

| | |
|--|----|
| <u>INTRODUCCIÓN</u> | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN AL GÉNERO VIBRIO | 3 |
| 1.1. Antecedentes históricos | 3 |
| 1.2. Situación taxonómica actual | 3 |
| 1.3. Morfología y características bioquímicas | 5 |
| 1.4. Aspectos ecológicos | 6 |
| 2. <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> | 8 |
| 2.1. Introducción | 8 |
| 2.2. Características microbiológicas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 8 |
| 2.3. Ecología de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 9 |
| 2.3.1. Distribución en entornos marinos | 9 |
| 2.3.2. Prevalencia en mariscos y pescados | 10 |
| 2.4. Cepa emergente de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 10 |
| 2.5. Epidemiología | 12 |
| 2.5.1. Incidencia en Asia, Estados Unidos y Europa | 12 |
| 2.5.2. Transmisión de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 14 |
| 2.5.3. Tipos de infecciones producidas por <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 14 |
| 2.5.4. Susceptibilidad del hospedador | 16 |
| 2.6. Patogénesis | 17 |
| 2.6.1. Factores de virulencia de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 17 |
| 3. <i>VIBRIO VULNIFICUS</i> | 19 |
| 3.1. Introducción | 19 |
| 3.2. Características microbiológicas de <i>Vibrio vulnificus</i> | 20 |
| 3.3. Ecología de <i>Vibrio vulnificus</i> | 20 |
| 3.4. Biotipos | 22 |
| 3.5. Epidemiología | 23 |
| 3.5.1. Incidencia de las infecciones producidas por <i>Vibrio vulnificus</i> | 23 |
| 3.5.2. Tipos de infecciones producidas por <i>Vibrio vulnificus</i> | 24 |
| 3.5.3. Susceptibilidad del hospedador | 25 |
| 3.5.4. Síntomas clínicos y tratamiento | 26 |
| 3.6. Patogénesis | 28 |
| 3.6.1. Factores de virulencia de <i>Vibrio vulnificus</i> | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 4. MÉTODOS TRADICIONALES PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>VIBRIO SPP.</i>, <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> Y <i>VIBRIO VULNIFICUS</i> | 31 |
| 4.1. Detección por cultivo | 31 |
| 4.2. Identificación de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i> | 32 |
| 5. MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>VIBRIO SPP.</i>, <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> Y <i>VIBRIO VULNIFICUS</i> | 36 |
| 5.1. Detección por PCR tradicional | 36 |
| 5.1.1. Introducción | 36 |
| 5.1.2. Aspectos metodológicos: Fundamentos y fases de la PCR | 37 |
| 5.1.3. Modificaciones de la técnica PCR | 40 |
| 5.2. PCR cuantitativa a tiempo real para la detección, identificación y cuantificación de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i> | 42 |
| 5.2.1. PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR): fundamentos y tipos | 42 |
| 5.2.2. Sistemas inespecíficos: Agentes intercalantes | 47 |
| 5.2.3. Sistemas específicos: Sondas de hibridación | 49 |
| 5.2.4. Análisis cuantitativo | 54 |
| 5.2.5. Aplicación de la Q-PCR en alimentos y agua | 56 |
| 5.3. Detección mediante hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes (FISH) | 57 |
| 5.3.1. Introducción | 57 |
| 5.3.2. Aspectos metodológicos | 58 |
| 5.3.3. Marcaje de sondas | 59 |
| 5.3.4. Especificidad de las sondas | 60 |
| 5.3.5. Investigaciones actuales | 60 |
| 6. VALIDACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES | 61 |

| | |
|--|----|
| 7. TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> Y <i>VIBRIO VULNIFICUS</i>. AMPLIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE INICIADORES DE SECUENCIA ALEATORIA (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA, RAPD) | 65 |
| <u>OBJETIVOS</u> | 69 |
| <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u> | 75 |
| 1. CEPAS BACTERIANAS | 77 |
| 1.1. Condiciones de cultivo | 77 |
| 1.2. Conservación de cepas | 77 |
| 2. PUESTA A PUNTO DE MÉTODOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>VIBRIO SPP.</i>, <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> Y <i>VIBRIO VULNIFICUS</i> MEDIANTE PCR TRADICIONAL | 80 |
| 2.1. Aislamiento de ADN genómico bacteriano | 80 |
| 2.2. Puesta a punto de métodos de detección e identificación de <i>Vibrio spp.</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i> mediante PCR tradicional | 80 |
| 2.2.1. Detección de <i>Vibrio spp</i> | 81 |
| 2.2.2. Detección de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 82 |
| 2.2.3. Detección de <i>Vibrio vulnificus</i> | 82 |
| 2.3. Detección conjunta de <i>Vibrio spp.</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i> mediante PCR múltiple | 83 |
| 2.4. Análisis de los productos de PCR | 83 |

