

a novel member of the genus *Spiribacter* isolated from a saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* 67: 2947-2952.

León MJ, Fernández AB, Ghai R, Sánchez-Porro C, Rodríguez-Valera F y Ventosa A. (2014). From metagenomics to pure culture: isolation and characterization of the moderately halophilic bacterium *Spiribacter salinus* gen. nov., sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 80: 3850-3857.

León MJ, Hoffmann T, Sánchez-Porro C, Heider J, Ventosa A y Bremer E. (2018). Compatible solute synthesis and import by the moderate halophile *Spiribacter salinus*: physiology and genomics. *Front Microbiol* 9: 108.

León MJ, Rodríguez-Olmos A, Sánchez-Porro C, López-Pérez M, Rodríguez-Valera F, Soliveri J, Ventosa A y Copa-Patiño JL. (2015). *Spiribacter curvatus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* 65: 4638-4643.

León MJ, Sánchez-Porro C y Ventosa A. (2017). *Marinobacter aquaticus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a solar saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* 67: 2622-2627.

León MJ, Vera-Gargallo B, Sánchez-Porro C y Ventosa A. (2016). *Spiribacter roseus* sp. nov., a moderately halophilic species of the genus *Spiribacter* from salterns. *Int J Syst Evol Microbiol* 66: 4218-4224.

López-Hermoso C, de la Haba RR, Sánchez-Porro C, Papke RT y Ventosa A. (2017). Assessment of Multi-Locus Sequence Analysis as a valuable tool for the classification of the genus *Salinivibrio*. *Front Microbiol* 8: 1107.

López-Hermoso C, de la Haba RR, Sánchez-Porro C y Ventosa A. (2017). *Salinivibrio kushneri* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from salterns. *Syst Appl Microbiol* 41: 159-166.

López-Hermoso C, de la Haba RR, Sánchez-Porro C y Ventosa A. (2018). Emended description of *Salinivibrio proteolyticus*, including *Salinivibrio costicola* subsp. *vallismortis* and five new isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* 68: 1599-1607.

Moshtaghi Nikou M, Ramezani M, Harirchi S, Makzoum S, Amoozegar MA, Shahzadeh Fazeli SA, Schumann P y Ventosa A. (2017). *Salinifilum* gen. nov.,

with description of *Salinifilum proteiniolyticum* sp. nov., an extremely halophilic actinomycete isolated from Meighan wetland, Iran, and reclassification of *Saccharopolyspora aidingensis* as *Salinifilum aidingensis* comb. nov. and *Saccharopolyspora ghardaiensis* as *Salinifilum ghardaiensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 67: 4221-4227.

Ventosa A, de la Haba RR, Sánchez-Porro C y Papke RT. (2015). Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach. *Curr Opin Microbiol* 25: 80-87.

Vera-Gargallo B, Navarro-Sampedro L, Carballo M y Ventosa A. (2018). Metagenome sequencing of prokaryotic microbiota from two hypersaline soils of the Odiel Salt Marshes in Huelva, Southwestern Spain. *Genome Announc* 6: e00140-18.

Vera-Gargallo B y Ventosa A. (2018). Metagenomic insights into the phylogenetic and metabolic diversity of the prokaryotic community dwelling in hypersaline soils from the Odiel saltmarshes (SW Spain). *Genes (Basel)* 9: 152.

Taxonomía y epidemiología de los géneros *Aeromonas* y *Arcobacter*

María José Figueras Salvat, Alba Pérez-Cataluña, Ana Fernández-Bravo y Nuria Salas-Massó

Unidad de Biología y Microbiología, Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, IISPV. Universidad Rovira i Virgili, Sant Llorenç 21, 43201 REUS.



mariajose.figueras@urv.cat



De izquierda a derecha: María José Figueras, Ana Fernández Bravo, Nuria Salas Massó y Alba Pérez Cataluña

El papel del agua como vehículo de transmisión de enfermedades es conocido. En este ámbito hemos participado a lo largo de los años en los proyectos europeos AQUACHIP, EPIBATH, HEALTHY-WATER, AQUAVALENS y JPI-METAWATER y en el proyecto nacional NEWMICRORISK. Todos estos proyectos han permitido un significativo avance en el estudio de la calidad del agua, así como aislar numerosas cepas de los géneros *Aeromonas* y *Arcobacter* con los que venimos trabajando desde hace años.

TAXONOMÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DE AEROMONAS

Aeromonas es un microorganismo autóctono del medio acuático también aislado con frecuencia en alimentos destinados al consumo humano, peces y en diversos procesos infecciosos en humanos (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). Nuestros objetivos desde 1996, cuando empezamos a trabajar con este género, han sido el estudio de la taxonomía y epidemiología. Desde entonces se han realizado

6 tesis doctorales, en las cuales se ha descrito un total de 13 nuevas especies, 4 de ellas pendientes de aceptación, representando un 36% del total de especies del género (n=36).

Los estudios de taxonomía y filogenia se han realizado con cepas clínicas y ambientales utilizando una identificación basada en la secuenciación de genes "housekeeping" tales como *rpoD* o *gyrB* entre otros (Martínez-Murcia et al., 2011). Nuestro grupo ha demostrado que estos genes tienen un gran poder discrimina-

tivo. Su utilización ha permitido caracterizar las distintas especies conocidas y descubrir las 13 especies mencionadas (Figueras et al., 2017; Latif-Eugenín et al., 2016a, 2016b). Así mismo, en colaboración con la Dr. Brigitte Lamy del *Centre Hospitalier Universitaire* de Niza, se ha revisado la taxonomía de especies crípticas, como *Aeromonas media*, y se ha demostrado que esta especie enmascaraba otras dos más (Talagrand-Reboul et al., 2017). En estos estudios y en otros realizados con el Dr. Mark Liles de la Universidad de Auburn (Alabama, USA), se ha utilizado ya la secuenciación de genomas para la descripción de nuevas especies (Figueras et al., 2014a, 2017; Rasmussen-Ivey et al., 2016). La comparación de estos genomas con otros ya depositados en las bases de datos ha permitido reconocer que más de un 30% de los genomas estaban mal etiquetados, por lo que se recomienda que una vez obtenidos los genomas se comparen con la cepa tipo de la especie a la que se supone que pertenece utilizando el *Average Nucleotide Identity (ANI)*, y la hibridación DNA-DNA *in silico (isDDH)*. Valores de ANI e *isDDH* superiores al 96% y 70%, respectivamente permiten confirmar la pertenencia a la especie, pero si estos valores son inferiores deberán extraerse los genes "housekeeping" del genoma y realizar un análisis filogenético con las cepas tipo para determinar si el genoma pertenece a una especie conocida o se trata de una nueva (Beaz-Hidalgo et al., 2015; Figueras et al., 2014a).

Respecto a la virulencia y epidemiología, el principal objetivo es demostrar la capacidad patógena de *Aeromonas* y que estas se pueden transferir del ambiente al hombre. En este sentido en la tesis de Fadua Latif-Eugenín se demostró que las mismas cepas de *Aeromonas caviae* y *Aeromonas saranelli* aisladas de tomate y perejil coincidían con las aisladas en el agua de riego (Latif-Eugenín et al., 2017). Ambas especies han sido aisladas en asociación con infecciones humanas (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015).

Los objetivos desarrollados en las tesis de Ana Fernández-Bravo van más dirigidos a determinar la virulencia y son i) Evaluar *in vitro* la respuesta inmunitaria frente a las infecciones producidas por *Aeromonas*, utilizando una línea celular de monocitos humanos; ii) Estudiar las complejas infecciones mixtas asociadas a la fascitis necrotizante causada por *Aeromonas*. Cabe destacar que

se ha puesto a punto un modelo *in vitro* con una línea celular monocítica humana (THP-1) para determinar la respuesta inmunitaria frente a infecciones realizadas con cepas de diferentes especies de *Aeromonas* de origen clínico y ambiental. Con este trabajo el grupo obtuvo el premio otorgado por el grupo especializado de patogenicidad de la SEM en el *Congress of European Microbiologist FEMS 2017* celebrado en Valencia. Por otro lado, Ana Fernández-Bravo ha realizado una estancia en la *University of Texas Medical Branch* con el grupo del Dr. Chopra. Durante la misma ha continuado estudiando las infecciones mixtas responsables de producir fascitis necrotizante en una paciente joven inmunocompetente (Ponnusamy et al., 2016).

