

Epidemiología del género *Aeromonas* en hospitales españoles: caracterización patogénica de dos nuevas especies

Marcos Joaquín Berges Buxeda

TRABAJO FINAL DE GRADO DE BIOTECNOLOGÍA



Tutor académico: Javier Capilla Luque, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, javier.capilla@urv.cat

En cooperación con: Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV)

Supervisora: Dra. Ana Fernández Bravo, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, ana.fernandez@urv.cat

16 de julio de 2020

Yo, Marcos Joaquín Berges Buxeda, con DNI 73163390E, soy conocedor de la guía de plagio de la URV *Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes* (aprobada en julio de 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.



Tarragona, 10 de julio de 2020.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer el trato que me han dado todos y cada uno de los integrantes de la Unidad de Micología y Microbiología Ambiental, desde doctorandos y doctores hasta las técnicas de laboratorio. Aunque breve, el tiempo compartido con todos ellos ha sido muy fructífero y agradable, no sólo por la experiencia y los conocimientos adquiridos sino también por el magnífico ejemplo de trabajo en grupo que son.

Por último, me gustaría resaltar el apoyo firme y constante que he recibido por parte de mi tutora, la doctora Ana Fernández Bravo. Durante el confinamiento, la Dra. Fernández Bravo ha estado respondiendo todas mis dudas y consultas derivadas de este trabajo, así como las que han ido surgiendo sobre el SARS-CoV-2. La continuación de este estudio fuera del laboratorio no hubiera sido posible sin su esfuerzo y dedicación. Como tutora, me ha transmitido sus conocimientos en microbiología clásica, biología molecular e inmunología de la manera más interesante y cercana posible, compartiendo conmigo su visión sobre el mundo de la investigación, lo cual me parece primordial para un alumno de último curso de Biotecnología. Además, me ha ayudado a elegir mis estudios de máster universitario, por lo que le estoy doblemente agradecido.

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Datos del centro.....	2
3. Introducción.....	3
3.1 Género <i>Aeromonas</i>	3
3.2. Historia del género	3
3.3. Taxonomía del género <i>Aeromonas</i>	4
3.3.1. Gen 16S rRNA.....	4
3.3.2. Genes de mantenimiento o <i>housekeeping</i>	6
3.3.3. Genomas	7
3.4. Ecología y epidemiología del género <i>Aeromonas</i>	8
3.5. Virulencia del género <i>Aeromonas</i>	10
3.6. Sistema inmunitario	11
3.7. Resistencia a antibióticos.....	12
4. Interés y objetivos	14
5.1 Identificación molecular	15
5.1.1 Cepas bacterianas, conservación y cultivo	15
5.1.2. Extracción de ADN	15
5.1.3. Identificación molecular en base al gen <i>rpoD</i>	15
5.2 Estudios de infección <i>in vitro</i>	16
5.2.1. Línea celular y condiciones de crecimiento	16
5.2.2. Infección	16
5.2.3. Ensayo fagocítico	16
5.2.4. Supervivencia intracelular	17
5.3. Extracción de ARN y RT-qPCR	17
5.4. Estadística.....	17
6. Resultados	18
6.1. Diversidad y origen de las <i>Aeromonas</i> aisladas en diversos hospitales	18
6.1.1. Diversidad de especies.....	21
6.1.2. Orígenes	21
6.2. Caracterización patogénica de <i>Aeromonas enterica</i> y <i>Aeromonas intestinalis</i>	22
6.2.1. Ensayo de fagocitosis	22
6.2.2. Supervivencia intracelular	23
6.2.3. Expresión de TNF- α	24

8. Conclusiones.....	30
9. Bibliografía.....	31
10. Autoevaluación	37
11. Anexos	38
Anexo 1: Cepas obtenidas de los hospitales para su identificación.....	38
Anexo 2: Cepas tipo utilizadas para los experimentos <i>in vitro</i>	39

1. Resumen

El género *Aeromonas* pertenece a la familia *Aeromonadaceae*. Los microorganismos incluidos en este género se caracterizan por ser bacilos Gram-negativos ampliamente distribuidos en ambientes acuáticos e igualmente aislables en diversos alimentos, algunos animales y en procesos infecciosos en humanos. Algunas especies de *Aeromonas* son consideradas patógenas oportunistas emergentes, debido a que son aisladas como agentes etiológicos en varios procesos infecciosos, principalmente gastroenteritis, septicemia e infección de heridas. El principal objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento de la epidemiología y la patogenicidad de este género. Las colaboraciones con varios hospitales españoles han demostrado que, debido a las carencias en sus bases de datos, el uso de la espectrometría de masas MALDI-TOF es un método poco preciso para la identificación de *Aeromonas* procedentes de muestras clínicas. Sin embargo, el uso de la secuenciación del gen *rpoD* sí ha demostrado su utilidad para la identificación bacteriana a nivel de especie. Las cepas identificadas como *Aeromonas* fueron en su mayoría recuperadas a partir de muestras de heces (68%). El resto provino de muestras de sangre y heridas, principalmente. De las cepas reidentificadas, la especie más abundante resultó ser *Aeromonas caviae*, lo cual era esperable dado que es la más prevalente en heces. En este estudio también se han caracterizado dos especies nuevas: *Aeromonas enterica* y *Aeromonas intestinalis*. Ambas generaron resultados *in vitro* similares a los obtenidos por especies poco prevalentes en clínica, lo que podría explicar su bajo nivel de prevalencia. Además, las especies más prevalentes demostraron sobreactivar el sistema inmunitario, causando lo que se conoce como “tormenta de citoquinas”, mientras que estas dos nuevas especies no sobreexpresaron la citoquina proinflamatoria TNF- α , lo que indica una posible baja virulencia por su parte. No obstante, serían necesarios más estudios para clarificar esta afirmación. Podemos concluir que *Aeromonas* es un género cada vez más estudiado en clínica y, por tanto, se necesitan métodos de identificación fiables para conocer la prevalencia real de sus distintas especies. Así mismo, es necesario realizar más estudios *in vitro* e *in vivo* para evaluar la interacción de estas nuevas especies con el huésped. Por último y considerando todos los casos analizados, resulta evidente que el género *Aeromonas* debería ser reconocido como un patógeno verdadero.

Palabras clave: *Aeromonas*, ambientes acuáticos, taxonomía, nuevas especies, respuesta inmune.

2. Datos del centro

Este Trabajo de Fin de Grado se basa en las prácticas curriculares que he realizado en el grupo de Micología y Microbiología Ambiental en el Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) situado en la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili en Reus. El instituto fue creado en el marco de un convenio de colaboración científica interinstitucional entre el Instituto Catalán de la Salud (Hospital Universitario de Tarragona Joan XXIII y Hospital de Tortosa Verge de la Cinta), el Hospital Universitario Sant Joan de Reus, el Instituto Pere Mata y la Universidad Rovira i Virgili. La misión del IISPV es gestionar de forma eficiente los recursos propios y ajenos y dar el mejor servicio a los profesionales de la Salud, para que, mediante la promoción, la consolidación y la traslación de la investigación en el ámbito biomédico y sanitario puedan mejorar la salud y el bienestar de la población del Camp de Tarragona y las Terres de l'Ebre.

Las áreas de investigación a las que se dedican en el IISPV están divididas en cuatro grupos principales: Nutrición y Metabolismo, Neurociencias y Salud Mental, Salud y Medio Ambiente y Otras actividades. En mi caso, trabajé en el área de Salud y Medio Ambiente, la cual acoge a diversos grupos que trabajan en el impacto de diversos componentes del medio ambiente sobre la salud de las personas. A su vez, en este ámbito encontramos un total de seis unidades, siendo en la Unidad de Micología y Microbiología Ambiental en la cual fui aceptado como alumno en prácticas. En esta unidad predominan tres líneas de investigación: micología médica, biodiversidad fúngica y microbiología ambiental. La mayoría de los doctorandos y doctores se dedican al área de la micología, pero la Dra. Ana Fernández Bravo (mi tutora) y yo nos centramos en el género bacteriano *Aeromonas*. Cabe destacar que este es el género en el que está especializada la anterior jefa de grupo y actual rectora universitaria María José Figueras.

Durante la realización de este estudio, he tenido a mi disposición todos los medios disponibles en los laboratorios de Microbiología, Biología Molecular y Cultivos Celulares del IISPV, gracias a lo cual he tenido la oportunidad de conocer de primera mano su instrumentación, su funcionamiento, lo que tienen en común y también lo que los diferencia.

3. Introducción

3.1 Género *Aeromonas*

El género *Aeromonas* pertenece a la Clase Gammaproteobacteria, Orden Aeromonadales y Familia *Aeromonadaceae*, que actualmente incluye tres géneros: *Aeromonas*, *Oceanimonas* y *Tolumonas* (Martin-Carnahan y Jospheh, 2005). Estos microorganismos se caracterizan por ser bacilos Gram-negativo, oxidasa y catalasa positivos, ser capaces de degradar nitratos a nitritos, ser fermentadores de glucosa y resistentes al factor vibriostático O/129. Este género comprende 36 especies, cuatro de las cuales se encuentran en proceso de descripción (Figura 1). A pesar de que son microorganismos autóctonos de ambientes acuáticos, también se aíslan con frecuencia en alimentos para humanos, peces y otros procesos infecciosos en humanos (Janda y Abbott, 2010).

3.2. Historia del género

Los primeros aislamientos de *Aeromonas* fueron reportados en 1871 por Sanarelli, quien nombró a la bacteria como *Bacillus hydrophilus fuscus* (ahora conocida como *Aeromonas hydrophila*). Sin embargo, el Comité Internacional de Bacteriología Sistemática le otorgó la autoría del género a Stanier en 1943. Este género fue incluido originalmente en la familia *Vibrionaceae* en 1965, junto a los géneros *Vibrio* y *Plesiomonas*. A mediados de la década de 1970, las especies del género se dividieron en dos grupos en función de diferentes características: grupo mesófilo (crecimiento óptimo a 35-37 °C) con aislados móviles, responsables de varias infecciones en humanos y definidas como "*Aeromonas hydrophila*" y un grupo psicrófilo (crecimiento óptimo a 22-28 °C) con cepas no móviles, relacionadas con enfermedades de peces e identificadas como "*Aeromonas salmonicida*". Sin embargo, en los últimos años, muchos estudios sugieren que una temperatura de crecimiento superior a 22 °C induce cambios importantes en *A. salmonicida*, como la pérdida del sistema de secreción tipo tres (T3SS), que es un factor de virulencia importante para la bacteria. Esto es consistente con el hecho de que esta especie infecta únicamente a peces de agua fría, como los salmónidos, que no sobreviven a temperaturas superiores a 25 °C (Fernández-Bravo y Figueras, 2020). Finalmente, no fue hasta 1986 cuando Colwell *et al.* llevaron a cabo un análisis de la secuencia de los genes 16S rRNA y 5S rRNA y estudios de hibridación ADN-ADN, demostrando que el género *Aeromonas* pertenece a una rama filogenética

diferente y creando así la familia *Aeromonadaceae*. El género está actualmente compuesto por 36 especies que se han descrito desde 1943: *Aeromonas allosaccharophila*, *Aeromonas aquatica*, *Aeromonas aquatilis*, *Aeromonas australiensis*, *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas bivalvium*, *Aeromonas cavernicola*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas crassostreae*, *Aeromonas dhakensis*, *Aeromonas diversa*, *Aeromonas encheleia*, *Aeromonas enterica*, *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas finlandiensis*, *Aeromonas fluvialis*, *A. hydrophila*, *Aeromonas intestinalis*, *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas media*, *Aeromonas molluscorum*, *Aeromonas lacus*, *Aeromonas lusitana*, *Aeromonas piscicola*, *Aeromonas popoffii*, *Aeromonas rivipollensis*, *Aeromonas rivuli*, *A. salmonicida*, *Aeromonas sanarellii*, *Aeromonas schubertii*, *Aeromonas simiae*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas taiwanensis*, *Aeromonas tecta*, *Aeromonas trota* y *Aeromonas veronii* (Fernández-Bravo y Figueras, 2020).

