó a cabo la técnica de tipado MLST (*Multilocus sequence typing*) y el posterior análisis bioinformático de las secuencias concatenadas para el establecimiento de relaciones filogenéticas. *A. xylosoxidans* se ha revelado como la especie aislada con una mayor frecuencia, además de ser la principal especie asociada con la colonización/infección crónica. No obstante, es necesario optimizar los protocolos para la amplificación de fragmentos de genes, puesto que errores en la amplificación impidieron la obtención de perfiles alélicos completos. Consecuentemente, se necesitarían estudios adicionales para poder comparar las características de los aislados en función de que sean puntuales o persistentes, para trazar una posible dispersión clonal de algún secuenciotipo.

**Palabras clave:** *Achromobacter*, Fibrosis quística (FQ), genotipado, epidemiología, resistencia a antimicrobianos, secuenciotipo (ST).

### 3 INTRODUCCIÓN

#### 3.1 *Achromobacter* spp.

Las especies del género *Achromobacter* corresponden a bacilos Gram negativos aeróbicos pertenecientes al orden Burkholderiales, caracterizados por ser no fermentadores de glucosa y oxidasa-positivos, de distribución ubicua en el entorno. Se han descrito hasta 19 especies dentro de este género <sup>[1]</sup>, que permanece en constante revisión taxonómica.

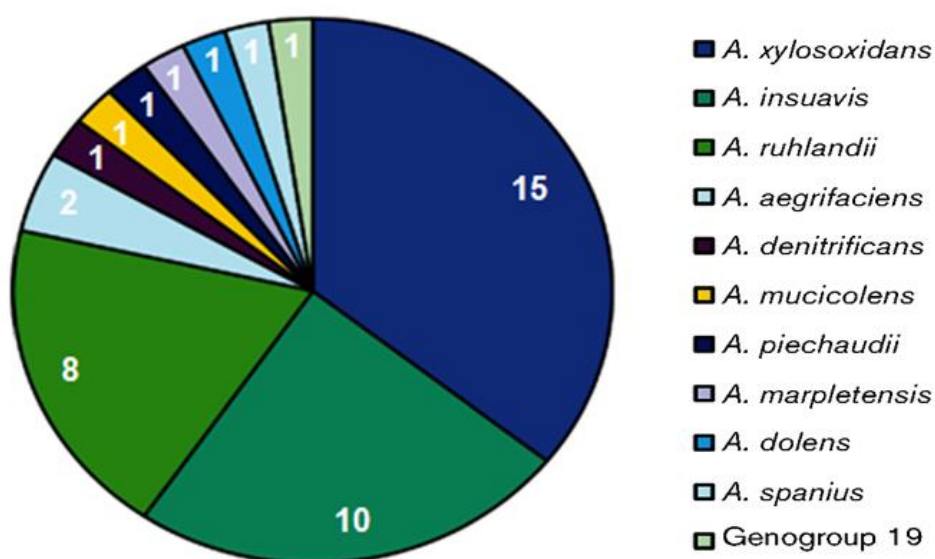
Tabla 1. Especies identificadas del género *Achromobacter*.

NOMBRE	REFERENCIA
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	(ex Yabuuchi and Ohyama 1971) Yabuuchi and Yano 1981
<i>Achromobacter denitrificans</i>	(Rüger and Tan 1983) Coenye <i>et al.</i> 2003
<i>Achromobacter piechaudii</i>	(Kiredjian <i>et al.</i> 1986) Yabuuchi <i>et al.</i> 1998
<i>Achromobacter ruhlandii</i>	(Packer and Vishniac 1955) Yabuuchi <i>et al.</i> 1998
<i>Achromobacter insolitus</i>	Coenye <i>et al.</i> 2003
<i>Achromobacter spanius</i>	Coenye <i>et al.</i> 2003
<i>Achromobacter marplatensis</i>	Gomila <i>et al.</i> 2011
<i>Achromobacter animicus</i>	Vandamme <i>et al.</i> 2013
<i>Achromobacter mucicolens</i>	Vandamme <i>et al.</i> 2013
<i>Achromobacter pulmonis</i>	Vandamme <i>et al.</i> 2013
<i>Achromobacter aegrifaciens</i>	Vandamme <i>et al.</i> 2014
<i>Achromobacter anxifer</i>	Vandamme <i>et al.</i> 2014
<i>Achromobacter dolens</i>	Vandamme <i>et al.</i> 2014
<i>Achromobacter insuavis</i>	Vandamme <i>et al.</i> 2014
<i>Achromobacter pestifer</i>	(ex Frankland and Frankland 1887) Vandamme <i>et al.</i> 2016
<i>Achromobacter agilis</i>	Vandamme <i>et al.</i> 2016
<i>Achromobacter deleyi</i>	Vandamme <i>et al.</i> 2016
<i>Achromobacter kerstersii</i>	Vandamme <i>et al.</i> 2016
<i>Achromobacter aloeverae</i>	Kuncharoen <i>et al.</i> 2017

Estos microorganismos se encuentran ubicuamente distribuidos en el entorno, habiendo sido aislados de diversas fuentes, principalmente en ambientes acuáticos y suelo, incluyendo muestras clínicas humanas. Aunque pueden formar parte de la flora gastrointestinal normal de individuos sanos, ocasionalmente son hallados en secreciones del tracto respiratorio <sup>[2][3]</sup>.

Las especies de *Achromobacter* se comportan como patógenos humanos oportunistas que pueden causar infecciones en pacientes inmunocomprometidos. Aunque infrecuentes, pueden desencadenar infecciones nosocomiales graves, especialmente en las unidades de cuidados intensivos (UCI). Entre los casos descritos en la literatura, la bacteremia primaria se presenta como el cuadro clínico más común, reportándose también: meningitis, neumonía, sepsia, peritonitis o infecciones del tracto urinario entre otras [4] [5]. Además de causar cuadros agudos, el género *Achromobacter* ha sido descrito como patobionte emergente en pacientes afectos de Fibrosis Quística [6].

Se han podido establecer diferencias entre las especies de *Achromobacter*, en función de su nicho ecológico y el impacto que pueden llegar a generar en el huésped. *Achromobacter xylosoxidans* se ha aislado de muestras de agua y se considera la especie que con más frecuencia causa infecciones crónicas en las vías respiratorias. Aunque algunas especies como *A. piechaudii*, *A. denitrificans*, *A. spanius*, *A. insolitus* y *A. marplatensis*, habían sido reportadas como habitantes del suelo, recientemente se han vinculado a infecciones humanas con escasa frecuencia. Además, se ha evidenciado un aumento en la prevalencia de ciertas especies que se relacionan con infecciones humanas, como es el caso de *A. ruhlandii* y *A. insuavis* (Figura 1).



**Figura 1.** Distribución de especies y genogrupos de *Achromobacter* identificados en 42 pacientes. En el gráfico se presenta el número de pacientes infectados por cada especie/grupo [7].

Representantes del género *Achromobacter* fueron aislados y descritos por primera vez en 1971 por Yabuuchi y Oyama [8]. Posteriormente, se clasificaron dentro del género *Alcaligenes*, hasta el establecimiento definitivo del género *Achromobacter* como un ente propio. Las herramientas de secuenciación genómica de las cuales se dispone

actualmente han permitido dilucidar que el género estaría filogenéticamente más próximo a *Bordetella* que a *Alcaligenes*, llegando incluso a ser propuesto un ancestro común entre ambos géneros [3].

La estructura poblacional y taxonomía del género *Achromobacter* siguen estando mal definidas y, en consecuencia, la identificación a nivel de especie es complicada. Por esta razón, es frecuente la identificación errónea de especies de *Achromobacter*, siendo comúnmente confundidas con especies de los géneros *Alcaligenes*, *Bordetella*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Ralstonia* y *Stenotrophomonas*, especialmente cuando ésta se basa en perfiles bioquímicos [9][10].

Aunque asequibles en cuanto a coste y aplicación, la aplicación de métodos fenotípicos basados en pruebas bioquímicas ofrece pobres resultados en lo que respecta a la precisión de la identificación de género y especie cuando se aplica a *Achromobacter* en los laboratorios de rutina asistencial, como se ha mencionado.

La técnica de espectrometría de masas, MALDI-TOF MS, es otra de las técnicas que ha resultado especialmente útil en la identificación bacteriana. No obstante, aunque se trata de un sistema rápido y preciso, ocasionalmente se obtienen resultados imprecisos cuando se trata de especies poco frecuentes [11]. Para evitar estos problemas y conseguir una identificación más fiable que permita profundizar en el conocimiento de su epidemiología y vinculación con la patología humana, las técnicas moleculares se han revelado mucho más fiables, aunque su uso sólo suele estar al alcance de los laboratorios de referencia. La amplificación de la subunidad 16S del ARN ribosomal, de utilidad para la identificación de especies de otros géneros no proporciona suficiente capacidad discriminativa como para diferenciar aislados pertenecientes a los géneros *Achromobacter* y *Bordetella*, por lo que se han promovido el uso de marcadores genéticos alternativos. Este es el caso del gen *bla*<sub>OXA-114</sub> propuesto por Turton *et al.* [12] para la identificación de *A. xylosoxidans* o, más recientemente, Spilker *et al.* [13] ha propuesto la utilización de un fragmento de 765 pares de bases del gen *nrdA* para la identificación de la totalidad de especies conocidas del género. Una porción de este último gen, junto con secuencias parciales de otros 7 loci [9], forman parte del único esquema de genotipado universal disponible actualmente, de utilidad para delimitar la epidemiología del género, descubrir posibles brotes de infección secundarios a transmisión cruzada, o verificar la persistencia de los aislados en pacientes con aislamientos de *Achromobacter* persistentes en el tiempo.