| | |
|--|----|
| 3. PUESTA A PUNTO DE MÉTODOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>VIBRIO SPP.</i>, <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> Y <i>VIBRIO VULNIFICUS</i> MEDIANTE HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> CON SONDAS FLUORESCENTES (FISH) | 83 |
| 3.1.Sondas empleadas para la detección de <i>Vibrio spp.</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i> | 83 |
| 3.1.1.Detección de <i>Vibrio spp.</i> | 84 |
| 3.1.2.Detección de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 84 |
| 3.1.3.Detección de <i>Vibrio vulnificus</i> | 85 |
| 3.1.4.Sondas EUB | 85 |
| 3.2.Condiciones de hibridación | 86 |
| 4. PUESTA A PUNTO DE MÉTODOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> Y <i>VIBRIO VULNIFICUS</i> MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL | 89 |
| 4.1.Aislamiento de ADN genómico bacteriano | 89 |
| 4.2.Puesta a punto de dos métodos de detección de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i> mediante PCR a tiempo real usando agentes intercalantes (SYBR Green I) | 89 |
| 4.2.1.Análisis cualitativo | 90 |
| 4.3.Puesta a punto de un método de detección de <i>Vibrio vulnificus</i> mediante PCR a tiempo real usando sondas de hibridación específicas (Sondas TaqMan) | 92 |
| 4.4.Análisis de los productos de PCR | 93 |
| 5. PUESTA A PUNTO DE MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> Y <i>VIBRIO VULNIFICUS</i> MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL | 94 |
| 5.1.Curvas patrón para la cuantificación de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i> | 94 |
| 6. APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS DESARROLLADOS A LA DETECCIÓN EN MUESTRAS INOCULADAS ARTIFICIALMENTE | 96 |
| 6.1.Detección de <i>Vibrio spp.</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en muestras inoculadas artificialmente mediante cultivo, PCR y FISH | 96 |

| | |
|--|------------|
| 6.1.1. Análisis del límite de detección en alimentos de origen marino inoculados artificialmente | 96 |
| 6.1.2. Análisis del límite de detección en aguas inoculadas artificialmente | 99 |
| 6.2. Ensayo colaborativo para la evaluación del método de PCR a tiempo real para <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 103 |
| 6.3. Detección de <i>Vibrio vulnificus</i> en muestras inoculadas artificialmente mediante cultivo, PCR y FISH | 107 |
| 6.3.1. Análisis del límite de detección en alimentos de origen marino inoculados artificialmente | 107 |
| 6.3.2. Análisis del límite de detección en aguas inoculadas artificialmente | 108 |
| 7. APLICACIÓN EN MUESTRAS DE ALIMENTOS DE ORIGEN MARINO Y AGUAS | 111 |
| 7.1. Detección y cuantificación de <i>Vibrio spp.</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. vulnificus</i> en alimentos de origen marino | 111 |
| 7.2. Detección de <i>Vibrio spp.</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i> en muestras de agua | 111 |
| 7.3. Aislamiento de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i> en medio de cultivo selectivo TCBS | 112 |
| 7.4. Secuenciación de los productos de amplificación | 112 |
| 8. DETERMINACIÓN DEL BIOTIPO DE LAS CEPAS DE V. VULNIFICUS | 113 |
| 9. AMPLIFICACIÓN DEL ADN MEDIANTE INICIADORES DE SECUENCIA ALEATORIA (“RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA” O RAPD) | 114 |
| 9.1. Análisis de los perfiles de bandas generados por RAPD | 116 |
| <u>RESULTADOS</u> | 119 |
| 1. PUESTA A PUNTO DE MÉTODOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE VIBRIO SPP., VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS Y VIBRIO VULNIFICUS MEDIANTE PCR TRADICIONAL | 121 |