3.3. Taxonomía del género *Aeromonas*

La taxonomía del género *Aeromonas* ha ido cambiando durante los últimos años, con 22 nuevas especies agregadas desde 1992 (Fernández-Bravo, 2019). Anteriormente, la diferenciación taxonómica estaba basada en las características fenotípicas de la bacteria, como la morfología o el análisis del perfil de proteínas y ácidos grasos. Estos criterios fueron revisados, concluyendo que la diferenciación fenotípica no era lo suficientemente resolutive a la hora de caracterizar una especie. Actualmente, los métodos moleculares proporcionan una mayor información para la diferenciación filogenética (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Fernández-Bravo, 2019).

3.3.1. Gen 16S rRNA

El gen 16S rRNA se considera un marcador molecular estable para identificar géneros bacterianos, ya que su distribución es universal y permite la comparación de microorganismos. Además, su estructura presenta un mosaico de regiones variables, adecuadas para la diferenciación de organismos estrechamente relacionados, y sus regiones conservadas son útiles para la comparación de organismos distantes (Marchadin *et al.*, 2003; Latif-Eugenín, 2015). En la Figura 1 (obtenida de Fernández-Bravo y Figueras, 2020) podemos observar el árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S rRNA de las 36 especies de *Aeromonas*. Sin embargo, la presencia de microheterogeneidades (es decir, mutaciones en posiciones específicas del gen 16S rRNA) en combinación con la excesiva similitud entre especies del género

Aeromonas (entre 96,7-100%) hacen que este gen no sea adecuado para la identificación de *Aeromonas* spp (Marchadin *et al.*, 2003; Alperi *et al.*, 2008).

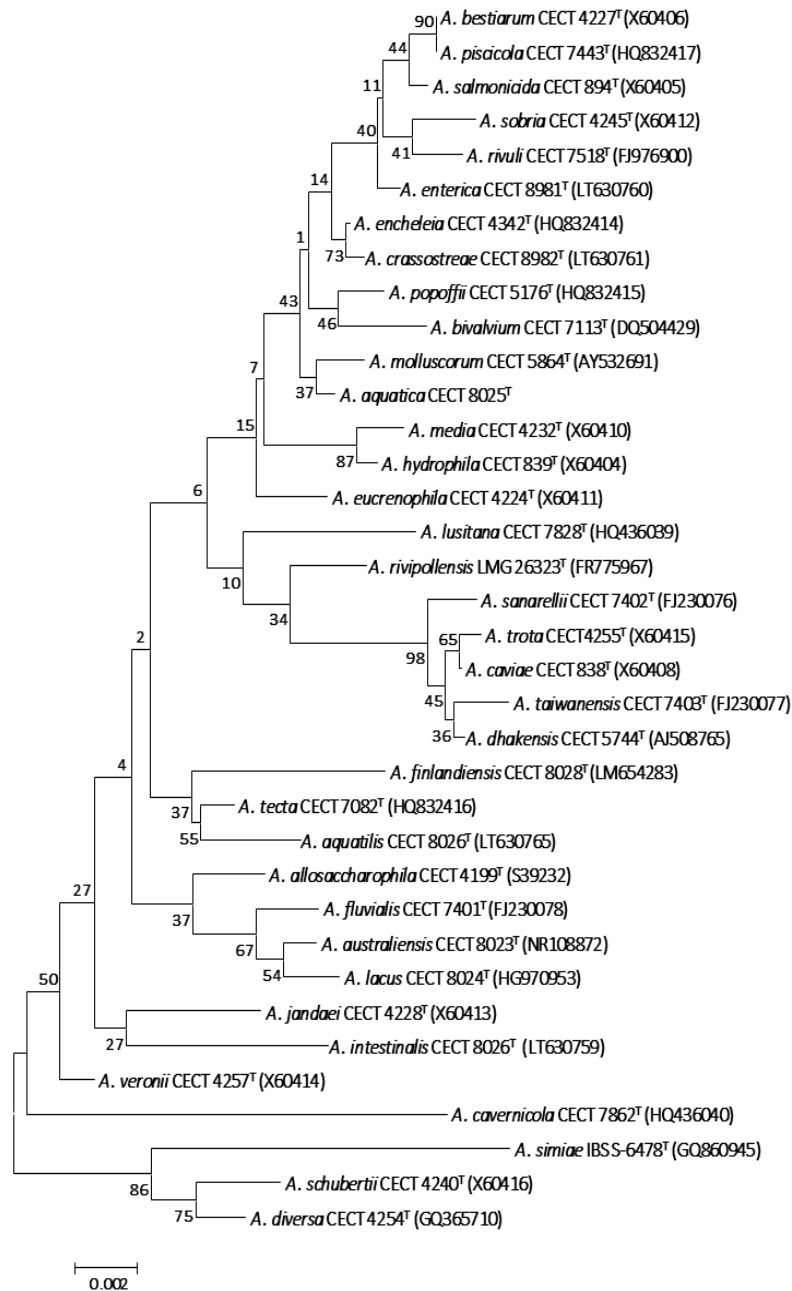


Figura 1. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S rRNA de las 36 especies del género *Aeromonas* (1503 pb).

Por ello, durante los últimos años muchos laboratorios clínicos introdujeron la espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* con el detector de iones *Time-Of-Flight* acoplado) para la identificación y comparación de aislados microbianos. El MALDI-TOF MS es una técnica muy potente que detecta principalmente proteínas asociadas con el gen 16S rRNA y, por tanto, la baja resolución

de este gen para la identificación de especies de *Aeromonas* estrechamente relacionadas también afecta a la resolución de este método (Latif-Eugenin, 2015; Pérez-Sancho *et al.*, 2018). De cualquier manera, varios estudios demuestran que MALDI-TOF MS es una herramienta útil, ya que el error de identificación de especie es <10%, mientras que con los métodos de identificación fenotípica el error puede ser muy elevado (Latif-Eugenin, 2015; Shin *et al.*, 2015). La principal limitación de este método es la necesidad de actualizar la base de datos para incluir muchas de las especies faltantes de *Aeromonas* como *A. enterica* o *A. intestinalis* (Fernández-Bravo y Figueras, 2020).

3.3.2. Genes de mantenimiento o *housekeeping*

Actualmente, el método de identificación molecular más resolutivo para el género *Aeromonas* es la secuenciación de genes de mantenimiento o *housekeeping* (HKG). Los HKG codifican proteínas con funciones esenciales para la supervivencia de las bacterias. Para el análisis taxonómico, los HKG deben tener las siguientes características: no debe verse influenciado por la transferencia horizontal de genes, debe estar presente en todas las bacterias, debe ser un gen único en el genoma bacteriano y, finalmente, debe presentar al menos dos regiones conservadas para el diseño de cebadores (Latif-Eugenín, 2015; Fernández-Bravo y Figueras, 2020). Los primeros HKG estudiados en *Aeromonas* fueron *gyrB* (que codifica para la subunidad B de la ADN girasa) y *rpoD* (que codifica para el factor σ^{70} de la RNA polimerasa) (Yáñez *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2004). Estos genes han ayudado a reconocer y describir muchas especies en los últimos años. En la Figura 2 (modificada de Fernández-Bravo y Figueras, 2020) podemos observar el árbol filogenético basado en las secuencias concatenadas de los genes *rpoD* y *gyrB*, de las especies más similares del género *Aeromonas*. Durante su tesis doctoral, la doctora Latif-Eugenín reidentificó 422 aislamientos de hospitales españoles utilizando las secuencias del gen *rpoD*. Los resultados mostraron que sólo el 41,6% habían sido identificados correctamente a nivel de especie. Sin embargo, la filogenia basada en la secuenciación de un único HGK puede no mostrar suficiente resolución para la construcción de un árbol filogenético preciso. Debido a esta limitación, actualmente se utiliza el *Multilocus Phylogenetic Analysis* (MLPA) descrito por Martínez-Murcia *et al.* (2011), en el que se utilizan las secuencias concatenadas de 7 HKG (*rpoD*, *gyrB*, *gyrA*, *atpD*, *dnaJ*, *dnaX* y *recA*). El análisis MLPA proporciona una mayor resolución y diferenciación filogenética al superar la limitación de la alta similitud del gen 16S rRNA que existe entre algunas especies estrechamente relacionadas (Fernández-Bravo, 2019).

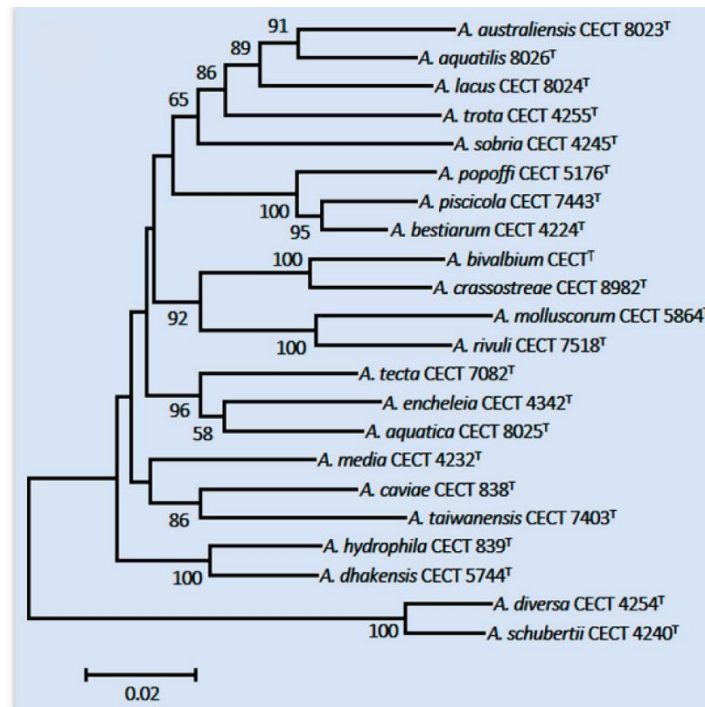


Figura 2. Árbol filogenético basado en el concatenado de las secuencias de los genes *rpoD* y *gyrB*.

3.3.3. Genomas

El desarrollo de nuevas herramientas para la comparación y caracterización del genoma ha permitido a los analistas la descripción de nuevas especies con una única cepa. En mayo de 2020, existían un total de 413 entradas de genomas disponibles para el público en la base de datos de GenBank (disponibles en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=%20Aeromonas>). El tamaño de los genomas de *Aeromonas* varía entre 3,90 Mbp (*A. fluvialis*) y 5,18 Mbp (*A. piscicola*) con un tamaño promedio de 4,51 Mbp. Además, el porcentaje de G+C es del 60,2%, variando entre 58,1% (*A. australiensis*) y 62,8% (*A. taiwanensis*) (Fernández-Bravo y Figueras, 2020). Los avances en los métodos de obtención de genomas completos han aumentado el número de genomas disponibles en los últimos años. De hecho, únicamente seis genomas estaban disponibles en 2012 y, sólo dos años después, esta cifra aumentó a 56 genomas (Colston *et al.*, 2014).

Durante 2015, Beaz-Hidalgo *et al.* (2015) reidentificaron 44 genomas depositados en GenBank, mediante el uso del análisis MLPA y nuevas técnicas bioinformáticas como el *Average Nucleotide Identity* (ANI) y demostraron que 14 de estos genomas también fueron etiquetados incorrectamente. Los datos obtenidos en estos estudios mostraron la importancia de verificar la posición taxonómica de un

genoma, utilizando herramientas más resolutivas, antes de incluirlos en las bases de datos del NCBI.

Las técnicas de tipado molecular son esenciales para rastrear si dos aislados de *Aeromonas* pertenecen o no al mismo clon y, por lo tanto, comparten una relación epidemiológica. Uno de los métodos más populares para genotipar *Aeromonas* es la *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC-PCR) (Figueras *et al.*, 2011; Fernández-Bravo, 2019). Esto se debe a que es una técnica fácil de llevar a cabo, no requiere equipos costosos y es altamente reproducible. En un estudio reciente, una cepa de *A. caviae* aislada de una muestra de lechuga mostró el mismo patrón de genotipado ERIC que una cepa recuperada de una muestra de agua de riego (Latif-Eugenín *et al.*, 2016). Además, en ese mismo estudio, se observó que cepas de *A. sanarellii* recuperadas de muestras de perejil y tomate, regadas con la misma agua, tenían el mismo patrón de ERIC, lo que confirmaba el potencial riesgo del agua de riego para la salud humana.