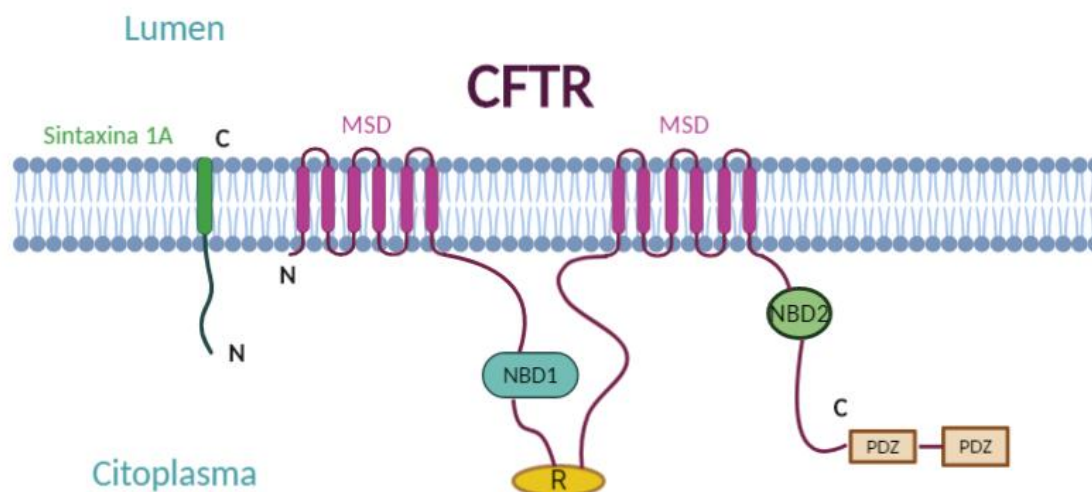
Todavía no se han definido con claridad los factores de virulencia, y el impacto clínico de la infección de *Achromobacter spp* es controvertido. Aunque se sabe que hay

cepas capaces de crear multirresistencias a ciertos antibióticos, no se conocen exactamente los mecanismos que pueden permitir la adherencia, colonización e infección del tracto respiratorio.

### 3.2 La Fibrosis Quística como enfermedad sistémica

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad congénita y sistémica. Es el trastorno genético autosómico recesivo más frecuente en los caucásicos, con una mayor prevalencia en Europa, América del Norte y Australia. Está causada por mutaciones en la proteína denominada Regulador de la Conductancia Transmembranal de la FQ (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* [CFTR]).

CFTR es una proteína de membrana que juega, entre otros, un papel clave en el control de la secreción de sodio, cloro, agua y bicarbonato. Se localiza principalmente en membranas de células epiteliales de vías respiratorias, intestino, tejidos reproductivos y glándulas exocrinas (páncreas exocrino, glándulas salivales o sudoríparas). Resulta fundamental para mantener la composición iónica, regular el flujo de iones transepiteliales y el volumen de líquido en la superficie de vías respiratorias. Pese a los numerosos estudios de que ha sido objeto, sigue sin estar bien definido su papel en la interrelación entre células de diferente estirpe (Figura 2).



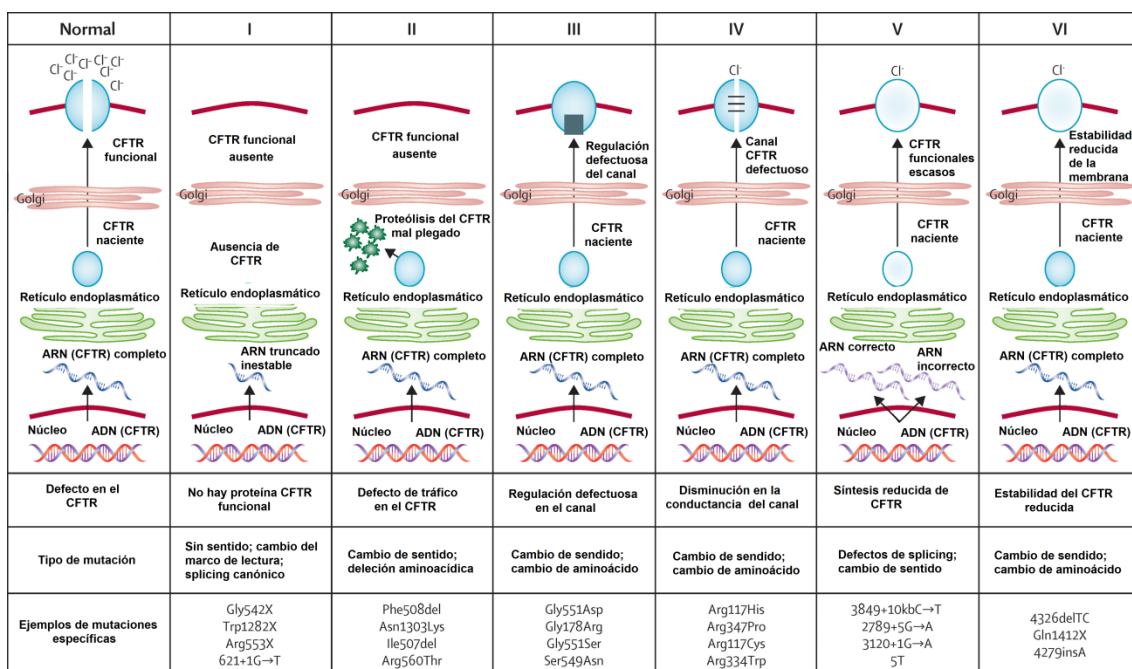
**Figura 2.** Esquema representativo del CFTR y su interacción con otras proteínas. MSD (dominio de expansión de membrana); NBD (dominio de unión de nucleótidos citosólicos); R (dominio regulador citoplasmático); PDZ (proteínas adaptadoras citoplasmáticas). Elaboración propia.

El gen CFTR contiene 27 exones y, aunque se han descrito cerca de 2000 mutaciones para este gen, solo está clara la asociación con FQ en alrededor de un centenar de ellas. El tipo de mutación, el grado de repercusión en la integridad y funcionalidad del CFTR, así como la combinación de variantes alélicas presentes en los pacientes

condiciona, al menos en parte, el amplio espectro de gravedad que pueden presentar los pacientes FQ [14].

Aún no se conocen con precisión todas las características del CFTR, por lo que tampoco se han podido identificar las posibles consecuencias de todas las mutaciones del gen o de los genes que pueden influir en la regulación de las funciones de CFTR. No obstante, los efectos que podrían provocar las mutaciones se han relacionado con el procesamiento de la proteína CFTR y su función y estabilidad en la membrana celular (Figura 3) [15][16].

La pérdida o disfunción de actividad de CFTR provoca una alteración en la homeóstasis de iones y del líquido de las superficies epiteliales de diferentes órganos o tejidos, y conduce a manifestaciones clínicas diversas. Aunque principalmente se ven afectadas las células epiteliales, el mal funcionamiento de la proteína también puede influir en las células inmunitarias.



**Figura 3.** Diferentes tipos de mutaciones identificadas en el gen CFTR, así como el defecto/consecuencia provocado/a. Adaptación de *Elborn et al* [16].

La FQ desencadena principalmente obstrucción de pequeñas vías respiratorias y progresivamente, deterioro respiratorio secundario a la viscosidad excesiva de las secreciones respiratorias, difíciles de movilizar, y la retención en su interior de los microorganismos que entran por inhalación en el tracto respiratorio inferior y no pueden ser expulsados, lo que desencadena un círculo vicioso de inflamación-infección. En la zona afectada se desencadena la secreción elevada de elastasa por

parte de los neutrófilos, aumentando así la producción de moco, lo cual estimula en mayor medida la respuesta innata. Los pacientes con FQ son susceptibles de desarrollar esta respuesta inflamatoria neutrófila excesiva. La inflamación aparece en edades tempranas y progresa de forma que se vuelve persistente, de manera que acaba resultando perjudicial para el huésped. Se ha informado de que la respuesta neutrófila ocasiona daños estructurales y agrava la obstrucción en las paredes de las vías respiratorias. Las alteraciones respiratorias son las principales condicionantes de la morbi-mortalidad que presenta esta enfermedad, aunque la disfunción de las células epiteliales de otros órganos y sistemas es responsable de otras manifestaciones importantes como la mala absorción de nutrientes (páncreas), la cirrosis biliar (hígado), el choque térmico (glándulas sudoríparas) o la infertilidad en los varones afectados (conductos deferentes) <sup>[17]</sup>.

### 3.3 Los patobiones bacterianos en Fibrosis Quística: emergencia de *Achromobacter*

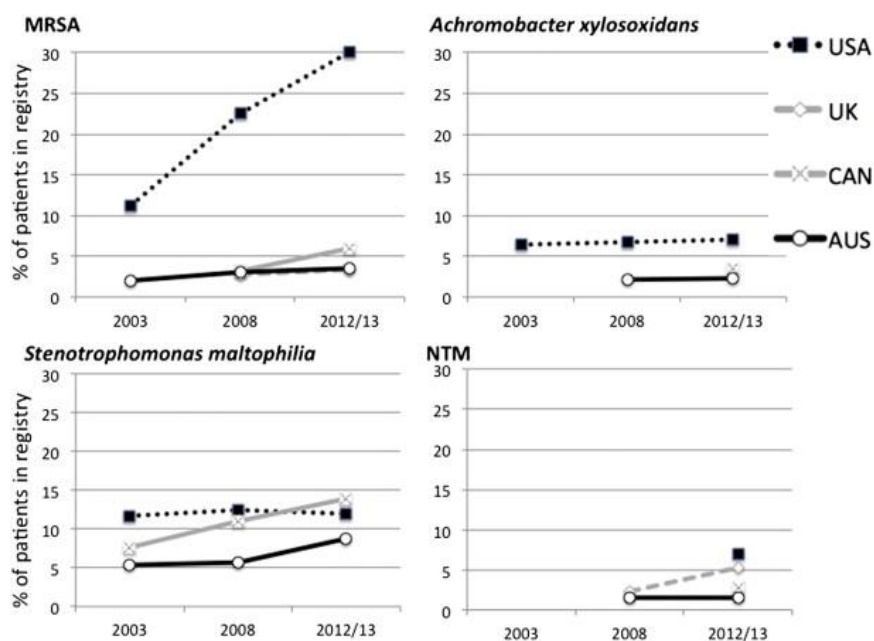
La retención de microorganismos en las secreciones hiperviscosas junto a la capacidad de éstos para resistir el estrés oxidativo derivado del estado de excesiva inflamación y de generar biofilms hace que los pacientes FQ se caractericen por presentar colonizaciones crónicas por microorganismos (fundamentalmente *Staphylococcus aureus* y una amplia gama de bacilos Gram negativos no fermentadores) desde edades tempranas de la vida.

Entre las especies bacterianas predominantes aisladas de las mucosas de pacientes FQ se encuentra *Pseudomonas aeruginosa*, responsable de una elevada mortalidad. Otros patógenos humanos comunes como *S. aureus* y *Haemophilus influenzae* pueden causar infección pulmonar repetida en niños con FQ. Otros patógenos oportunistas importantes en la FQ son las bacterias del complejo *Burkholderia cepacia* y las micobacterias no tuberculosas, principalmente *Mycobacterium abscessus* y el *Mycobacterium avium-intracellulare* <sup>[16]</sup>.

Sin embargo, en los últimos años, ha aumentado la incidencia de otras bacterias como *Stenotrophomonas maltophilia*, o especies de *Achromobacter* (Figura 4).