| | |
|--|-----|
| 1.1.Detección mediante PCR simple | 121 |
| 1.1.1.Detección de <i>Vibrio spp.</i> | 121 |
| 1.1.2.Detección de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 122 |
| 1.1.3.Detección de <i>Vibrio vulnificus</i> | 124 |
| 1.2.Detección conjunta de <i>Vibrio spp.</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i> mediante PCR múltiple | 125 |
| | |
| 2. PUESTA A PUNTO DE MÉTODOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>VIBRIO SPP.</i>, <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> Y <i>VIBRIO VULNIFICUS</i> MEDIANTE HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> CON SONDAS FLUORESCENTES (FISH) | 128 |
| 2.1.Detección de <i>Vibrio spp.</i> | 128 |
| 2.2.Detección de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 138 |
| 2.3.Detección de <i>Vibrio vulnificus</i> | 140 |
| | |
| 3. PUESTA A PUNTO DE MÉTODOS DE DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> Y <i>VIBRIO VULNIFICUS</i> MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL | 145 |
| 3.1.Detección y cuantificación de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> usando el agente intercalante SYBR Green I | 145 |
| 3.1.1.Análisis cualitativo | 145 |
| 3.1.2.Análisis cuantitativo. Curva patrón de <i>V. parahaemolyticus</i> | 148 |
| 3.1.3.Análisis del límite de detección | 152 |
| 3.2.Detección y cuantificación de <i>Vibrio vulnificus</i> usando el agente intercalante SYBR Green I. | 153 |
| 3.2.1.Análisis cualitativo | 153 |
| 3.2.2.Análisis cuantitativo. Curva patrón de <i>V. vulnificus</i> | 155 |
| 3.2.3.Análisis del límite de detección | 159 |
| 3.3.Detección y cuantificación de <i>Vibrio vulnificus</i> usando sondas de hibridación TaqMan | 160 |
| 3.3.1.Análisis cualitativo | 160 |
| 3.3.2.Análisis cuantitativo. Curva patrón de <i>V. vulnificus</i> | 164 |
| 3.3.3.Análisis del límite de detección | 171 |

| | |
|--|------------|
| 4. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>VIBRIO SPP.</i>, <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> Y <i>VIBRIO VULNIFICUS</i> EN MUESTRAS DE ALIMENTOS DE ORIGEN MARINO Y AGUAS INOCULADAS ARTIFICIALMENTE | 172 |
| 4.1. Detección de <i>Vibrio spp.</i> en muestras inoculadas artificialmente mediante cultivo, FISH y PCR | 172 |
| 4.1.1. Análisis del límite de detección en alimentos de origen marino inoculados artificialmente | 172 |
| 4.1.2. Análisis del límite de detección en aguas inoculadas artificialmente | 176 |
| 4.2. Detección de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en muestras inoculadas artificialmente mediante cultivo y PCR | 177 |
| 4.2.1. Análisis del límite de detección en alimentos de origen marino inoculados artificialmente | 177 |
| 4.2.2. Análisis del límite de detección en aguas inoculadas artificialmente | 179 |
| 4.2.3. Ensayo colaborativo para la evaluación del método de detección de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> mediante PCR a tiempo real | 181 |
| 4.3. Detección de <i>Vibrio vulnificus</i> en muestras inoculadas artificialmente mediante cultivo y PCR | 183 |
| 4.3.1. Análisis del límite de detección en alimentos de origen marino inoculados artificialmente | 183 |
| 4.3.2. Análisis del límite de detección en aguas inoculadas artificialmente | 186 |
| 4.4. Detección conjunta de <i>Vibrio spp.</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i> en muestras inoculadas artificialmente mediante PCR múltiple | 188 |
| 4.4.1. Análisis del límite de detección en alimentos de origen marino inoculados artificialmente | 188 |
| 4.4.2. Análisis del límite de detección en aguas inoculadas artificialmente | 190 |

