

Indicadores de contaminación microbiológica en agua

Taxonomía y epidemiología de los géneros “Aeromonas” y “Arcobacter”

María José Figueras Salvat y Roxana Beaz Hidalgo

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

EL GRUPO MICROAQUA

Centra su investigación en la Microbiología Ambiental prestando servicios externos de análisis y asesoramiento a la vez que estudia la taxonomía y epidemiología de los géneros bacterianos *Aeromonas* y *Arcobacter* que son considerados patógenos emergentes en el hombre, de los que se desconocen muchos aspectos relacionados con su taxonomía, virulencia, diversidad genética y prevalencia tanto en agua como en alimentos. Entre los servicios externos el más importante es el que se realiza ininterrumpidamente desde el año 1990 para la Agencia Catalana del Agua (ACA) del Departamento de Medio Ambiente del gobierno catalán y que consiste en el control microbiológico de todas las zonas de baño de Cataluña. Cada sábado durante las 17 semanas que dura la estación balnearia se analizan 250 muestras de agua para los indicadores de contaminación fecal y el diagnóstico de los resultados que proporcionamos cada martes al ACA, y que se difunde al público cada semana. Para poder realizar este servicio con las máximas garantías el grupo inició una línea de investigación con dos objetivos: 1. Evaluar la fiabilidad de los métodos de cultivo recomendados para el análisis de los indicadores de contaminación fecal y 2. Evaluar la capacidad de los indicadores de contaminación fecal para predecir la presencia de microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Arcobacter*, etc. Los resultados de nuestros estudios han demostrado la poca fiabilidad de los métodos microbiológicos y la experiencia adquirida nos ha permitido actuar como asesores de diversos organismos como el Ministerio de Sanidad y Consumo, el Ministerio de Medio Ambiente Medio Rural y Marino, la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Programa de Medio Ambiente de la Naciones Unidas (en su programa para la prevención de la contaminación del Mar Mediterráneo - MED POL) y la Comisión Europea en el diseño de la nueva Directiva para la gestión de la calidad de las aguas de baño (2006/7/CE) que aplicamos en la actua-

lidad. De especial relevancia han sido las aportaciones realizadas en las guías desarrolladas por la OMS para la monitorización de las aguas de baño en las que también colabora el Prof. Juan José Borrego de la Universidad de Málaga.

(http://www.who.int/water_sanitation_health/bathing/bathing3/en/index.html; http://www.who.int/water_sanitation_health/bathing/srwe1/en/).

En la actualidad, los principales objetivos se centran en definir el riesgo de contaminación microbiológica de las aguas de baño en función de los criterios de la nueva directiva Europea y evaluar sus posibles limitaciones, así como en validar su capacidad de proteger la salud de los bañistas mediante estudios epidemiológicos. Asimismo seguimos investigando métodos alternativos rápidos para establecer la calidad sanitaria de las aguas de baño.

El papel del agua como vehículo de transmisión de enfermedades es conocido, no obstante, existen muy pocos estudios epidemiológicos que evalúen cuantitativamente el riesgo real para las personas expuestas al agua de baño o al consumo de agua potable. En este sentido hemos realizado dos estudios epidemiológicos, como los mencionados, en dos proyectos Europeos EPIBATHE y HEALTHY WATER. En el primero, se reclutaron a 2.250 personas, para un estudio aleatorizado durante el cual mientras el grupo de bañistas se encontraba en el agua recogíamos muestras de las mismas cada 20 minutos. El principal objetivo era evaluar si los nuevos estándares de calidad incluidos en la nueva directiva Europea para el agua de baño (2006/7/EC) protegían suficientemente a los bañistas de cualquier riesgo de infección. Los resultados de este estudio realizado por nuestro grupo en las playas Catalanas, ha demostrado la capacidad de la Directiva para proteger la salud de los bañistas. El segundo proyecto tuvo como objetivo evaluar microorganismos emergentes en aguas potables mediante estudios epidemiológicos y moleculares. Entre nuestras responsabilidades se incluyeron los estudios sobre *Arcobacter* y *Aeromonas*,