Las especies de *Achromobacter* son cada vez más reconocidas como patógenos emergentes en pacientes con FQ <sup>[11]</sup>, aumentando su incidencia en este tipo de pacientes. Según los informes del Registro Nacional de la Fundación para la Fibrosis Quística de los Estados Unidos, la prevalencia de pacientes con infección por

*Achromobacter* ha aumentado de un 0,5% en 1995 a un 6,2% en 2011. La mayor tasa se ha registrado en individuos de entre 18 y 25 años [5].



**Figura 4.** Datos de prevalencia de los principales patógenos en pacientes FQ en diferentes países. Los criterios de presentación varían en función del registro del país (razón por la que algunos datos no están incluidos). Representan como mínimo un cultivo por año y no se hacen diferencias entre colonización transitoria o crónica. Los datos fueron tomados del Registro de Pacientes de Fibrosis Quística de los respectivos países [2]. MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. NTM: Nontuberculous mycobacteria.

La patogenicidad de estas bacterias aún no está bien establecida, puesto que las pruebas clínicas son limitadas y se trata de estudios en breves periodos de tiempo con resultados variados. Sin embargo, los datos indican que el impacto clínico de la colonización en pacientes con FQ puede ser transitorio, aunque ha llegado a ser crónico en algunos casos [9] [18]. No está claro su papel en el deterioro de la función respiratoria en pacientes FQ, pero el hecho de que algunos pacientes lleguen a situaciones terminales presentando como únicos colonizantes estos microorganismos apunta a que pueden ejercer un papel deletéreo a largo plazo. Por otra parte, estos no fermentadores emergentes presentan como característica la resistencia a numerosos grupos de antimicrobianos, haciendo difícil su control mediante la administración de antibióticos.

Aunque la infección crónica se ha relacionado con tasas de mortalidad mayores, no se ha determinado si ciertas especies o secuenciotipos (ST) podrían estar vinculados con una patogenicidad superior o colonización crónica.

Generalmente, la colonización se da por adquisición de bacterias del medio y cada paciente contiene su propia cepa. No obstante, estudios de aislamiento de *Achromobacter spp.* a partir de muestras de pacientes FQ, normalmente de esputo, han descrito casos de contaminación cruzada y transferencia horizontal [15][16][18][19].

### 3.4 Resistencia a antibióticos

Las especies de *Achromobacter*, al igual que otros bacilos Gram negativos no fermentadores, presentan como característica la resistencia a numerosos grupos de antimicrobianos, haciendo difícil su control mediante la administración de antibióticos (Tabla 2). Su adaptación a la vida en biofilms, además, se sabe que confiere un mayor grado de resistencia a antimicrobianos a consecuencia de las modificaciones metabólicas que condiciona, entre otras causas [20].

La resistencia intrínseca a antimicrobianos en el género *Achromobacter* se basa en dos mecanismos principales: la presencia de bombas de expulsión y las  $\beta$ -lactamasas de tipo OXA-114 [21].

Dentro de las bombas de expulsión, AxyABM afecta a cefalosporinas de tercera generación, aztreonam y cefamicinas. AxyXY-OprZ es otra bomba de expulsión presente en *Achromobacter* con un espectro de actividad mucho más extenso y que afecta a aminoglicósidos, cefalosporinas de 4<sup>o</sup> generación, carbapenémicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas y eritromicina en distinto grado. Se ignora hasta qué punto la presión antibiótica es responsable de la sobreexpresión de estas bombas de expulsión.

OXA-114 es una  $\beta$ -lactamasa de expresión constitutiva en *Achromobacter spp.* Es responsable de la ausencia de sensibilidad a penicilina G, cefalosporinas de 1<sup>o</sup> y 2<sup>o</sup> generación y ticarcilina. La actividad de OXA-114 frente a piperacilina, en cambio, es controvertida.

Además de los ya descritos, se conocen hasta 50 genes codificadores de enzimas o bombas de eflujo que condicionan resistencia intrínseca a prácticamente todas las familias de antimicrobianos en uso clínico.

Otras  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC y metalo- $\beta$ -lactamasas como IMP o VIM también pueden contribuir a la resistencia adquirida a  $\beta$ -lactámicos, incluidos los carbapenémicos, en algunos aislados. Enzimas responsables de resistencia adquirida a aminoglicósidos y quinolonas también han sido descritos. Aunque algunos de estos

mecanismos son de codificación cromosómica, otros se encuentran en elementos móviles (plásmidos), lo que potencialmente facilitaría su transmisión horizontal.

Además, cabe destacar que el alto grado de similitud entre algunas secuencias genómicas de especies de *Achromobacter* y algunas bacterias como *P. aeruginosa* y *Burkholderia pseudomallei*, aumenta enormemente la posibilidad de que se produzca transferencia horizontal de ciertos genes.

La susceptibilidad a antibióticos se ha evaluado en diversos estudios mediante valores de concentración mínima inhibitoria (*Minimum Inhibitory Concentration* [MIC]), que determinan la concentración más baja de antimicrobiano capaz de impedir el crecimiento de un determinado microorganismo (Tabla 2).

**Tabla 2.** Valores MIC<sub>90</sub> y sensibilidad a diferentes antibióticos evaluados en *A. xylooxidans* a partir de aislados de queratitis <sup>[22]</sup>. MIC<sub>90</sub> = concentración mínima inhibitoria para el 90% de los aislados.

ANTIBIÓTICO	MUESTRAS ANALIZADAS	SENSIBILIDAD (%)	MIC90 mg/ml (rango)
Ampicilina	12	1 (8.3)	32 (4-32)
Cefazolina	12	0 (0)	64 (32-64)
Ceftazidima	10	7 (70.0)	16 (2-16)
Ciprofloxacina	15	7 (46.7)	8 (0.5-32)
Gentamicina	15	3 (20.0)	16 (2-16)
Imipenem	13	9 (69.2)	8 (4-16)
Piperacilina	10	10 (100.0)	8 (4-8)
Ticarcilina	12	12 (100.0)	16 (16-16)
Tobramicina	15	4 (26.7)	16 (4-16)
Trimetoprim-sulfametoxazol	14	11 (78.6)	10 (0.032-320)

## 4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

Las infecciones por *Achromobacter* son especialmente notables en pacientes con fibrosis quística y están aumentando su prevalencia en los últimos años.

La taxonomía y estructura de la población no están bien definidas, puesto que la discriminación entre las diferentes especies del género es complicada, dificultando así el entendimiento de su epidemiología y distribución.

La aplicación de un método eficiente que permita la identificación a nivel de especie, podría dilucidar la distribución y relación de las especies con los diferentes rasgos patológicos. Especialmente en situaciones de cronicidad, en las que la distinción precisa entre diferentes especies o ST resultaría singularmente útil para el diseño de nuevas estrategias de manejo.

Por ello, la hipótesis del proyecto es que la aplicación de un esquema de tipificación multilocus de secuencias (MLST) permitirá conocer la distribución de especies del género *Achromobacter* en muestras de tracto respiratorio en pacientes con FQ.

La amplificación y secuenciación de fragmentos de genes descritos previamente por Spilker en el esquema MLST, ha permitido confirmar especies de *Achromobacter*, revelando genogrupos adicionales en algunos casos <sup>[9]</sup>. Por tanto, se seleccionan varios locus incluidos en el esquema para ser amplificados y realizar el genotipado.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, el objetivo de este estudio es la puesta a punto de esta técnica en muestras de tracto respiratorio para el estudio de la distribución de especies de *Achromobacter*, así como la descripción de las principales características asociadas al aislamiento de dichas especies.

Con la obtención de las secuencias se podrá realizar un análisis bioinformático de los datos obtenidos. El estudio y comparación de las secuencias concatenadas se realiza con el fin de establecer relaciones filogenéticas. De esta manera, se trazará una descripción de la epidemiología de *Achromobacter*, destacando la presencia de especies que infectan las vías respiratorias de forma persistente en el tiempo.

Finalmente, se compararán las características de los aislados en función de que su colonización sea puntual o persistente con el fin de determinar una posible dispersión clonal de algún ST. Además, se realizará una técnica de sensibilización en agar para estudiar los perfiles de sensibilidad.

## 5 METODOLOGÍA

---

En este apartado se incluye una descripción detallada de las técnicas y materiales empleados durante el estudio.

### 5.1 Recogida de las muestras y aislamiento de las cepas

La recuperación y procesamiento de las muestras se realizó en un laboratorio de Microbiología con actividad asistencial dual (centro hospitalario de tercer nivel y atención primaria) entre 2017 y 2019. Durante este periodo de tiempo, se recogieron consecutivamente cepas aisladas a partir de secreciones respiratorias (aspirado bronquial, aspirado traqueal, esputo, exudado sinusal, lavado broncoalveolar) de pacientes FQ.

Las muestras proceden tanto de pacientes ingresados en el Hospital Vall d'Hebron (HUVH), como de centros externos (consultas externas y centros de atención primaria).

Antes de empezar el estudio, todas las cepas fueran identificadas a nivel de género mediante sistema MALDI- TOF (VitekMS, BioMerieux).

### 5.2 Selección de los genes a amplificar

Para la caracterización de las cepas, se siguió el esquema de tipificación multilocus de secuencias descrito anteriormente por Spilker. Se seleccionaron 5 de los 7 genes incluidos en el esquema MLST: *eno*, *gltB*, *lepA*, *nuoL* y *rpoB* (Tabla 3) <sup>[9]</sup>. La longitud del locus MLST seleccionado dentro de cada gen varió entre 214 pb (*eno*) hasta 413 pb (*rpoB*).

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron los mismos primers descritos en el trabajo de Spilker para la amplificación de los genes indicados en el esquema. Estas parejas de primers fueron diseñadas para unirse de 50 a 200 bases *upstream* o *downstream* de la secuencia de interés <sup>[9]</sup>.

**Tabla 3.** Genes seleccionados del esquema MLST de Spilker (REF) para ser utilizados en este estudio <sup>[9]</sup>. En la tabla se muestran los primers (PF: primer forward. PR: primer reverse) utilizados para la amplificación cada gen, así como la T de anillamiento, y los tamaños del amplicón y del gen. <sup>a</sup>En negrita se indican las bases de oligonucleótidos mixtos de los primers. <sup>b</sup>Longitud de la secuencia analizada para cada locus.