3.4. Ecología y epidemiología del género *Aeromonas*

En relación con la ecología y epidemiología, el género *Aeromonas* está ampliamente distribuido en numerosos ecosistemas, aunque se encuentra más comúnmente en diversos ambientes acuáticos (Figura 3). Las especies de este género son autóctonas de estos ambientes y se han aislado en aguas superficiales, subterráneas, potables, embotelladas, residuales, agua de mar y de riego (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015; Fernández-Bravo y Figueras, 2020). Estudios metagenómicos de las aguas residuales revelaron que *Aeromonas* es una de las bacterias predominantes, probablemente debido a su capacidad de regeneración en el sistema de alcantarillado. Los tratamientos primarios y secundarios o biológicos de estas aguas no reducen en gran medida la concentración microbiana de este género (McLellan *et al.*, 2010). Sin embargo, si se llevan a cabo tratamientos terciarios adicionales, como procesos químicos (ozono, cloración) y físicos (radiación ultravioleta), sí pueden eliminarse por completo (Latif-Eugenín *et al.*, 2016). Dependiendo de la calidad microbiológica del agua recuperada, esta puede usarse para riego. Las aguas de riego que contienen *Aeromonas* pueden contaminar frutas y verduras y, por lo tanto, causar una infección en humanos (Latif-Eugenín *et al.*, 2016, Fernández-Bravo y Figueras, 2020). Además, cabe destacar que las bacterias de este género también son consideradas patógenas para los animales desde su aislamiento en septicemias de ranas y peces enfermos. Las especies patógenas importantes de peces son *A. salmonicida* y *A. hydrophila*, que

afectan particularmente a los salmónidos, causando importantes pérdidas económicas en la industria acuícola (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010).

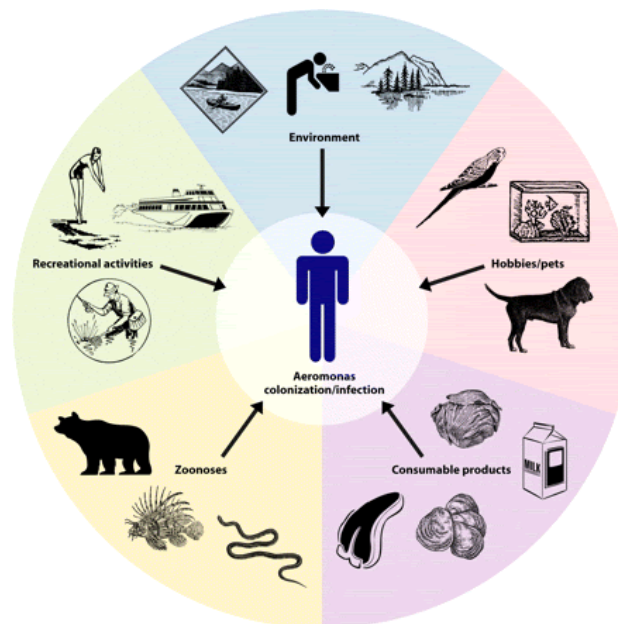


Figura 3. Distribución del género *Aeromonas* en el medio ambiente. Recuperado de Janda y Abbott (2010).

Actualmente, algunas especies de *Aeromonas* son consideradas como patógenas oportunistas emergentes, debido a que son aisladas como agentes etiológicos en varios procesos infecciosos, principalmente gastroenteritis, bacteremia/septicemia e infección de heridas. Las *Aeromonas* son generalmente patógenos entéricos que afectan en mayor medida a las poblaciones de riesgo, como los niños, los ancianos y los individuos inmunocomprometidos (Janda y Abbott, 2010). Hasta el momento, los estudios han señalado que el 95,4% de las cepas asociadas a casos clínicos pertenecen a cuatro especies únicas: *A. caviae* (37,26%), *A. dhakensis* (23,49%), *A. veronii* (21,54%) y *A. hydrophila* (13,07%) (Fernández-Bravo *et al.*, 2020). Por otro lado, otras especies menos prevalentes en casos clínicos, como *A. media* o *A. salmonicida*, así como las que se encuentran en periodo de descripción (*A. intestinalis* y *A. enterica*,) han sido reportadas. Sin embargo, estos porcentajes varían según la ubicación geográfica y pueden estar relacionados con malos hábitos de higiene y otras carencias propias de regiones subdesarrolladas. Es el caso de *A. dhakensis*, descrita como la especie más prevalente en países como Malasia, Taiwán y Australia debido a sus climas tropical. Debido a las técnicas fenotípicas, hasta el momento han existido confusiones a la hora de identificar especies del género, identificando erróneamente cepas como *A. hydrophila*, lo que conlleva a reportar una prevalencia errónea. Un

estudio previo, ha reportado la posible confusión entre *A. hydrophila* y *A. dhakensis*, pudiendo tener consecuencias, ya que esta última es más virulenta y muestra una mayor actividad citotóxica (Chen *et al.*, 2014).

En los últimos años se ha observado que las infecciones humanas por *Aeromonas*, a menudo, involucran a más de un tipo de bacteria en la misma muestra clínica, lo que se define como una infección polimicrobiana o mixta (Fernández-Bravo y Figueras, 2020). La bacteria dominante en estos casos depende del tipo de infección. Previos estudios han demostrado que, en casos de diarrea, *Aeromonas* coinfecta en combinación con *Campylobacter* y *Salmonella*, mientras que en infecciones de herida prevalece *Staphylococcus aureus* (Janda y Abbott, 2010).

Según la información actual sobre la ecología, la epidemiología y la patogenicidad del género *Aeromonas*, debemos suponer que las infecciones que producen estas bacterias seguirán siendo un gran problema de salud en el futuro. La distribución ubicua de estas bacterias y la creciente población de ancianos, para quienes son un patógeno oportunista, facilitarán este problema (Fernández-Bravo y Figueras, 2020).

En resumen, el género *Aeromonas* se compone de importantes microorganismos ampliamente distribuidos en el medio ambiente, capaces de colonizar e infectar a humanos y animales. Como señalan Fernández-Bravo y Figueras (2020) en su actualización sobre el género, poseemos un extenso conocimiento sobre él, pero es importante continuar los estudios para proporcionar respuestas precisas a preguntas relacionadas con la ecología y la epidemiología.

3.5. Virulencia del género *Aeromonas*

La virulencia de *Aeromonas* ha sido descrita como multifactorial y está relacionada con la expresión de genes que codifican para diferentes toxinas, componentes estructurales, sistemas de secreción y proteínas asociadas a metales (Tomás, 2012; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013). La adhesión de las bacterias a los tejidos del huésped es un paso crítico en la fase inicial de las infecciones por microorganismos. Las bacterias se adhieren a los tejidos y las células del huésped y alteran sus mecanismos de defensa, iniciando así la colonización (Fernández-Bravo y Figueras, 2020). Los componentes estructurales más estudiados en *Aeromonas* involucrados en el proceso de colonización son: el flagelo, el pili, la cápsula, la capa S y

los lipopolisacáridos (LPS). La interacción entre la bacteria patógena y las células huésped se produce, además de por sus componentes extracelulares, a través de toxinas secretadas al espacio extracelular. En el género *Aeromonas* se han identificado enterotoxinas, proteasas, lipasas, hemolisinas y toxina Shiga, entre muchas otras (Tomás, 2012; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013). Para que las bacterias puedan transportar estos factores de virulencia al medio extracelular o directamente a la célula huésped son necesarios los sistemas de secreción. Hoy en día, se han descrito seis sistemas de secreción en bacterias Gram-negativas, siendo el de tipo VI (T6SS) el último reconocido en 2006 (Bingle *et al.*, 2008). Cada uno de estos sistemas está especializado en transportar ciertos tipos de biomoléculas y son de especial utilidad en bacterias Gram-negativas, ya que su doble membrana dificulta este proceso. Por último, las proteínas asociadas a metales son importantes debido a que, durante el transcurso de una infección, las células huésped restringen la accesibilidad de metales cruciales. Los iones metálicos son esenciales para el correcto funcionamiento del proceso biológico de los microorganismos y, gracias a este tipo de proteínas, las *Aeromonas* pueden hacer frente a esta adversidad (Fernández-Bravo y Figueras, 2020). La presencia de estos factores de virulencia permite a la bacteria colonizar, invadir y superar la respuesta inmune del organismo huésped, dando lugar a la infección que genera la enfermedad (Janda y Abbott, 2010).

3.6. Sistema inmunitario

Diversos estudios han demostrado la expresión de diferentes genes relacionados con el sistema inmune en el huésped después de una infección por *Aeromonas*. La interacción huésped-patógeno activa una respuesta inmune como resultado de la exposición al antígeno. Se han descritos dos tipos: la respuesta inmune innata y la adaptativa. La respuesta inmune innata se activa después del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Estos receptores se expresan en una amplia variedad de células del sistema inmune como neutrófilos, monocitos o macrófagos (Kumar *et al.*, 2011). A su vez, los PRR se clasifican en cuatro familias: los receptores tipo Toll (TLR), tipo NOD (NLR), lectina tipo C (CLR) y tipo RIG-1 (RLR). Los TLR son PRR de membrana que reducen la fagocitosis y activan la expresión de citocinas en células huésped, dando lugar a una respuesta inflamatoria. También se ha demostrado que el reconocimiento de TLR puede resultar en la inducción de la apoptosis (Shrestha *et al.*, 2012, Fernández-Bravo y Figueras, 2020). Recientemente, se ha reportado un aumento en la expresión de varios genes TLR (TLR1, TLR2, TLR3, etc.) como respuesta

a la infección de *Aeromonas* (Zhang *et al.*, 2017). Otros estudios investigaron específicamente las vías de señalización del TLR4 y TLR22 en respuesta a la infección de *A. hydrophila* en peces *Gobiocypris rarus* y *Megalobrama amblycephala*, respectivamente, indicando la importancia de estos receptores en concreto (Su *et al.*, 2009; Lai *et al.*, 2017). Los datos obtenidos en estos estudios demostraron que la respuesta inmune presentaba patrones específicos de tejido (Fernández-Bravo y Figueras, 2020). También se ha reportado la expresión génica inducida por TLRs de citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa y beta (TNF- α , TNF- β), interferón gamma (IFN- γ), quimiocinas e interleucinas 6, 8 y 10 (IL-6, IL-8, IL-10) como respuesta a la infección de bacterias de este género (Mulder *et al.*, 2007). Un estudio reciente destacable sería el realizado por Kong *et al.* (2017) en el que establecieron que *A. hydrophila* podría inducir una sobreexpresión del gen de la citocina proinflamatoria TNF- α en el intestino de los peces, deteriorando la integridad de la barrera mucosa.

3.7. Resistencia a antibióticos

Actualmente, existe un aumento de la resistencia a los agentes antimicrobianos, siendo esta una respuesta genético-evolutiva mediada por la presencia de genes, algunos de los cuales se encuentran en plásmidos, integrones o en el genoma de la bacteria (Fernández-Bravo y Figueras, 2020). Los antibióticos actuales se orientan contra actividades celulares vitales para la bacteria como la expansión de su pared externa (crecimiento), la síntesis de proteínas y el despliegue del ADN (reproducción). Las bacterias, a su vez, cuentan con varios medios para destruir los fármacos o eludir su acción. Algunas de estas tácticas de resistencia son la destrucción del fármaco, su excreción o la sustitución de la diana a la que va dirigido (Walsh y Fischbach, 2009). Excepto por algunas cepas concretas y la especie *A. trota*, *Aeromonas* se describe como resistente a la ampicilina. Este género también es resistente a otras penicilinas y cefalosporinas de primera generación (Janda y Abbott, 2010). Sin embargo, las *Aeromonas* son susceptibles a fármacos monobactámicos, carbapenémicos, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, aminoglucósidos y fluoroquinolonas (Fernández-Bravo y Figueras, 2020). Ndi y Barton (2011) informaron de un aumento en la resistencia a los antimicrobianos betalactámicos (penicilinas y derivados, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos) por la presencia de genes que codifican la producción de betalactamasas. Años más tarde, Dias *et al.* (2014) describieron tres β -lactamasas principales en *Aeromonas*: clase B metalo- β -lactamasa, clase C cefalosporinasa y clase D penicilinasa. En 2017, Piotrowska *et al.* estudiaron la variedad de genes de betalactamasas presentes en *Aeromonas* spp. aisladas de aguas

residuales, encontrando una gran cantidad de genes codificados por plásmidos. Sugieren que las cepas de *Aeromonas* resistentes a antibióticos podrían diseminarse desde las aguas residuales a otros ambientes. Los tratamientos antibióticos previos podrían ser la causa principal de esta evolución genético-evolutiva. Varios estudios que compararon aislamientos clínicos demostraron que los genes de resistencia dependían de las especies y del sitio de aislamiento. Por ejemplo, Wimalasena *et al.* (2017) sugirieron que, respecto a los animales, las tortugas domésticas podrían ser un riesgo para la salud humana, debido a las cepas de *Aeromonas* resistentes que se encuentran en estos animales. De la misma forma, Zhou *et al.* (2019) demostraron que las cepas clínicas aisladas de infecciones extraintestinales eran resistentes a varios antibióticos, aunque estas infecciones podían tratarse con otros de tercera generación. Y, por último, Hossain *et al.* (2019) observaron una mayor incidencia de diferentes genes de resistencia y casetes de genes integrones en aislamientos resistentes de *Aeromonas* (Fernández-Bravo y Figueras 2020). La resistencia a antibióticos es un problema importante que aumenta cada año. Como podemos observar en los últimos estudios, el género *Aeromonas* también forma parte de este amplio grupo de microorganismos bacterianos cuya respuesta genético-evolutiva supone un riesgo que debe ser tratado en el menor periodo de tiempo posible.