De izquierda a derecha: Arturo Levican, Roxana Beaz-Hidalgo, Carolila Sivera, Kendra Rodriguez, Catalina Nuñez, Maria José Figueras y Kathiusca Paredes.

así como la preparación de materiales formativos para difundir los *Water Safety Plans*, basados en la metodología del Análisis de Peligro y Puntos de Control Crítico desarrollados por la OMS para la industria del agua potable, considerando que estos serán de aplicación obligatoria según la modificación de la actual Directiva para el agua potable.

TAXONOMÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DE AEROMONAS

Nuestro grupo tiene una amplia trayectoria en el estudio de este complejo de bacterias autóctonas del medio acuático capaces de producir infecciones gastrointestinales y extraintestinales en humanos (Figueras, 2005) así como diversas patologías en peces (Beaz-Hidalgo, 2010). Muchos de los estudios se han realizado en colaboración del Dr. Antonio Martínez-Murcia, profesor de la Universidad Miguel Hernández y director del *Molecular Diagnostic Center* (MDC) de Orihuela. Los objetivos se han centrado en: 1. Evaluar la incidencia de *Aeromonas* en muestras de origen clínico y ambiental para estudiar la taxonomía y filogenia del género y desarrollar técnicas de identificación molecular rápidas y fiables; 2. Determinar la presencia de genes que codifican factores de virulencia y estudiar los mecanismos de patogenicidad y 3. Investigar la epidemiología de especies de interés clínico.

La poca fiabilidad de los métodos fenotípicos para la identificación de *Aeromonas* tanto a nivel de especie como de género, demostrada repetidas veces (Figueras, 2005; Beaz-Hidalgo, 2010 y otras referencias incluidas en estos estudios), motivaron el desarrollo de una sonda específica de género (Chacón *et al.*, 2002) y de un método (RFLP-16S ARNr) que permitía la identificación de todas las especies descritas hasta entonces (Borrel *et al.*, 1997; Figueras *et al.*, 2000). El gen ARNr 16S no es útil para la identificación de *Aeromonas* spp. ya que la mayoría de especies muestran similitudes >99% (Beaz-Hidal-

go *et al.*, 2009; Alperi *et al.*, 2010; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Figueras *et al.*, en prensa a) y además un 8.1% de las cepas presentan mutaciones en alguna de las copias de los operones de este gen (Alperi *et al.*, 2008). Este hallazgo nos llevó a centrar los estudios filogenéticos del género en las secuencias de genes *housekeeping* (*gyrB*, *rpoD*, etc.) no estudiados hasta entonces, demostrando el gran poder discriminativo que tienen estos genes (Yañez *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2004) y su capacidad para caracterizar especies clínicas y ambientales cuya prevalencia estaba enmascarada por identificaciones incorrectas (Figueras, 2005; 2009; en prensa b; Alperi *et al.*, 2008; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009; 2010; Figueras *et al.*, 2009). Muy recientemente, el MDC ha realizado el primer análisis filogenético con las secuencias de 7 genes *housekeeping* (MLPA) en el que hemos colaborado (Martínez-Murcia *et al.*, en revisión en *Syst. Appl. Microbiol.*). Además, 5 de estos genes nos han sido de gran utilidad para caracterizar cinco especies nuevas para el género: *A. fluvialis*, *A. piscicola*, *A. sanarellii*, *A. taiwanensis* y *A. rivuli* (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009, 2010; Alperi *et al.*, 2010 b,c; Figueras *et al.*, en prensa a).