Nuestro mayor reto es demostrar que *Aeromonas* es un patógeno con importancia en salud pública y que, como tal, sea considerado de declaración obligatoria. Con este objetivo seguimos publicando nuevos casos clínicos asociados a *Aeromonas* en colaboración con numerosos hospitales y realizando estudios que apoyan este mensaje (Teunis y Figueras, 2016). Así mismo, hemos sido los responsables del capítulo "*Aeromonas infections in humans*" en el libro *Aeromonas* (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015).

TAXONOMÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DE ARCOBACTER

El género *Arcobacter* incluye especies relacionadas con la producción de enfermedades entéricas y sistémicas en animales y humanos (Collado y Figueras, 2011; Salas-Massó et al., 2016). Nuestro grupo empezó a trabajar con este género en 2007 y desde entonces se han desarrollado 4 tesis doctorales a partir de las cuales se ha descrito un total de 12 especies, representando un 44% del total de especies del género (n=27). Además, también demostramos la asociación de *Arcobacter* con la contaminación fecal (Collado et al., 2008; Fisher et al., 2014; Levican et al., 2016) y una elevada prevalencia de este género en moluscos y productos cárnicos (Collado et al., 2009; Salas-Massó et al., 2016). Las últimas tesis realizadas por Nuria Salas-Massó y Alba Pérez-Cataluña se han centrado en esclarecer, la primera, la incidencia de *Arcobacter* en bivalvos y la segunda en realizar un análisis taxogenómico del género *Arcobacter*, para el

cual ha sido necesario secuenciar los genomas de la mayoría de las cepas tipo y otras cepas adicionales. En esta última tesis y en colaboración con diferentes hospitales Universitarios, como el Hospital San Joan de Reus, Hospital Juan XXIII de Tarragona y Hospital Miguel-Servet de Zaragoza, hemos caracterizado a nivel de especie sus aislados clínicos de *Campylobacter* y *Arcobacter* mediante secuenciación del gen *rpoB*, y hemos descrito un caso clínico producido por *Arcobacter cryaerophilus* enmascarado bajo un *Campylobacter* sp. (Figueras et al., 2014b). Sin embargo, los centros que cuentan con MALDI-TOF ya reconocen cepas como pertenecientes al género *Arcobacter*, siendo confirmadas posteriormente en nuestro laboratorio como *Arcobacter butzleri*. El genotipado de estos aislados mediante la tipificación multilocus de secuencias (MLST) reveló una elevada variabilidad, ya que las 28 cepas clínicas estudiadas resultaron pertenecer a 27 nuevas secuencias tipo o ST. Únicamente una de nuestras cepas presentó la misma ST que dos cepas aisladas también de heces ya depositada en la bases de datos (Pérez-Cataluña et al., 2017). Adicionalmente, este estudio evidenció que cepas no relacionadas epidemiológicamente presentaban el mismo ST lo que indica que el MLST no posee la suficiente resolución para el estudio epidemiológico de *Arcobacter* (Pérez-Cataluña et al., 2017).

La tesis doctoral de Alba Pérez-Cataluña ha sido financiada por el Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili (IISPV) y la de Nuria Salas-Massó se encuadra dentro de las becas URV-IRTA-SANTANDER, estando codirigida por la Dra. Figueras y por la Dra. Dolors Furones y el Dr. Karl B Andree, estos últimos del IRTA-SCR. En esta tesis, por primera vez, se adicionó 2.5% de cloruro sódico al caldo de enriquecimiento y se usó Agar Marino en la recuperación de especies de *Arcobacter* de bivalvos y del agua que los rodea (Salas-Massó et al., 2016, 2018). El resultado fue el descubrimiento de 8 potenciales nuevas especies y el aislamiento por primera vez de las especies *Arcobacter marinus* y *Arcobacter halophilus* (Pérez-Cataluña et al., 2018a; Salas-Massó et al., 2016). Hemos desarrollado en conjunto con el Dr. Dang Duong Bang de la *Denmark Technical University (DTU)*, donde Nuria Salas-Massó realizó una estancia de tres meses, una viable-qPCR para la detección de células vivas de *Arcobacter*, la

cual utiliza Propidio Monoazida (PMA) para evitar la amplificación tanto del DNA libre como del DNA de células con las membranas afectadas. Se ha estudiado también, cómo *Arcobacter* se distribuye en los tejidos de los bivalvos y cómo dos especies frecuentes en moluscos (*Arcobacter butzleri* y *Arcobacter molluscorum*) son depuradas de estos animales. Además, gracias a la colaboración con el grupo de investigación del Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad del País Vasco, liderado por el Dr. Rodrigo Alonso y la Dra. Aurora Fernández; y con Francisco Javier García Peña del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente; hemos encontrado otras 3 nuevas especies pertenecientes a este género, que están en proceso de descripción.