4. Interés y objetivos

Aeromonas es un patógeno emergente, distribuido en diferentes ambientes y considerado autóctono del medio acuático. Esta bacteria causa un amplio espectro de enfermedades, principalmente gastroenteritis, septicemia e infecciones de herida. Aparte de su relevancia en la salud humana, poco se sabe acerca de la interacción de este patógeno con el huésped y su sistema inmune. Por otro lado, muchos hospitales utilizan para la identificación rápida métodos como el MALDI-TOF, sin embargo, esto puede llevar a errores en su identificación a nivel de especie. Por último, la aparición de nuevas especies aisladas de muestras humanas conlleva la necesidad de su estudio para dilucidar las diferencias entre la prevalencia de las especies.

El **objetivo principal** del trabajo es el estudio de la epidemiología del género *Aeromonas* en hospitales españoles, así como la caracterización patogénica de dos nuevas especies del género.

Para contribuir a solventar el objetivo principal, distintos objetivos específicos han sido planteados:

1. Contribuir con la Unidad de Micología y Microbiología ambiental en la identificación de cepas obtenidas de diferentes hospitales, mediante la secuenciación del gen *rpoD*.

1.1. Estudiar la prevalencia de las distintas especies del género *Aeromonas* en muestras clínicas, así como los diferentes orígenes.

1.2. Comparar si existen diferencias entre los métodos de identificación.

2. Caracterizar el rol en la virulencia, de dos nuevas especies aisladas de muestras clínicas: *Aeromonas enterica* y *Aeromonas intestinalis*.

5. Materiales y Métodos

5.1 Identificación molecular

5.1.1 Cepas bacterianas, conservación y cultivo

Las cepas utilizadas durante este estudio se encuentran listadas en el Anexo 1. Todas las cepas con las que se trabajó fueron aisladas de muestras clínicas o bien obtenidas a partir de la colección de cultivo, incluyendo cepas tipo.

Durante el estudio se trabajó con diversos medios de cultivo para la conservación, recuperación y crecimiento de las cepas. Para la conservación de las cepas, estas se mantuvieron en “Tryptic Soy Broth” (TSB, Difco, Francia) más glicerol al 15% a -80 °C. Antes de los experimentos, las bacterias fueron rutinariamente crecidas en “Tryptone Soya Agar” (TSA, Difco, Francia) y en Ampicillin Dextrine Agar Base (ADA) suplementado con ampicilina, a 30 °C durante 24 horas. Aquellas cepas no recuperadas mediante este método fueron crecidas en “Luria Bertani Agar” (LB, Difco, Francia) enriquecido con agua peptonada (APA) e incubadas a 37 °C durante 24 horas.

5.1.2. Extracción de ADN

El ADN genómico para la identificación molecular se extrajo de cultivos puros de TSA, utilizando la matriz de purificación de ADN InstaGene™ (Bio-Rad Hercules CA, EE. UU.) y siguiendo las instrucciones del fabricante (Fernández-Bravo, 2019).

5.1.3. Identificación molecular en base al gen *rpoD*

Todas las cepas analizadas en este estudio se identificaron a nivel de especie mediante la secuenciación del gen *rpoD*, utilizando los cebadores listados en la Tabla 1 y las condiciones descritas por Soler *et al.* (2004). Las secuencias resultantes fueron alineadas con otras especies descritas previamente, utilizando el algoritmo ClustalW en MEGA 6.0 (Larkin *et al.*, 2007). El análisis filogenético se realizó con el método Neighbor-joining (NJ) con MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

Tabla 1. Cebadores utilizados para la amplificación por PCR y secuenciación del gen *rpoD* (Fernández-Bravo, 2019).

Cebador	Secuencia 5'-3'
<i>rpoD</i> -Fs (<i>forward</i>)	GTCAATTCCGCCTGATGC
<i>rpoD</i> -Rs (<i>reverse</i>)	ATCATCTCGCGCATGTTGT

5.2 Estudios de infección *in vitro*

5.2.1. Línea celular y condiciones de crecimiento

Para realizar este estudio se seleccionó la línea celular J744A.1 (monocito/macrófago de ratón BALB/c) (Rama *et al.*, 2011). Las células se mantuvieron como células adheridas en medio “Dublecco's Modified Eagle's Medium” (DMEM, PAA Laboratories) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB, PAA Laboratories) junto con un 1% de solución de penicilina-estreptomicina (P/S, PAA Laboratories) a 37 °C y 5% de CO₂.

5.2.2. Infección

Previo a la infección, las células fueron cultivadas en placas con pocillos (1×10^6 células/ml) que contenían medio DMEM libre de suero y antibióticos (condiciones de inanición sérica) durante 18 horas, tal y como describieron Murciano *et al.* (2015). Las células se infectaron con cepas de *Aeromonas* cultivadas durante la noche a una multiplicidad de infección (MOI) de 5, calculada a través de diluciones en serie, espectrofotometría (450 nm) y la recta patrón descrita por Fernández-Bravo (2019).

5.2.3. Ensayo fagocítico

Tras la infección (1 hora), se llevó a cabo un tratamiento para matar las bacterias extracelulares (no fagocitadas) con gentamicina (50 µg/ml) durante 45 minutos. El número de bacterias dentro de los macrófagos se contó después del tratamiento con gentamicina (punto temporal 0), mediante una dilución en serie y cultivo en placas de TSA. El porcentaje de fagocitosis se calculó con el número de unidades formadoras de colonias (ufc) en el punto temporal 0 en relación con la dosis inicial de infección (Fernández-Bravo, 2019).

5.2.4. Supervivencia intracelular

Tras 1 hora de infección, se llevó a cabo un tratamiento para matar las bacterias extracelulares (no fagocitadas) con gentamicina durante 45 minutos (punto temporal 0). El porcentaje de supervivencia intracelular se calculó utilizando el número de ufc medidas a través de dilución en serie y el cultivo en placas de TSA, después de 4 y 6 horas en relación con el punto temporal de 0 horas (Fernández-Bravo, 2019).

5.3. Extracción de ARN y RT-qPCR

El ARN fue obtenido de las células J744A.1 tras 4 horas utilizando el kit “GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep” (Sigma-Aldrich) para eliminar el ADN genómico. El ARN fue transcrito a ADNc utilizando “iScript cDNA Synthesis Kit” (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). La RT-qPCR fue realizada mediante el uso de “SYBR green PCR mastermix” (Applied Biosystems) en la “StepOnePlus Real Time PCR System”, para establecer la expresión del TNF- α , utilizando el *GAPDH* como gen *housekeeping*. Los cebadores utilizados se encuentran listados en la Tabla 2.

Tabla 2. Cebadores utilizados para la RT-qPCR en macrófagos de la línea celular J744A.1 (Fernández-Bravo, 2019).

Gen	Secuencia 5'-3'
<i>GAPDH</i>	<i>Forward</i> CATGAGAAGTATGACAACAGCCT
	<i>Reverse</i> AGTCCTTCCACGATACCAAAGT
<i>TNF-α</i>	<i>Forward</i> GAGGCCAAGCCCTGGTATG
	<i>Reverse</i> CGGGCCGATTGATCTCAGC

5.4. Estadística

Todos los experimentos se han realizado con réplicas y las diferencias significativas se han determinado con el uso del modelo *t*-test en GraphPad Prism 6.0 (Graphpad Software, CA, USA). * $p < 0,05$.

6. Resultados

6.1. Diversidad y origen de las *Aeromonas* aisladas en diversos hospitales

Tras realizar la PCR y la electroforesis, se descubrió que los cebadores *rpoD* producían un amplicón de tamaño esperado para todas las cepas estudiadas en este trabajo (Anexo 1). Específicamente, las cepas amplificadas para su secuenciación durante la realización de este estudio (1R, 2R, 3R, 4R, 5R, 1A, 2A, 3A, 4A y 5A) se muestran en el gel de la Figura 4.

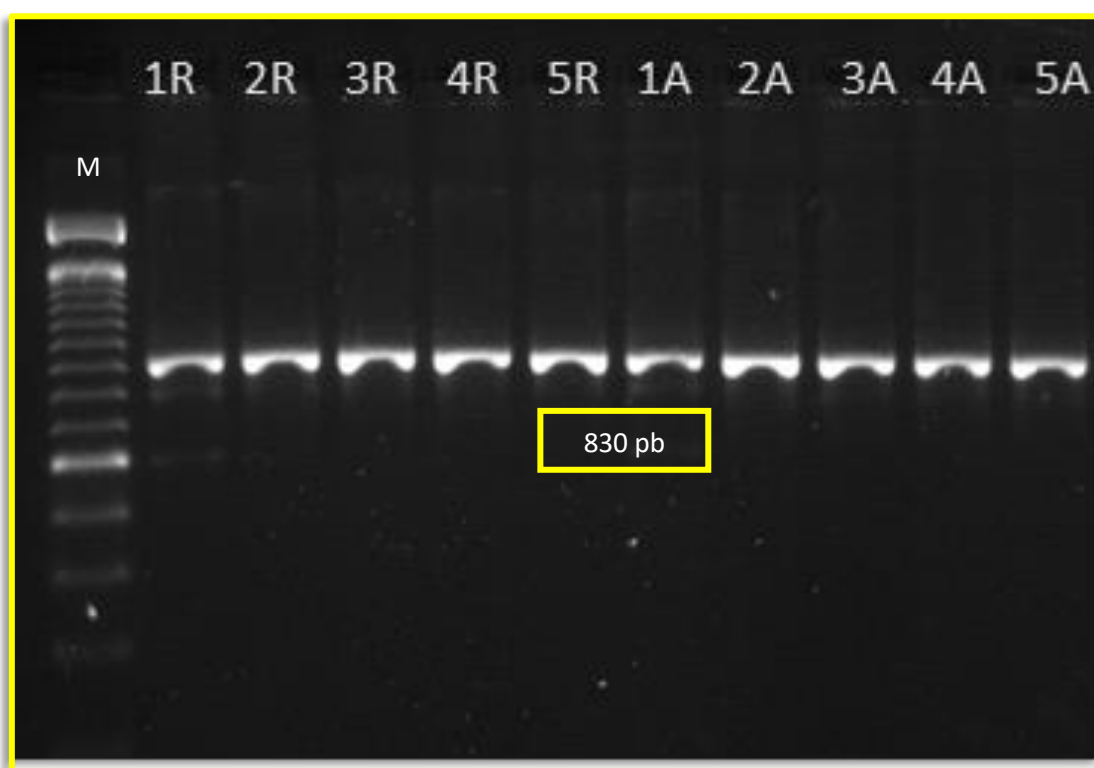


Figura 4. Resultado de PCR del gen *rpoD* (34234kb) de diferentes cepas bacterianas del género *Aeromonas* revelado en gel de agarosa al 0,7%. Las cepas aparecen listadas en el Anexo 1.