Con respecto a la virulencia y epidemiología, hay que destacar que describimos por primer vez en cepas clínicas la presencia del Sistema de Secreción de Tipo III (T3SS) (Chacón *et al.* 2004) y que gracias a la experiencia de los Drs. Juan Tomás y Susana Merino de la Universidad de Barcelona pudimos describir conjuntamente la secuencia completa de los 35 genes que constituyen el T3SS de *Aeromonas* (Viches *et al.* 2004). Además, nuestro grupo ha descrito un nuevo caso de síndrome urémico hemolítico (SUH) asociado a *Aeromonas* (Figueras *et al.*, 2007) y recientemente hemos detectado la presencia de los genes que codifican las toxinas Shiga (*stx1* y *stx2*), responsables del SUH, en cepas de este género (Alperi y Figueras, 2010a). Actualmente seguimos trabajando en los mismos objetivos y colaborando con diversos hospitales, para los que identificamos genéticamente las cepas pertenecientes a este género.

TAXONOMÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DE ARCOBACTER

El género *Arcobacter* fue propuesto en el año 1991 a partir de especies incluidas previamente en el género *Campylobacter* y sus especies son capaces de producir gastroenteritis y bacteremias en humanos así como numerosas patologías en animales (diarrea, mastitis, abortos) (Collado y Figueras., en revisión en *Clin. Microbiol. Rev.*). Los objetivos planteados para este género son similares a los descritos para *Aeromonas*. A pesar de que esta línea de investigación se inició en el año 2007, ha resultado ser muy productiva. Hemos demostrado por primera vez que la presencia de *Arcobacter* en agua está asociada a la contaminación fecal (Collado *et al.*, 2008; 2010) y constatado su elevada prevalencia en muestras de carne y moluscos (Collado *et al.*, 2009b). Desde la perspectiva de la Salud Pública estos resultados son muy relevantes, ya que recientemente estos microorganismos se han asociado a brotes hídricos. Además, se ha desarrollado el primer método de identificación molecular que permite reconocer todas las especies del género (RFLP-ARNr 16S) descritas hasta entonces (Figueras *et al.*, 2008) y su aplicación nos permitió reconocer tres especies nuevas: *A. mytili* y *A. molluscorum*, aisladas de mejillones (Collado *et al.*, 2009a; Figueras *et al.*, en revisión en *Syst. Appl. Microbiol.*) y *A. defluvii* aislada de aguas residuales (Collado *et al.*, en prensa). En la actualidad, estamos caracterizando otras posibles nuevas especies y optimizando los métodos de cultivo, detección e identificación. Asimismo, en colaboración con el MDC, estamos preparando el primer análisis filogenético del género basado en 5 genes *housekeeping*. También se determinará la patogenicidad de las distintas especies utilizando cultivos celulares y se desarrollarán métodos para establecer la presencia de genes que codifiquen sus factores de virulencia.