Gen	Primers (5 → 3') <sup>a</sup>	Temperatura anillamiento (°C)	Tamaño amplicón (pb)	Tamaño fragmento gen (pb) <sup>b</sup>
<b>eno</b>	PF, ATGCCCGTGCC <b>S</b> ATGATGAA PR, TCAGGGTGCCGATCTGGTTG	57	613	214
<b>gltB</b>	PF, TGCAACCGGGCAAGATGTT PR, TCGGACACGATCAGGATGTT	57	685	241
<b>lepA</b>	PF, CTAYAACCTGAACCTGATCGACAC PR, GCGACTT <b>S</b> GGCGTGAACAC	57	524	347
<b>nuoL</b>	PF, CATGCACCAY <b>R</b> ACCAGGACAT PR, CGCGAACGCGTAGTGATAGATG	56	880	230
<b>rpoB</b>	PF, TGCC <b>M</b> TGGAACGGYTACAAC PR, GGCCAGRT <b>A</b> SACCTTGATCATCTT	57	791	413

### 5.3 Materiales

Listado de productos empleados a lo largo del proceso de amplificación y secuenciación:

- *GoTaq® DNA Polymerase*. Taq polimerasa con tampones para mejorar la amplificación de la PCR. Referencia del producto: M3001 (Promega)
- *Midori Green Advance DNA Stain*. Colorante para la visualización de bandas en geles. Referencia del producto: NC0434746 (Thermo Fisher)
- 100 bp DNA ladder. Es útil para separar fragmentos de ADN de doble cadena de 100-1.500 pb. Referencia del producto: 10488058 (Thermo Fisher)
- *ExoSAP-IT™*. Reactivo de limpieza de productos de PCR Referencia del producto: 78201.1.ML (Thermo Fisher)
- *BigDye® Terminator v3.1*. Kit de secuenciación de ciclos. Referencia del producto: 4337455 (Thermo Fisher)
- *Montage® Sequencing Reaction Cleanup*. Kit de purificación para reacción de secuenciación. Referencia del producto: 10456641 (Thermo Fisher)
- *Montage Wash Solution*. Tampón para la filtración por tamaño y limpieza del producto para la secuenciación. Referencia del producto: 11844041 (Thermo Fisher)
- *Injection Solution*. Solución para la limpieza del producto de secuenciación. Referencia del producto: 11724684 (Thermo Fisher)

## 5.4 Amplificación y secuenciación del ADN

La amplificación del material genético se llevó a cabo en un volumen de reacción final de 25  $\mu$ l, siguiendo los volúmenes y concentraciones de reactivos indicadas a continuación en la Tabla 4.

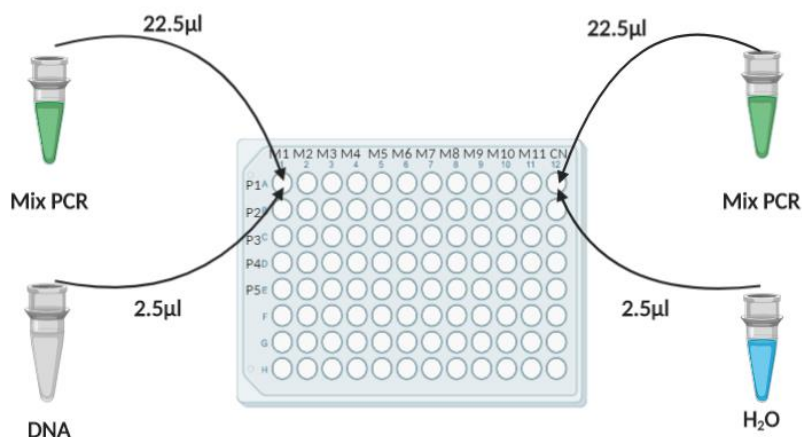
**Tabla 4.** Cantidad correspondiente de cada reactivo para la preparación de la mix de PCR.

Reactivo	Concentración inicial	Volumen ( $\mu$ l)
<b>Primer Forward</b>	10 mM	0.5
<b>Primer Reverse</b>	10 mM	0.5
<b>H<sub>2</sub>O</b>		9
<b>GoTaq® DNA Polymerase</b>		12.5

Para la preparación de la mix se utilizó la enzima *GoTaq® DNA Polymerase*. Previamente, es necesario hacer una dilución 1:10 de los primers (forward y reverse) para obtener una concentración 10 mM.

Considerando que se disponía de 5 parejas de primers diferentes (*eno*, *gltB*, *lepA*, *nuoL*, *rpoB*), se preparó una mix para cada par de primers por separado, siguiendo la relación de volúmenes indicada en la Tabla 3.

Se hicieron 5 PCR por cada muestra, considerando que se querían amplificar los 5 genes mencionados anteriormente. Para ello, en placas de 96 pocillos (siempre manteniendo las condiciones de frío), se transfieren 22.5  $\mu$ l de mix a cada pocillo y se añaden 2.5  $\mu$ l de ADN o H<sub>2</sub>O según sea una reacción con muestra o un control negativo en cada pocillo (Figura 5).



**Figura 5.** Esquema de preparación de la placa PCR. Se amplifican diferentes muestras (columnas) con cada par de primers (fila). CN: control negativo. Elaboración propia.

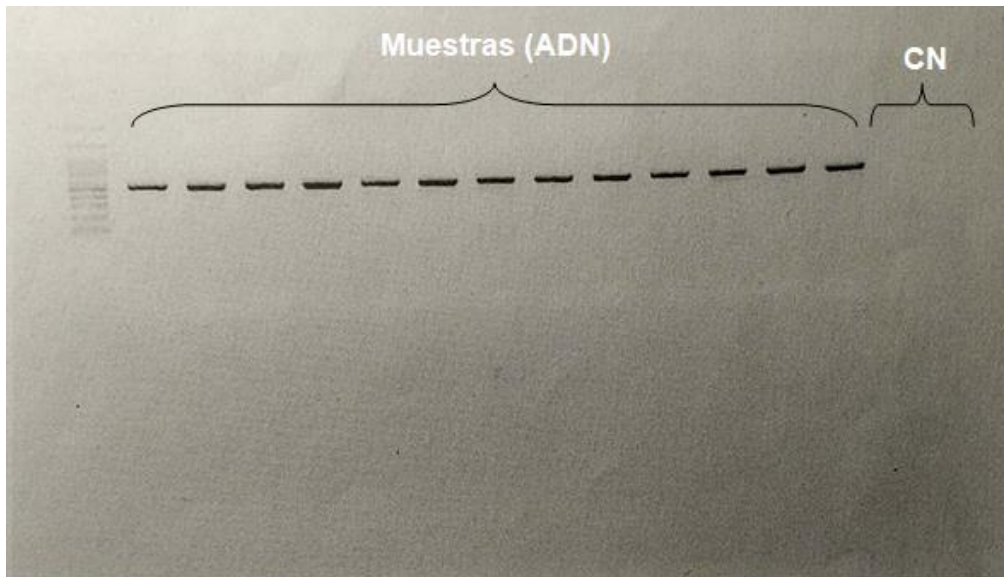
A continuación, se ajustaron en el termociclador las condiciones de la reacción de amplificación indicadas en la Tabla 5. Para el establecimiento de la temperatura de anillamiento, se comprobó que la temperatura de anillamiento de las 5 parejas de primers utilizadas en el estudio es de 56 y 57°C como se ha indicado anteriormente en la Tabla 3. En consecuencia, se decidió ajustar una temperatura de 55°C en la reacción de amplificación de manera que pudieran hibridar todos los primers.

**Tabla 5.** Condiciones aplicadas a la reacción de amplificación.

	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	94	2min	1
<b>Desnaturalización</b>	94	10s	40
<b>Anillamiento</b>	55	40s	
<b>Extensión</b>	72	30s	
<b>Extensión final</b>	72	4min	1
	4	∞	∞

## 5.5 Electroforesis

La electroforesis es una técnica ampliamente utilizada para separar fragmentos de ADN (u otras moléculas como ARN y proteínas) por su tamaño y carga. Este método se llevó a cabo con el objetivo de verificar el producto amplificado por la PCR (Figura 6).



**Figura 6.** Gel electroforesis resultado de la amplificación de *lepA*. La visualización de bandas en los primeros carriles indica un resultado positivo (muestras). En el último carril no se observa banda (CN: control negativo).

Las amplificaciones realizadas se comprobaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) (apto para resolución de fragmentos de ADN lineal de 200 a 3000pb). El protocolo detallado de preparación y revelado del gel se describe en el Anexo 1.

## 5.6 Purificación de los amplificados

El siguiente paso es la purificación de los productos amplificados, para realizar la reacción de purificación enzimática, solamente se seleccionaron aquellas muestras en las que previamente se había visualizado una única banda en el gel de electroforesis (no se añaden los controles negativos).

La reacción con *EXO-SAP-IT*<sup>TM</sup> se efectuó con el objetivo de purificar enzimáticamente el producto PCR amplificado. Este kit de purificación permite hidrolizar el exceso de primers y nucleótidos presentes en el producto amplificado.

Para completar la limpieza del material genético es necesario llevar a cabo una primera incubación a 37°C que degrada el exceso de primers y nucleótidos. A continuación, una segunda incubación a 80°C inactivará la *EXO-SAP-IT*<sup>TM</sup>. El protocolo seguido para la purificación se describe en el Anexo 2.

## 5.7 Reacción de secuenciación

Cuando se obtuvo el producto de la PCR adecuadamente purificado, se pasó a la reacción con el kit *BigDye® Terminator v3.1*, el cual incluye 4 tintes fluorescentes diferentes que etiquetarán los ddNTP agregados secuencialmente al primer. La

aplicación de este kit permite la amplificación de productos PCR, mejorando así el resultado y la lectura de la posterior secuenciación.

En este caso, se preparó una mix para cada primer (forward/reverse), con el fin de amplificar cada primer por separado en una reacción diferente. De esta manera, en la lectura de secuenciación, se obtendrá una secuencia correspondiente al primer forward y otra al reverse. Para la reacción BigDye se utilizaron los mismos primers de la PCR para la amplificación (Tabla 3), en cambio, en este caso la dilución fue 1:5. El volumen necesario de cada reactivo para la preparación de la mix y las condiciones de reacción se adjuntan en el Anexo 3.

## 5.8 Precipitación ADN

El último paso antes de la secuenciación es la precipitación o purificación del ADN. Para ello, se utilizó el kit *Montage® Sequencing Reaction Cleanup* con el objetivo de obtener el producto perfectamente purificado para su posterior secuenciación.

En esta parte del procedimiento se lleva a cabo una filtración necesaria para eliminar sales contaminantes y colorantes que quedan como residuo en el producto y que deben ser eliminados antes de la secuenciación. La placa utilizada contiene una membrana que permite la separación por exclusión de tamaño aplicando el vacío. Con la aplicación de este método, se consigue agilizar el proceso de filtración y se eliminan las columnas de lavado o la centrifugación. El procedimiento seguido para realizar los lavados con las soluciones de tampón en la bomba de vacío se adjuntan en el Anexo 4.

Finalmente, el volumen resultante de la filtración se transfiere a la correspondiente placa de secuenciación (96 pocillos), listo para ser secuenciado.