| | |
|---|-----|
| 5. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE <i>VIBRIO SPP.</i>, <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> Y <i>VIBRIO VULNIFICUS</i> EN ALIMENTOS DE ORIGEN MARINO Y AGUAS | 191 |
| 5.1. Detección y cuantificación de <i>Vibrio spp.</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i> en alimentos de origen marino | 191 |
| 5.1.1. Detección de <i>Vibrio spp.</i> | 191 |
| 5.1.2. Detección y cuantificación de <i>V. parahaemolyticus</i> | 192 |
| 5.1.3. Detección y cuantificación de <i>V. vulnificus</i> | 192 |
| 5.2. Aislamiento de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i> en alimentos | 193 |
| 5.3. Detección y cuantificación de <i>Vibrio spp.</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i> en agua de mar y agua de depuradora | 203 |
| 5.3.1. Detección de <i>Vibrio spp.</i> | 203 |
| 5.3.2. Detección y cuantificación de <i>V. parahaemolyticus</i> | 204 |
| 5.3.3. Detección y cuantificación de <i>V. vulnificus</i> | 204 |
| 5.4. Aislamiento de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i> en agua de mar y agua de depuradora | 206 |
| 6. DETERMINACIÓN DEL BIOTIPO DE LAS CEPAS DE <i>V. VULNIFICUS</i> | 217 |
| 7. ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE BANDAS GENERADOS POR RAPD | 217 |
| 7.1. Caracterización molecular mediante RAPD de las cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> aisladas de agua y alimentos de origen marino | 220 |
| 7.2. Caracterización molecular mediante RAPD de las cepas de <i>V. vulnificus</i> aisladas de agua y alimentos de origen marino | 222 |

| | |
|----------------------------|-----|
| <u>DISCUSIÓN</u> | 225 |
| <u>CONCLUSIONES</u> | 251 |
| <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | 255 |
| <u>ANEXOS</u> | 297 |

INTRODUCCIÓN**MATERIAL Y MÉTODOS**

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Cepas de referencia utilizadas | 79 |
| Tabla 2. Nombre, localización y tipo de termociclador de los laboratorios que participaron en el interlaboratorio para la evaluación del método de PCR a tiempo real para la detección de <i>V. parahaemolyticus</i> | 104 |

RESULTADOS

| | |
|--|-----|
| Tabla 1. Alineamiento de secuencias de la sonda GV | 129 |
| Tabla 2. Alineamiento de secuencias de la sonda VIB | 134 |
| Tabla 3. Alineamiento de secuencias de las sondas VPA | 138 |
| Tabla 4. Alineamiento de secuencias de la sonda Vvul23S296 | 140 |
| Tabla 5. Alineamiento de secuencias de la sonda Vvu3 | 140 |
| Tabla 6. Alineamiento de secuencias de la sonda Vul23 | 143 |
| Tabla 7. Alineamiento de secuencias de la sonda Vvran2 | 143 |
| Tabla 8. Puntos de corte obtenidos de los cuatro ensayos y concentraciones calculadas para la PCR de <i>V. parahaemolyticus</i> | 151 |
| Tabla 9. Puntos de corte obtenidos de los cuatro ensayos y concentraciones calculadas para la PCR de <i>V. vulnificus</i> | 158 |
| Tabla 10. Puntos de corte obtenidos de los cuatro ensayos y concentraciones calculadas para la PCR de <i>V. vulnificus</i> usando la sonda VVH-TM | 167 |
| Tabla 11. Puntos de corte obtenidos de los cuatro ensayos y concentraciones calculadas para la PCR de <i>V. vulnificus</i> usando la sonda VVH-TM-LNA | 169 |
| Tabla 12. Comparación de los límites de detección (u.f.c/g) de las distintas técnicas para la detección de <i>Vibrio spp.</i> en muestras de mejillón | 176 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 13. Comparación de los límites de detección (u.f.c./ml) de las distintas técnicas para la detección de <i>Vibrio spp.</i> en muestras de agua | 177 |
| Tabla 14. Comparación de los límites de detección (u.f.c./g) de las distintas técnicas para la detección de <i>V. parahaemolyticus</i> en muestras de mejillón | 179 |
| Tabla 15. Comparación de los límites de detección (u.f.c./ml) de las distintas técnicas para la detección de <i>V. parahaemolyticus</i> en muestras de agua | 181 |
| Tabla 16. Resultados de la segunda etapa del ejercicio colaborativo donde se muestran los valores del punto de corte obtenidos en el análisis de PCR a tiempo real | 182 |
| Tabla 17. Comparación de los límites de detección (u.f.c./g) de las distintas técnicas para la detección de <i>V. vulnificus</i> en muestras de mejillón | 186 |
| Tabla 18. Comparación de los límites de detección (u.f.c./ml) de las distintas técnicas para la detección de <i>V. vulnificus</i> en muestras de agua | 188 |
| Tabla 19. Límites de detección (u.f.c./g) de la técnica de PCR múltiple para la detección de <i>Vibrio spp.</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. vulnificus</i> en muestras de mejillón | 189 |
| Tabla 20. Límites de detección (u.f.c./ml) de la técnica de PCR múltiple para la detección de <i>Vibrio spp.</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. vulnificus</i> en muestras de agua | 191 |
| Tabla 21. Procedencia de los aislados obtenidos en muestras de alimentos y resultados de los análisis realizados a cada uno de ellos para su caracterización | 197 |
| Tabla 22. Resultados de los análisis de muestras de alimentos mediante cultivo y PCR para la detección y cuantificación de <i>V. parahaemolyticus</i> | 200 |
| Tabla 23. Resultados de los análisis de muestras de alimentos mediante cultivo y PCR para la detección y cuantificación de <i>V. vulnificus</i> | 202 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 24. Procedencia de los aislados obtenidos en muestras de agua de playa y agua residual y resultados de los análisis realizados a cada uno de ellos para su caracterización | 210 |
| Tabla 25. Resultados de los análisis de muestras de aguas mediante cultivo y PCR para la detección y cuantificación de <i>V. parahaemolyticus</i> | 213 |
| Tabla 26. Resultados de los análisis de muestras de aguas mediante cultivo y PCR para la detección y cuantificación de <i>V. vulnificus</i> | 216 |