Con relación al análisis genómico, tenemos secuenciados los genomas del 90% de las especies del género *Arcobacter*. En todas las descripciones de nuevas especies realizadas por el grupo hemos incluido sus genomas y el análisis basado en el ANI e *isDDH* (Pérez-Cataluña et al., 2018a). Además, los estudios genómicos también nos han permitido descubrir la existencia de 4 genomas dentro de la especie *A. cryaerophilus* (Pérez-Cataluña et al., 2018b). Actualmente, en colaboración con el equipo del Dr. Jesús Romalde de la Universidad de Santiago de Compostela estamos comprobando, utilizando un estudio taxonómico polifásico, la hipótesis de que el género *Arcobacter* está en realidad formado por 7 géneros diferentes. Recientemente el grupo ha participado en dos capítulos del *Handbook of Foodborne Diseases*. Edited by Dongyou Liu sobre *Aeromonas* en colaboración con el Dr. Ko (National Cheng Kung University, Taiwan) y otro realizado íntegramente por nuestro grupo sobre *Arcobacter* el cual saldrá publicado próximamente. Una participación similar es la realizada para el *Global Water Pathogen Project, Part III. Specific excreted pathogens: environmental and epidemiology aspects* (GWPP, <http://www.waterpathogens.org/toc>) con un capítulo dedicado a *Arcobacter* (Banting y Figueras, 2017) y otro de *Aeromonas* (Figueras y Ashbolt, 2017).