## 5.9 Secuenciación

El último paso es la secuenciación de las muestras, que se llevó a cabo en otro servicio del hospital. Las placas fueron suministradas al módulo oportuno, que proporcionó los correspondientes archivos con los electroferogramas, una vez habían sido secuenciadas.

Todos los cromatogramas de secuencia fueron visualizados y procesados con ayuda del programa MEGA7. MEGA es una aplicación gratuita destinada al análisis filogenético que incluye herramientas útiles para la alineación automática o manual de las secuencias y permite la creación de árboles filogenéticos, además del análisis de bases de datos <sup>[23]</sup>.

Las secuencias fueron editadas, realizando los cortes oportunos, para ser alineadas aplicando la herramienta ClustalW. Cada secuencia se archivó individualmente para asignarle su correspondiente alelo.

Para la distribución alélica se consultó la base de datos pública de *Achromobacter* PubMLST (<https://pubmlst.org/achromobacter/>).

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Los diferentes experimentos descritos anteriormente se llevaron a cabo con el objetivo de establecer relaciones filogenéticas entre los aislados de *Achromobacter* identificados en este estudio. Teniendo en cuenta esto, la discriminación entre distintas especies permitiría comparar las características asociadas a su patogenicidad. Además, se podría trazar una posible dispersión clonal de determinados ST.

A continuación, se discutirán los resultados obtenidos en el estudio teniendo en cuenta los objetivos iniciales y las posibles variables que han influido en el resultado final.

### 6.1 Análisis de las secuencias

Entre 2017 y 2019 se tomaron muestras de secreciones respiratorias (aspirado traqueal y bronquial, esputo, exudado sinusal, faringoamigdalario, lavado broncoalveolar) de pacientes FQ.

Aunque el aislamiento de *Achromobacter* es poco habitual en el conjunto de la población, fue habitual el reconocimiento de infección/colonización crónica en el tracto respiratorio inferior. Como ya se informó inicialmente, las infecciones por *Achromobacter* en pacientes FQ comúnmente transcurren de forma crónica, confirmándose su resistencia en el tracto respiratorio a través de aislados repetidos en el tiempo. En este tipo de pacientes, clasificados con infección/colonización crónica, se disponía de aislados consecutivos recuperados en diferentes muestras tomadas durante 2017 y 2019.

Para realizar este estudio, se tomaron 35 cepas recuperadas de muestras respiratorias pertenecientes a 22 pacientes FQ, las cuales habían sido previamente identificadas como *Achromobacter* mediante MALDI-TOF. De los 22 pacientes tomados como objeto de estudio, en 12 de ellos se disponía de registros de 2 o en algún caso 3 aislados repetidos en el tiempo.

### 6.2 Optimización de la amplificación

Los resultados obtenidos con la secuenciación de las 5 dianas descritas al inicio no fueron los esperados. Pese a reproducir estrictamente el protocolo descrito por Spilker para la aplicación del esquema MLST propuesto, la secuenciación de algunos locus no fue posible.

Con el revelado del gel de la electroforesis se comprobó que la amplificación de los genes *eno* y *gltB* no se había producido correctamente. En el caso de *eno*,

generalmente se observaban inespecificidades, mientras que en las muestras amplificadas con el primer *gltB* no se observaba banda (Figura 7).

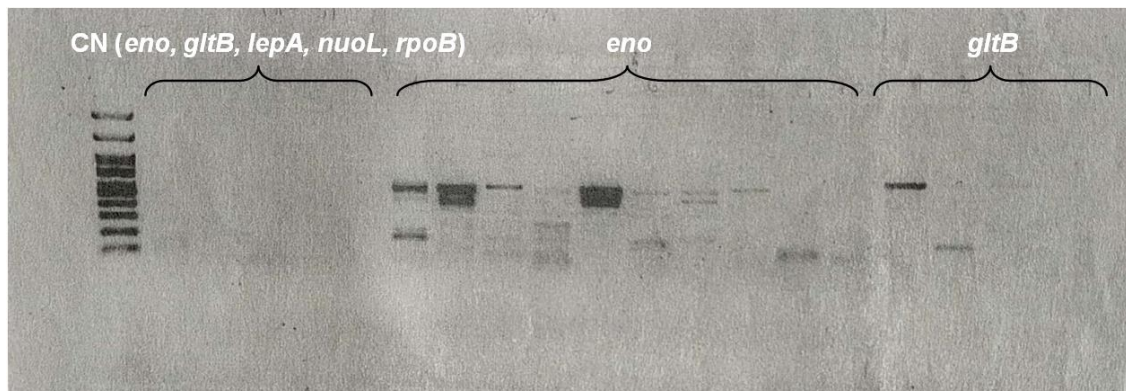


Figura 7. Gel electroforesis resultado de la amplificación de *eno* y *gltB*.

La mala amplificación de los locus *eno* y *gltB* obligó a buscar soluciones que pudieran mejorar la amplificación. La búsqueda de un protocolo optimizado se realizó con el objetivo de permitir el genotipado con todos los locus seleccionados inicialmente para poder realizar el estudio de distribución de especies.

Alternativamente y con el fin de mejorar la amplificación, se alteraron algunas condiciones de la reacción. En primer lugar, se pensó en reajustar la temperatura de anillamiento del primer. Se consultó de nuevo la temperatura de los primers indicada en el protocolo descrito por Spilker y se estudió posteriormente la temperatura de anillamiento empleando el sistema *OligoAnalyzer Tool*. Si bien se decidió ajustar la temperatura de ambos primers a 58°C, esperando que la unión del primer a la diana fuera más específica, esta variación de temperatura no fue suficiente para mejorar los resultados.

Seguidamente, como segunda opción se propuso trabajar con una dilución 1:10 de las muestras, ya que en algunos casos, la elevada concentración de ADN en la muestra puede llevar a errores en la PCR, pero igualmente no se obtuvo amplicón en esta situación.

Ante la perseverancia de resultados deficientes, a pesar de la modificación de las condiciones de la reacción de amplificación y considerando el tiempo del cual se disponía para realizar el estudio, se decidió seguir el procedimiento con la amplificación de los 3 locus restantes: *lepA*, *nuoL*, *rpoB*.

En cuanto a los deficientes resultados obtenidos con el esquema MLST propuesto por Spilker, probablemente se necesite una optimización de los protocolos de amplificación para su aplicación a la clínica.

### 6.3 Asignación de los perfiles alélicos

Con la amplificación y secuenciación de fragmentos internos de los 3 genes *housekeeping* (*lepA*, *nuoL*, *rpoB*), incluidos en el esquema de tipificación de secuencias multilocales, se elaboró la descripción de los perfiles alélicos correspondientes.

Se utilizó el programa MEGA7 para la visualización de los electroferogramas obtenidos tras la secuenciación. Las secuencias resultantes de la amplificación de cada diana fueron analizadas con las correspondientes herramientas incorporadas en el software. Se realizaron los recortes y correcciones pertinentes y se verificó la calidad de los resultados obtenidos. Cada secuencia procedente de la amplificación fue analizada por separado siguiendo este proceso (Figura 8).

Considerando que tanto la secuencia correspondiente al amplificado con el primer forward como al reverse se encontraban en dirección 5' → 3', fue necesaria la obtención de la complementaria reversa correspondiente a la secuencia del reverse. Posteriormente, se aplicó la herramienta ClustalW, encargada de realizar el alineamiento de ambas secuencias.

Una vez completada la alineación, las secuencias editadas se guardaron individualmente para poder asignar una única variante alélica a cada locus.

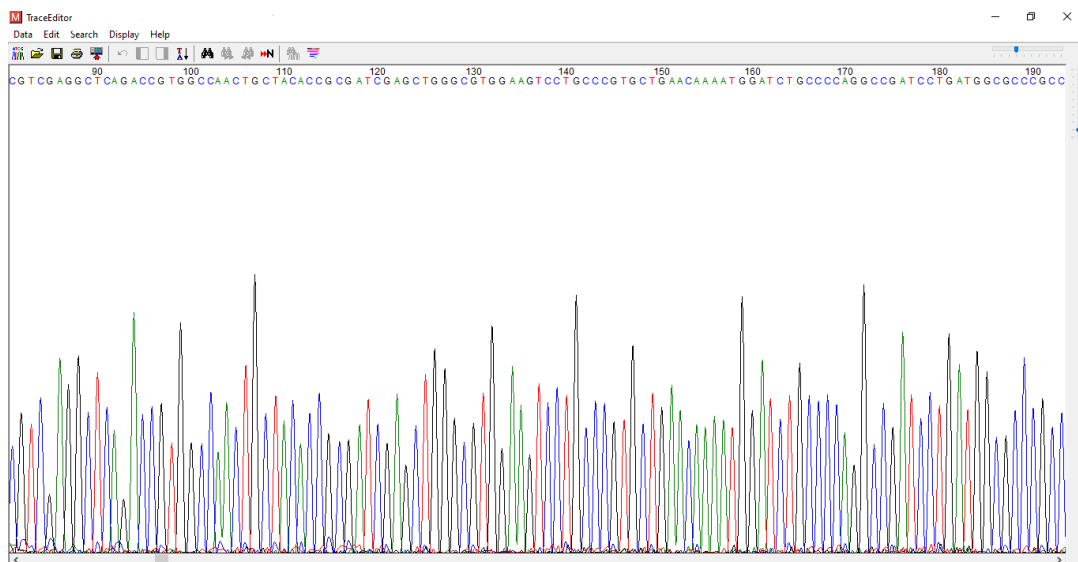


Figura 8. Análisis de las secuencias en el programa MEGA7.

Con ayuda de la base de datos PubMLST, se obtuvo el alelo correspondiente a cada locus amplificado. Para ello, es necesario adjuntar la secuencia analizada previamente en el programa MEGA7. La web de PubMLST de *Achromobacter* ofrece automáticamente el alelo correspondiente a la secuencia en cuestión e indicará si se trata de una coincidencia exacta con una de las secuencias depositadas en la base de datos. En caso de no encontrar una coincidencia exacta entre la secuencia de interés y aquellas que ya han sido identificadas e incorporadas, se indicará el alineamiento de ambas destacando las bases que difieren entre ellas.

Se elaboró un listado con los datos obtenidos tras la búsqueda de los alelos en la base de datos, registrando la variante alélica de cada uno de los genes amplificados en cada aislado con el fin de obtener diferentes perfiles alélicos en cada una de las muestras analizadas (Anexo 5).

