

**Universitat Politècnica de València**

Departamento de Biotecnología



**DESARROLLO DE MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN Y  
CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS EMERGENTES DEL  
GÉNERO *VIBRIO* EN AGUAS Y ALIMENTOS**

Tesis Doctoral

Irene Cañigral Cárcel

Valencia, Septiembre 2011



**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**  
**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL**  
**MEDIO NATURAL**  
**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**  
**ÁREA DE MICROBIOLOGÍA**

**Dña. M<sup>a</sup> Antonia Ferrús Pérez**, Catedrática de Universidad y **Dña. Yolanda Moreno Trigós**, Profesora Asociada, pertenecientes al área de Microbiología del Departamento de Biotecnología de la Universitat Politècnica de València,

**CERTIFICAN:**

Que la Tesis doctoral titulada “DESARROLLO DE MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS EMERGENTES DEL GÉNERO *VIBRIO* EN AGUAS Y ALIMENTOS”, que presenta Dña. Irene Cañigral Cárcel para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada bajo su dirección y reúne los requisitos adecuados para ser presentada como Tesis Doctoral ante el tribunal correspondiente para su lectura y defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado,

Valencia, 9 de Septiembre de 2011

Fdo.: Dña M<sup>a</sup> Antonia Ferrús Pérez      Fdo.: Dña. Yolanda Moreno Trigós



Irene Cañigral Cárcel ha disfrutado de una ayuda Predoctoral de Formación de Personal Investigador (BES-2006-12326) del Ministerio de Educación y Ciencia para el desarrollo de la presente tesis doctoral llevada a cabo en la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Valencia.

Este trabajo ha sido co-financiado por:

- Proyecto de Investigación del Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL2005-07776-C03-1) “Desarrollo y validación de métodos moleculares para la detección rápida y caracterización epidemiológica de microorganismos patógenos emergentes de interés en seguridad alimentaria”.
- Proyecto de Investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2008-05275-C03-02) “Análisis integrado de riesgos en agua y alimentos para bacterias patógenas emergentes por métodos moleculares: Desinfección, supervivencia y trazabilidad”

La presente tesis doctoral está enmarcada en el programa de doctorado con mención de calidad de Biotecnología (Ministerio de Educación MCD2006-00536) de la Universidad Politécnica de Valencia.



***A mis padres, a Migue y a mis hermanos***





Con esta tesis pongo fin a una etapa muy especial, en la que he aprendido mucho y en la que mi corazón se ha llenado de miles de recuerdos. Por ello, quiero darles las gracias a muchas personas que se han cruzado en mi camino durante estos años y que ya estaban en él cuando comencé.

En primer lugar, agradecer a mis dos directoras de tesis, M<sup>a</sup> Antonia Ferrús y Yolanda Moreno, la oportunidad de trabajar con ellas.

Gracias M<sup>a</sup> Antonia por haber creído en mi, por ser el mejor ejemplo de que con trabajo y optimismo, los sueños se hacen realidad. Gracias por abrirme los ojos en muchas experiencias del laboratorio y de la vida. Espero haber superado las expectativas que tenías depositadas en mí. Espero no haberte defraudado.

Gracias Yoli, por ser, además de una jefa, una amiga. Gracias por ser tan cercana, por estar siempre dispuesta a todo y por todo lo que me has enseñado. Ha sido un placer trabajar contigo.

A los doctores Jose Luis Alonso e Inmaculada Amorós, por haberme hecho un hueco en el IIAMA, por su ayuda desinteresada. Gracias por hacerme sentir especial a vuestro lado.

A Manuel Hernández por poner siempre a mi disposición sus conocimientos de Microbiología.

A Jorge, Lore, Elodia y Pau, por haber sido mis amigos y compañeros durante estos cinco años y por los muy buenos momentos que hemos pasado juntos dentro y fuera del laboratorio.

A toda la gente del Área de Microbiología, por su ayuda, por sus consejos y por muchas cosas que son muy difíciles de explicar en unas pocas líneas.

## *Agradecimientos*

---

A mis padres, por su amor y apoyo incondicional, por que gracias a ellos soy lo que soy. Sois el mejor ejemplo a seguir, lo que más admiro y lo que más quiero. Gracias por darme todo. Os quiero mucho.

A mis 4 hermanos, Gerar, Marti, María y Julia, por ser tan especiales en mi vida y por el cariño y apoyo que me han dado y que me siguen dando incondicionalmente. Gracias por los momentos que hemos pasado juntos, por lo que nos hemos reído y llorado. Doy gracias por teneros como hermanos.

A Migue, mi marido, por querer formar parte de mi vida, por quererme como soy y por hacerme sentir mejor persona. Gracias por creer en mí, incluso más que yo. Te necesito, te quiero y mi vida, sin ti, ya no tendría sentido.

## ÍNDICES Y RESÚMENES



<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b>	1
<b>1. INTRODUCCIÓN AL GÉNERO VIBRIO</b>	3
1.1. Antecedentes históricos	3
1.2. Situación taxonómica actual	3
1.3. Morfología y características bioquímicas	5
1.4. Aspectos ecológicos	6
<b>2. <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i></b>	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
<b>3. <i>VIBRIO VULNIFICUS</i></b>	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

<b>4. MÉTODOS TRADICIONALES PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>VIBRIO SPP.</i>, <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> Y <i>VIBRIO VULNIFICUS</i></b>	<b>31</b>
4.1. Detección por cultivo	31
4.2. Identificación de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i>	32
<b>5. MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>VIBRIO SPP.</i>, <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> Y <i>VIBRIO VULNIFICUS</i></b>	<b>36</b>
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
<b>6. VALIDACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES</b>	<b>61</b>

---

<b>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)</b>	<b>65</b>
<b><u>OBJETIVOS</u></b>	<b>69</b>
<b><u>MATERIAL Y MÉTODOS</u></b>	<b>75</b>
<b>1. CEPAS BACTERIANAS</b>	<b>77</b>
1.1. Condiciones de cultivo	77
1.2. Conservación de cepas	77
<b>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</b>	<b>80</b>
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

<b>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)</b>	<b>83</b>
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
<b>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</b>	<b>89</b>
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
<b>5. PUESTA A PUNTO DE MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> Y <i>VIBRIO VULNIFICUS</i> MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL</b>	<b>94</b>
5.1. Curvas patrón para la cuantificación de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i>	94
<b>6. APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS DESARROLLADOS A LA DETECCIÓN EN MUESTRAS INOCULADAS ARTIFICIALMENTE</b>	<b>96</b>
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
<b>7. APLICACIÓN EN MUESTRAS DE ALIMENTOS DE ORIGEN MARINO Y AGUAS</b>	<b>111</b>
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
<b>8. DETERMINACIÓN DEL BIOTIPO DE LAS CEPAS DE <i>V. VULNIFICUS</i></b>	<b>113</b>
<b>9. AMPLIFICACIÓN DEL ADN MEDIANTE INICIADORES DE SECUENCIA ALEATORIA (“RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA” O RAPD)</b>	<b>114</b>
9.1. Análisis de los perfiles de bandas generados por RAPD	116
<b><u>RESULTADOS</u></b>	<b>119</b>
<b>1. 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</b>	<b>121</b>

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
<b>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)</b>	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
<b>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</b>	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

---

<b>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</b>	<b>172</b>
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

<b>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</b>	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
<b>6. DETERMINACIÓN DEL BIOTIPO DE LAS CEPAS DE <i>V. VULNIFICUS</i></b>	217
<b>7. ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE BANDAS GENERADOS POR RAPD</b>	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

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

## **INTRODUCCIÓN**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

<b>Tabla 1.</b> Cepas de referencia utilizadas	79
<b>Tabla 2.</b> 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**

<b>Tabla 1.</b> Alineamiento de secuencias de la sonda GV	129
<b>Tabla 2.</b> Alineamiento de secuencias de la sonda VIB	134
<b>Tabla 3.</b> Alineamiento de secuencias de las sondas VPA	138
<b>Tabla 4.</b> Alineamiento de secuencias de la sonda Vvul23S296	140
<b>Tabla 5.</b> Alineamiento de secuencias de la sonda Vvu3	140
<b>Tabla 6.</b> Alineamiento de secuencias de la sonda Vul23	143
<b>Tabla 7.</b> Alineamiento de secuencias de la sonda Vvran2	143
<b>Tabla 8.</b> Puntos de corte obtenidos de los cuatro ensayos y concentraciones calculadas para la PCR de <i>V. parahaemolyticus</i>	151
<b>Tabla 9.</b> Puntos de corte obtenidos de los cuatro ensayos y concentraciones calculadas para la PCR de <i>V. vulnificus</i>	158
<b>Tabla 10.</b> 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
<b>Tabla 11.</b> 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
<b>Tabla 12.</b> 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

<b>Tabla 13.</b> 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
<b>Tabla 14.</b> 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
<b>Tabla 15.</b> 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
<b>Tabla 16.</b> 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
<b>Tabla 17.</b> 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
<b>Tabla 18.</b> 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
<b>Tabla 19.</b> 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
<b>Tabla 20.</b> 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
<b>Tabla 21.</b> Procedencia de los aislados obtenidos en muestras de alimentos y resultados de los análisis realizados a cada uno de ellos para su caracterización	197
<b>Tabla 22.</b> Resultados de los análisis de muestras de alimentos mediante cultivo y PCR para la detección y cuantificación de <i>V. parahaemolyticus</i>	200
<b>Tabla 23.</b> Resultados de los análisis de muestras de alimentos mediante cultivo y PCR para la detección y cuantificación de <i>V. vulnificus</i>	202

<b>Tabla 24.</b> 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
<b>Tabla 25.</b> Resultados de los análisis de muestras de aguas mediante cultivo y PCR para la detección y cuantificación de <i>V. parahaemolyticus</i>	213
<b>Tabla 26.</b> Resultados de los análisis de muestras de aguas mediante cultivo y PCR para la detección y cuantificación de <i>V. vulnificus</i>	216



## **INTRODUCCIÓN**

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

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

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

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

## **RESULTADOS**

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

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

<b>Figura 25.</b> 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
<b>Figura 26 (A y B).</b> Ensayo de especificidad de la PCR a tiempo real para <i>V. vulnificus</i> usando la sonda TaqMan VVH-TM	162
<b>Figura 27 (A y B).</b> Ensayo de especificidad de la PCR a tiempo real para <i>V. vulnificus</i> usando la sonda TaqMan-LNA VVH-TM-LNA	163
<b>Figura 28.</b> Curva de amplificación para la PCR de <i>V. vulnificus</i> usando la sonda VVH-TM	164
<b>Figura 29.</b> Curva de amplificación para la PCR de <i>V. vulnificus</i> usando la sonda VVH-TM-LNA	165
<b>Figura 30.</b> 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
<b>Figura 31.</b> 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
<b>Figura 32.</b> Detección de <i>Vibrio spp.</i> mediante FISH en la dilución $10^6$ sin enriquecimiento empleando las sondas VIB (Cy3) y EUB (6-FAM)	173
<b>Figura 33.</b> 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
<b>Figura 34.</b> Límite de detección de la PCR de <i>Vibrio spp.</i> usando como matriz mejillón, antes del enriquecimiento	175
<b>Figura 35.</b> Límite de detección de la PCR de <i>Vibrio spp.</i> usando como matriz mejillón, tras enriquecimiento	175
<b>Figura 36.</b> Límite de detección de la PCR de <i>V. parahaemolyticus</i> usando como matriz mejillón, sin enriquecimiento	178

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

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

*Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* son microorganismos patógenos pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* y al género *Vibrio*. Son microorganismos con morfología ligeramente curvada, gram negativos y oxidasa positivos. En cuanto a sus aspectos ecológicos son halófilos, por tanto suelen estar presentes en aguas marinas costeras y en el interior de moluscos, crustáceos y peces, y tienden a encontrarse en aguas cálidas.