INTRODUCCIÓN

| | |
|--|----|
| Figura 1. Fases de la PCR | 38 |
| Figura 2. Representación gráfica del aumento de la fluorescencia (ΔR_n) con respecto al número de ciclos de la PCR y determinación del valor de C_T para las muestras A y B | 43 |
| Figura 3. Elementos del termociclador a tiempo real | 45 |
| Figura 4. LightCycler® de Roche | 46 |
| Figura 5. Mecanismo del agente intercalante SYBR Green I | 48 |
| Figura 6. Mecanismo de las sondas de hidrólisis o sondas TaqMan | 51 |
| Figura 7. Molecular beacons | 52 |
| Figura 8. Sondas FRET | 53 |
| Figura 9. Curva patrón obtenida con el método “Second Derivative Maximum” | 55 |

MATERIAL Y MÉTODOS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Curva de amplificación: se observa el aumento de la fluorescencia a medida que se incrementan los ciclos de amplificación | 91 |
| Figura 2. Curva de fusión: se observa un descenso brusco de la fluorescencia a una determinada temperatura | 91 |
| Figura 3. Representación del pico de fusión (melting peak) que muestra la temperatura de fusión | 92 |
| Figura 4. Curvas de amplificación de los distintos patrones de <i>V. parahaemolyticus</i> , mostrando dos réplicas de cada patrón | 96 |

| | |
|--|-----|
| Figura 5. Detección de <i>V. parahaemolyticus</i> en muestras de alimentos de origen marino inoculadas con concentraciones crecientes de la bacteria | 98 |
| Figura 6. Detección directa de <i>V. parahaemolyticus</i> en muestras de agua inoculadas artificialmente con concentraciones crecientes de la bacteria | 101 |
| Figura 7. Detección tras enriquecimiento de <i>V. parahaemolyticus</i> en muestras de agua inoculadas artificialmente con concentraciones crecientes de la bacteria | 102 |
| Figura 8. Detección de <i>V. vulnificus</i> en muestras de alimentos de origen marino inoculadas con concentraciones crecientes de la bacteria | 108 |
| Figura 9. Detección directa de <i>V. vulnificus</i> en muestras de agua inoculadas artificialmente con concentraciones crecientes de la bacteria | 109 |
| Figura 10. Detección tras enriquecimiento de <i>V. vulnificus</i> en muestras de agua inoculadas artificialmente con concentraciones crecientes de la bacteria | 110 |