Mediante la secuenciación del gen *rpoD* y su posterior análisis filogenético, se determinó que las 10 (100%) cepas secuenciadas en este trabajo pertenecían al género *Aeromonas* (Figura 5). Lo mismo ocurrió con las cepas previamente identificadas en el laboratorio, como se observa en la Figura 5, las 18 (100%) pertenecían al género *Aeromonas*. El árbol filogenético mostró que las 28 cepas listadas en el Anexo 1 e

identificadas como *Aeromonas* pertenecían a estas especies: *A. caviae*, *A. dhakensis*, *A. veronii*, *A. hydrophila*, *A. enterica* y *A. intestinalis*.

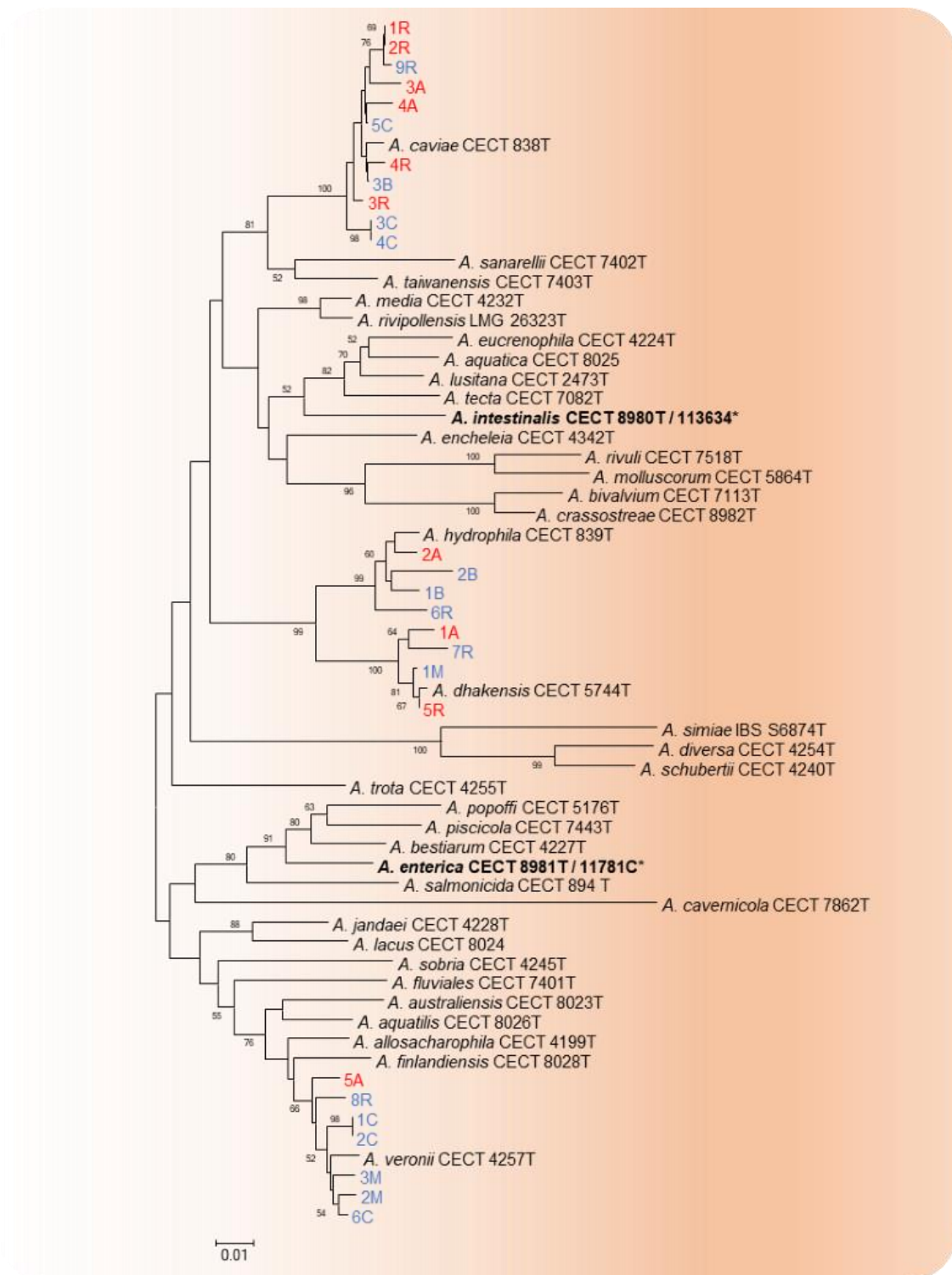


Figura 5. Árbol filogenético del género bacteriano *Aeromonas* basado en la secuencia del gen *rpoD* (457 pb). Los números de los nodos indican los valores Bootstrap (porcentaje de 1000 repeticiones). Fueron eliminados los Bootstrap menores del 50%. Barra de 0,01 sustituciones de nucleótidos estimados por sitio.

Como se muestra en la Figura 5, las cepas 1R y 2R resultaron ser clones entre ellas, del mismo modo que la cepa 1C es clon de la 2C y la 3C de la 4C. Las cepas 3R, 4R y 5R provienen del mismo paciente, pero fueron catalogadas como infección mixta tras analizar los resultados. Se trata de una infección mixta entre dos cepas de *A. caviae* (3R y 4R) y una cepa de *A. dhakensis* (5R). Por otro lado, las cepas 5C y 6C también provenían del mismo paciente, pero resultaron ser la causa de una infección mixta entre las especies *A. caviae* (5C) y *A. veronii* (6C).

Tabla 3. Concordancia de la identificación entre el MALDI-TOF y la identificación molecular (secuenciación del gen *rpoD*).

Método	Identificación correcta	
	A nivel de género	A nivel de especie
MALDI-TOF	28 (100%)	16 (57,1%)
Secuenciación del gen <i>rpoD</i>	28 (100%)	28 (100%)

Por otro lado, la reidentificación de las 28 cepas mediante secuenciación del gen *rpoD* puso de manifiesto que las 28 (100%) cepas fueron correctamente identificadas a nivel de género con el método MALDI-TOF, sin embargo, solo 16 (57,1%) fueron correctamente identificadas a nivel de especie en los hospitales, como se muestra en la Tabla 3 y en el Anexo 1.

Los resultados de identificación preliminar de las 28 cepas del género *Aeromonas* con MALDI-TOF mostraron que 8 (28,6%) cepas fueron identificadas solo a nivel de género, mientras que 4 (14,3%) fueron identificadas como otras especies del género (Figura 5 y Anexo 1). Por ejemplo, las cepas 5R y 1A fueron catalogadas erróneamente, ya que habían sido anteriormente identificadas como *A. hydrophila*, y ambas fueron reidentificadas mediante la secuenciación del *rpoD* como *A. dhakensis* en este estudio.

6.1.1. Diversidad de especies

De las 28 cepas identificadas como *Aeromonas*, 11 (39,3%) correspondieron a *A. caviae*, 7 (25%) a *A. veronii*, 4 (14,3%) a *A. dhakensis*, 4 (14,3%) a *A. hydrophila*, 1 (3,5%) a *A. enterica* y 1 (3,5%) a *A. intestinalis* (Figura 6). Estas dos últimas son las únicas cepas de *A. enterica* y *A. intestinalis*, y actualmente están en proceso de descripción (Anexo 1).

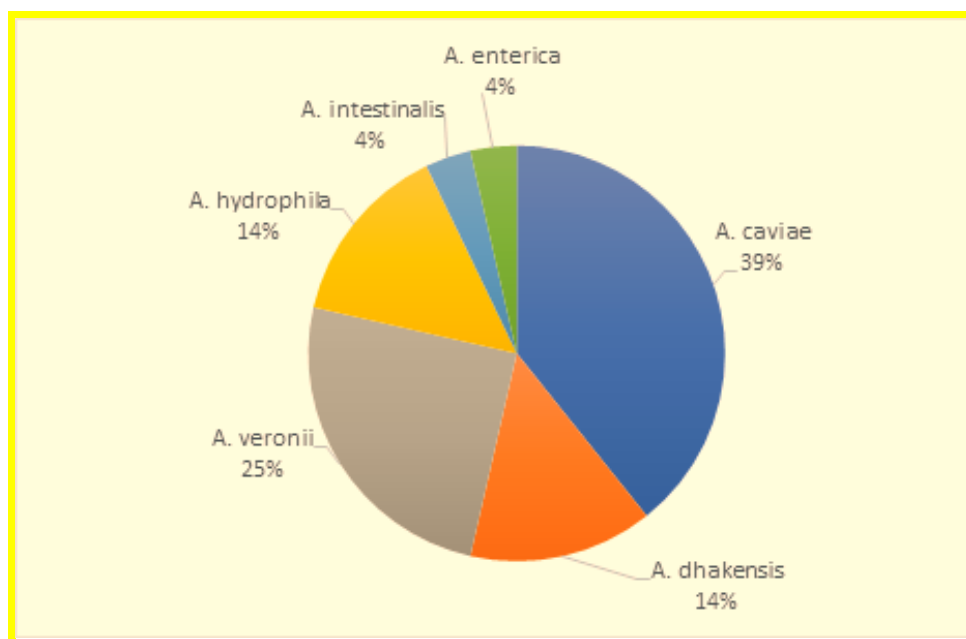


Figura 6. Prevalencia de las especies bacterianas del género *Aeromonas* utilizadas en este estudio expresada en tanto por ciento (%). La tabla a partir de la cual se realizó el gráfico se encuentra en el Anexo 1.

6.1.2. Orígenes

En lo que respecta al origen, 19 (67,9%) de las cepas fueron aisladas de heces, 4 (14,3%) de heridas, 3 (10,8%) de sangre, 1 (3,5%) de orina y 1 (3,5%) de líquido ascítico, como se puede apreciar en la Figura 7. La especie *A. caviae* destaca por su prevalencia en heces, aunque también se aisló frecuentemente a partir de sangre, lo que coincide con la literatura. Por último, tanto la cepa tipo de *A. enterica* como la de *A. intestinalis* fueron aisladas de heces.

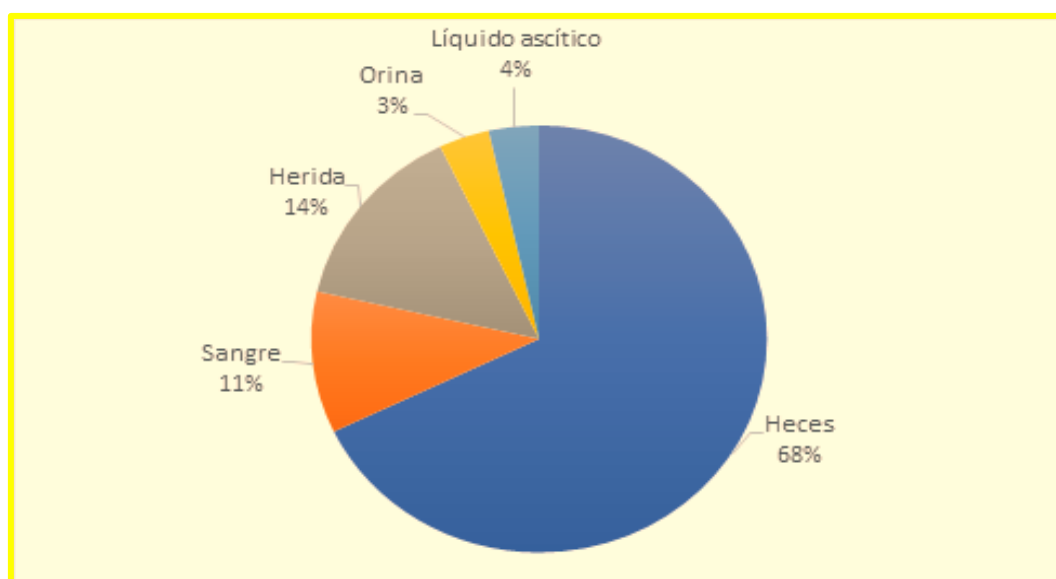


Figura 7. Origen de las cepas bacterianas del género *Aeromonas* utilizadas en este estudio expresado en tanto por ciento (%). La tabla a partir de la cual se realizó el gráfico se encuentra en el Anexo 1.