La patología que producen está asociada al consumo de mariscos, moluscos y pescado crudo o poco cocinado y a la exposición a aguas contaminadas. Ambas especies son consideradas patógenos emergentes debido al aumento en su incidencia y a la mayor distribución geográfica de los casos de intoxicación alimentaria, sobre todo en países asiáticos.

La detección e identificación de ambas especies en alimentos de origen marino y agua, presenta gran dificultad, ya que los procedimientos convencionales son largos y tediosos, y pueden proporcionar falsos negativos. Los métodos de detección molecular pueden suponer una alternativa más rápida, sensible y fiable.

Debido a esto, en este trabajo se han desarrollado métodos de detección y cuantificación de *Vibrio spp.*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* mediante PCR tradicional, PCR a tiempo real e hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) para su aplicación en matrices alimentarias y en agua. Los resultados muestran que la PCR a tiempo real es el método más rápido y sensible para la detección de las diferentes especies estudiadas, además de permitir la cuantificación del microorganismo en las muestras de forma fiable.

En este estudio se han aplicado los distintos métodos a matrices ambientales (agua de playa y agua residual) y a alimentos de origen marino. En este trabajo hemos demostrado la presencia

de bacterias del género *Vibrio* en ambos tipos de matrices y el potencial de aguas y alimentos de origen marino para actuar como vehículos de transmisión de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*.

Nuestros resultados sobre la presencia de éstos patógenos en ambos tipos de muestras son lo suficientemente relevantes como para considerar que *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* podrían suponer un riesgo para la salud humana en nuestra área geográfica.



*Vibrio parahaemolyticus* i *Vibrio vulnificus* són microorganismes patògens pertanyents a la família *Vibrionaceae* i al gènere *Vibrio*. Són microorganismes amb morfologia lleugerament corbada, gram negatius i oxidasa positius. Quant als seus aspectes ecològics són halòfils, per tant solen estar presents en aigües marines costaneres i a l'interior de mol·luscs, crustacis i peixos, i tendeixen a trobar-se en aigües càlides.

La patologia que produeixen està associada al consum de mariscs, mol·luscs i peix cru o poc cuinat i a l'exposició a aigües contaminades. Ambdós espècies són considerades patògens emergents a causa de l'augment en la seva incidència i la major distribució geogràfica dels casos d'intoxicació alimentària, sobretot en països asiàtics.

La detecció i identificació d'ambdós espècies en aliments d'origen marí i aigua, presenta gran dificultat, ja que els procediments convencionals són llargs i tediosos, i poden proporcionar falsos negatius. Els mètodes de detecció molecular poden suposar una alternativa més ràpida, sensible i fiable.

A causa d'això, en aquest treball s'han desenvolupat mètodes de detecció i quantificació de *Vibrio spp.*, *Vibrio parahaemolyticus* i *Vibrio vulnificus* mitjançant PCR tradicional, PCR a temps real i hibridació *in situ* amb sondes fluorescents (FISH) per a la seva aplicació en matrius alimentàries i en aigua. Els resultats mostren que la PCR a temps real és el mètode més ràpid i sensible per la detecció de les diferents espècies estudiades, a més de permetre la quantificació del microorganisme en les mostres de forma fiable.

En aquest estudi s'han aplicat els diferents mètodes a matrius ambientals (aigua de platja i aigua residual) i aliments d'origen

marí. En aquest treball hem demostrat la presència de bacteris del gènere *Vibrio* en ambdós tipus de matrius i el potencial d'aigües i aliments d'origen marí per actuar com a vehicles de transmissió de *V. parahaemolyticus* i *V. vulnificus*.

Els nostres resultats sobre la presència d'aquests patògens en ambdós tipus de mostres són prou rellevants com per considerar que *V. parahaemolyticus* i *V. vulnificus* podrien suposar un risc per a la salut humana en la nostra àrea geogràfica.

*Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* are pathogenic microorganisms belonging to the *Vibrionaceae* family and the genus *Vibrio*. They are microorganisms with morphology curved, gram negative and oxidase positive. Regarding environmental aspects, both species are halophilic, so often present in coastal marine waters and within molluscs, crustaceans and fish, and they are usually found in warm waters.

The pathology is produced by consumption of seafood, shellfish and raw or undercooked fish and exposure to contaminated water. Both species are considered emerging pathogens due to the increase in incidence and geographic distribution of most food poisoning cases, especially in Asian countries.

The detection and identification of both species in seafood and water, has high difficulty, since the conventional methods are long and tedious, and can provide false negatives. Molecular detection methods can make a faster alternative, sensitive and reliable.

Because of this, in this work we have developed methods of detection and quantification of *Vibrio spp.*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* by traditional PCR, real-time PCR and *in situ* hybridization with fluorescent probes (FISH) for use in food samples and in water. The results show that real-time PCR is more rapid and sensitive method for detecting the different species studied, and allows the quantification of microorganisms in samples reliably.

In this study, various methods have been applied to environmental samples (beach water and waste water) and seafood. In this study, we demonstrated the presence of *Vibrio* bacteria in both types of samples and potential water and

seafood to act as vehicles for transmission of *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*.

Our results on the presence of these pathogens in both types of samples are relevant enough to consider that *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* may pose a risk to human health in our geographic area.

**ABREVIATURAS EMPLEADAS**

<b>6-FAM</b>	6-carboxyfluoresceína
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>APW 2% NaCl</b>	Agua de Peptona Alcalina adicionada con 2% de NaCl
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNr</b>	Ácido ribonucleico ribosómico
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention
<b>CTAB</b>	Bromuro de cetil-trimetil-amonio
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótidos trifosfato
<b>EDAR</b>	Estación Depuradora de Agua Residual
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético.
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FISH</b>	Hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes ( <i>Fluorescent in situ Hybridization</i> )
<b>g</b>	Gramo
<b>G+C</b>	Guanina+Citosina
<b>IDSC</b>	Infectious Disease Surveillance Center
<b>Kb</b>	Kilobases (1000 pb)
<b>M</b>	Molar
<b>min</b>	Minuto
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mTSA 2% NaCl</b>	Agar Triptona y Soja modificado adicionado con el 2% de NaCl
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa

## *Abreviaturas empleadas*

---

	<i>(Polymerase Chain Reaction)</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SEIMC</b>	Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
<b>t</b>	Tiempo
<b>T<sup>a</sup></b>	Temperatura
<b>TAE</b>	Tris-acético-EDTA
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>U</b>	Unidades
<b>u.f.c.</b>	Unidades formadoras de colonia
<b>UPV</b>	Universidad Politécnica de Valencia
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>V</b>	Voltios
<b>VNC</b>	Viable No Cultivable
<b>μl</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar

# INTRODUCCIÓN





## 1. INTRODUCCIÓN AL GÉNERO *VIBRIO*

### 1.1. Antecedentes históricos

En 1854, el médico italiano Filippo Pacine describió el primer *Vibrio*, *Vibrio cholerae* (agente causante del cólera), mientras estudiaba los brotes de esta enfermedad en Florencia.

En el año 1951, investigadores japoneses encabezados por Fujino identificaron por primera vez a *Vibrio parahaemolyticus* como el causante de intoxicación alimentaria. Esto ocurrió durante la aparición de un brote epidémico en la provincia de Isaka en el cual hubo 272 personas afectadas, con 20 fallecidos. El brote se asoció al consumo de sardinas crudas.

Numerosos brotes de intoxicaciones alimentarias y casos esporádicos de *Vibrio parahaemolyticus* se fueron sucediendo en EEUU, Europa y Asia, pero no fue hasta 1969 en que este microorganismo se consideró un problema de salud pública. Desde entonces ha adquirido un papel cada vez más importante como agente causal de infección gastrointestinal relacionada con el consumo de mariscos crudos o insuficientemente cocidos (Kaysner y DePaola, 2001).

### 1.2. Situación taxonómica actual

La familia *Vibrionaceae* ha sido sometida a un intenso estudio desde la publicación en 1984 de la primera edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1984). En el capítulo sobre la familia *Vibrionaceae* de la citada edición, Baumann y Shubert incluyeron los géneros *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*. Son los mismos géneros incluidos en la clasificación original de la familia

propuesta por Véron casi veinte años antes, basándose en el fundamento de agrupar bajo una misma familia aquellos géneros cuyas especies fueran oxidasa positiva y móviles por un flagelo polar (Véron, 1965).

El criterio empleado para agrupar un determinado grupo de bacterias en el género *Vibrio* era su constitución morfológica, bacilos cortos y curvados. Sin embargo, con el paso de los años muchas de las especies que inicialmente formaban parte de este género, fueron clasificadas en otros géneros. Por ejemplo, *Vibrio fetus* (Smith y Taylor, 1919) se clasifica en la actualidad dentro del género *Campylobacter* (Sebald y Véron, 1963) como *Campilobacter fetus* y sin embargo presenta la constitución típica morfológica definida para el género *Vibrio*.

Durante muchos años se especuló acerca de la taxonomía del género *Vibrio*. Tres técnicas introducidas entre 1960 y 1970 ayudaron a la comprensión de su filogenia: hibridación DNA-DNA, hibridación rRNA-DNA y el estudio de los perfiles proteicos (Farmer y Hickman-Brenner, 1992; Baumman et al., 1984). Numerosos autores se han basado especialmente en el estudio de las secuencias 16 rRNA del género *Vibrio* (Gómez-Gil et al., 2008; Thompson et al., 2003; Lambert et al., 1998; Cerdà-Cuéllar et al., 1997; Raguénès et al., 1997; Aznar et al., 1994;).

En la segunda edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2005), la familia *Vibrionaceae* incluye 3 géneros: *Vibrio*, *Photobacterium* y *Salinivibrio*. El género *Vibrio* incluye, a su vez, 44 especies.

La taxonomía del género *Vibrio* está en constante revisión. En la actualidad la familia *Vibrionaceae* cuenta con 7 géneros y el género *Vibrio* incluye 87 especies

(<http://www.vibriobiology.net>), de las cuales al menos 12 de ellas son patógenas para el hombre y varias son también patógenas para animales, tanto vertebrados como invertebrados.

### 1.3. Morfología y características bioquímicas

Los microorganismos de este género son bacilos Gram negativos, cortos, curvados o ligeramente curvados, o incluso que se asemejan a una coma, miden entre 0,5 y 0,8  $\mu\text{m}$  de ancho y entre 1,4 y 2,6  $\mu\text{m}$  de largo. La curvatura es más pronunciada en la fase estacionaria inicial en medios líquidos que durante el crecimiento exponencial (Baumann *et al.*, 1984). Sin embargo, algunos *Vibrios* marinos presentan cierta tendencia al pleomorfismo cuando crecen en medios líquidos, de forma que bacilos con formas irregulares coexisten con células con forma de L (Onarheim *et al.*, 1994). Otras especies halófilas, incluidas las relacionadas con enfermedades humanas, pueden adoptar formas esféricas o alargadas y delgadas como respuesta a bajas concentraciones de NaCl (Onarheim *et al.*, 1994).

Se presentan como células simples, en forma de S, en parejas o a veces en cadenas cortas, no producen esporas, son bacterias móviles por la presencia de uno o varios flagelos polares, aunque en medio sólido muchas pueden producir flagelos laterales (Baumann *et al.*, 1984).

Las especies de *Vibrio* difieren en sus requerimientos nutritivos y condiciones de cultivo. La característica más importante es su dependencia del ion sodio. Las concentraciones mínimas requeridas de  $\text{Na}^+$  para conseguir un crecimiento óptimo se encuentran dentro de un rango que va desde 5-15 mM (0,029-0,087%) para *Vibrio cholerae* y *Vibrio metschnikovii*, a 1,5 M para *Vibrio alginolyticus* (Miyamoto *et al.*, 1961). La mayoría de especies crecen bien

en medios sólidos o líquidos con una concentración de 0,5-2% de NaCl.

Algunos vibrios crecen en condiciones ligeramente alcalinas. Aunque la mayoría de las especies prefiere un pH de rango 7-8 (Raguénès *et al.*, 1997a), algunas especies, incluyendo *Vibrio cholerae* y *Vibrio metschnikovii*, crecen incluso a un pH de 10 (Baumann *et al.*, 1984).

