

# Actualización de los géneros *Aeromonas* y *Arcobacter-like*. Grupo de Microbiología Ambiental (MicroAmb) de la Universidad Rovira i Virgili

MARÍA JOSÉ FIGUERAS SALVAT, ISABEL PUJOL BAJADOR, MARTA SANCHÍS TALÓN, ANA FERNÁNDEZ BRAVO, GEMA RECIO COMÍ Y ROBERTO MONLLOR GUERRA

Grupo de Microbiología Ambiental, Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, IISPV. Universidad Rovira i Virgili, Sant Llorenç 21, 43201 Reus.

✉ [mariajse.figueras@urv.cat](mailto:mariajse.figueras@urv.cat) | [anafernandez@urv.cat](mailto:anafernandez@urv.cat)



Miembros del Grupo de investigación en Microbiología Ambiental. De izquierda a derecha, arriba: M<sup>a</sup> José Figueras, Isabel Pujol, Marta Sanchis y Ana Fernández (seniors); abajo: Roberto Monllor, Gema Recio (doctorandos), Carme Sanmartí y Núria Pilas (técnicos de laboratorio).

Un balance detallado de la actividad sobre los estudios de taxonomía de nuestro grupo consta en el n<sup>o</sup> 65 de Actualidad SEM de 2018. El grupo de investigación MicroAmb ha participado durante más de 20 años en diferentes proyectos europeos (AQUACHIP, EPIBATHE, HEALTHY-WATER, AQUAVALENS y JPI-METAWATER) relacionados con el papel del agua como vehí-

culo de transmisión de infección. En estos proyectos se ha tenido la oportunidad de profundizar en la taxonomía y la epidemiología de los géneros bacterianos *Aeromonas* y *Arcobacter*, que hoy en día sabemos que son bacterias que se multiplican en aguas residuales como hemos constatado en los estudios de metagenómica (Rosinó *et al.*, 2020).

El género *Aeromonas* (Stanier 1943), definido hace unos 80 años, engloba especies consideradas, todavía hoy, patógenos emergentes por causar gastroenteritis, infecciones de heridas, bacteriemias y otras infecciones (Figueras y Ashbolt 2019; Fernández-Bravo y Figueras 2020). Desde 1996, cuando iniciamos nuestros estudios en este género y hasta la fecha, se han rea-

lizado 6 tesis doctorales (+2 en curso) y se han descrito un total de 19 nuevas especies de origen clínico y ambiental, lo que representa un 52,7% del total de especies descritas (n=36) hasta el momento (Fernández-Bravo 2019; Fernández-Bravo y Figueras 2020). Esto ha sido posible gracias a la utilización de métodos de identificación molecular que han evolucionado hasta el análisis filogenético de los genes *housekeeping* (HK) *rpoD* y *gyrB*, que tienen una mayor resolución que el gen 16S rRNA para la identificación de las especies de *Aeromonas* (Fernández-Bravo y Figueras 2020). Esta estrategia la desarrollamos en colaboración con el Dr. Martínez-Murcia (Universidad Miguel Hernández, Orihuela) y podemos decir que es el método de referencia (*gold standard*) que se aplica en la actualidad. También, en el año 2011, propusimos el uso del *Multilocus Phylogenetic Analysis* (MLPA), con siete genes (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA*, *dnaX*, and *atpD*), para la descripción de nuevas especies del género (Martínez-Murcia *et al.*, 2011). También introdujimos en la descripción de nuevas especies sus genomas utilizando el análisis de índices genómicos *Average Nucleotide Identity* (ANI) y la *in-silico DNA-DNA hybridization* (isDDH) con valores de corte  $\geq 96\%$  y  $\geq 70\%$ , respectivamente, para confirmar la pertenencia a una especie (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2015). En base a estos índices reconocimos que al menos el 30% de genomas depositados en el GenBank bajo el nombre de *Aeromonas hydrophila* están mal etiquetados y recomendamos como estrategia de verificación el análisis del ANI e isDDH con la cepas tipo de las especies y que cuando los valores sean inferiores a los indicados, se realice un análisis filogenético con las cepas tipo utilizando las secuencias de los genes HK extraídas de los genomas para determinar la identidad de la especie (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2015). Estas técnicas nos han permitido demostrar que *Aeromonas hydrophila* no es la especie más importante dentro del género, y que las especies mayoritariamente asociadas a infecciones humanas son *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii*, *Aeromonas dhakensis* y *A. hydrophila* (Fernández-Bravo y Figueras 2020). Así mismo, en colaboración con el grupo de la Dra. Garaciela Castro-Escarpulli (Instituto Politécnico Nacional de México DF), se ha identificado por primera vez desde su descripción (2016) en muestras de agua y de vegetales en Portugal la especie *Aeromonas lusitana* en trucha arcoíris de una piscifactoría en México (Fernández-Bravo