6.2. Caracterización patogénica de *Aeromonas enterica* y *Aeromonas intestinalis*

Los experimentos con líneas celulares se realizaron para caracterizar las nuevas especies (*A. enterica* y *A. intestinalis*). Para los análisis se incluyeron diferentes especies con prevalencia variable (Anexo 2).

6.2.1. Ensayo de fagocitosis

Como se observa en la Figura 5, después de la infección de macrófagos murinos (J744A.1) infectados a MOI 5 con las cepas tipo de *Aeromonas*, los resultados mostraron que las especies menos prevalentes en clínica (*A. salmonicida*, *A. enterica* y *A. intestinalis*) tenían un porcentaje de fagocitosis significativamente mayor ($p < 0,05$) que las especies más prevalentes en clínica (*A. caviae*, *A. dhakensis* y *A. veronii*) (Figura 8). Respecto a las tres especies menos prevalentes, se observó únicamente diferencias significativas entre *A. salmonicida* y *A. intestinalis* ($p < 0,05$). En cambio, entre las tres especies más prevalentes, no se observaron diferencias significativas. Cabe destacar, el resultado de las dos especies en proceso de caracterización (*A. enterica* y *A. intestinalis*),

con porcentajes más de tres veces superiores al de la especie más prevalente (*A. caviae*) (Figura 8).

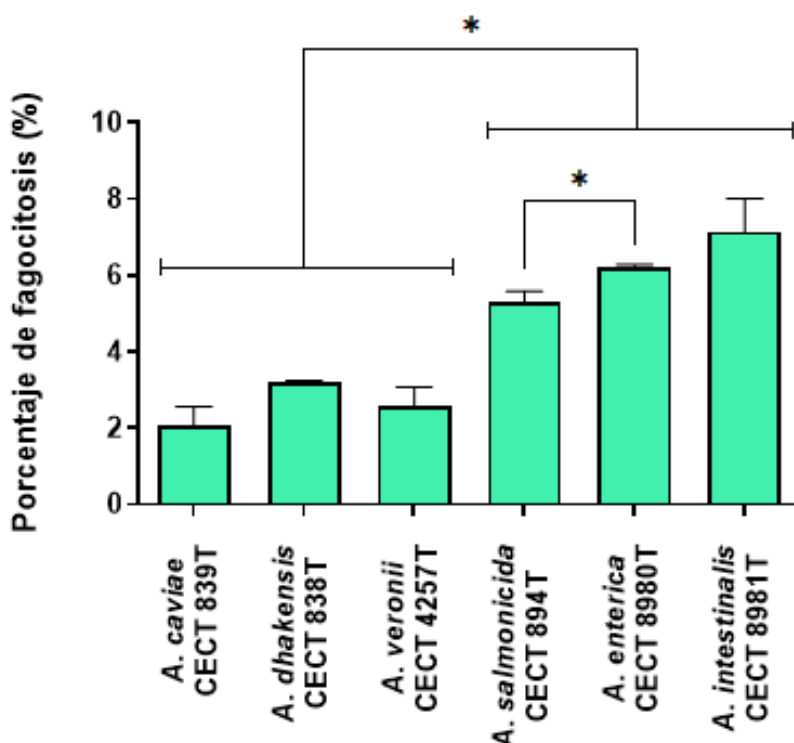


Figura 8. Promedio del porcentaje de fagocitosis de las cepas tipo de *Aeromonas* estudiadas tras 1 h de infección a MOI 5 en la línea celular de macrófagos murinos J744A.1. Diferencias significativas ($p < 0,05$) indicadas con un asterisco (*).

6.2.2. Supervivencia intracelular

En la Figura 9 se muestra el porcentaje de supervivencia intracelular que mostraron las cepas tipo de *Aeromonas* después de 4 y 6 horas en relación con el punto temporal de 0 horas con las que se infectó a MOI 5 los macrófagos murinos (línea celular J744A.1). Como se puede observar, es evidente que la supervivencia intracelular de las bacterias a las 6 horas es menor que a las 4 horas debido a la acción intracelular de los macrófagos. Al contrario que en el ensayo de fagocitosis, los resultados de las tres especies más prevalentes fueron mayores que los de las menos prevalentes. Además, cabe destacar que los resultados de *A. enterica*, *A. intestinalis* y *A. salmonicida* son similares. A las 4 horas, la supervivencia intracelular de las cepas más prevalentes (*A. caviae*, *A. dhakensis* y *A. veronii*) fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que la de las cepas menos prevalentes en clínica (*A. salmonicida*, *A. enterica* y *A. intestinalis*). De cualquier forma, no se observaron diferencias significativas entre

ninguna especie, exceptuando el porcentaje de supervivencia de *A. dhakensis*, que resultó ser significativamente mayor ($p < 0,05$) que el de *A. intestinalis*.

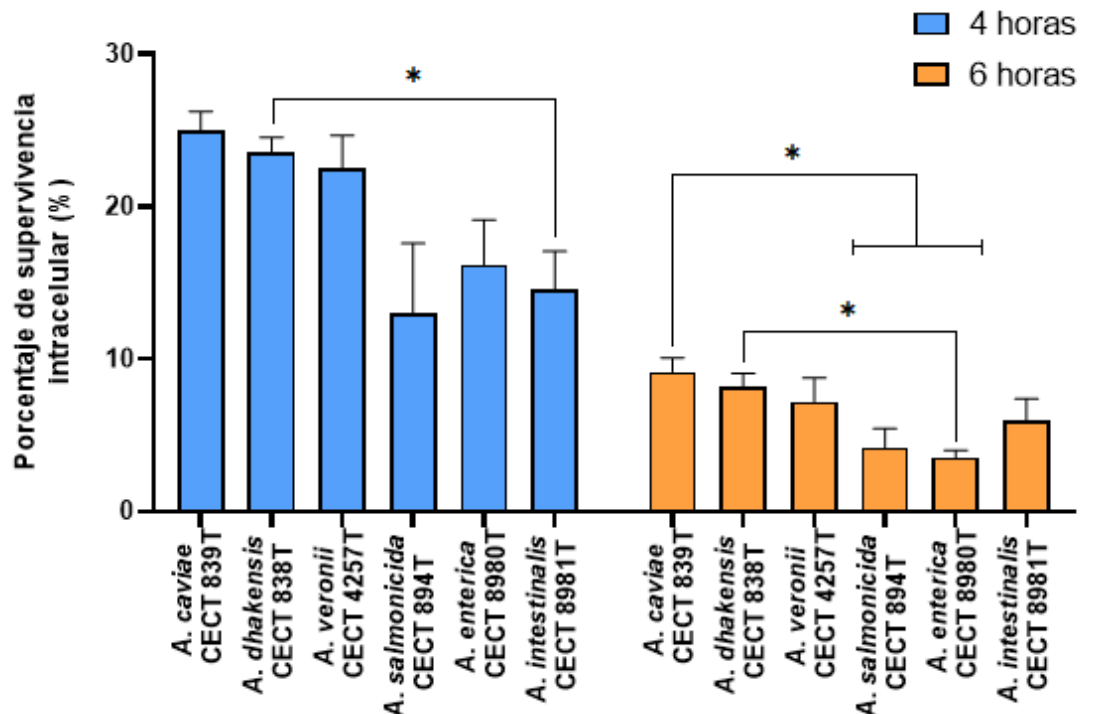


Figura 9. Promedio del porcentaje de supervivencia intracelular de las cepas tipo de *Aeromonas* estudiadas después de 4 y 6 horas de infección a MOI 5 (respecto al punto temporal de 0) en la línea celular de macrófagos murinos J744A.1. Diferencias significativas ($p < 0,05$) indicadas con un asterisco (*).

A las 6 h, la supervivencia de las cepas más prevalente también fue mayor, pero la diferencia respecto a las menos prevalente fue menos destacable. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) que se observaron en este punto temporal fueron el resultado de *A. enterica* respecto a *A. caviae* y *A. dhakensis*, así como el resultado de *A. caviae* respecto al de *A. salmonicida*.

6.2.3. Expresión de TNF- α

La infección de la línea celular de macrófagos murinos J744A.1 con todas las cepas, independientemente de la especie estudiada, indujo la expresión génica de TNF- α con una diferencia significativa ($p < 0,05$) en el patrón de transcripción en relación con las células no infectadas ($\Delta\Delta\text{ct}=1$).

Como se muestra en la Figura 10, los mayores niveles transcripcionales del gen de la citocina proinflamatoria TNF- α fueron inducidos por las especies más prevalentes (*A. caviae*, *A. veronii* y *A. dhakensis*, respectivamente), mientras que los menores fueron inducidos por las especies menos prevalentes (*A. intestinalis*, *A. enterica* y *A. salmonicida*, respectivamente). El nivel de inducción de la expresión de esta citocina fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en las tres especies más prevalentes respecto a las tres menos prevalentes. Entre las más prevalentes no se observan diferencias significativas. Sin embargo, el resultado de *A. salmonicida* difiere significativamente ($p < 0,05$) de los de *A. enterica* y *A. intestinalis*, las dos especies en proceso de caracterización.

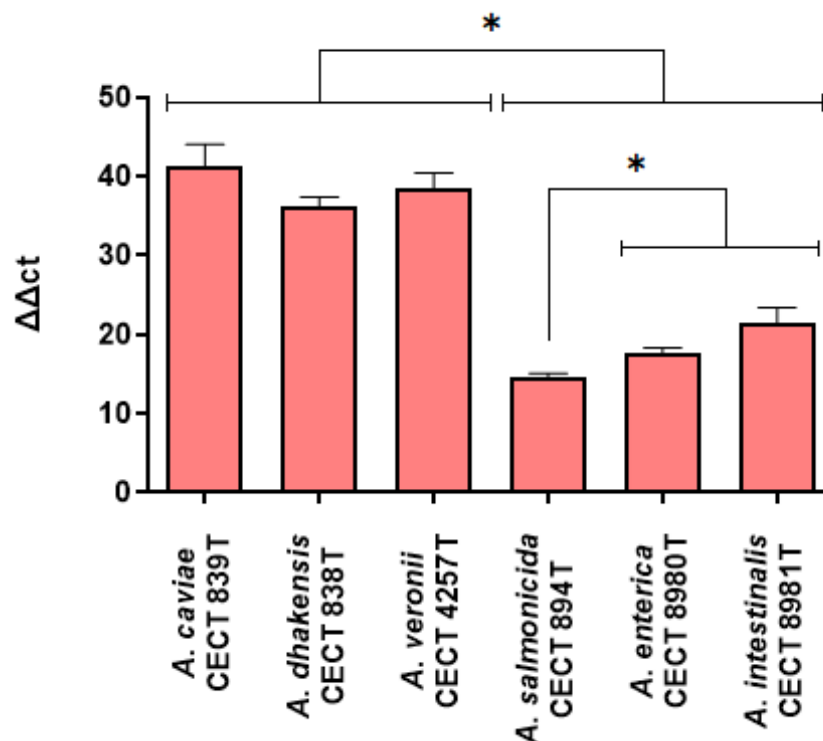


Figura 10. Perfil de expresión génica de TNF- α en la línea celular de macrófagos murinos J744A.1 (valores medios de qPCR) inducida a MOI 5 por las diferentes cepas tipo de *Aeromonas* estudiadas en relación con las células sin infectar ($\Delta\Delta ct=1$). Diferencias significativas ($p < 0,05$) indicadas con un asterisco (*).

7. Discusión

Tal y como se mencionó en la introducción, el género *Aeromonas* está formado por microorganismos asociados a ambientes acuáticos. Sin embargo, estas bacterias están distribuidas por todo el mundo y han sido aisladas de varias muestras clínicas y ambientales (Janda y Abbott *et al.*, 2010; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015; Fernández-Bravo y Figueras, 2020). Esta bacteria tiene una especial importancia en salud humana ya que puede provocar infecciones tanto a nivel intestinal como extraintestinal y en salud animal ya que puede provocar grandes pérdidas económicas en acuicultura (Latif-Eugenín, 2015).