Respecto a las exigencias de temperatura, también existe una gran variabilidad. La mayoría de las especies de *Vibrio* crecen bien a temperaturas entre 18-22°C. Algunas especies crecen a 0-4°C, mientras que otras pueden crecer a temperaturas superiores a los 45°C. La temperatura a la cual pueden crecer las diferentes especies de *Vibrio* depende de factores como la concentración de NaCl (Onarheim *et al.*, 1994).

Son quimiorganotrofos y anaerobios facultativos, generando diversos ácidos durante la fermentación, como el ácido fórmico, láctico, acético, succínico y pirúvico (Baumann *et al.*, 1984). La mayoría de los vibrios fermentan azúcares como la glucosa, fructosa o maltosa sin que se produzca formación de gas. Son oxidasa positivos y reducen los nitratos a nitritos.

### **1.4. Aspectos ecológicos**

Las aguas marinas costeras son el hábitat natural de la mayoría de las especies del género *Vibrio*. Los factores medioambientales que determinan la presencia y la concentración de estos microorganismos son la temperatura, el pH, la disponibilidad de nutrientes, su asociación con animales marinos y la exposición a la radiación ultravioleta (Chakraborty *et al.*, 1997). Sin embargo, la salinidad, es el factor más importante y el que determina la distribución de las distintas especies del género en el medio ambiente. El

rango de concentración salina tolerable es de 5-700 mM; su amplitud explica por qué *V. cholerae*, *Vibrio mimicus*, *V. fluvialis* y *V. furnissii* han sido aislado de ríos de agua dulce, arroyos y estanques. Otras especies como *Vibrio vulnificus* prefieren una concentración de Na<sup>+</sup> moderada y se encuentran en las zonas costeras (Motes *et al.*, 1998; Chakraborty *et al.*, 1997; Kaysner *et al.*, 1987). A pesar de que la salinidad es un parámetro determinante, no explica completamente la distribución en el medio ambiente de todos los vibrios, porque especies halófilas, como *Vibrio parahaemolyticus*, pueden sobrevivir con concentraciones de Na<sup>+</sup> bajas.

Independientemente de la salinidad, la concentración de estos microorganismos tiende a aumentar en aguas más cálidas cuando existe una adecuada disponibilidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos. Su presencia es más común en zonas con climas templados o tropicales. Estudios realizados acerca de la presencia de *Vibrio vulnificus* en ostras en el Golfo de Méjico y en la costa Atlántica indicaron que la concentración de esta especie era muy elevada durante los meses de Mayo a Octubre, mientras que la concentración disminuía hasta finales de Marzo (Motes *et al.*, 1998).

## 2. VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS

### 2.1. Introducción

En 1953, Fujino *et al.* identificaron por primera vez a *Vibrio parahaemolyticus* como causante de enfermedad alimentaria.

El consumo de pescados y mariscos crudos o poco cocinados contaminados por *V. parahaemolyticus* puede ocasionar procesos agudos de gastroenteritis. Aunque suele ser autolimitada, la infección puede producir septicemia, causando la muerte a personas inmunodeficientes, y especialmente a aquellas con enfermedades del hígado.

Actualmente *V. parahaemolyticus* es reconocido como la principal causa de gastroenteritis en humanos asociada al consumo de marisco en Estados Unidos, y un importante patógeno alimentario en todo el mundo (Kaysner y DePaola, 2001).

### 2.2. Características microbiológicas de *Vibrio parahaemolyticus*

*Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria perteneciente a la familia *Vibrionaceae* y al género *Vibrio*. Es gram negativo, halófilo, con forma bacilar, que puede ser recta o curvada. Tiene un único flagelo polar y es móvil cuando la bacteria es cultivada en un medio líquido (medio Baumann and Schubert, 1984). Las condiciones óptimas de crecimiento son una temperatura de 37°C, pH entre 7,8 y 8,6, condiciones atmosféricas aeróbicas y una concentración de NaCl del 3%. Esta bacteria crece normalmente en ambientes marinos y con frecuencia se aísla de gran variedad de pescados y mariscos, tales como el bacalao, la sardina, la caballa, el

lenguado, pulpo, camarón, almeja, cangrejo, langosta, viera y ostras (Liston, 1990).

### **2.3. Ecología de *Vibrio parahaemolyticus***

#### **2.3.1. Distribución en entornos marinos**

La variable distribución de *Vibrio parahaemolyticus* en el ambiente marino es debida a la temperatura del agua. Diversos estudios han demostrado que este microorganismo se encuentra en agua de mar cuando la temperatura sea mayor a 15°C, aumentando en número en las estaciones cálidas. Estudios ecológicos realizados en la bahía de Chesapeake de Maryland (Estados Unidos) aportaron datos sobre la supervivencia de *V. parahaemolyticus* en los sedimentos durante el invierno, observando que, tras el aumento de la temperatura del agua a la llegada de la primavera, el microorganismo crecía más rápidamente (Kaneko and Colwell, 1973). Otros autores que llevaron a cabo estudios en nueve estados ribereños de EE.UU. entre los años 1984 y 1985, obtuvieron datos de densidades de *Vibrio parahaemolyticus* cuando la temperatura del agua descendía de 16°C. Estas densidades no eran mayores a 4 células/100 ml de agua de mar (DePaola *et al.*, 1990). Sin embargo, las densidades de *V. parahaemolyticus* en agua de mar aumentaban a 1000 células/100 ml cuando la temperatura del agua llegaba a 26°C (DePaola *et al.*, 1990; Kaneko y Colwell, 1973).

Un estudio sobre la presencia de *V. parahaemolyticus* en ostras cultivadas, realizado en Oregón entre noviembre de 2002 y octubre de 2004, encontró también correlación positiva entre la densidad de *V. parahaemolyticus* y la temperatura del agua, detectando un aumento muy

considerable de células de *V. parahaemolyticus* durante los meses de verano (Duan y Su, 2005a).

### **2.3.2. Prevalencia en mariscos y pescados**

El grado de contaminación de los mariscos y pescados por *Vibrio parahaemolyticus* también se relaciona directamente con la temperatura del agua. Es más probable detectar *V. parahaemolyticus* en mariscos y pescados cosechados en las estaciones más cálidas que en las estaciones más frías (Kaysner y DePaola, 2000). Aunque la densidad de *V. parahaemolyticus* en ostras contaminadas suele ser inferior a  $10^3$  u.f.c./g, podría sobrepasar este valor, ya que *Vibrio parahaemolyticus* se multiplica rápidamente cuando está expuesto a temperaturas elevadas (De Paola *et al.*, 2000). Diversos estudios han demostrado que las poblaciones de *V. parahaemolyticus* en ostras sin refrigeración pueden aumentar rápidamente de 50 a 800 veces su nivel original después de 24 horas a 26°C (Gooch *et al.*, 2002).

En muestreos realizados en EE.UU. desde junio de 1998 hasta julio de 1999 de más de 370 lotes de ostras distribuidos en restaurantes y mercados de marisco y pescados al por menor y al por mayor, se encontraron crecimientos estacionales de *V. parahaemolyticus*, donde las mayores densidades del microorganismo se dieron en los meses que correspondían a las estaciones estivales (Cook *et al.*, 2002).

### **2.4. Cepa emergente de *Vibrio parahaemolyticus***

Estudios realizados en los últimos años por diferentes grupos de trabajo confirman que la mayoría de infecciones provocadas actualmente por *Vibrio parahaemolyticus* son debidas al serotipo emergente O3:K6 (González-Escalona *et al.*, 2005; Martínez-Urtaza *et al.*, 2005, Chiou *et al.*, 2000;



Vuddhakul *et al.*, 2000). La primera vez que fue identificado este serotipo fue en un hospital de Calcuta, India, durante un estudio entre los años 1994 y 1996, de forma que este serovar llegó a ser el responsable del 63% de las infecciones estudiadas en Calcuta desde septiembre de 1996 hasta abril de 1997 (Okuda *et al.*, 1997).

En otros países del Sudeste Asiático se ha demostrado también la virulencia de este nuevo serotipo, ya que se ha aislado en diferentes personas que viajaron a Japón procedentes de otros países (Chiou *et al.*, 2000; Vuddhakul *et al.*, 2000; Okuda *et al.*, 1997).

En EE.UU., *V. parahaemolyticus* O3:K6 fue identificado por primera vez en 1998 cuando causó el brote con mayor número de casos (416) asociado al consumo de ostras (Daniels *et al.*, 2000b). Este mismo serovar participó más tarde en otro brote relacionado con el consumo de marisco en Connecticut, Nueva Jersey y Nueva York (CDC, 1999). En 2004, *V. parahaemolyticus* O3:K6 se aisló en un brote producido en Chile (González-Escalona *et al.*, 2005) y en España (Martínez-Urtaza *et al.*, 2005). Desde entonces, se ha producido una propagación de esta cepa a distintos países.

Las infecciones transmitidas por alimentos causadas por *Vibrio parahaemolyticus*, particularmente por el serotipo O3:K6, ha aumentado globalmente en los últimos 10 años. La FDA (Food and Drug Administration, EE.UU.) ha llevado a cabo proyectos para evaluar el impacto que tiene este microorganismo sobre la salud pública y ha detectado deficiencias en los procesos de post-cosecha, recogida, procesamiento y consumo de ostras crudas (Su *et al.*, 2007). El aislamiento de las cepas O3:K6 en los distintos brotes de EE.UU., Chile, España y otros países ha comenzado a provocar

una gran preocupación, debido al aumento del riesgo de infecciones de *V. parahaemolyticus* por el consumo de ostras.

## 2.5. Epidemiología

### 2.5.1. Incidencia en Asia, Estados Unidos y Europa

*V. parahaemolyticus* es considerado un patógeno alimentario causante del 20-30% de los casos de toxi-infección por consumo de pescados y mariscos en muchos países asiáticos (Deepanjali *et al.*, 2005; Alam *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1991). *V. parahaemolyticus* fue el principal causante de enfermedad alimentaria, con 1710 incidencias y 24.373 casos, en Japón entre 1996 y 1998 (IDSC, 1999), representó el 69% del total de toxi-infecciones de origen alimentario producidas en Taiwán entre 1981 y 2003 (Anónimo, 2005) y el 31,1% en China entre 1991 y 2001 (Liu *et al.*, 2004).

En Maryland (EE.UU.), después de provocar un brote con tres focos y 425 casos de gastroenteritis por consumo de cangrejos cocidos, *V. parahaemolyticus* fue reconocido como uno de los principales agentes causales de infecciones alimentarias (Molenda *et al.*, 1972).

Entre 1973 y 1998, los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) registraron 40 brotes producidos por *V. parahaemolyticus* (Daniels *et al.*, 2000a). Entre ellos, cuatro brotes importantes provocaron más de 700 enfermos, debido al consumo de ostras en la costa del Golfo, el Pacífico Noroeste y en el Atlántico Nordeste, entre 1997 y 1998. En el verano de 1997 se produjeron 209 casos de infección y una muerte asociados al consumo de ostras en el Noroeste del Pacífico (Oregón, Washington, California y la Columbia Británica de Canadá) (CDC, 1998). En 1998, se produjeron dos

brotos en Washington, con 43 casos, y en Texas, con 416 casos, asociados también al consumo de ostras crudas (DePaola *et al.*, 2000). Además, un pequeño brote provocó 8 casos en Connecticut, Nueva Jersey y Nueva York entre julio y septiembre en 1998. Estas infecciones fueron relacionadas con el consumo de ostras y almejas cosechadas en Long Island en Nueva York (CDC, 1999). Durante el verano de 2004, 14 pasajeros de un crucero de Alaska desarrollaron un cuadro de gastroenteritis después de comer ostras crudas (McLaughlin *et al.*, 2005). En el verano del año 2006, un brote por *Vibrio parahaemolyticus* provocó 177 enfermos. Este brote fue asociado al consumo de ostras contaminadas en Washington y la Columbia Británica (CDC, 2006). La aparición de todos estos brotes indican que la contaminación de ostras por *Vibrio parahaemolyticus* es un peligro para la seguridad alimentaria en EE.UU.