The screenshot shows the PubMLST website interface for sequence querying. At the top, there are navigation links for 'PubMLST', 'Database home', and 'Contents'. Below that is a 'Log in' link and a 'Help' icon. The main heading is 'Sequence query - Achromobacter typing'. A paragraph of instructions explains that query sequences will be checked for exact matches against the chosen loci. Below this, there are two options for submitting a query: 'Please select locus/scheme' (with a dropdown set to 'All loci') and 'Order results by' (with a dropdown set to 'locus'). The primary option is 'Enter query sequence (single or multiple contigs up to whole genome in size)', which includes a large text input area. An alternative option is 'Alternatively upload FASTA file', which includes a 'Select FASTA file' button and a 'Ningún archivo seleccionado' message. There are also 'Reset' and 'Submit' buttons. Below the form, a green bar states '1 exact match found.' and a 'Translate query' button is visible. At the bottom, a table displays the search results.

Locus	Allele	Length	Contig	Start position	End position	Linked data values
lepA	62	347	Query	121	467	

**Figura 9.** Asignación de la variante alélica correspondiente al locus *lepA* según la base de datos PubMLST.

## 6.4 Identificación de las especies

La identificación a nivel de especie se concluyó comparando las combinaciones de los 3 locus (*lepA*, *nuoL*, *rpoB*) obtenidas en cada uno de los aislados anteriormente, con los perfiles disponibles en la base de datos. PubMLST, dispone de un apartado para la identificación de especies de *Achromobacter* mediante la incorporación del número de alelo, buscando una coincidencia por combinaciones de loci con los aislamientos de *Achromobacter* disponibles en la base de datos (Figura 10).

PubMLST Database home Contents

Log in

### Search *Achromobacter* isolates database by combinations of loci

Please enter your allelic profile below. Blank loci will be ignored. Autofill profile by searching remote database

nusA	rpoB	eno	gltB	lepA	nuoL	nrdA
26				62	4	

ST:  Autofill

Filters:  Include old record versions

Options: Search:

Display/sort options: Order by:   Display:  records per page

Action:

Exact matches found (3 loci).  
5 records returned. Click the hyperlinks for detailed information.

Isolate fields							MLST							Loci		
id	isolate	aliases	species	genogroup	country	source	year	nusA	rpoB	eno	gltB	lepA	nuoL	nrdA	ST	nrdA_765
510	R3		<a href="#">A. xylosoxidans</a>		Thailand	NON CF	2012	6	26	2	4	62	4	2	182	36
517	R10		<a href="#">A. xylosoxidans</a>		Thailand	NON CF	2012	6	26	2	4	62	4	2	182	36
613	8N9		<a href="#">A. xylosoxidans</a>		Russia	CF	2014	6	26	2	4	62	4	2	182	36
625	6681-14		<a href="#">A. xylosoxidans</a>		Russia	CF	2014	1	26	2	2	62	4	2	252	113
1037	77b		<a href="#">A. xylosoxidans</a>		France	CF	2014	156	26	2	89	62	4	138	441	315

Figura 10. Identificación a nivel de especie comparando combinaciones de locus.

Se identificaron 6 especies de *Achromobacter* detalladas a continuación. El estudio de los 35 aislados analizados con el esquema de tipificación reveló *A. xylosoxidans* como la especie recuperada con más frecuencia entre los 22 pacientes estudiados. Entre las demás especies recuperadas en las muestras, se identificaron: *A. aegrifaciens*, *A. insuavis*, *A. insolitus*, *A. animicus*, *A. marplatensis*. En la Figura 11 se representa la relación entre las diferentes especies anteriormente mencionadas y la incidencia de infección por paciente.

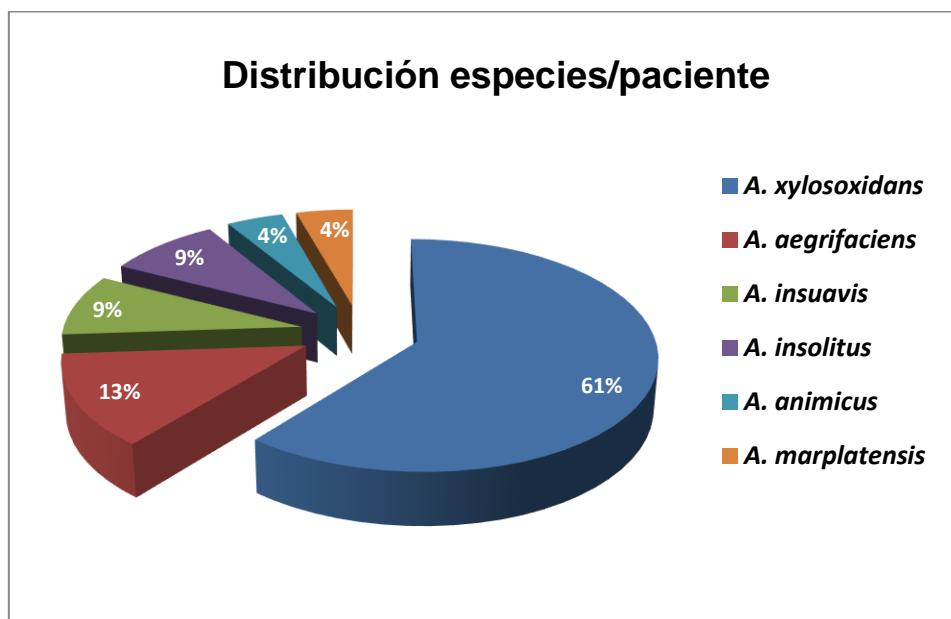


Figura 11. Distribución de especies de *Achromobacter* identificadas en 22 pacientes. En el gráfico se indica el porcentaje de pacientes infectados por cada especie.

En cuanto a la prevalencia de las diferentes especies identificadas en los 22 pacientes tomados en el estudio, la especie *A. xylosoxidans* se identificó en 14 de los pacientes, representando el 61% de las infecciones en los aislados recuperados. La segunda especie predominante en este estudio fue *A. aegrifaciens*, protagonizando un 13% de los casos. Sin embargo, las especies restantes fueron aisladas con una frecuencia mucho menor.

Tomando como referencia las especies identificadas en este estudio, se puede hacer una comparación de la incidencia de diferentes especies de *Achromobacter* aisladas en el mismo tipo de muestras en otros centros FQ.

La prevalencia mayoritaria de *A. xylosoxidans* coincide en estudios llevados a cabo en diferentes centros europeos. En un estudio llevado a cabo en Dinamarca, los datos de un análisis de distribución de *Achromobacter* spp. indicaron una colonización predominante de esta especie. Con la secuenciación del gen *nrdA* en aislados de secreciones respiratorias de 42 pacientes FQ, se identificó *A. xylosoxidans* en 15 pacientes (36%) [7].

De manera similar, se pueden confirmar datos semejantes en estudios de prevalencia de especies de *Achromobacter* en un centro de Reino Unido, donde *A. xylosoxidans* afectó a 59 de 96 pacientes (61%) [24].

En cambio, cuando se refiere a la diversidad de especies identificadas aquí y las citadas en los estudios de otros centros, se pueden encontrar ciertas disimilitudes. Los datos resultantes de los ensayos mencionados anteriormente reportan la presencia de *A. insuavis* y *A. ruhlandii* en porcentajes elevados, siendo estas especies las más comunes en sus aislados junto con *A. xylosoxidans*.

Aunque con baja frecuencia, en este centro, la tipificación de las 35 cepas ha revelado algunos casos de *A. insuavis*. Sin embargo, no se ha registrado la presencia de *A. ruhlandii* entre las muestras analizadas aquí, a diferencia de los resultados obtenidos en el resto de centros del norte de Europa.

Cabe destacar que, aunque en comparación con los datos de distribución de especies de otros estudios, la colonización prevalente de *A. xylosoxidans* coincide con los registros de Dinamarca, Reino Unido, Francia y otro centro de España, en Madrid [7] [18] [24] [25]. Por otro lado, cuando se trata de *A. insuavis* y *A. ruhlandii*, los datos son más dispares entre los diferentes países europeos. Mientras que *A. insuavis* ha resultado ser una especie habitual entre la población de Dinamarca, Reino Unido y Francia, el hallazgo de *A. ruhlandii* varía más de unos centros a otros. Consultado los datos

disponibles en estos estudios, se observa que *A. ruhlandii* se aisló escasamente en 3 de 96 pacientes en Reino Unido, en contraste, representó el 19% de los aislados en Dinamarca, siendo la tercera especie más prevalente en su centro.

## 6.5 Colonización crónica

Como se ha comentado anteriormente, había 12 pacientes a los que se les había tomado muestras consecutivamente entre 2017 y 2019 con el fin de obtener aislados repetidos. La finalidad de examinar estas repeticiones era comprobar si realmente se trataba de una infección crónica. En caso de ser así, solo se identificaría una especie asociada a esta situación, lo cual indicaría que la colonización se mantiene persistente en el tiempo y que la detección de *Achromobacter* no se debe a nuevas reinfecciones. Sin embargo, fue necesario definir los perfiles alélicos para demostrar que no se trataba de una reinfección con otra cepa de la misma especie.

La concatenación y comparación de las secuencias en pacientes con aislados repetidos reveló que las secuencias se mantenían idénticas en el tiempo. Cuando se consultó la base de datos, se establecieron perfiles alélicos con los mismos valores cuando se trataba de muestras recuperadas de un mismo paciente que mostraba infección persistente. De esta manera, la detección del mismo perfil alélico de forma uniforme apoya la idea de que las cepas de *Achromobacter* en FQ son capaces de establecer colonizaciones crónicas y que los aislamientos repetidos no son consecuencia de reinfecciones, como se había supuesto en el inicio.

Los aislamientos repetidos de un mismo paciente fueron representativos de perfiles alélicos idénticos y por tanto, de la misma especie. No se identificó más de una especie en la misma muestra, ni en muestras consecutivas en ninguno de los pacientes. Sin embargo, destaca el caso de un paciente, infectado inicialmente por *A. aegrifaciens*, en el que se pudo recuperar *A. xylosoxidans* de un segundo aislado.

En cuanto a la prevalencia, los datos obtenidos indican que la especie que se puede asociar con una mayor frecuencia a situaciones de colonización/infección crónica es *A. xylosoxidans*. En las muestras restantes, se identificaron casos aislados de *A. aegrifaciens*, *A. insuavis* y *A. insolitus*, siendo éstas las muestras identificadas con una mayor prevalencia (Figura 12).

Estos datos son análogos a los reportados por los centros mencionados anteriormente. Gade *et al.* [7] en Dinamarca identificaron en sus aislados una extensa variedad de *Achromobacter* spp. capaces de colonizar el tracto respiratorio de forma transitoria. En cambio, limitaron la colonización crónica a 3 especies: *A. xylosoxidans*,

*A. insuavis* y *A. ruhlandii*, sólo que éstas no coinciden exactamente con las identificadas en este estudio, puesto que previamente no se había recuperado *A. ruhlandii* en las muestras analizadas.