Como resultado de la colaboración del laboratorio con hospitales universitarios de nuestra área, nosotros reidentificamos molecularmente, a nivel de especie, diez cepas clínicas provenientes de hospitales españoles mediante la secuenciación del gen *rpoD*. Las cepas para identificar se incluyeron en un grupo de cepas identificadas previamente, con el objetivo de realizar un análisis competente de la prevalencia de las especies y sus orígenes, obteniendo un total de 28 cepas para analizar. La identificación a nivel de especie de las diez cepas demostró que la identificación molecular basada en HGK (en concreto, basada en el gen *rpoD*) era más resolutive que los métodos clásicos utilizados en hospitales como el MALDI-TOF. Literatura previa demostró que un 98,3% de cepas de *Aeromonas* eran correctamente identificadas a nivel de género y un 91,1% a nivel de especie, siendo el MALDI-TOF un método interesante para la identificación de *Aeromonas* (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). Sin embargo, este método posee limitaciones, debido a que la taxonomía se encuentra en constante cambio con la descripción de nuevas especies y las reclasificaciones (Fernández-Bravo, 2019). Por ejemplo, en este trabajo encontramos cepas previamente identificadas como *A. hydrophila* por los hospitales, pero tras analizar las secuencias de sus genes *rpoD* resultaron pertenecer a *A. dhakensis*. Esta confusión concuerda con la literatura descrita por Chen *et al.* (2014). Además, otras cepas fueron previamente identificadas por MALDI-TOF como *Aeromonas* sp. Esto sería debido a la falta de *A. dhakensis*, *A. enterica* y *A. intestinalis* en la base de datos de MALDI-TOF (Latif-Eugenín, 2015; Fernández-Bravo, 2019). Por ello, sería importante alertar a los hospitales sobre la necesidad de actualizar la base de datos de MALDI-TOF o de realizar la secuenciación de genes *housekeeping* para la identificación de especies.

Algunas especies del género son consideradas patógenos emergentes oportunistas que causan diarrea, bacteriemia e infecciones de heridas que afectan en

mayor medida a las poblaciones de riesgo, como los niños, los ancianos y los individuos inmunocomprometidos (Janda y Abbott *et al.*, 2010; Fernández-Bravo, 2019). Como resultado del análisis de las 28 cepas clínicas, se encontró que *A. caviae* (39%), *A. veronii* (25%) *A. dhakensis* (14%) y *A. hydrophila* (14%) fueron las especies más prevalentes. Estos resultados fueron similares a los descritos en estudios previos (Latif-Eugenín, 2015; Fernández-Bravo y Figueras, 2020). Según Fernández-Bravo y Figueras (2020), el 95.4% de las cepas de *Aeromonas* asociadas con casos clínicos humanos corresponden a: *A. caviae* (37,26%), *A. dhakensis* (23,49%), *A. veronii* (21,54%) y *A. hydrophila* (13,07%). Sin embargo, estos resultados podrían variar dependiendo las zonas de aislamiento, como ocurre con *A. dhakensis*, menos aislada en hospitales españoles, pero de gran prevalencia en zonas tropicales como Australia (Fernández-Bravo y Figueras, 2020). Por otro lado, la identificación a nivel de especie de las bacterias de este género por parte de los hospitales españoles no es siempre del todo correcta (Latif-Eugenín, 2015). Esto se debe a que, como se ha comentado anteriormente, durante los últimos años, muchos laboratorios clínicos utilizan como método de identificación el MALDI-TOF. Respecto al origen de las cepas, en este trabajo destaca la prevalencia de este género en heces (68%), seguido de heridas (14%) y sangre (11%). En la tesis doctoral de Fernández-Bravo (2019), las heces (86,8%) también son el origen más común, aunque la prevalencia en sangre (4,4%) es superior a la de heridas (1,7%). Además, en este trabajo previo se encuentran orígenes más variados como bilis, esputo o secreción de faringe. La diferencia en los resultados en los tipos de orígenes se debe al tamaño muestral de este estudio.

Analizando la diversidad del género *Aeromonas* con las 28 cepas identificadas previamente en el laboratorio y en este trabajo, es importante destacar la utilidad del gen *rpoD*, que permitió identificar varios escenarios. Por un lado, distintas cepas del mismo paciente fueron aisladas para su estudio. Los resultados concluyeron que existían distintas cepas e incluso distintas especies de *Aeromonas* en el mismo paciente. Este resultado es interesante, ya que recientemente, infecciones mixtas con diferentes especies o cepas de *Aeromonas* han sido reportadas en un 5-10% de los casos clínicos (Mosser *et al.*, 2015; Ponnusamy *et al.*, 2016; Fernández-Bravo *et al.*, 2019) y esto podría ayudar a entender la complejidad de las infecciones por *Aeromonas*. Por otro lado, durante el estudio de la prevalencia se encontraron dos cepas, provenientes de pacientes con diarrea en dos hospitales españoles, que no pertenecían a ninguna especie de *Aeromonas*, por lo que fueron denominadas *A. enterica* y *A. intestinalis*. Estas fueron anunciadas en 2017 por Figueras *et al.* Sin embargo, actualmente se encuentran en proceso de descripción.

Debido al interés de conocer la complejidad del género, se procedió a caracterizar la patogenicidad de estas nuevas especies, *A. enterica* y *A. intestinalis*, a través de experimentos de infección *in vitro*. Previos estudios caracterizaron otras especies del género (Fernández-Bravo, 2019), por lo que estas se añadieron a los experimentos. Nuestros resultados mostraron que las especies *A. enterica* y *A. intestinalis* resultaron ser las que inducían una mayor fagocitosis por parte de los macrófagos murinos, llegando a triplicar el resultado de la especie más prevalente *A. caviae*. La causa de que los macrófagos murinos fagociten con tanta eficacia a estas especies puede residir en que ellas mismas carecen de factores de virulencia que les permitan ocultarse o evadir la acción de estas células del sistema inmune, como previamente se ha descrito en otras especies (Fernández-Bravo *et al.*, 2019). Por otro lado, el porcentaje de supervivencia intracelular de las especies estudiadas (*A. enterica* y *A. intestinalis*) es menor que el de las más prevalentes (*A. caviae*, *A. dhakensis* y *A. veronii*) en ambos puntos temporales (4 y 6 horas). Esto indica que, además de que *A. enterica* y *A. intestinalis* son fagocitadas en mayor número por los macrófagos murinos, muestran una supervivencia menor en su interior. Estas podrían ser las razones principales por las que su prevalencia en clínica es mínima, a diferencia de las otras especies cuyos resultados fueron previamente reportados (Fernández-Bravo, 2019). En este punto, destaca especialmente el descenso de la supervivencia intracelular de *A. enterica* a lo largo del experimento. Parece ser que, de las dos especies en proceso de caracterización, esta es más vulnerable a la acción del fagolisosoma, pero con sólo estos resultados no se pueden sacar conclusiones definitivas. En ambos experimentos los resultados de *A. salmonicida* fueron similares a los de las especies en proceso de caracterización. Esto puede parecer extraño si consideramos que la especie psicrófila *A. salmonicida* resulta patógena para salmónidos y otros peces, aunque un estudio previo realizado por Fernández- Bravo (2019) demostró que existen cepas mesófilas capaces de infectar mamíferos con diferentes niveles de patogenicidad. En base a estos resultados similares, se podría decir que estas especies (*A. salmonicida*, *A. enterica* y *A. intestinalis*) podrían comportarse de la misma forma en humanos, aunque se requieren más experimentos para clarificar esta afirmación.

La evaluación de la expresión inducida de la citocina proinflamatoria TNF- α demostró que las nuevas especies descritas apenas estimulan el sistema inmune. En cambio, las más prevalentes (*A. caviae*, *A. dhakensis* y *A. veronii*) estimulan fuertemente el sistema a inmune. En teoría, esta fuerte activación debería ser positiva ya que facilitaría la eliminación del patógeno, pero una sobreactivación del sistema inmune genera la denominada tormenta de citocinas que resultan perjudiciales para el huésped

(Tisoncik *et al.*, 2012; Murciano *et al.*, 2015). Las tormentas de citocinas son reacciones inmunitarias defensivas potencialmente mortales que consisten en una retroalimentación positiva entre las citocinas y las células inmunitarias provocando fiebre elevada, náuseas y fatiga extrema, entre otros síntomas (Tisoncik *et al.*, 2012; Murciano *et al.*, 2015). En este experimento, *A. salmonicida* es la especie que menos induce la expresión de TNF- α , pero los resultados son similares a los de *A. enterica* y *A. intestinalis*. Que una especie poco prevalente y, generalmente, no patógena para mamíferos como lo es *A. salmonicida*, dé lugar a resultados similares en los tres experimentos de infección *in vitro*, explicaría el motivo por el que *A. enterica* y *A. intestinalis* son poco prevalentes a pesar de provenir del intestino humano. El hecho de que las nuevas especies apenas estimulen el sistema inmune puede deberse a la ausencia de la expresión de citocinas proinflamatorias que estimulen el sistema inmune para que estas especies no perjudiquen al huésped, debido por un lado a la gran capacidad de los macrófagos para fagocitar estas especies y, por otro, a su limitada supervivencia intracelular. Esta sería otra razón por la cual su prevalencia en clínica es mínima. Para corroborarlo sería necesario estudiar la expresión inducida por estas especies de otras citocinas proinflamatorias como la IL-6, la IL-8, la IL-12 o el IFN- γ . Aparte de a nivel de ARN, se podría estudiar la inducción a nivel proteico mediante la técnica analítica *Western blot*. Cabe destacar que las tres especies menos prevalentes (*A. salmonicida*, *A. enterica* y *A. intestinalis*) sí que activan el sistema inmune, pero no inducirían la tormenta de citocinas que provocan las especies más prevalentes (*A. caviae*, *A. dhakensis* y *A. veronii*).

8. Conclusiones

1. El método de identificación molecular a nivel de especie basado en el análisis filogenético de la secuencia de genes *housekeeping* es más resolutivo que la espectrometría de masas MALDI-TOF.
2. El rendimiento limitado de MALDI-TOF MS para la identificación de especies de *Aeromonas* ha sido demostrado. Este se puede mejorar actualizando regularmente las bases de datos de los hospitales.
3. Las cepas estudiadas corresponden a 6 especies, 4 de las cuales: *A. caviae* (39%), *A. veronii* (25%), *A. dhakensis* (14%) y *A. hydrophila* (14%) englobaron el 92% de las cepas.
4. Las dos nuevas especies en proceso de descripción, *A. enterica* y *A. intestinalis*, son muy poco prevalentes en clínica.
5. Se comprobó que en hospitales españoles existe una mayor probabilidad de aislar *Aeromonas* en heces.
6. Las nuevas especies *A. intestinalis* y *A. entérica* poseen un mayor porcentaje de fagocitosis y menor supervivencia intracelular tras la infección en líneas celulares de macrófagos murinos, en comparación con las especies más prevalentes en clínica.
7. Los niveles transcripcionales del TNF- α fueron menores en las infecciones producidas por las nuevas especies, *A. entérica* y *A. intestinalis*, en comparación con las producidas por especies más prevalentes en clínica. Esto se debe a que estas nuevas especies no provocan una tormenta de citoquinas y explica su baja prevalencia en clínica.

9. Bibliografía

1. Martin-Carnahan, A.; Joseph, S.W. Order XII. Aeromonadales ord. nov. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology; Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Garrity, G.M., Eds.; Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2005.
2. Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010.
3. Colwell RR, MacDonell MT, De Ley J. Proposal to recognize the family Aeromonadaceae fam. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1986.
4. Fernández-Bravo A, Figueras MJ. An update on the genus *Aeromonas*: Taxonomy, epidemiology, and pathogenicity. *Microorganisms*. 2020.
5. Fernández-Bravo, A. Epidemiology and pathogenic characterization of the species of the genus *Aeromonas*; Universidad Rovira i Virgili: Tarragona, Spain, 2019.
6. Beaz-Hidalgo R, Alperi A, Buján N, Romalde JL, Figueras MJ. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Syst Appl Microbiol*. 2010.
7. Marchandin H, Godreuil S, Darbas H, Jean-Pierre H, Jumas-Bilak E, Chanal C, et al. Extended-Spectrum β -Lactamase TEM-24 in an *Aeromonas* Clinical Strain: Acquisition from the Prevalent *Enterobacter aerogenes* Clone in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003.
8. Latif-Eugenin, F.L. *Aeromonas*, un microorganismo ambiental de importancia en salud humana y animal; Universidad Rovira i Virgili: Tarragona, Spain, 2015.
9. Alperi A, Figueras MJ, Inza I, Martínez-Murcia AJ. Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. *Int Microbiol*. 2008.