En Europa *Vibrio parahaemolyticus* raramente provoca toxi-infecciones alimentarias. Sin embargo, se han producido casos esporádicos en países como España y Francia. En España, en 1989, se registraron ocho casos de gastroenteritis provocados por *V. parahaemolyticus* asociados al consumo de pescado y marisco (Molero *et al.*, 1989). En 1999 en Galicia se produjo un brote de 64 toxi-infecciones asociadas al consumo de ostras crudas (Lozano-León *et al.*, 2003). En Francia, en 1997, se confirmó un brote que afectó a 44 personas, debido al consumo de camarones importados de Asia (Robert-Pillot *et al.*, 2004).

Más recientemente, en A Coruña, en julio de 2004, se produjo un brote provocado por *Vibrio parahaemolyticus* que afectó a 80 personas. La infección se produjo entre los invitados de una boda debido al consumo de cangrejo cocido procesado en condiciones insalubres en un restaurante (Martínez-Urtaza *et al.*, 2005).

### **2.5.2. Transmisión de *Vibrio parahaemolyticus***

Los mariscos, especialmente los moluscos bivalvos como ostras y almejas, acumulan grandes cantidades del microorganismo. Los crustáceos y pescados no acumulan la cantidad de *V. parahaemolyticus* necesaria para causar infección, pero pueden alcanzar un número elevado de éste al dejarse sin adecuada refrigeración durante unas pocas horas.

La enfermedad se transmite por ingestión de cualquier alimento contaminado crudo o mal cocinado. También se puede transmitir por contaminación cruzada, al ingerir cualquier alimento que haya tenido contacto con mariscos o agua contaminada (CDC, 2006). La enfermedad no es trasmisible de persona a persona (Paris *et al.*, 2005).

El transporte o almacenamiento de los productos marinos en las condiciones adecuadas de refrigeración e higiene favorecen la proliferación de la bacteria y, por tanto, la posibilidad de infección (CDC, 2006).

Se considera que la toxi-infección producida por *V. parahaemolyticus* puede producirse con una ingesta de 1.000.000 de vibriones viables (D'Mello, 2003).

### **2.5.3. Tipos de infecciones producidas por *Vibrio parahaemolyticus***

La infección producida por *Vibrio parahaemolyticus* causa tres entidades clínicas reconocidas: gastroenteritis, septicemia e infección de heridas.

El cuadro clínico provocado por *V. parahaemolyticus* cursa principalmente como **gastroenteritis**. El periodo de

incubación de la infección gastrointestinal es de 4 a 96 horas, con un promedio de 15 horas. La rapidez con la que se presenta el cuadro clínico sugiere la participación de una enterotoxina (Paris *et al.*, 2005). Los síntomas clínicos de la infección incluyen diarrea acuosa y cólicos abdominales, que pueden acompañarse de náuseas, vómitos, fiebre y cefalea (Honda y Lida, 1993).

Generalmente el cuadro es autolimitado, la persona se recupera en un periodo medio de 72 horas, pudiendo variar entre 1 y 10 días, dependiendo del inmunocompromiso del individuo infectado. En los casos más severos puede producirse un síndrome disentérico, caracterizado por heces sanguinolentas y fiebre alta (Silva *et al.*, 2007).

La **septicemia primaria** es causada por la entrada del microorganismo al torrente sanguíneo a través de la vena porta o el sistema linfático intestinal; los primeros síntomas incluyen fiebre, hipotensión, compromiso del estado general, escalofríos y ocasionalmente se producen náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal. La incidencia es baja, pero su severidad y mortalidad es elevada. Muchos estudios demuestran que los individuos sanos tienen un bajo riesgo de desarrollar septicemia. Sin embargo, personas con enfermedades crónicas hepáticas, renales, diabetes, neoplasias o aclorhidria poseen mayor riesgo de desarrollar septicemia primaria presentando un porcentaje de mortalidad elevada (Silva *et al.*, 2007).

Las **infecciones de heridas** pueden ocurrir cuando existen lesiones cutáneas, quemaduras o cortes preexistentes que entran en contacto con agua de mar o especies marinas contaminadas por el patógeno. El cuadro se caracteriza por una lesión en la piel que se desarrolla durante las primeras 24 horas posteriores al contacto con el patógeno. El sitio

donde comienza la infección presenta inicialmente eritema extremadamente edematoso, luego progresa rápidamente a una lesión con vesículas y finalmente evoluciona a necrosis que involucra la piel y la grasa subcutánea. Estas infecciones de la piel pueden producirse tanto en personas sanas como aquellos con enfermedades existentes (Silva *et al.*, 2007). Tras el huracán Katrina en el año 2005 se registraron dos muertes entre tres casos de infecciones de heridas causada por *V. parahaemolyticus* en Louisiana y Mississippi (CDC, 2005).

La principal medida de tratamiento de la gastroenteritis es la hidratación. El tratamiento antibiótico en la mayoría de los casos es innecesario, puesto que no hay evidencia de que disminuya la severidad o duración del cuadro intestinal. No obstante, en los casos severos, infecciones de piel o septicemia, se pueden usar antibióticos bajo estricta prescripción médica como ciprofloxacino, doxicilina, tetraciclina, ampicilina y cefalosporinas de tercera generación, dependiendo de la susceptibilidad del microorganismo (Silva *et al.*, 2007).

#### **2.5.4. Susceptibilidad del hospedador**

Los factores del hospedador tales como el estado de salud general, presencia de alguna enfermedad subyacente, el estado nutricional, o estrés físico parecen jugar un papel importante en la respuesta del individuo a las infecciones producidas por *Vibrio parahaemolyticus*. Los factores intrínsecos como la edad, el sexo y la genética influyen también en la susceptibilidad de un individuo a la enfermedad. El estado inmunológico, especialmente en aquellas personas que están inmunocomprometidas debido a enfermedad o tratamientos médicos pueden influir en presencia y/o severidad de la enfermedad. Sin embargo, la

relación del estado inmunológico con la colonización y la infección inicial del tracto gastrointestinal está menos clara (FDA, 2005).

## 2.6. Patogénesis

### 2.6.1. Factores de virulencia de *Vibrio parahaemolyticus*

Los dos factores de virulencia más importantes de *V. parahaemolyticus* son la hemolisina directa termoestable (tdh) y la hemolisina relacionada con la hemolisina directa termoestable (trh), que están codificadas por los genes *tdh* y *trh* respectivamente. Ambas hemolisinas comparten varias propiedades biológicas, incluidas la actividad hemolítica, enterotoxigenicidad y la citotoxicidad (Park *et al.*, 2004a) y se han considerado como marcadores moleculares para diferenciar las cepas virulentas de las no virulentas (Oliver y Kaper, 2001).

Se sabe que la mayoría de las cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas del medio ambiente o de alimentos de origen marino no son patógenos (Nishibuchi y Kapper, 1995; FDA, 2005). Las cepas clínicas de *V. parahaemolyticus* se diferencian de las cepas aisladas del medio ambiente por su capacidad de producir la tdh, enzima que puede lisar los glóbulos rojos o eritrocitos en placas de agar sangre Wagatsuma (contiene eritrocitos humanos). La actividad hemolítica de tdh se denomina fenómeno Kanagawa, y se sabe que está asociada comúnmente con las cepas aisladas de humanos con gastroenteritis mientras que se observa raramente en cepas aisladas del medio ambiente (Joseph *et al.*, 1982). Además, estudios epidemiológicos revelan una fuerte asociación entre el fenómeno Kanagawa y la gastroenteritis (Okuda *et al.*, 1997; Shirai *et al.*, 1990). Por ello, la hemolisina directa

termoestable ha sido propuesta como el factor de virulencia más importante de *V. parahaemolyticus* (Takeda, 1983; Miyamoto *et al.*, 1969).

Diversos trabajos han revelado un vínculo entre el fenómeno Kanagawa (KP) y la patogénesis de *V. parahaemolyticus*: cepas clínicas KP negativas no producen la tdh, sino que producen la trh (Honda *et al.*, 1987, 1988). Shirai *et al.* (1990) examinaron 215 cepas clínicas aisladas de pacientes con diarrea para ver la presencia de las hemolisinas directa (tdh) y relacionada (trh). Se encontró que 112 cepas (52,3%) poseían el gen *tdh*, 52 (24,3%) poseían el gen *trh* y 24 cepas (11,2%) poseían ambos genes *tdh* y *trh*. Estos resultados indican que la trh también es un factor de virulencia relevante de *V. parahaemolyticus*.

Los genes que codifican las tdh y trh han sido clonados y secuenciados (Kaper *et al.*, 1984; Nishibuchi y Kaper, 1985; Taniguchi *et al.*, 1985). También se han desarrollado sondas de oligonucleótidos para ambos genes, con el fin de detectar la virulencia de las cepas de *V. parahaemolyticus* (Nishibuchi *et al.*, 1986; Kaper *et al.*, 1984) mediante PCR.

Aunque la patogénesis está básicamente relacionada con la presencia de estas dos hemolisinas, existen otros factores de virulencia que son identificados con frecuencia en cepas patógenas de *V. parahaemolyticus*. Recientemente fue identificada una proteína termolábil llamada serina proteasa, en una cepa clínica de *V. parahaemolyticus* en la que no estaban presentes los genes *tdh* y *trh*, por lo que fue considerada como un factor de virulencia potencial. La proteasa purificada inoculada en hámsteres chinos tuvo efectos significativos, ya que producía lisis de eritrocitos, hemorragia en tejidos y la muerte de los ratones cuando se inyectaba tanto por vía intraperitoneal como por vía



intravenosa. Sin embargo, la clínica e incidencia medioambiental de las cepas poseedoras de esta proteasa no se han determinado (Lee *et al.*, 2002).

### **3. VIBRIO VULNIFICUS**

#### **3.1. Introducción**

*V. vulnificus* se aisló por primera vez en 1964 en Estados Unidos, aunque en el momento en que fue aislado fue erróneamente identificado como una cepa virulenta de *V. parahaemolyticus*. La especie *V. vulnificus* se reconoció como una especie distinta en la década de 1970 y fue validada en 1980 por Farmer, cuando se observó que muchos casos clínicos de septicemias transmitidas por los alimentos e infecciones de heridas eran causadas por un patógeno con características únicas que no tenían el resto de especies del género *Vibrio* (Hollis *et al.*, 1976).

El número de personas infectadas en el mundo por *V. vulnificus* es bajo en comparación con otros vibrios, pero este microorganismo es responsable de un porcentaje significativo de las enfermedades relacionadas con *Vibrio* en los Estados Unidos (Hlady W.G., 1997; Bonner *et al.*, 1983). Además, la gravedad de la enfermedad que produce la convierte en la principal causa de las muertes asociadas a los mariscos en los Estados Unidos (Morris Jr. J.G., 1988; Morris *et al.*, 1985) aunque hay, en promedio, sólo un total de 50 casos confirmados al año de infecciones debidas a *V. vulnificus*. La relación de las infecciones de *V. vulnificus* con el consumo de marisco y pescado también tiene un efecto adverso en el mercado de estos productos. Las muertes atribuidas a *V. vulnificus* por el consumo de ostras crudas son frecuentes. Esto puede reducir la confianza de los consumidores, lo que lleva a la pérdida de ventas y daños

económicos posteriores a la industria del marisco, incluso en áreas donde *V. vulnificus* no es generalmente considerado un problema (Mackenzie *et al.*, 1997).

### **3.2. Características microbiológicas de *Vibrio vulnificus***

*Vibrio vulnificus* es una bacteria perteneciente al género *Vibrio*; es móvil y posee un único flagelo polar. Al ser tolerante a la sal, prospera en el agua marina, especialmente en zonas cálidas. Es gram negativa, con forma bacilar o de bastoncillo, y no forma esporas ni cápsulas. Se distingue de otros miembros del género *Vibrio* por su capacidad de fermentar la lactosa y soporta alcalinidades relativamente elevadas, hasta el pH 9.