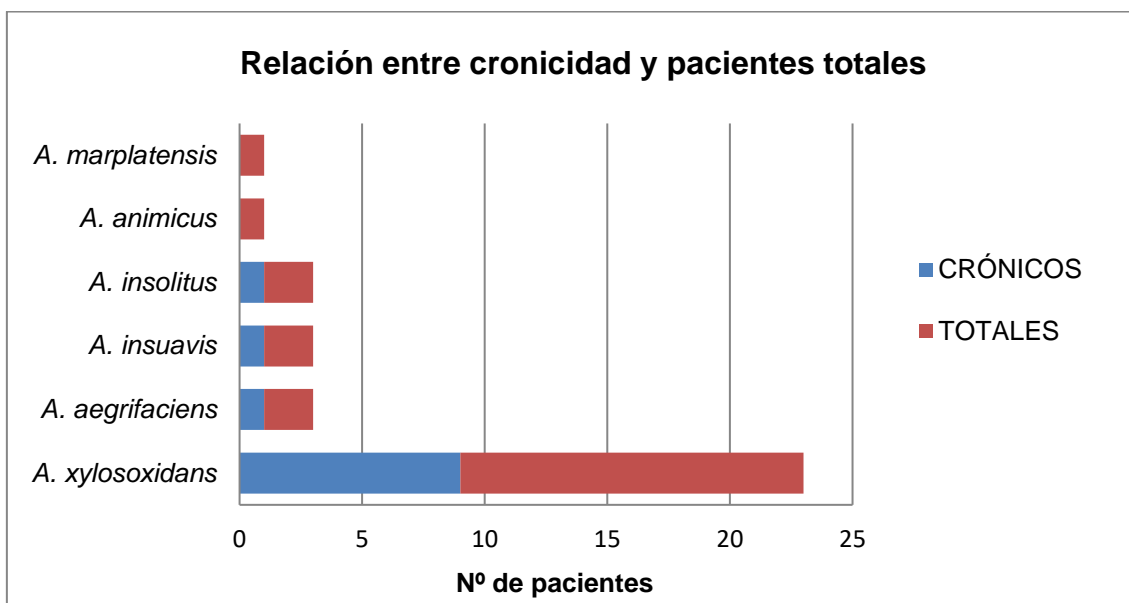


Figura 12. Distribución de pacientes con colonización crónica respecto al total de 22 pacientes tomados en el estudio. Se indica la especie de *Achromobacter* causante de la infección en cada caso.

## 6.6 Identificación de secuenciotipos (ST)

No fue posible determinar los ST representativos de los aislados de los pacientes colonizados crónicamente debido a los malos resultados obtenidos en el genotipado.

La imposibilidad de secuenciación de todos los loci incluidos en el esquema, seleccionados y descritos al inicio del estudio, limitaron la capacidad de descripción de los perfiles alélicos completos. Por consiguiente, tampoco se pudieron describir los ST concretos asociados a dichos perfiles de cronicidad.

Sin el reconocimiento de ST concretos, no fue posible trazar una dispersión clonal de los aislados tal y como se propuso en el inicio. Igualmente, el análisis de STs sería necesario para la asociación de rasgos clínicos concretos de determinadas especies o cepas vinculadas al establecimiento crónico de la infección.

La descripción de la distribución de especies identificadas en este estudio ha proporcionado un mayor entendimiento de la epidemiología de las especies de *Achromobacter*. No obstante, sería necesaria la optimización del protocolo, como se ha mencionado anteriormente, para poder buscar relaciones entre los ST y la patogenicidad.

## **6.7 Perfiles de sensibilidad a antimicrobianos**

Desafortunadamente, la reducción de horas en las prácticas externas debido a la pandemia de COVID-19, no permitió llevar a cabo la técnica de sensibilización en agar para estudiar los perfiles antimicrobianos. No obstante, estudios previos del grupo de investigación en Microbiología determinaron el perfil de sensibilidad de un repertorio de aislados de pacientes FQ confirmando la resistencia a determinados antimicrobianos descrita al inicio (datos no mostrados).

## 7 CONCLUSIONES

---

Las especies del género *Achromobacter* son reconocidas como patógenos humanos oportunistas y nosocomiales. Su frecuencia ha aumentado de forma considerable en los últimos años, especialmente en personas con FQ, en las que la colonización del tracto respiratorio desencadena daños pulmonares graves.

Con el propósito de aclarar la epidemiología y trazar relaciones filogenéticas entre las especies de *Achromobacter*, se trató de reproducir un esquema de MLST con el que se pudiera llevar a cabo el análisis filogenético de las cepas.

El esquema MLST se aplicó a un repertorio de cepas identificadas como *Achromobacter*, recuperadas de tracto respiratorio. Sin embargo, la amplificación de las muestras presentó limitaciones para realizar el genotipado, restringiendo así las posibilidades de establecer perfiles alélicos completos.

El estudio de las secuencias MLST concatenadas de los 35 aislados incluidos aquí reveló la presencia de 6 especies diferentes de *Achromobacter* en los aislados analizados. Entre la diversidad de especies identificadas destacó claramente *A. xylosoxidans*, afectando al 61% de los pacientes. Estos datos sugieren que a pesar de que el aislamiento de especies de *Achromobacter* es inusual en la población, la especie aislada más frecuentemente en este centro es *A. xylosoxidans*, convirtiéndola en una de las más habituales en el entorno. Recientemente, *A. xylosoxidans* ha sido reconocido como un patógeno emergente en muestras respiratorias de pacientes con FQ. La importancia clínica de *A. xylosoxidans* se ha asociado con una fuerte disminución de la función pulmonar y con múltiples resistencias a antibióticos. El aislamiento de las especies restantes identificadas en el estudio: *A. aegrifaciens*, *A. insuavis*, *A. insolitus*, *A. animicus*, *A. marplatensis* fue habitualmente puntual.

Según la diversidad de especies de *Achromobacter* identificadas en este estudio, destaca la ausencia de *A. ruhlandii* frente a los numerosos casos reportados en centros del norte de Europa.

*A. xylosoxidans* también fue la especie más recuperada en los 12 pacientes asociados a una situación de colonización/infección crónica, aunque se identificaron algunos casos de *A. aegrifaciens*, *A. insuavis* y *A. insolitus*.

Cuando se compararon las secuencias concatenadas de los aislados secuenciados, se comprobó que las secuencias se mantenían idénticas en el tiempo, confirmando así

que los aislamientos repetidos no son consecuencia de nuevas infecciones. El hecho de detectar secuencias idénticas en los aislados de un mismo paciente en diferentes muestras indicó que pertenecían a la misma especie. A excepción de un paciente en el que se asoció *A. aegrifaciens* en un primer aislado, mientras que se identificó *A. xylosoxidans* en la segunda muestra. Aun así, los datos mostraron la identificación de una única especie en cada uno de los aislados.

La limitación a la hora de identificar los ST concretos restringió la capacidad de su asociación con rasgos clínicos determinados y con la existencia de potenciales transmisiones cruzadas entre pacientes.

El desarrollo de conocimientos sobre la distribución de especies de *Achromobacter* y su vínculo con el contexto patológico mejoraría el entendimiento del significado clínico de estas bacterias. Una comprensión más amplia de la patogenicidad del género podría dilucidar la administración de estrategias de manejo específicas, particularmente en las situaciones de cronicidad, en las que la resistencia a los antibióticos limita gravemente las opciones terapéuticas.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

---

1. Vandamme PA, Peeters C, Inganäs E, Cnockaert M, Houf K, Spilker T, et al. *Taxonomic dissection of Achromobacter denitrificans Coenye et al. 2003 and proposal of Achromobacter agilis sp. nov., nom. rev., Achromobacter pestifer sp. nov., nom. rev., Achromobacter kerstersii sp. nov. and Achromobacter deleyi sp. nov.* Int J Syst Evol Microbiol. **2016**;66:3708–17.
2. Parkins MD, Floto RA. *Emerging bacterial pathogens and changing concepts of bacterial pathogenesis in cystic fibrosis.* Journal of Cystic Fibrosis. Elsevier B.V. **2015**;14:293–304.
3. Swenson CE, Sadikot RT. *Achromobacter respiratory infections.* Annals of the American Thoracic Society. American Thoracic Society; **2015**;12:252–8.
4. Almuzara M, Limansky A, Ballerini V, Galanternik L, Famiglietti A, Vay C. *In vitro susceptibility of Achromobacter spp. isolates: comparison of disk diffusion, Etest and agar dilution methods.* Int J Antimicrob Agents. **2010**;35:68–71.
5. Filipic B, Malesevic M, Vasiljevic Z, Lukic J, Novovic K, Kojic M, et al. *Uncovering differences in virulence markers associated with Achromobacter species of CF and Non-CF Origin.* Front Cell Infect Microbiol. **2017**;7:224.
6. Mahenthiralingam E. *Emerging cystic fibrosis pathogens and the microbiome.* Paediatr Respir Rev. **2014**;15:13–5.
7. Gade SS, Nørskov-Lauritsen N, Ridderberg W. *Prevalence and species distribution of Achromobacter sp. Cultured from cystic fibrosis patients attending the aarhus centre in Denmark.* Journal of Medical Microbiology. Microbiology Society; **2017**;66: 686–9.
8. Yabuuchi E, Ohyama A. *Achromobacter xylosoxidans n. sp. from Human Ear Discharge.* Jpn J Microbiol. **1971**;15:477–81.
9. Spilker T, Vandamme P, LiPuma JJ. *A Multilocus sequence typing scheme implies population structure and reveals several putative novel achromobacter species.* J Clin Microbiol. **2012**;50:3010–5.
10. Edwards BD, Greysen-Wong J, Somayaji R, Waddell B, Whelan FJ, Storey DG, et al. *Prevalence and outcomes of achromobacter species infections in adults*

- with cystic fibrosis: A North American cohort study.* J Clin Microbiol. **2017**;55:2074–85.
11. Papalia M, Steffanowski C, Traglia G, Almuzara M, Martina P, Galanternik L, et al. *Diversity of Achromobacter species recovered from patients with cystic fibrosis, in Argentina.* Rev Argent Microbiol. **2019**;52:13–8.
  12. Turton JF, Mustafa N, Shah J, Hampton C V., Pike R, Kenna DT. *Identification of Achromobacter xylosoxidans by detection of the blaOXA-114-like gene intrinsic in this species.* Diagn Microbiol Infect Dis. **2011**;70:408–11.
  13. Spilker T, Vandamme P, LiPuma JJ. *Identification and distribution of Achromobacter species in cystic fibrosis.* J Cyst Fibros. **2013**;12:298–301.
  14. Fanen P, Wohlhuter-Haddad A, Hinzpeter A. *Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies.* Int J Biochem Cell Biol. **2014**;52:94–102.
  15. LiPuma JJ. *The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis.* Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology (ASM). **2010**;23:299–323.
  16. Elborn JS. *Cystic fibrosis.* The Lancet. Lancet Publishing Group. **2016**;388:2519–31.
  17. Li C, Naren AP. *Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners.* Pharmacology and Therapeutics. Pergamon. **2005**;108:208–23.
  18. Llorca Otero L, Girón Moreno R, Buendía Moreno B, Valenzuela C, Guiu Martínez A, Alarcón Cavero T. *Achromobacter xylosoxidans infection in an adult cystic fibrosis unit in Madrid.* Enferm Infecc Microbiol Clin. **2016**;34:184–7.
  19. Dupont C, Jumas-Bilak E, Michon AL, Chiron R, Marchandin H. *Impact of high diversity of Achromobacter populations within cystic fibrosis sputum samples on antimicrobial susceptibility testing.* J Clin Microbiol. **2017**;55:206–15.
  20. Hall CW, Mah TF. *Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria.* FEMS Microbiology Reviews. Oxford University Press. **2017**;41:276–301.