*et al.*, 2022). Al estudiarse comparativamente su genoma con el de la cepa tipo, se hizo evidente la capacidad de esta especie para adaptarse a ambientes muy diversos. Otro importante hallazgo está relacionado con el aislamiento, de una fascitis en un adulto y de un caso de diarrea en un niño, de dos cepas mesófilas de *Aeromonas salmonicida*, conocidas por ser capaces de producir infecciones en peces. El estudio realizado en colaboración con el grupo del Dr. Steve J. Charette (Canadá), demostró que estos aislados tenían una gran patogenicidad en infecciones experimentales y que su genoma presentaba importantes determinantes de virulencia (Vincent *et al.*, 2019). Nuestro interés en los últimos años se ha centrado en estudiar las interacciones entre las cepas de *Aeromonas* involucradas en las infecciones mixtas, como las dos cepas responsables de producir una fascitis necrotizante que requirió de amputación de parte de las extremidades en una paciente joven inmunocompetente (Fernández-Bravo *et al.*, 2019). En estos estudios, se investigan las interacciones entre las bacterias involucradas en la infección evaluando por transcriptómica la expresión en líneas celulares, de los genes de virulencia y de los relacionados con la respuesta inmune innata (Fernández-Bravo *et al.*, 2019; 2024). En la actualidad hay dos tesis doctorales en marcha una de Gema Recio Comí sobre infecciones mixtas asociadas a casos de diarrea (Fernández-Bravo *et al.*, 2024) y la de Roberto Monllor Guerra sobre alternativas al uso de antibióticos (Guerra *et al.*, 2024).

En 2007, iniciamos los estudios con el género *Arcobacter* propuesto por Vandamme (1991) y que también engloba especies capaces de producir infecciones en el hombre y los animales y desde entonces se han desarrollado 5 tesis doctorales y descrito un total de 12 nuevas especies (Banting y Figueras, 2019; Pérez-Cataluña 2018; Salas-Massó 2019). Estas nuevas especies representan el 44% del total de especies del género (n=27). Muchas de estas especies se identificaron en la tesis doctoral realizada en bivalvos en colaboración con la Dra. Dolores Furones y Dr. Karl Andree del IRTA (La Rápita) al suplementar el caldo *Arcobacter*-CAT con 2,5% NaCl y su posterior cultivo en agar marino (Salas-Massó 2019). Con esta aproximación se pudieron aislar por primera vez desde su descripción, *Arcobacter marinus* y *Arcobacter halophilus*, aisladas en Corea y Hawaii, respectivamente. La adición a los medios de cultivo convencionales

de sal, agua de mar artificial, liofilizado de ostras etc. son claros ejemplos de cómo se puede incrementar la diversidad y descubrimiento de especies (referencias SEM@FORO 2018 y 2020 n° 74; Rahman *et al.*, 2020). La otra clave ha sido la utilización de métodos moleculares y en especial de las secuencias de los genes *rpoB* y/o *gyrB* para la identificación rutinaria de las cepas aisladas. El uso en 2015, del MLPA con cinco genes (*gyrA*, *atpA*, *rpoB*, *gyrB*, and *hsp60*) y la secuenciación del genoma del 90% de las especies del género con el análisis del ANI y el isDDH para la descripción de nuevas especies también han sido decisivos. Así, los estudios genómicos nos permitieron descubrir la existencia de especies crípticas entre las cepas identificadas como *Arcobacter cryaerophilus* que se definieron como genovares al no poderlas diferenciar fenotípicamente (Pérez-Cataluña 2018; Pérez-Cataluña *et al.*, 2018a). Así mismo, el análisis comparativo de los genomas de todas las especies realizado en colaboración con el equipo del Dr. Jesús Romalde (Universidad de Santiago de Compostela) nos condujo a dividir el género en 7 géneros: *Arcobacter*, *Aliarcobacter*, *Pseudoarcobacter*, *Haloarcobacter*, *Malacobacter*, *Poseidonibacter* y *Arcomarinus* (Pérez-Cataluña *et al.*, 2018b). Esta separación estaba reforzada también en base a la similitud del 91,0% del gen 16S rRNA entre algunas de las especies, muy inferior al 95% propuesto para indicar que dos especies pertenecen a géneros distintos.