### **3.3. Ecología de *Vibrio vulnificus***

*V. vulnificus* habita en estuarios y ambientes marinos de todo el mundo (Baffone *et al.*, 2001; Hoy *et al.*, 1998; Shapiro *et al.*, 1998; Dalsgaard *et al.*, 1996; Veenstra *et al.*, 1994; Maxwell *et al.*, 1991; Myatt *et al.*, 1989). Prefiere los climas tropicales y subtropicales, y ha sido aislado de aguas donde la temperatura oscila entre 9 y 31°C. Suele proliferar en todas las zonas costeras durante los meses en los que la temperatura del agua supera los 18°C (Hlady *et al.*, 1996; Kaspar *et al.*, 1993).

En Estados Unidos se suele encontrar en las costas de los estados que bordean el Golfo de Méjico, aunque también ha sido aislado en zonas de Nueva Inglaterra y la costa norte del Pacífico (O'Neill *et al.*, 1992). *V. vulnificus* suele estar presente en las zonas donde la salinidad es de baja a moderada (rango de salinidad de 15-25 ppm). La salinidad superior a 25 ppm suele tener un efecto adverso en la supervivencia de *V. vulnificus* (Motes *et al.*, 1996; Kaspar *et*

*al.*, 1993), aunque ha sido aislado de aguas costeras con 34 ppm de sal (Motes *et al.*, 1998).

El número total de células viables de *V. vulnificus* aumenta o disminuye con la temperatura del agua. A temperaturas por debajo de 10°C, el número de células se reduce a niveles casi indetectables (Kaysner *et al.*, 1987; Oliver *et al.*, 1982). La hipótesis es que *V. vulnificus* sobrevive en un estado viable pero no cultivable (VNBC) en los sedimentos marinos (Oliver *et al.*, 1995). Los experimentos han demostrado que *V. vulnificus* entra en el estado VNBC a temperaturas inferiores a 10°C, independientemente del nivel de nutrientes existente en el medio. Se produce un cambio morfológico en el cual las células que poseen forma bacilar pasan a ser cocos; además, otro cambio en el perfil de ácidos grasos de la membrana hace que la pared celular posea una mayor resistencia mecánica y el transporte de aminoácidos se reduzca (Weichart *et al.*, 1996 y 1997; Linder *et al.*, 1989). La reanimación de la bacteria del estado VNBC se produce aumentando la temperatura y usando un medio libre de nutrientes (Oliver *et al.*, 1995), fenómeno similar al que ocurre en el calentamiento gradual de las aguas costeras al comenzar la estación primaveral.

*V. vulnificus* se puede encontrar en forma de vida libre o asociado con el zooplancton y otro tipo de biota acuática. Es absorbido por los moluscos que se alimentan por filtración, como las ostras, almejas, mejillones y vieiras, y se concentra en el intestino y otros tejidos. Durante los periodos de calor en el Golfo de México (Motes *et al.*, 1996) cuando el agua supera los 18°C, se pueden encontrar concentraciones de  $10^3$  a  $10^6$  bacterias por gramo de carne de ostra. La bacteria también puede encontrarse en el intestino de una gran variedad de especies de peces de estuario, con cifras también superiores durante los meses de verano (DePaola *et al.*,

1993). Estos peces pueden actuar como reservorio para transportar el microorganismo entre diferentes criaderos de ostras o como una fuente de infección muy potente para el hombre.

En las ostras, *V. vulnificus* resiste los métodos de depuración usados normalmente para la eliminación de patógenos. También resiste métodos de desinfección de agua, como la luz UV o la filtración con membranas de diámetro de poro de 2  $\mu\text{m}$  (Tamplin *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 1991). La cocción de los mariscos y pescados es actualmente el único método fiable para la destrucción completa de la bacteria.

### 3.4. Biotipos

En la actualidad, se diferencian tres biotipos de *V. vulnificus* basándonos en el tipo de hospedador, en la distribución geográfica y en diferencias bioquímicas y fenotípicas (Tison *et al.*, 1982). En el biotipo 1 se incluyen cepas que producen indol y ornitina descarboxilasa, producen distintos tipos de lipopolisacáridos (LPS) y están asociados a la colonización de moluscos y a las infecciones en humanos. El biotipo 2 comprende cepas que no producen indol ni ornitina descarboxilasa, expresan un solo tipo de LPS y están asociadas a infecciones de vertebrados marinos, especialmente anguilas cultivadas en piscifactoría, donde producen importantes pérdidas económicas (Austin *et al.*, 1999). El biotipo 2 se considera patógeno único de anguilas y peces, pero se ha demostrado que puede ser virulento en ratones (Amaro *et al.*, 1994) y puede causar infecciones oportunistas en seres humanos (Amaro *et al.*, 1996; Veenstra *et al.*, 1993). El biotipo 3 fue identificado en 2004, es considerado patógeno oportunista de humanos y ha sido aislado en Israel (Colodner *et al.*, 2004). Los tres biotipos presentan diferencias en los factores de virulencia que

producen y en sus secuencias 16S y 23S rRNA, lo que ha permitido diseñar diversos métodos moleculares para su diferenciación (Aznar *et al.*, 1994, Senoh *et al.*, 2005).

### 3.5. Epidemiología

#### 3.5.1. Incidencia de las infecciones producidas por *Vibrio vulnificus*

En los Estados Unidos, la mayoría de los casos se producen en el sureste del país, en la Costa del Golfo de México. Se han recogido datos importantes en esta zona sobre la epidemiología de *V. vulnificus*, debido a la importancia de la industria del marisco y a efectivos sistemas de estudios (Shapiro *et al.*, 1998; Hlady *et al.*, 1996; Klontz *et al.*, 1988).

La mayoría de los vibrios proliferan en aguas cálidas y por tanto la mayoría de las infecciones de *V. vulnificus* se producen durante los meses más cálidos, cuando el número de células de *V. vulnificus* es más alto. Por ejemplo, en Estados Unidos, la aparición de infecciones de heridas y de septicemia primaria se produce mayoritariamente entre los meses de abril y septiembre (Motes *et al.*, 1998).

A pesar de los elevados porcentajes de mortalidad, debe señalarse que contraer infecciones de *V. vulnificus* es un evento muy raro (Jackson *et al.*, 1997). La incidencia anual en estados Unidos ronda los 300 casos (CDC, 2005). En este país se declaran anualmente entre 30 y 40 casos de septicemia primaria, asociados en su práctica totalidad al consumo de ostras crudas (OMS, 2005). No existen datos sobre la incidencia en España. Hasta 2002 se habían documentado solamente 3 casos de infección por este patógeno (Pérez-Moreno *et al.*, 1996; García *et al.*, 1998; Hernáez *et al.*, 1991)

y hasta la actualidad se han descrito sólo cinco casos en la literatura médica (Turiño-Luque *et al.*, 2007).

### 3.5.2. Tipos de infecciones producidas por *Vibrio vulnificus*

Usando los datos proporcionados por el CDC de Estados Unidos y otras organizaciones y centros de control y prevención de enfermedades, se definen varios tipos de infecciones producidas por *V. vulnificus*:

La primera es la **septicemia primaria**, que se define como una enfermedad sistémica caracterizada con fiebre y shock, que aparece mayoritariamente en personas con deficiencia inmunitaria y suele producirse por el consumo de mariscos y pescados crudos y poco cocinados. Otro tipo de infección más leve es la **gastroenteritis**, que cursa con fiebre, calambres abdominales, vómitos y diarrea. Por último, el microorganismo también puede producir **infecciones de heridas**, en las que *V. vulnificus* penetra en heridas abiertas por contacto con agua contaminada, provocando infección y posible septicemia (CDC, 1996; CDC, 1993).

Casi todos los casos de septicemia primaria y gastroenteritis son producidos por el consumo de mariscos y pescados crudos o poco cocinados. La mayoría de aislamientos clínicos de *V. vulnificus* proceden de casos de septicemia primaria, no de los casos de gastroenteritis. Esto es debido a que las personas que presentan cuadros de gastroenteritis no están en peligro y los síntomas rara vez son lo suficientemente graves como para justificar la asistencia médica; por tanto, el aislamiento en estos casos no suele producirse (Shapiro *et al.*, 1998).

Los casos de infección de heridas son provocados por contacto de la herida con agua con alta prevalencia de *V. vulnificus*. En un trabajo llevado a cabo por Strom *et al.* en el año 2000, el 100% de los casos estudiados que estaban infectados por *V. vulnificus* había tenido contacto con agua de mar o mariscos crudos en los 7 días antes a la enfermedad y tenían heridas cuando se les examinó (Strom *et al.*, 2000). Muchas infecciones de la herida parecen estar relacionadas con la exposición ocupacional, es decir, suele producirse en personas dedicadas a la industria marisquera o pesquera.

### 3.5.3. Susceptibilidad del hospedador

Se desconoce cuál es la dosis infectiva o letal para los seres humanos, lo que si se conoce es que la susceptibilidad del hospedador es un factor clave. Las personas más susceptibles a sufrir una infección provocada por *V. vulnificus* son generalmente aquellas que sufren una enfermedad crónica que afecta a la función del hígado o al sistema inmunológico (Tacket *et al.*, 1984). Como enfermedades del hígado se incluyen la cirrosis o enfermedad hepática alcohólica, hepatitis o antecedentes de hepatitis, cáncer metastásico o el trasplante de hígado. También se incluyen las patologías hematológicas que provocan niveles elevados de hierro sérico como la hemocromatosis y la talasemia mayor. Otras condiciones que predisponen a las personas a las infecciones de *V. vulnificus* son aquellas en las que el hospedador está inmunocomprometido (incluyendo quimioterapia y SIDA), otras enfermedades crónicas (diabetes, enfermedad renal, enfermedad intestinal crónica, o la dependencia de esteroides) o la hipoclorhidria gástrica (Shapiro *et al.*, 1998; Koenig *et al.*, 1991; Klontz *et al.*, 1988).

En las personas con enfermedades crónicas o inmunocomprometidas es mucho más común que se

produzca septicemia primaria (97%) que infecciones de heridas (68%). En general, la enfermedad de hígado es el factor de riesgo más común entre las personas que han contraído septicemia primaria, estando presente esta enfermedad hasta en un 80% de los infectados. La enfermedad hepática es un fuerte predictor de resultados fatales, ya que el 80% de los que la padecen fallecen (Strom *et al.*, 2000). Las infecciones de heridas se producen con más frecuencia en personas que tienen otro factor coadyuvante que no sea enfermedad hepática.

#### **3.5.4. Síntomas clínicos y tratamiento**

Los síntomas y la severidad de la enfermedad en personas infectadas por *Vibrio vulnificus* depende del tipo de infección (Klontz *et al.*, 1988). En general, la tasa de mortalidad suele estar entre el 30-48% (Shapiro *et al.*, 1998; Klontz *et al.*, 1988), sin embargo, esta tasa varía dependiendo del tipo de infección y los factores del hospedador.

Los pacientes con septicemia primaria por lo general presentan inicialmente fiebre y escalofríos, a menudo acompañados de vómitos, diarrea y dolor abdominal, así como dolor en las extremidades. Después de las primeras 24 horas de la aparición de la enfermedad pueden aparecer lesiones cutáneas como celulitis, ampollas y equimosis. El 60% de los pacientes sufren un choque séptico con una presión arterial sistólica inferior a 90 mm Hg y a los siete días más del 50% de los infectados presentan alteración mental. En casi todos los casos de septicemia primaria se ha podido aislar el patógeno de la sangre, y algunas veces de infecciones cutáneas. A menudo, estas lesiones cutáneas se necrosan (fascitis necrosante) y requieren el desbridamiento quirúrgico o la amputación. La septicemia primaria es mortal en el 60-75% de los casos (Klontz *et al.*, 1998).