21. Isler B, Kidd TJ, Stewart AG, Harris P, Paterson DL. *Achromobacter Infections and Treatment Options*. Antimicrob Agents Chemother. **2020**
22. Spierer O, Monsalve PF, O'Brien TP, Alfonso EC, Gologorsky D, Miller D. *Clinical Features, Antibiotic Susceptibility Profiles, and Outcomes of Infectious Keratitis Caused by Achromobacter xylosoxidans*. Cornea. **2016**;35:626–30.
23. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets*. Mol Biol Evol. **2016**;33:1870–4.
24. Coward A, Kenna DTD, Perry C, Martin K, Doumith M, Turton JF. *Use of nrdA gene sequence clustering to estimate the prevalence of different Achromobacter species among Cystic Fibrosis patients in the UK*. J Cyst Fibros. **2016**;15:479–85.
25. Amoureux L, Bador J, Bounoua Zouak F, Chapuis A, de Curraize C, Neuwirth C. *Distribution of the species of Achromobacter in a French Cystic Fibrosis Centre and multilocus sequence typing analysis reveal the predominance of A. xylosoxidans and clonal relationships between some clinical and environmental isolates*. J Cyst Fibros. **2016**;15:486–94.

## 9 AUTOEVALUACIÓN

---

Este trabajo se elaboró durante la realización de las prácticas curriculares en la Unidad de Bacteriología Respiratoria y Micología Clínica del Departamento de Microbiología del Hospital Vall d'Hebron. Personalmente, ha sido una experiencia que me ha permitido descubrir el mundo de la investigación y me ha hecho crecer enormemente a nivel profesional. He adquirido conocimientos y experiencia relacionados con las técnicas de amplificación y secuenciación de genes, así como con el tratamiento de los datos y el análisis de bases de datos para estudios filogenéticos. Además, formar parte de un laboratorio de referencia como este me ha servido para aprender cómo se trabaja realmente en un laboratorio de investigación. Me ha impulsado a trabajar de forma más autónoma y precisa, siendo muy exigente conmigo misma, lo cual me ha permitido crecer como biotecnóloga y como persona. Esta experiencia me ha motivado a seguir mejorando y aprendiendo en el mundo de la investigación.

## 10 ANEXO 1

---

### ELECTROFORESIS

1. Gel de agarosa 1.5%
  - a. Pesar 1.5 g de agarosa en balanza de precisión y añadir 100 ml de tampón TBE 1X.
  - b. En un matraz Erlen-Meyer de 250 ml, calentar la mezcla hasta que sea homogénea, remover para evitar que se llegue a ebulliciones agudas.
  - c. Añadir 6 µl de Midori Green a la mezcla, colorante necesario para la detección de ADN y visualización de bandas en el gel.
2. Montar y ajustar adecuadamente la bandeja en el soporte, para verter la mezcla sobre el molde.
3. Colocar los peines necesarios evitando crear burbujas.
4. Dejar reposar y enfriar el gel 30 min aproximadamente.
5. Cuando el gel ha polimerizado, retirar cuidadosamente los peines y pasar el gel a la cubeta de electroforesis.
6. Añadir tampón TBE 0.5X hasta cubrir completamente el gel.
7. En uno de los pocillos de los extremos, cargar 6 µl de marcador 100 bp DNA ladder. Para las muestras y controles negativos, añadir 8 µl a cada pocillo.
8. Una vez cargado el gel, encajar la tapa de la cubeta asegurando que los electrodos coinciden correctamente. Si la tapa no está correctamente cerrada, no podrá iniciarse la electroforesis.
9. Conectar los cables (negro y rojo) de cada electrodo a su entrada correspondiente en la fuente de alimentación.
10. Establecer las condiciones de la electroforesis (25 min a 140 V) y dejar correr el gel.
11. Para el revelado, colocar gel en el Molecular Imager® y con ayuda del programa Quantity One, obtener la imagen del gel. Quantity One es un software utilizado en la obtención de imágenes y el análisis de geles de electroforesis en 1-D, manchas de puntos, matrices y colonias.

## 11 ANEXO 2

---

### REACCIÓN EXO SAP IT

1. En una placa de 96 pocillos (del mismo tipo que se ha utilizado en la PCR) se añaden 2  $\mu$ l de EXO-SAP-IT™ a cada pocillo, junto con 5  $\mu$ l de producto PCR amplificado hasta un volumen de reacción de 7  $\mu$ l. (Mantener siempre la placa en condiciones de frío).
2. Establecer las condiciones de la reacción en el termociclador indicadas a continuación en la Tabla 7.

**Tabla 6.** Condiciones de incubación de la muestra con EXO-SAP-IT™.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
37	15
80	15

## 12 ANEXO 3

---

### REACCIÓN BIGDYE

1. Preparación de mix con cada primer (forward/reverse) por separado, siguiendo los volúmenes de la (Tabla 7).
2. En una placa de 96 pocillos, añadir 8 µl de la mix y 2 µl del producto PCR purificado. (Mantener siempre la placa en condiciones de frío).
3. En la Tabla 8 se indican las condiciones de la reacción en el termociclador.

**Tabla 7.** Volumen de cada reactivo para la preparación de la mix de la reacción Bigdye.

Reactivo	Volumen (µl)
<b>BigDye® Terminator</b>	1
<b>Sequencing Buffer 5X</b>	1.5
<b>Primer F/R</b>	1
<b>H<sub>2</sub>O</b>	4.5
<b>ADN (producto purificación EXO)</b>	2
<b>VOLUMEN FINAL</b>	10

**Tabla 8.** Condiciones aplicadas en la reacción de secuenciación.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
96	1min	1
96	10s	30
50	4s	
60	4min	
4	∞	∞

## 13 ANEXO 4

---

### PRECIPITACIÓN ADN

1. En la placa de reacción Bigdye añadir 30  $\mu$ l de *Montage Wash Solution* y mezclar pipeteando suavemente (*up and down*) con ayuda de una pipeta multicanal.
2. Transferir el volumen pipeteado a la placa de filtración (96 pocillos).
3. Colocar la placa en el colector de vacío (12 min). Cuando se haya absorbido el líquido en todos los pocillos, repetir el lavado con un volumen de 60  $\mu$ l de solución Wash (15 min) y dejar que se absorba de nuevo.
4. Añadir 30  $\mu$ l de *Injection Solution* para resuspender los productos purificados, que habrán quedado fijados en membrana y colocar la placa en el agitador para vortear durante 10 min.
5. Transferir el volumen de solución a la correspondiente placa de secuenciación (96 pocillos) y centrifugar la placa.

## 14 ANEXO 5

PACIENTE	MUESTRAS	FECHA	<i>lepA</i>	<i>nuoL</i>	<i>rpoB</i>	ESPECIE
1	NO	8/3/17	62	8	118	<i>A. xylosoxidans</i>
2	NO	28/06/17	62	4	26	<i>A. xylosoxidans</i>
3	NO	04/04/17	15	46	17	<i>A. marplatensis</i>
4	NO	08/10/17	148	28	15	<i>A. aegrifaciens</i>
5	NO	11/01/18	123	92	122	<i>A. animicus</i>
6	NO	16/8/17	28	35	68	<i>A. insolitus</i>
7	NO	13/02/17	59	2	26	<i>A. xylosoxidans</i>
8	NO	1/2/19	57	24	161	<i>A. insuavis</i>
9	NO	14/12/17	59	8	26	<i>A. xylosoxidans</i>
10	NO	02/02/17	162	8	26	<i>A. xylosoxidans</i>
11	M1	27/01/17	161	35	68	<i>A. insolitus</i>
	M2	03/09/19	161	35	68	<i>A. insolitus</i>
12	M1	27/1/17	59	8	40	<i>A. xylosoxidans</i>
	M2	03/09/18	59	8	40	<i>A. xylosoxidans</i>
13	M1	23/06/17	86	4	26	<i>A. xylosoxidans</i>
	M2	13/12/18	86	4	26	<i>A. xylosoxidans</i>
	M3	22/2/19	86	4	26	<i>A. xylosoxidans</i>
14	M1	22/9/17	148	142	15	<i>A. aegrifaciens</i>
	M2	25/11/19	62	4	26	<i>A. xylosoxidans</i>
15	M1	07/04/17	62	4	40	<i>A. xylosoxidans</i>
	M2	14/06/19	62	4	40	<i>A. xylosoxidans</i>
16	M1	19/01/17	59	8	26	<i>A. xylosoxidans</i>
	M2	15/06/17	59	8	26	<i>A. xylosoxidans</i>
17	M1	23/03/17	62	4	26	<i>A. xylosoxidans</i>
	M2	12/11/19	62	4	26	<i>A. xylosoxidans</i>
18	M1	24/07/17	53	14	47	<i>A. insuavis</i>
	M2	06/09/18	53	14	47	<i>A. insuavis</i>
19	M1	23/01/17	59	8	40	<i>A. xylosoxidans</i>
	M2	11/12/19	59	8	40	<i>A. xylosoxidans</i>
20	M1	11/12/17	30	29	17	<i>A. aegrifaciens</i>
	M2	06/11/18	30	29	17	<i>A. aegrifaciens</i>
21	M1	17/01/17	59	8	84	<i>A. xylosoxidans</i>
	M2	02/12/19	59	8	84	<i>A. xylosoxidans</i>
22	M1	15/10/18	86	4	26	<i>A. xylosoxidans</i>
	M2	26/11/19	86	4	26	<i>A. xylosoxidans</i>