10. Pérez-Sancho M, Cerdá I, Fernández-Bravo A, Domínguez L, Figueras MJ, Fernández-Garayzábal JF, et al. Limited performance of MALDI-TOF for identification of fish aeromonas isolates at species level. *J Fish Dis*. 2018.
11. Shin HB, Yoon J, Lee Y, Kim MS, Lee K. Comparison of MALDI-TOF-MS, housekeeping gene sequencing, and 16S rRNA gene sequencing for identification of *Aeromonas* clinical isolates. *Yonsei Med J*. 2015.
12. Yáñez MA, Catalán V, Apráiz D, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003.
13. Soler L, Yáñez MA, Chacon MR, Aguilera-Arreola MG, Catalán V, Figueras MJ, et al. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004.
14. Martínez-Murcia AJ, Monera A, Saavedra MJ, Oncina R, Lopez-Alvarez M, Lara E, et al. Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Syst Appl Microbiol*. 2011.
15. Colston SM, Fullmer MS, Beka L, Lamy B, Peter Gogarten J, Graf J. Bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using aeromonas as a test case. *MBio*. 2014.
16. Beaz-Hidalgo R, Hossain MJ, Liles MR, Figueras MJ. Strategies to avoid wrongly labelled genomes using as example the detected wrong taxonomic affiliation for aeromonas genomes in the genbank database. *PLoS One*. 2015.
17. Figueras MJ, Beaz-Hidalgo R, Senderovich Y, Laviad S, Halpern M. Re-identification of *Aeromonas* isolates from chironomid egg masses as the potential pathogenic bacteria *Aeromonas aquariorum*. *Environ Microbiol Rep*. 2011.
18. Latif-Eugenín F, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ. Evaluation of different conditions and culture media for the recovery of *Aeromonas* spp. from water and shellfish samples. *J Appl Microbiol*. 2016.

19. McLellan SL, Huse SM, Mueller-Spitz SR, Andreishcheva EN, Sogin ML. Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent. *Environ Microbiol*. 2010.
20. Fernández-Bravo A, Fort-Gallifa I, Ballester F, Pujol I, Gomez-bertomeu F, Domínguez M, et al. A case of aeromonas trota in an immunocompromised patient with Diarrhea. *Microorganisms*. 2020.
21. Chen PL, Wu CJ, Chen CS, Tsai PJ, Tang HJ, Ko WC. A comparative study of clinical *Aeromonas dhakensis* and *Aeromonas hydrophila* isolates in southern Taiwan: *A. dhakensis* is more predominant and virulent. *Clin Microbiol Infect*. 2014.
22. Tomás JM. The Main *Aeromonas* Pathogenic Factors. *ISRN Microbiol*. 2012.
23. Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *Journal of Fish Diseases*. 2013.
24. Bingle LE, Bailey CM, Pallen MJ. Type VI secretion: a beginner's guide. *Current Opinion in Microbiology*. 2008.
25. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. 2011.
26. Shrestha N, Bahnan W, Wiley DJ, Barber G, Fields KA, Schesser K. Eukaryotic Initiation Factor 2 (eIF2) signaling regulates proinflammatory cytokine expression and bacterial invasion. *J Biol Chem*. 2012.
27. Zhang XT, Zhang GR, Shi ZC, Yuan YJ, Zheng H, Lin L, et al. Expression analysis of nine Toll-like receptors in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) responding to *Aeromonas hydrophila* challenge. *Fish Shellfish Immunol*. 2017.
28. Su J, Yang C, Xiong F, Wang Y, Zhu Z. Toll-like receptor 4 signaling pathway can be triggered by grass carp reovirus and *Aeromonas hydrophila* infection in rare minnow *Gobiocypris rarus*. *Fish Shellfish Immunol*. 2009.

29. Lai RF, Jakovlić I, Liu H, Wei J, Zhan FB, Yang PH, et al. Characterization and expression of *Megalobrama amblycephala* toll-like receptor 22 involved in the response to *Aeromonas hydrophila*. *J Fish Biol.* 2017.
30. Mulder IE, Wadsworth S, Secombes CJ. Cytokine expression in the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during infection with *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.* 2007.
31. Kong WG, Li SS, Chen XX, Huang YQ, Tang Y, Wu ZX. A study of the damage of the intestinal mucosa barrier structure and function of *Ctenopharyngodon idella* with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Physiol Biochem.* 2017.
32. Walsh CT, Fischbach MA. Nuevas tácticas contra bacterias resistentes. *Investigación y Ciencia*, 2009.
33. Ndi OL, Barton MD. Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *J Fish Dis.* 2011.
34. Dias C, Serra CR, Simões LC, Simões M, Martinez-Murcia A, Saavedra MJ. Extended-spectrum β -lactamase and carbapenemase-producing *Aeromonas* species in wild animals from Portugal. *Vet Rec.* 2014.
35. Piotrowska M, Przygodzinska D, Matyjewicz K, Popowska M. Occurrence and variety of β -lactamase genes among *Aeromonas* spp. isolated from Urban Wastewater treatment plant. *Front Microbiol.* 2017.
36. Wimalasena SHMP, Shin GW, Hossain S, Heo GJ. Potential enterotoxicity and antimicrobial resistance pattern of *Aeromonas* species isolated from pet turtles and their environment. *J Vet Med Sci.* 2017.
37. Zhou Y, Yu L, Nan Z, Zhang P, Kan B, Yan D, et al. Taxonomy, virulence genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolated from extra-intestinal and intestinal infections. *BMC Infect Dis.* 2019.
38. Hossain S, De Silva BCJ, Wickramanayake MVKS, Dahanayake PS, Wimalasena SHMP, Heo GJ. Incidence of antimicrobial resistance genes and

- class 1 integron gene cassettes in multidrug-resistant motile *Aeromonas* sp. isolated from ornamental guppy (*Poecilia reticulata*). *Lett Appl Microbiol*. 2019.
39. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007.
40. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013.
41. Rama D, Esendagli G, Guc D. Expression of chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) on J744A.1 macrophages co-cultured with fibroblast and/or tumor cells: Modeling the influence of microenvironment. *Cell Immunol*. 2011.
42. Murciano C, Hor LI, Amaro C. Host-pathogen interactions in *Vibrio vulnificus*: Responses of monocytes and vascular endothelial cells to live bacteria. *Future Microbiol*. 2015.
43. Mosser T, Talagrand-Reboul E, Colston SM, Graf J, Figueras MJ, Jumas-Bilak E, et al. Exposure to pairs of *Aeromonas* strains enhances virulence in the *Caenorhabditis elegans* infection model. *Front Microbiol*. 2015.
44. Ponnusamy D, Kozlova E V., Sha J, Erova TE, Azar SR, Fitts EC, et al. Cross-talk among flesh-eating *Aeromonas hydrophila* strains in mixed infection leading to necrotizing fasciitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016.
45. Fernández-Bravo A, Kilgore PB, Andersson JA, Blears E, Figueras MJ, Hasan NA, et al. 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*. 2019.
46. Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG. Into the Eye of the Cytokine Storm. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012.
47. Figueras MJ, Beaz-Hidalgo R. *Aeromonas* infections in humans. In: *Aeromonas*. Ed. Graf J. Caister Academic Press. EE. UU. 2015.

48. Figueras MJ, Latif-Eugenín F, Ballester F, Pujol I, Tena D, Berg K, et al. '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.* 2017.

10. Autoevaluación

Este Trabajo de Fin de Grado se ha realizado durante mi periodo de prácticas curriculares correspondiente a la asignatura “Prácticas externas”. Después de valorar distintas posibilidades tanto en hospitales del sistema público de salud como en otros centros de investigación me decanté por la Unidad de Micología y Microbiología Ambiental del IISPV que estudia el género *Aeromonas*. Este género me ha resultado muy interesante por su singularidad y sus implicaciones clínicas. A ello ha contribuido que se trata de un género bacteriano poco estudiado respecto a otros, lo que resulta más motivante y alentador para el principiante, como es mi caso.

La realidad ha superado con creces las expectativas que tenía y, pese al poco tiempo que he permanecido en el grupo debido a las circunstancias sanitarias vividas, considero que mi aprendizaje ha sido muy satisfactorio y me ha brindado la oportunidad de realizar técnicas muy variadas como queda de manifiesto en este estudio. Desde el primer día, me sentí respaldado por mi tutora, los doctorandos y las técnicas de laboratorio, quienes confiaron en mí permitiéndome participar activamente en la realización de diversos experimentos (tanto de carácter bacteriano como relacionados con la micología).

La realización de este Trabajo de Fin De Grado me ha permitido aplicar los conocimientos teóricos y prácticos aprendidos durante el grado de Biotecnología y obtener así una visión completa del trabajo que se lleva a cabo en un laboratorio de microbiología. Debido a la variedad de este estudio, he aprendido y reforzado técnicas de microbiología clásica y biología molecular, incluyendo técnicas de cultivo bacteriano, cultivo celular, PCRs, PCRs a tiempo real (qPCR) y secuenciación de genes, entre otras.

En mi opinión, mi desarrollo personal ha dado un paso más hacia mi carrera investigadora y laboral como miembro de la comunidad científica. Durante la investigación y redacción de este trabajo he tenido la oportunidad de enfrentarme a problemas reales y dificultades técnicas que, con la ayuda de mi tutora, he conseguido solventar. Mi experiencia ha sido muy positiva también en cuanto al trabajo en grupo se refiere, compartiendo datos, técnicas instrumentación y experiencias profesionales y personales.

11. Anexos

Anexo 1: Cepas obtenidas de los hospitales para su identificación.

Código Hospital	Código URV	Origen	Identificación preliminar	Identificación URV
8199246502 (1)	1R	Heces	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Aeromonas caviae</i>
8199246502 (2)	2R	Sangre	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas caviae</i>
8044407685 (1)	3R	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas caviae</i>
8044407685 (2)	4R	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas caviae</i>
8044407685 (3)	5R	Heces	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas dhakensis</i>
8110525172	6R	Herida	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
8163132027	7R	Herida	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas dhakensis</i>
8318318560	8R	Heces	<i>Aeromonas veronii</i>	<i>Aeromonas veronii</i>
1760506	9R	Orina	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Aeromonas caviae</i>
1726761	1M	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas dhakensis</i>
1731745	2M	Herida	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas veronii</i>
8455984937	3M	Fluido ascítico	<i>Aeromonas veronii</i>	<i>Aeromonas veronii</i>
2486224	1A	Herida	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas dhakensis</i>
2971299	2A	Heces	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
2879117	3A	Heces	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Aeromonas caviae</i>
2894752	4A	Heces	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Aeromonas caviae</i>
2796214	5A	Heces	<i>Aeromonas veronii</i>	<i>Aeromonas veronii</i>
41589241 (1)	1C	Heces	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Aeromonas veronii</i>
41589241 (2)	2C	Sangre	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas veronii</i>
58218250 (1)	3C	Heces	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Aeromonas caviae</i>
58218250 (2)	4C	Sangre	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Aeromonas caviae</i>
52896160 (1)	5C	Heces	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Aeromonas caviae</i>
52896160 (2)	6C	Heces	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Aeromonas veronii</i>
58941885	1B	Heces	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
54789276	2B	Heces	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
32117899	3B	Heces	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Aeromonas caviae</i>
113634	113634	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas intestinalis</i>*
1459510	1178C	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas enterica</i>*

Color **rojo**: cepas identificadas durante la realización de este estudio.

Color **azul**: cepas previamente identificadas por el grupo, pero igualmente utilizadas en este estudio.

*: únicas cepas encontradas en muestras clínicas correspondientes a estas especies.

Anexo 2: Cepas tipo utilizadas para los experimentos *in vitro*.

Cepa	Especie	Origen
CECT 838T	<i>A. caviae</i>	Cerdo
CECT 5744T	<i>A. dhakensis</i>	Heces
CECT 4257T	<i>A. veronii</i>	Espuito
CECT 894T	<i>A. salmonicida</i>	Salmon
CECT 8981T	<i>A. enterica</i>	Heces
CECT 8980T	<i>A. intestinalis</i>	Heces