Los síntomas que sufren los pacientes con infecciones en heridas provocadas por *V. vulnificus* son similares a los síntomas de la septicemia primaria, pero difieren en el momento en el que aparecen y en la gravedad (Klontz *et al.*, 1998). En la mayoría de pacientes la infección comienza con la inflamación de la herida, lo que indica que el patógeno está creciendo y colonizando la zona a infectar. Tras unos días, en la zona de alrededor de la herida puede aparecer celulitis y necrosis similar a la que se produce en la septicemia primaria. A menudo aparecen fiebre, escalofríos, alteración del estado mental e hipotensión. Raramente se observan síntomas gastrointestinales cuando la infección de *V. vulnificus* se produce a través de una herida. La tasa de mortalidad de *V. vulnificus* cuando el patógeno produce infección a través de heridas es del 20-30%, mucho menor que cuando produce septicemia primaria (Klontz *et al.*, 1998).

En los casos de gastroenteritis provocadas por *V. vulnificus* que requieren hospitalización, los síntomas más frecuentes son fiebre, diarrea, calambres abdominales, náuseas y vómitos (Klontz *et al.*, 1998). No existe ni choque séptico ni celulitis localizada.

El tratamiento apropiado, tanto para la septicemia como para las infecciones de las heridas, es la administración de antibióticos. Es necesario comenzar la administración rápidamente, ya que se ha demostrado que mejora la supervivencia del paciente, de forma que cuanto mayor es la demora en el comienzo del tratamiento mayor es la tasa de mortalidad (Klontz *et al.*, 1998). La tetraciclina parece ser el antibiótico más efectivo, combinándolo con gentamicina o cloranfenicol (Jackson *et al.*, 1997). La atención rápida es totalmente necesaria en casos de choque séptico y pérdida de fluidos. Cuando los síntomas son los producidos por gastroenteritis, el tratamiento es casi idéntico al usado

cuando se trata una infección por *Vibrio parahaemolyticus*. Se lleva a cabo reposición de líquidos, y en casos graves, se trata también con antibióticos (Koenig *et al.*, 1991).

### 3.6. Patogénesis

#### 3.6.1. Factores de virulencia de *Vibrio vulnificus*

Ha habido muchos estudios encaminados a caracterizar los mecanismos utilizados por *V. vulnificus* para causar enfermedad. Se han llevado a cabo diferentes estudios epidemiológicos para tipificar los diferentes aislados clínicos y ambientales de *V. vulnificus*, de los cuales se ha podido concluir que no todas las cepas de *V. vulnificus* son virulentas (Stelma *et al.*, 1992; Tison *et al.*, 1986).

Tras diferentes investigaciones se han acumulado pruebas que sugieren que las infecciones son causadas por solamente unas pocas de las cepas encontradas en el ambiente (Tacket *et al.*, 1984). Esto ha hecho que se lleven a cabo trabajos para diferenciar estas cepas con capacidad patógena (Warner *et al.*, 1999), usando tanto expresión de factores bacterianos como características fenotípicas. Los esfuerzos han demostrado que no existe un solo factor que distinga las cepas virulentas de las no virulentas (Moreno *et al.*, 1998; Amaro *et al.*, 1994; Krovacek *et al.*, 1994; Rodrigues *et al.*, 1992; Stelma *et al.*, 1992; Morris *et al.*, 1987; Tison *et al.*, 1986). Podemos decir así que un conjunto de todos los factores expresados en *V. vulnificus* hace que las cepas sean más o menos virulentas.

De entre los factores de virulencia de *Vibrio vulnificus* conocidos podemos nombrar:

El **polisacárido capsular** (CPS). Es un polisacárido ácido que está en la superficie celular y su presencia y cantidad están correlacionadas positivamente con la virulencia del microorganismo (Wright *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1985). La contribución del CPS en la producción del shock séptico se cree que se establece a través de la inducción de la inflamación asociada a las citoquinas.

El **lipopolisacárido de membrana** (LPS). Este factor bacteriano es uno de los responsables de la necrosis de tejidos y del choque endotóxico. Es un potente mediador del shock séptico debido a que es un pirógeno que provoca una respuesta inflamatoria, con liberación de TNF- $\alpha$  (Powell *et al.*, 1997; McPherson *et al.*, 1991). La inyección directa de LPS en ratas y ratones da lugar a una caída muy brusca de la presión arterial y la muerte rápida de los animales, implicando así su papel en el desarrollo de los síntomas y la letalidad (Park *et al.*, 2007; McPherson *et al.*, 1991).

Los **pili** o **fimbrias**. La adhesión y la colonización a las superficies tisulares son pasos importantes en la fase precoz de la mayoría de las infecciones bacterianas. A menudo, el proceso de conexión inicial es mediado por los *pili*. La unión del *pili* a las células hospedador está mediada por las interacciones entre los dominios del polipéptido del *pili* y los receptores específicos de la superficie de la célula hospedador (Strom *et al.*, 1993). Paranjpye *et al.* (2005, 1998) generaron en *V. vulnificus* varias mutaciones en PIIA, que codifica una proteína estructural, la pilina, y en PIID, que codifica una peptidasa. Tanto los mutantes PIIA como PIID, mostraron una pérdida de adhesión a las células epiteliales del hospedador a colonizar y, por tanto, una reducción global de la citotoxicidad.

Las **hemolisinas**. Se conocen dos proteínas con actividad hemolítica en *V. vulnificus*. La más estudiada es la hemolisina A (VvhA) que es una hemolisina extracelular termolábil de 56kDa. Está codificada en el gen *vvhA*, contribuye a la liberación de hierro a través de su actividad hemolítica y es responsable de la actividad citotóxica de la bacteria (Wright *et al.*, 1991).

La inyección de la toxina purificada en ratones causa una gran variedad de efectos patológicos, incluyendo grave necrosis de tejidos. Los síntomas resultantes a la exposición de la hemolisina incluyen la acumulación de líquidos, irregularidades intestinales, parálisis parcial y muerte (Lee *et al.*, 2005; Gray *et al.*, 1987). La observación directa de los efectos de la hemolisina en las células del hospedador ha revelado que la exposición a estos tóxicos aumenta la permeabilidad vascular, la apoptosis de células endoteliales, la inducción de óxido nítrico sintasa, con el consiguiente aumento de producción de óxido nítrico y, posiblemente, un aumento de neutrófilos (Kang *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Kwon *et al.*, 2001). La muerte celular se produce a través de la formación de poros en la membrana celular, y se ha sugerido que esta actividad en última instancia conduce al aumento de la permeabilidad vascular y la hipotensión características de la enfermedad que provoca *V. vulnificus* (Kim *et al.*, 1993). A pesar de los importantes atributos de virulencia, la inactivación de la hemolisina A a través de la mutación de *vvhA* no demostró diferencias en la DL50 (Wright *et al.*, 1991), lo que sugiere que la hemolisina A no es la única responsable de la letalidad de *V. vulnificus* en ratones.

La otra hemolisina de *V. vulnificus* es la VvpE; es una proteasa extracelular inespecífica. La enzima purificada e inyectada ha demostrado causar necrosis en el tejido y lesiones cutáneas.

También produce un aumento de la permeabilidad vascular, originando el edema característico de la septicemia (Chang *et al.*, 2005; Miyoshi *et al.*, 1988; Kothary *et al.*, 1987).

#### **4. MÉTODOS TRADICIONALES PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *VIBRIO SPP.*, *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* Y *VIBRIO VULNIFICUS***

##### **4.1. Detección por cultivo**

Las especies halófilas del género *Vibrio* crecen en agar sangre, agar McConkey, caldo cerebro-corazón (BHI) y en medio de triptosa soja, pero su comportamiento en los medios utilizados habitualmente para el aislamiento de patógenos entéricos es imprevisible y generalmente crecen con dificultad.

Su aislamiento se facilita en medios selectivos que inhiben o retardan el crecimiento de otros microorganismos. Algunos autores emplean otros medios de cultivo para el aislamiento y diferenciación de *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* por separado, como el agar Celobiosa-Polimixina B-Colistina (CPC) desarrollado por Massad y Oliver (1987) para el aislamiento de *V. vulnificus* en muestras ambientales o el agar *Vibrio vulnificus* (DePaola JR. A. and Kaysner. C.A., 2004), pero el más empleado es el agar tiosulfato-citrato-sacaros con sales biliares (TCBS), el cual permite diferenciar las especies que no fermentan la sacarosa, como *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (color verde), de las que poseen esta capacidad (color amarillo).

La utilización del agar TCBS puede presentar algún problema debido a las variaciones de calidad encontradas entre los diferentes medios comercializados y entre los lotes distintos del mismo fabricante. Algunos de ellos pueden ser muy

inhibidores, por lo que es importante realizar un control de calidad de cada lote (Álvarez *et al.*, 2008)

Respecto a los medios de enriquecimiento, el más común es el agua de peptona alcalina (pH 8,5) con adición de 1% de NaCl.

La temperatura óptima de crecimiento es de 35-37°C, incubado durante 18-24 horas.

#### **4.2. Identificación de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus***

Los vibrios son bacterias gram negativas con forma de bacilos cortos, rectos o curvados, con tendencia al pleomorfismo, pudiendo observarse formas cocobacilares e incluso cocoides. Por esta razón la forma curva no es diagnóstica, al carecer el microorganismo de una morfología uniforme, particularmente si su crecimiento se ha efectuado en condiciones subóptimas.

Un dato que puede hacer sospechar la presencia de una bacteria halófila es la ausencia de crecimiento en medios de identificación utilizados de rutina. En la práctica, la identificación presuntiva de los vibrios halófilos puede efectuarse con los medios convencionales empleados para la identificación de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, previa adición de 1% de NaCl en todos los que carecen de sal en su composición: Clark-Lubs (Voger-Proskauer), reducción de nitratos, hidrólisis de la gelatina, descarboxilasas de Möeller, descarboxilación de la arginina mediante el método Möeller, producción de indol y fermentación de algunos azúcares.

Existen sistemas comerciales, tanto manuales miniaturizados como semiautomáticos, que pueden emplearse para la identificación de las especies *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. Sin embargo, la base de datos de algunos de estos equipos no es idónea para identificar dichas especies, pudiendo inducir a errores. Otro aspecto a tener en cuenta es el diluyente utilizado en cada uno de estos sistemas, ya que algunos carecen de NaCl y otros lo poseen en cantidad insuficiente. Los sistemas o equipos que incluyen una concentración de NaCl superior a 0,5% pero inferior a 1% permiten el crecimiento de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, aunque conviene recordar que el estudio de los caracteres bioquímicos debe realizarse en condiciones de enriquecimiento óptimas para que las reacciones puedan ser debidamente expresadas y evitar falsos resultados negativos. Por tanto, ante la sospecha de un vibrio halófilo, se debe revisar la composición iónica del diluyente empleado en cada caso para incorporar cloruro sódico en aquellos que lo necesiten.

Según el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, (Holt *et al.*, 1994) los caracteres bioquímicos más útiles para establecer una clave sencilla de identificación de las estas especies son:

- **Reacción de la Oxidasa.** Positiva en ambos casos. Determina la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo, que es reducido por el oxígeno molecular, que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. Esta prueba no debe realizarse directamente de cultivos procedentes de medios que contengan carbohidratos fermentables, porque se pueden obtener falsos resultados negativos.

- **Reducción de nitratos.** Ambas especies son positivas para esta prueba bioquímica. Algunas bacterias pueden usar nitratos como aceptor final de electrones en la respiración y así el nitrato puede ser reducido a nitrito.
- **Prueba de la arginina dihidrolasa (ADH).** Tanto para *V. parahaemolyticus* como para *V. vulnificus* el resultado es negativo. La prueba consiste en detectar la presencia de arginina dihidrolasa, que es un sistema enzimático que actúa sobre la arginina transformándola en ornitina y amoniaco.



- **Prueba de la lisina descarboxilasa (LDC).** Los resultados de esta prueba para ambas especies son positivos. La prueba LDC determina la presencia de la enzima lisina descarboxilasa, la cual capacita al microorganismo para descarboxilar la lisina.