RESULTADOS

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Detección de <i>Vibrio sp.</i> mediante PCR | 122 |
| Figura 2. Detección de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> mediante PCR | 123 |
| Figura 3. Detección de <i>Vibrio vulnificus</i> mediante PCR | 125 |
| Figura 4. Detección mediante PCR múltiple de <i>Vibrio spp.</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. vulnificus</i> . | 127 |
| Figura 5. Acceso a las estructuras secundarias del ARNr 16S (A) y 23S (B) | 132 |
| Figura 6. <i>Vibrio vulnificus</i> CECT 529 hibridada con GV marcada con el fluorocromo Cy3 | 133 |
| Figura 7. <i>Vibrio vulnificus</i> CECT 529 hibridada con las tres sondas EUB marcadas con el fluorocromo 6-FAM | 133 |

| | |
|---|-----|
| Figura 8. <i>Vibrio vulnificus</i> CECT 529 hibridada con VIB marcada con el fluorocromo Cy3 | 136 |
| Figura 9. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> CECT 511 hibridada con VIB marcada con el fluorocromo Cy3 | 136 |
| Figura 10. <i>Vibrio vulnificus</i> CECT 529 hibridada con las tres sondas EUB marcadas con el fluorocromo 6-FAM | 137 |
| Figura 11. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> CECT 511 hibridada con las tres sondas EUB marcadas con el fluorocromo 6-FAM | 137 |
| Figura 12. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> CECT 511 hibridada con la sonda VPA marcada con el fluorocromo 6-FAM | 139 |
| Figura 13. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> CECT 511 hibridada con las tres sondas EUB marcadas con el fluorocromo Cy3 | 139 |
| Figura 14. <i>Vibrio vulnificus</i> CECT 529 hibridada con la sonda Vvul23S296 marcada con el fluorocromo 6-FAM | 142 |
| Figura 15. <i>Vibrio vulnificus</i> CECT 529 hibridada con las tres sondas EUB marcadas con el fluorocromo Cy3 | 142 |
| Figura 16. <i>Vibrio vulnificus</i> CECT 529 hibridada con la sonda Vul23 marcada con el fluorocromo 6-FAM | 144 |
| Figura 17. <i>Vibrio vulnificus</i> CECT 529 hibridada con las tres sondas EUB marcadas con el fluorocromo Cy3 | 144 |
| Figura 18 (A y B). Ensayo de especificidad de la PCR a tiempo real para <i>V. parahaemolyticus</i> | 147 |
| Figura 19. Curvas de fusión de las distintas especies del género <i>Vibrio</i> para la PCR de <i>V. parahaemolyticus</i> | 148 |
| Figura 20. Curva de amplificación para la PCR de <i>V. parahaemolyticus</i> | 149 |
| Figura 21. Curvas patrón obtenidas para la PCR de <i>V. parahaemolyticus</i> y análisis de regresión para los valores de las curvas, a partir de células y a partir de ADN | 152 |
| Figura 22 (A y B). Ensayo de especificidad de la PCR a tiempo real para <i>V. vulnificus</i> | 154 |
| Figura 23. Curvas de fusión de las distintas especies del género <i>Vibrio</i> para la PCR de <i>V. vulnificus</i> | 155 |
| Figura 24. Curva de amplificación para la PCR de <i>V. vulnificus</i> | 156 |

| | |
|--|-----|
| Figura 25. Curvas patrón obtenidas para la PCR de <i>V. vulnificus</i> y análisis de regresión para los valores de las curvas, a partir de células y a partir de ADN | 159 |
| Figura 26 (A y B). Ensayo de especificidad de la PCR a tiempo real para <i>V. vulnificus</i> usando la sonda TaqMan VVH-TM | 162 |
| Figura 27 (A y B). Ensayo de especificidad de la PCR a tiempo real para <i>V. vulnificus</i> usando la sonda TaqMan-LNA VVH-TM-LNA | 163 |
| Figura 28. Curva de amplificación para la PCR de <i>V. vulnificus</i> usando la sonda VVH-TM | 164 |
| Figura 29. Curva de amplificación para la PCR de <i>V. vulnificus</i> usando la sonda VVH-TM-LNA | 165 |
| Figura 30. Curvas patrón obtenidas para la PCR de <i>V. vulnificus</i> (usando la sonda TaqMan) y análisis de regresión para los valores de las curvas, a partir de células y a partir de ADN | 170 |
| Figura 31. Curvas patrón obtenidas para la PCR de <i>V. vulnificus</i> (usando la sonda TaqMan-LNA) y análisis de regresión para los valores de las curvas, a partir de células y a partir de ADN | 171 |
| Figura 32. Detección de <i>Vibrio spp.</i> mediante FISH en la dilución 10^4 sin enriquecimiento empleando las sondas VIB (Cy3) y EUB (6-FAM) | 173 |
| Figura 33. Detección de <i>Vibrio spp.</i> mediante FISH en la dilución 10^4 tras 24 horas de enriquecimiento empleando las sondas VIB (Cy3) y EUB (6-FAM) | 174 |
| Figura 34. Límite de detección de la PCR de <i>Vibrio spp.</i> usando como matriz mejillón, antes del enriquecimiento | 175 |
| Figura 35. Límite de detección de la PCR de <i>Vibrio spp.</i> usando como matriz mejillón, tras enriquecimiento | 175 |
| Figura 36. Límite de detección de la PCR de <i>V. parahaemolyticus</i> usando como matriz mejillón, sin enriquecimiento | 178 |