REFERENCIAS

- Banting GS y Figueras MJ.** (2017). *Arcobacter*, in *Global Water Pathogens Project. Part 3 Bacteria*. Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO.
- Beaz-Hidalgo R, Hossain MJ, Liles MR y Figueras MJ.** (2015). Strategies to avoid wrongly labelled genomes using as example the detected wrong taxonomic affiliation for aeromonas genomes in the GenBank database. *PLoS One* 10, e0115813.
- Collado L y Figueras MJ.** (2011). Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clin Microbiol Rev* 24: 174–192.
- Collado L, Guarro J y Figueras MJ.** (2009). Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish. *J Food Prot* 72: 1102–6.
- Collado L, Inza I, Guarro J y Figueras MJ.** (2008). Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. *Environ Microbiol* 10: 1635–1640.
- Figueras MJ y Beaz-Hidalgo R.** (2015). *Aeromonas* infections in humans, in *Aeromonas*. Caister Academic Press. UK.
- Figueras MJ, Beaz-Hidalgo R, Hossain MJ y Liles MR.** (2014a). Taxonomic affiliation of new genomes should be verified using average nucleotide identity and multilocus phylogenetic analysis. *Genome Announc* 2: e00927-14-e00927-14.
- Figueras MJ, Latif-Eugenin F, Ballester F, Pujol I, Tena D, Berg K, Hossain MJ, Beaz-Hidalgo R y Liles MR.** (2017). “*Aeromonas intestinalis*” and “*Aeromonas enterica*” isolated from human faeces, “*Aeromonas crassostreae*” from oyster and “*Aeromonas aquatilis*” isolated from lake water represent novel species. *New Microbes New Infect* 15: 74–76.
- Figueras MJ, Levican A, Pujol I, Ballester F, Rabada Quilez MJ y Gomez-Bertomeu F.** (2014b). A severe case of persistent diarrhoea associated with *Arcobacter cryaerophilus* but attributed to *Campylobacter* sp. and a review of the clinical incidence of *Arcobacter* spp. *New microbes new Infect* 2: 31–7.
- Fisher JC, Levican A, Figueras MJ y McLellan SL.** (2014). Population dynamics and ecology of *Arcobacter* in sewage. *Front Microbiol* 5: 525.
- Hossain MJ, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ y Liles MR.** (2014). Draft genome sequences of two novel *Aeromonas* species recovered in association with cyanobacterial blooms. *Genome Announc* 2: e01181-14-e01181-14.
- Latif-Eugenin F, Beaz-Hidalgo R y Figueras MJ.** (2016a). Evaluation of different conditions and culture media for the recovery of *Aeromonas* spp. from water and shellfish samples. *J. Appl Microbiol* 121: 883–91.
- Latif-Eugenin F, Beaz-Hidalgo R y Figueras MJ.** (2016b). First record of the rare species *Aeromonas schubertii* from mussels: phenotypic and genetic re-evaluation of the species and a review of the literature. *Arch Microbiol* 198: 333–45.
- Latif-Eugenin F, Beaz-Hidalgo R, Silvera-Simón C, Fernandez-Cassi X y Figueras MJ.** (2017). Chlorinated and ultraviolet radiation -treated reclaimed irrigation water is the source of *Aeromonas* found in vegetables used for human consumption. *Environ Res* 154: 190–195.
- Levican A, Collado L y Figueras MJ.** (2016). The use of two culturing methods in parallel reveals a high prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. in a wastewater treatment plant. *Biomed Res Int* 2016: 1–9.
- Martínez-Murcia AJ, Monera A, Saavedra MJ, Oncina R, Lopez-Álvarez M, Lara E y Figueras MJ.** (2011). Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Syst Appl Microbiol* 34: 189–199.
- Pérez-Cataluña A, Salas-Massó N y Figueras MJ.** (2018a). *Arcobacter canalis* sp. nov., isolated from a water canal contaminated with urban sewage. *Int J Syst Evol Microbiol* 68: 1258–1264.
- Pérez-Cataluña A, Collado L, Salgado O, Lefiñanco V y Figueras MJ.** (2018b) A polyphasic and taxonomic evaluation uncovers *Arcobacter cryaerophilus* as a species complex that embraces four genomovars. *Front Microbiol* [Aceptado]
- Pérez-Cataluña A, Tapiol J, Benavent C, Sarvisé C, Gómez F, Martínez B, Terron-Puig M, Recio G, Vilanova A, Pujol I, Ballester F, Rezusta A y Figueras MJ.** (2017). Antimicrobial susceptibility, virulence potential and sequence types associated with *Arcobacter* strains recovered from human faeces. *J Med Microbiol* 66: 1736–1743.
- Ponnusamy D, Kozlova EV, Sha J, Erova TE, Azar SR, Fitts EC, Kirtley ML, Tiner BL, Andersson JA, Grim CJ, Isom RP, Hasan NA, Colwell RR y Chopra AK.** (2016). Cross-talk among flesh-eating *Aeromonas hydrophila* strains in mixed infection leading to necrotizing fasciitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: 722–7.
- Rasmussen-Ivey CR, Hossain MJ, Odom SE, Terhune JS, Hemstreet WG, Shoemaker CA, Zhang D, Xu DH, Griffin MJ, Liu YJ, Figueras MJ, Santos SR, Newton JC y Liles MR.** (2016). Classification of a hypervirulent *Aeromonas hydrophila* pathotype responsible for epidemic outbreaks in warm-water fishes. *Front Microbiol* 7: 1615.
- Salas-Massó N, Andree KB, Furones MD y Figueras MJ.** (2016). Enhanced recovery of *Arcobacter* spp. using NaCl in culture media and re-assessment of the traits of *Arcobacter marinus* and *Arcobacter halophilus* isolated from marine water and shellfish. *Sci Total Environ* 566–567: 1355–1361.
- Salas-Massó N, Figueras MJ, Andree KB y Furones MD.** (2018). Do the *Escherichia coli* European Union shellfish safety standards predict the presence of *Arcobacter* spp., a potential zoonotic pathogen? *Sci Total Environ* 624: 1171–1179.
- Talagrand-Reboul E, Roger F, Kimper JL, Colston SM, Graf J, Latif-Eugenin F, Figueras MJ, Petit F, Marchandin H, Jumas-Bilak E y Lamy B.** (2017). Delineation of taxonomic species within complex of species: *Aeromonas media* and related species as a test case. *Front Microbiol* 8: 621.
- Teunis P y Figueras MJ.** (2016). Reassessment of the enteropathogenicity of mesophilic *Aeromonas* species. *Front Microbiol* 7: 1395.