- **Prueba de la ornitina descarboxilasa (ODC).** Para ambas especies el resultado es positivo. La prueba determina la presencia de la enzima ornitina descarboxilasa, la cual capacita al microorganismo para descarboxilar la ornitina.





- **Hidrólisis de Gelatina (gelatinasa).** Ambas especies son gelatinasa positiva. Con esta prueba se determina la capacidad de un microorganismo para producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que licuan la gelatina.
- **Prueba de Voges-Proskauer (VP).** El resultado para ambas especies es negativo. En esta prueba se determina la vía de fermentación butanodiolica. La glucosa es fermentada produciendo compuestos neutros como el 2,3-butanodiol y el etanol, y se acumula acetoína en el medio.
- **Producción de Indol.** *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* presentan resultados positivos para esta prueba. El indol es uno de los productos de la degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoniaco. La prueba de indol está basada en la formación de un complejo rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído. Este es el principio activo del reactivo de Kovacs.
- **Fermentación de azúcares.** Ambas especies fermentan diferentes azúcares para obtener energía. Las dos pruebas de metabolismo de azúcares que diferencian la especie *V. parahaemolyticus* de *V. vulnificus* son la fermentación de salicina y celobiosa, que dan resultados negativos para *V. parahaemolyticus* y positivos para *V. vulnificus*.

Actualmente para la mayor rapidez se usa el sistema API 20E (Biomerieux), que permite una obtención rápida de resultados, presenta buena repetitividad y permite la estandarización del proceso de identificación (Overman *et al.*, 1985).

## **5. MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *VIBRIO SPP.*, *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* Y *VIBRIO VULNIFICUS***

### **5.1. Detección por PCR convencional**

#### **5.1.1. Introducción**

Los métodos microbiológicos basados en el cultivo, además de requerir más tiempo hasta obtener el resultado final, con frecuencia pueden originar identificaciones erróneas o incluso indeterminaciones, sin llegar a identificar especies que comparten un gran número de caracteres. Además, la identificación basada en pruebas bioquímicas es un método laborioso que lleva implícito problemas de reproducibilidad y ambigüedad, y en general presenta un bajo poder de discriminación a nivel de especie.

Gracias a los avances en la tecnología de ADN recombinante, los métodos basados en el análisis de ácidos nucleicos han revolucionado el campo del diagnóstico microbiano. Actualmente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituye una de las técnicas de mayor utilidad para la detección e identificación de microorganismos como alternativa a los métodos tradicionales, debido a la elevada discriminación, precisión y reproducibilidad, así como a la rapidez y sencillez en la realización de dicha técnica.

Kleppe *et al.* describieron por primera vez en 1971 los principios de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). No obstante, hasta 1985 no fueron publicados los primeros datos experimentales por Saiki *et al.* (1985, 1988), aunque el descubrimiento de la PCR fue atribuido a Kary B. Mullis, investigador del mismo grupo, el cual fue galardonado con el Premio Nobel de Química en 1993 (Persing, D. H., 1991).

### 5.1.2. Aspectos metodológicos: Fundamentos y fases de la PCR

El fundamento de la PCR es la amplificación *in vitro* de ADN mediante una ADN polimerasa termoestable y un par de oligonucleótidos que delimitan el fragmento a amplificar. Este método enzimático permite copiar de forma exponencial un fragmento concreto de un genoma, pudiéndose obtener millones de copias de él. Este proceso se lleva a cabo cíclicamente.

En el primer paso, **desnaturalización**, la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello, se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C). En la **alineación**, que es la segunda etapa, los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que se desea amplificar. En el tercer paso, **elongación**, se produce la síntesis de una cadena sencilla en la dirección 5' → 3' mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde y produciéndose así un fragmento de doble cadena por complementariedad.

Una vez completado el primer ciclo, se dispone de 2 copias de la muestra original, al final del segundo ciclo se tienen 4, al final del tercero 8... (Figura 1). Si los ciclos se producen un número "n" de veces y suponiendo que el número de copias

de ADN se duplica en cada ciclo, se obtiene una cantidad de ADN de  $2^n$ , por lo que la amplificación se realiza en forma de progresión geométrica.

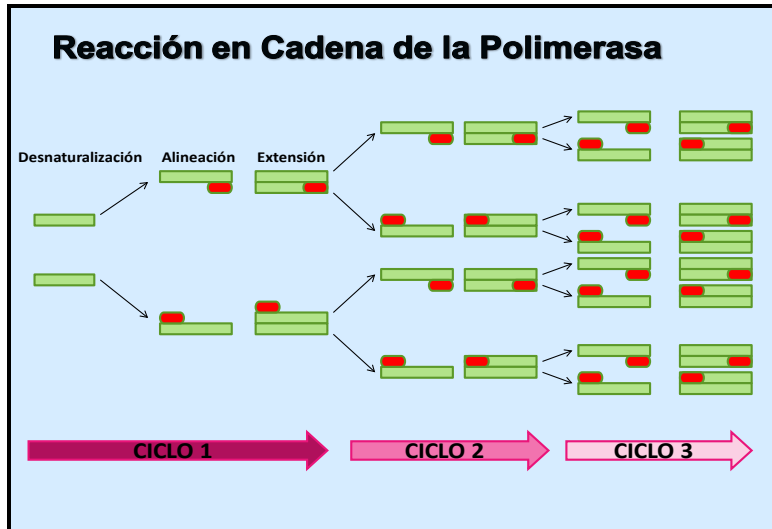


Figura 1. Fases de la PCR

Debido a la sencillez de la técnica, su uso en los laboratorios clínicos ha supuesto una revolución en el concepto de la detección microbiológica. Problemas tales como la dificultad de detección de determinados virus y la imposibilidad de aislamiento de algunos microorganismos por su dificultad o incapacidad para desarrollarse *in vitro*, pueden obviarse mediante la PCR, lo que ha hecho que esta técnica suponga una alternativa a veces obligada para su uso en microbiología. Además, la versatilidad de esta técnica ha permitido su aplicación a otros campos de interés económico como es el caso de la medicina forense, identificación genética o control de calidad de las industrias (Blackstone *et al.*, 2003; Mead *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1995).

La técnica de la PCR suele aplicarse para la identificación de microorganismos a partir de ADN purificado, así como para la detección directa desde el homogeneizado de la muestra (clínica, ambiental, alimento...), ya que no precisa del aislamiento previo del microorganismo y por tanto puede aplicarse a poblaciones mixtas.

Uno de los inconvenientes de la técnica de la PCR clásica es que no discrimina entre células vivas y muertas, incluso puede amplificar restos de ADN procedentes de células inactivadas (Josephson *et al.*, 1993). En cuanto a la metodología, las principales dificultades incluyen hacer accesibles los ácidos nucleicos y eliminar los inhibidores de la reacción de PCR en un rango amplio de matrices complejas (Wilson, I. G., 1997). En este sentido las especies del género *Vibrio* presentan el inconveniente adicional de poder encontrarse en el alimento y en el medio ambiente en forma de células viables no cultivable con paredes celulares más inaccesibles, lo que dificulta la extracción de ADN para su análisis (Strom *et al.*, 2000; Colwell *et al.*, 1995).

Un aspecto importante para que la PCR se lleve a cabo en condiciones óptimas es el diseño de los iniciadores o cebadores. Son oligonucleótidos o moléculas de ADN monocatenario de entre 15 y 30 nucleótidos que la enzima ADN polimerasa termoestable emplea para comenzar a polimerizar, de forma que el punto de inicio de la síntesis de nuevas moléculas de ADN lo establece la posición del iniciador. Es condición indispensable que los cebadores sean específicos del ADN que se vaya a amplificar. Para ello, es habitual recurrir a la información recopilada por otros investigadores y almacenada en las bases de datos.

La PCR se ha empleado en gran cantidad de estudios para detectar e identificar diferentes especies de género *Vibrio* en

diferentes tipo de muestras (Panicker *et al.*, 2005; De Paola *et al.*, 1994; Taniguchi *et al.*, 1985). También se ha empleado para evaluar el patrón de distribución de las distintas especies del género *Vibrio* (Cañigral *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2004; Panicker *et al.*, 2004; Baffone *et al.*, 2001) en diferentes zonas ambientales y matrices alimentarias.

### 5.1.3. Modificaciones de la técnica PCR

Se han realizado multitud de modificaciones sobre la técnica básica que pretenden aumentar el potencial de la PCR, como es el caso de la **PCR múltiple**, que permite detectar varias especies o varios genes de una misma especie en una misma muestra y reacción (Linch *et al.*, 2004, Panicker *et al.*, 2004; Bej *et al.*, 1999), con el consiguiente ahorro de tiempo, reactivos y volumen de muestra. Sin embargo, la combinación de más de un par de iniciadores en la reacción presenta algunos inconvenientes: la especificidad puede verse reducida debido a la competencia de los iniciadores. Esto puede reducir la disponibilidad de los reactivos, y por tanto hacer que la sensibilidad de la amplificación también disminuya.

La PCR múltiple ha permitido la identificación y la detección simultánea de factores de virulencia tales como la subunidad A de la toxina colérica (ctxA) de *Vibrio cholerae*, las hemolisinas tlh y tdh de *Vibrio parahaemolyticus* y hemolisina A de *Vibrio vulnificus* en alimentos de origen marino (Españeira *et al.*, 2010).

Otra modificación de la técnica se conoce como **PCR anidada** (nested PCR): en ella se realiza una doble amplificación con dos parejas de iniciadores, en donde la segunda pareja de cebadores reconoce y amplifica un fragmento interno del primer amplificado. Esta modificación aumenta la

sensibilidad y la especificidad de la PCR, siendo muy útil en la detección de muestras en la que los microorganismos se encuentran en poca cantidad, como las muestras ambientales. Sin embargo, su uso presenta un elevado riesgo de contaminación, al ser necesario pasar muestra del producto de la primera amplificación a nuevos viales con la mezcla de reacción para la segunda amplificación. En este caso, es necesario la realización de múltiples controles para desechar la posibilidad de aparición de falsos positivos debido a la contaminación con ADN. Esta técnica se ha empleado para la detección de *Vibrio vulnificus* en muestras clínicas (Lee *et al.*, 1998) y en pescado, sedimentos y agua (Arias *et al.*, 1995).

En ocasiones se emplea una variante de esta técnica denominada **PCR semi-anidada**, cuya diferencia básica con la anterior citada es que sólo emplea tres iniciadores diferentes, utilizándose uno de ellos en las dos amplificaciones.

En la tecnología PCR se están produciendo continuos avances. El objetivo es conseguir que la técnica llegue a ser automatizada en todas sus fases y que sea altamente específica y sensible a la vez.

## **5.2. PCR cuantitativa a tiempo real para la detección, identificación y cuantificación de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus***

### **5.2.1. PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR): fundamentos y tipos**

En la PCR a tiempo real la amplificación y el análisis ocurren al mismo tiempo. Es una herramienta poderosa, simple y rápida y está destinada a sustituir a muchas técnicas tradicionales en los laboratorios de microbiología.

Antes de la introducción de técnicas a tiempo real era común tomar datos periódicamente durante la PCR para la cuantificación. Tras tomar alícuotas en diferentes ciclos, los productos se separaban mediante electroforesis en geles de agarosa y se cuantificaba la cantidad de radioactividad incorporada. Hoy en día, la fluorescencia es el indicador elegido para la PCR cuantitativa.

Esta técnica detecta la señal de fluorescencia emitida tras la excitación del o los fluoróforos utilizados, con la correspondiente longitud de onda, ciclo por ciclo, durante el proceso de amplificación, siendo esta señal proporcional al número de copias generadas en cada ciclo (Figura 2). De esta forma, estableciendo el nivel umbral sobre la señal de fluorescencia basal, es posible determinar el ciclo en el cual se inicia la fase exponencial de la amplificación del ADN (ciclo umbral,  $C_T$  "threshold cycle"), el cual está relacionado directamente con la cantidad de ADN diana inicial y es el parámetro utilizado en la cuantificación (Higuchi *et al.*, 1993; Heid *et al.*, 1996; Nazarenko *et al.*, 1997).