REFERENCIAS

- Alperi A, Figueras MJ. (2010 a) Shiga toxin (*stx1* and *stx2*) genes in *Aeromonas* clinical strains show sequences which are highly similar to those of the most virulent human variants of shiga toxin producing *E. coli*. *Clin. Microbiol. Infec.* **16**: 1563-1567.
- Alperi A, Figueras MJ, Inza I, Martínez-Murcia AJ. (2008). Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. *Int. Microbiol.* **11**: 185-194.
- Alperi A, Martínez-Murcia AJ, Monera A, Saavedra MJ, Figueras MJ. (2010 b). *Aeromonas fluvialis* sp. nov., isolated from a Spanish river. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 72-77.
- Alperi A, Martínez-Murcia AJ, KO WC, Morena A, Saavedra MJ, Figueras MJ. *Aeromonas taiwanensis* sp. nov. and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., two new clinical species from Taiwan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 2048-2055.
- Beaz-Hidalgo R, Alperi A, Figueras MJ, Romalde JL. (2009). *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. *Syst. Appl. Microbiol.* **32**: 471-479.
- Beaz Hidalgo R., Alperi A, Buján N, Romalde JL, Figueras MJ. (2010 c). Comparison of biochemical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Syst. Appl. Microbiol.* **33**: 149-153.
- Borrell N, Acinas SG, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. (1997). Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1671-1674.
- Chacón MR, Castro-Escarpullí G, Soler L, Guarro J, Figueras MJ. (2002). A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **44**: 221-225.
- Chacón MR, Soler L, Groisman EA, Guarro J, Figueras MJ. (2004). Type III secretion system genes in clinical *Aeromonas* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **42**:1285-1287.
- Collado L, Cleenwerck I, Van Trappen S, De Vos P, Figueras MJ. (2009a). *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**:1391-1396.
- Collado I, Figueras MJ. The genus *Arcobacter*: A review of its taxonomy, epidemiology and importance. *Clin Microbiol. Rev.* (en prensa).
- Collado L, Guarro J, Figueras MJ. (2009b). Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish. *J. Food. Prot.* **72**: 1102-1106.
- Collado L, Inza I, Guarro J, Figueras MJ (2008). Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. *Environ. Microbiol.* **10**: 1635-1640.
- Collado L, Kasimir G, Perez U, Bosch A, Pinto R, Saucedo G, Huguet JM, Figueras MJ. (2010). *Water Res.* **44**:3696-702.
- Collado L, Levican A, Perez J, Figueras MJ. *Arcobacter defluvii* sp. nov., isolated from sewage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (en prensa).
- Figueras MJ. (2005). Clinical relevance of *Aeromonas*. *Rev. Med. Microbiol.* **16**: 145-153.
- Figueras MJ, Soler L, Chacón MR, Guarro J, Martínez-Murcia AJ. (2000). Use of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified 16S rRNA gene for the identification of *Aeromonas* spp. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2023-2025.
- Figueras MJ, Aldea MJ, Fernández N, Aspíroz C, Alperi A, Guarro J. (2007). *Aeromonas* hemolytic uremic syndrome. A case and a review of the literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **58**: 231-234.
- Figueras MJ, Collado L, Guarro J. (2008). A new 16S rDNA-RFLP method for the discrimination of the accepted species of *Arcobacter*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **62**:11-15.
- Figueras MJ, Alperi A, Saavedra MJ, Ko WC, Gonzalo N, Navarro M, Martínez-Murcia A. (2009). Clinical relevance of the recently described *Aeromonas aquariorum*. *J. Clin. Microbiol.* **47**: 3742-3746.
- Figueras MJ, Alperi A, Beaz-Hidalgo R, Stackebrandt E, Brambilla E, Monera A, Martínez-Murcia AJ. *Aeromonas rivuli* sp. nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet in Germany. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (en prensa a, doi:10.1099/ijs.0.016139-0).
- Figueras MJ, Beaz-Hidalgo R, Yigal S, Sivian L, Halpern H. Re-identification of *Aeromonas* isolates from chironomid egg masses as the potential pathogenic bacteria *Aeromonas aquariorum*. *Env. Microbiol. Rep.* (en prensa b).
- Figueras MJ, Collado L, Levican A, Perez J, Solana MJ, Yustes C. *Arcobacter molluscorum* sp. nov., new species isolated from shellfish. *Syst. Appl. Microbiol.* (en revisión).
- Martínez-Murcia A, Moreno A, Saavedra MJ, Ocina R, López-Álvarez M, Lara E, Figueras MJ. Multilocus Phylogenetic Analysis of the Genus *Aeromonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* (en revisión).
- Soler L, Yañez MA, Chacón MR, Aguilera-Arreola MG, Catalán V, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. (2004). Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1511-1519.
- Vilches S, Urgell C, Merino S, Chacón M, Soler L, Castro-Escarpullí G, Figueras MJ, Tomás JM. (2004). Complete Type III Secretion System of a Mesophilic *Aeromonas hydrophila* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6914-6919.
- Yañez MA, Catalán V, Apráiz D, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. (2003). Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* **53**: 875-883.