## Bibliografía

- Banting G, Figueras Salvat MJ** (2019). *Arcobacter*. In Global Water Pathogens Project. Part 3 Bacteria. Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO.
- Beaz-Hidalgo R, Hossain MJ, Liles MR et al.** (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.
- Fernández-Bravo A** (2019). Epidemiology and pathogenic characterization of species of the genus *Aeromonas*. PhD Thesis. <http://hdl.handle.net/10803/667146>
- Fernández-Bravo A, Figueras MJ** (2020). An update on the genus *Aeromonas*: Taxonomy, epidemiology, and pathogenicity. Microorganisms. 8 (1), 129.

- Fernández-Bravo A, Kilgore PB, Anderson JA et al.** (2019) T6SS and ExoA of flesh-eating *Aeromonas hydrophila* in peritonitis and necrotizing fasciitis during mono- and polymicrobial infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:24084–24092
- Fernández-Bravo A, Recio G, Figueras MJ** (2024). Interactions between *Aeromonas caviae* and *Yersinia enterocolitica* isolated from a case of diarrhea: evaluation of antimicrobial susceptibility and immune response of infected macrophages. *Front. Microbiol.* 15:1328766.
- Fernández-Bravo A, Vega-Sánchez V, Pérez-Cataluña A et al.** (2022) First record of the rare species *Aeromonas lusitana* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum): Comparative analysis with the existing strains. *Pathogens* 11, 1299.
- Figueras MJ, Ashbolt N** (2019). *Aeromonas*. In *Global Water Pathogens Project. Part 3 Bacteria*. Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO.
- Guerra RM, Figueras MJ, Pujol-Bajador I et al.** (2024). Repositioning of the anti-hyperlipidemic drug fenofibrate for the management of *Aeromonas* infections. *Microorganisms* 12, 465.
- Martínez-Murcia AJ, Monera A, Saavedra MJ et al.** (2011). Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Syst Appl Microbiol* 34: 189–199.
- Pérez-Cataluña A** (2018). Epidemiology and taxogenomics of the genus *Arcobacter*. PhD Thesis. <http://hdl.handle.net/20.500.11797/TDX2840>
- Pérez-Cataluña A, Collado L, Salgado O et al.** (2018a). A polyphasic and taxogenomic evaluation uncovers *Arcobacter cryaerophilus* as a species complex that embraces four genomovars. *Front Microbiol* 9:805.
- Pérez-Cataluña A, Salas-Massó N, Diéguez AL et al.** (2018b). Revisiting the taxonomy of the genus *Arcobacter*: Getting order from the chaos. *Front Microbiol.* 9:2077.
- Rahman FU, Andree KB, Salas-Massó N et al.** (2020). Improved culture enrichment broth for isolation of *Arcobacter*-like species from the marine environment. *Sci Rep.* 10:14547.
- Rusiñol M, Martínez-Puchol S, Timonedá N et al.** (2020) Metagenomic analysis of viruses, bacteria and protozoa in irrigation water. *Int J Hyg Environ Health* 224:113440
- Salas-Massó N** (2019). Epidemiology of *Arcobacter*-related spp. in shellfish exposed to marine and brackish water with different levels of fecal pollution. PhD Thesis. <http://hdl.handle.net/10803/668373>
- Vincent AT, Fernández-Bravo A, Sanchez M et al.** (2019). Investigation of the virulence and genomics of *Aeromonas salmonicida* strains isolated from human patients. *Infect Genet Evol.* 68:1-9.