| | |
|---|-----|
| Figura 37. Límite de detección de la PCR de <i>V. parahaemolyticus</i> usando como matriz mejillón después de 24 horas de enriquecimiento | 178 |
| Figura 38. Límites de detección de la PCR de <i>V. parahaemolyticus</i> usando como matriz agua, antes del enriquecimiento | 180 |
| Figura 39. Límite de detección de la PCR de <i>V. parahaemolyticus</i> usando como matriz agua, después de 24 horas de enriquecimiento | 180 |
| Figura 40. Límite de detección de la PCR de <i>V. vulnificus</i> usando como matriz mejillón, antes del enriquecimiento | 184 |
| Figura 41. Límite de detección de la PCR para <i>V. vulnificus</i> usando como matriz mejillón, después de 24 horas de enriquecimiento | 185 |
| Figura 42. Límite de detección de la PCR de <i>V. vulnificus</i> usando como matriz agua, antes del enriquecimiento | 187 |
| Figura 43. Límite de detección de la PCR de <i>V. vulnificus</i> usando como matriz agua, después de 24 horas de enriquecimiento | 187 |
| Figura 44. Límite de detección de la PCR múltiple para <i>Vibrio spp.</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. vulnificus</i> usando como matriz mejillón, antes del enriquecimiento | 189 |
| Figura 45. Límite de detección de la PCR múltiple para <i>Vibrio spp.</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. vulnificus</i> usando como matriz agua, antes del enriquecimiento | 190 |
| Figura 46. Colonias presuntivas del género <i>Vibrio</i> aisladas de alimentos en el medio selectivo TCBS | 194 |
| Figura 47. Curvas de amplificación obtenidas del análisis de los aislados de muestras de alimentos, mediante PCR a tiempo real para <i>V. parahemolyticus</i> | 195 |
| Figura 48. Curvas de amplificación obtenidas del análisis de los aislados de muestras de alimentos, mediante PCR a tiempo real usando SYBR Green I para <i>V. vulnificus</i> | 195 |
| Figura 49. Curvas de amplificación obtenidas del análisis de los aislados de muestras de alimentos, mediante PCR a tiempo real usando la sonda TaqMan para <i>V. vulnificus</i> | 196 |

| | |
|--|-----|
| Figura 50. Colonias presuntivas del género <i>Vibrio</i> aisladas de alimentos en el medio selectivo TCBS | 206 |
| Figura 51. Curvas de amplificación obtenidas del análisis de los aislados de muestras de agua, mediante PCR a tiempo real para <i>V. parahaemolyticus</i> | 207 |
| Figura 52. Curvas de amplificación obtenidas del análisis de los aislados de muestras de agua, mediante PCR a tiempo real usando SYBR Green I para <i>V. vulnificus</i> | 208 |
| Figura 53. Curvas de amplificación obtenidas del análisis de los aislados muestras de agua, mediante PCR a tiempo real usando la sonda TaqMan para <i>V. vulnificus</i> | 208 |
| Figura 54. Perfiles generados por el análisis mediante RAPD tras la amplificación con el iniciador M13 de las cepas aisladas de <i>V. parahaemolyticus</i> | 218 |
| Figura 55. Perfiles generados por el análisis mediante RAPD tras la amplificación con el iniciador M13 de las cepas aisladas de <i>V. vulnificus</i> | 219 |
| Figura 56. Dendrograma de similitud genética generado para las cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> | 221 |
| Figura 57. Dendrograma de similitud genética generado para las cepas de <i>V. vulnificus</i> | 223 |