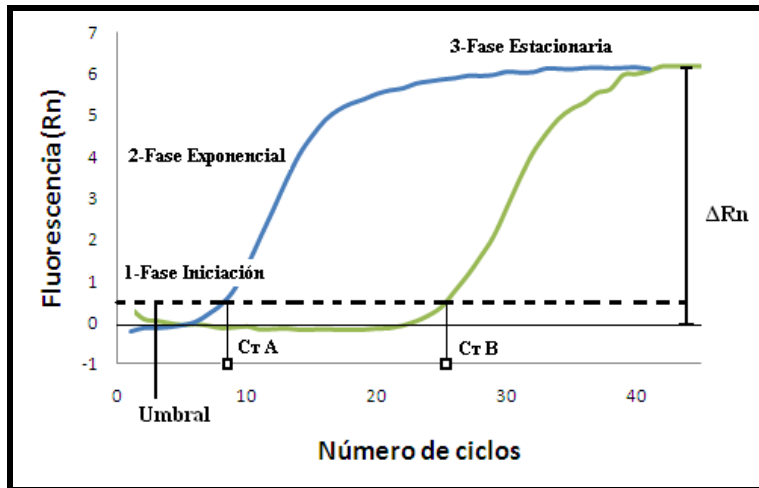


Figura 2. Representación gráfica del aumento de la fluorescencia ( $\Delta R_n$ ) con respecto al número de ciclos de la PCR y determinación del valor de  $C_r$  para las muestras A y B.

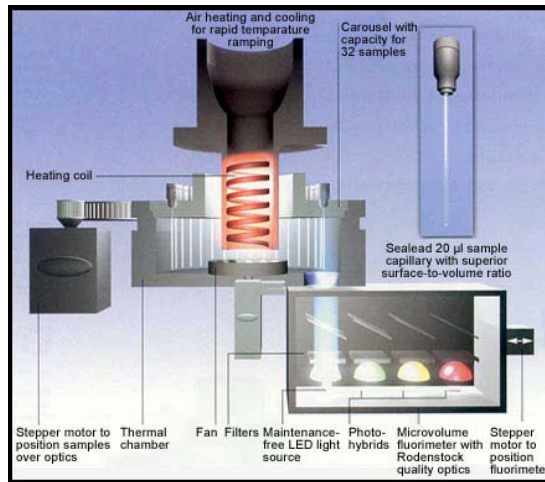
Esta técnica puede emplearse para dos tipos de detección. En la **detección cualitativa**, los ciclos de temperatura se emplean para amplificar las moléculas diana, de forma que puedan ser fácilmente detectadas. La fluorescencia de las sondas unidas al ADN se monitoriza en cada ciclo de PCR. Las reacciones son reconocidas como positivas por algoritmos que analizan los cambios de fluorescencia en cada ciclo. En la **detección cuantitativa**, La construcción de una curva estándar o recta patrón a partir de concentraciones conocidas de ADN diana permite la cuantificación de la muestra problema mediante la interpolación de los valores obtenidos. Además, la PCR a tiempo real también permite el **análisis**. Las curvas de fusión identifican productos de PCR y variaciones en la secuencia por sus temperaturas de fusión.

La tasa de crecimiento del producto de amplificación es conocida como **eficiencia** de la PCR. La eficiencia depende básicamente de los cebadores y de las condiciones de

temperatura de la reacción y se define como el número de copias en el ciclo  $n+1$  dividido por el número de copias en el ciclo  $n$ . Una reacción con eficiencia del 100% (equivaldría a 2) duplicaría el ADN cada ciclo de amplificación. La eficiencia de una reacción de amplificación se aproxima a 2 durante la fase exponencial de la mayoría de las reacciones bien optimizadas.

La amplificación y la detección de fluorescencia se desarrollan en un mismo tubo. Éste no se abre nunca durante el proceso, y el uso de dUTP y Uracil DNA glycosilado impide todo riesgo de contaminación. Además, dada la detección fluorimétrica de los amplificados, no se requiere electroforesis y evita los problemas de contaminaciones derivados de la apertura de los tubos (Wilhelm y Pingoud, 2003; McKillip y Drake, 2004). Así pues, la PCR a tiempo real puede integrar la detección, cuantificación y el análisis de microorganismos en un solo ensayo de forma rápida y eficaz.

El instrumento empleado para realizar los análisis de PCR a tiempo real es el termociclador a tiempo real, que consiste en una cabina de enfriamiento, una cámara de calor, un fluorímetro, rotores, mandos electrónicos y fuente de energía (Figura 3). Estos elementos están montados sobre una base de aluminio que garantiza la estabilidad.



**Figura 3. Elementos del termociclador a tiempo real**

Los datos de las medidas de fluorescencia se transmiten desde y al ordenador a través de una interfaz de serie. Los usuarios introducen los datos, las muestras y el protocolo experimental en el ordenador y éste transmite los datos al termociclador. El ordenador también monitoriza las temperaturas y las señales de fluorescencia durante la PCR.

Existen diversos tipos de termocicladores en el mercado. Existen termocicladores que usan tubos capilares de cristal como soporte en el cual se produce la reacción y otros termocicladores usan pocillos de plástico. En los termocicladores que poseen capilares, la reacción tiene una óptima superficie de volumen que garantiza un rápido equilibrio entre el aire y los componentes de la reacción, además el cierre individual de cada capilar con un tapón minimiza el riesgo de contaminación. Por otro lado los pocillos de plástico tienen paredes suaves, finas y uniformes que también garantizan una transferencia de calor precisa y están insertados en placas que son delgadas, flexibles y fáciles de cortar y manipular con menor riesgo de ruptura.

Uno de los más extendidos, y el que se ha empleado en estos estudios, es el LightCycler® de Roche (Figura 4). Este instrumento, que utiliza tubos capilares para la reacción de PCR, emplea para la detección un fluorímetro de tres canales. Un diodo azul (LED) con una emisión máxima de 470 nm sirve como fuente de energía para la excitación de las muestras. La fluorescencia se detecta a 530 nm, 640 nm y 710 nm con la ayuda de fotorhíbridos. Estos tres canales de detección permiten el marcaje de las muestras con varios fluorocromos, lo que posibilita el trabajo con PCR múltiple y la detección de 2 o incluso más mutaciones simultáneamente. Los nuevos termocicladores para PCR a tiempo real poseen 6 canales de detección, permitiendo así el análisis a varias longitudes de onda de emisión (530, 555, 610, 640, 670 y 705 nm), lo que posibilita la medida de emisiones de cuatro fluorocromos distintos.

El sistema permite el empleo de distintos protocolos para la incorporación y detección de la fluorescencia ([www.Roche-mb.com](http://www.Roche-mb.com)). La detección de fluorescencia puede realizarse mediante **sistemas inespecíficos** o **específicos** de secuencia (Lee *et al.*, 2004).



Figura 4. LightCycler® de Roche

### 5.2.2. Sistemas inespecíficos: Agentes intercalantes

Se basa en el uso de agentes intercalantes de ADN, que son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El incremento de ADN en cada ciclo de la PCR se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Entre ellos se encuentran los fluorocromos como el bromuro de etidio (Higuchi *et al.*, 1993, Le Pecq y Paoletti, 1996; Wittwer *et al.*, 1997), el YOPRO® y YoYo® (Ogura *et al.*, 1994; Ishiguro *et al.*, 1995), el SYBR® Green I y el SYBR Green Gold. Recientemente se ha descrito otra molécula intercalante, BEBO, de características similares al SYBR® Green I (Bengtsson *et al.*, 2003).

Uno de los más usados, y que ha sido utilizado en este trabajo, es el SYBR Green I (Figura 5) por su facilidad de utilización y disponibilidad comercial. La excitación de la molécula se produce con luz azul a una longitud de onda de 480 nm y el espectro de emisión es comparable al de la fluoresceína, con un máximo de 520 nm. La fluorescencia del colorante unido al ADN es 1000 veces superior que cuando está libre y por tanto es muy adecuado para la monitorización de la acumulación de amplificado durante la PCR (Wittwer *et al.*, 1997; Morrison *et al.*, 1998). Esta modalidad permite además, comprobar que el producto de amplificación es el esperado: Cada fragmento de amplificación tiene una temperatura de fusión ( $T_m$ ) característica, que es aquella temperatura a la cual el 50% del ADN amplificado se han desnaturalizado o liberado de la doble cadena, es decir, temperatura a la cual la mitad del ADN amplificado está en forma de cadena simple y la otra mitad en doble cadena. Esta temperatura depende sobre todo de la longitud y de la composición de las bases (contenido en G + C) del fragmento de amplificación. La  $T_m$

será la misma para todos los productos de PCR obtenidos con un determinado par de iniciadores, y es característica de cada amplicón, independientemente de las condiciones de la PCR.

Por tanto, de la medida de la  $T_m$  durante la PCR se obtiene una curva de fusión que permite comprobar, aunque no siempre con absoluta garantía, la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR (Ririe *et al.*, 1997), así como comprobar la ausencia de productos de amplificación de PCR inespecíficos que podrían inferir en la cuantificación (Simpson *et al.*, 2000).

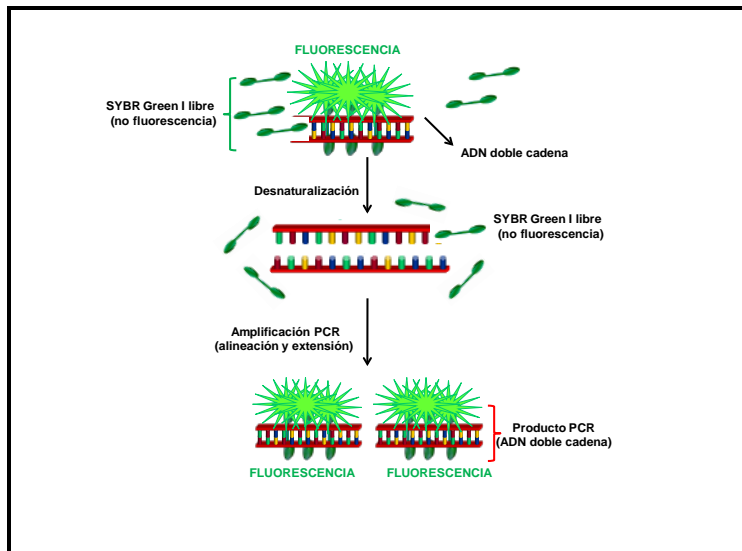


Figura 5. Mecanismo del agente intercalante SYBR Green I

### 5.2.3. Sistemas específicos: Sondas de hibridación

En los sistemas específicos de secuencia se utilizan sondas marcadas con fluoróforos, cuya diana se encuentra en el producto de amplificación, constituyendo un elemento más para conseguir la especificidad deseada. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente entre las moléculas. El método utiliza fluoróforos que actúan como donadores o aceptores de fotones y están unidos a una o varias sondas. Otras estrategias incluyen el marcaje de cebadores o del propio amplificado.

Las sondas de hibridación específicas más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan, las sondas tipo “molecular beacons” y las sondas FRET.

a. *Sondas de hidrólisis o sondas TaqMan.* Son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5', que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3', que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. Existen diferentes fluorocromos que se emplean para el marcaje de las sondas, con características diferentes y espectros de excitación y emisión determinados. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación

del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están ahora espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (Figura 6).

Una variación de la sonda TaqMan son las sondas TaqMan-Locked Nucleic Acids™ (TaqMan-LNA™) (Exiqon A/S, Danish Biotech Company, Vedbaek, Denmark). Estas últimas son sondas TaqMan convencionales pero con modificaciones en el anillo de ribosa. Estas restricciones conformacionales dotan a la molécula de una rigidez estructural que se traduce en las siguientes peculiares características:

- Mayor capacidad de hibridación con la molécula diana
- Mayor especificidad y sensibilidad
- Señal de fluorescencia más potente
- Menos capacidad de dimerización (Exiqon Life Sciences, Denmark)



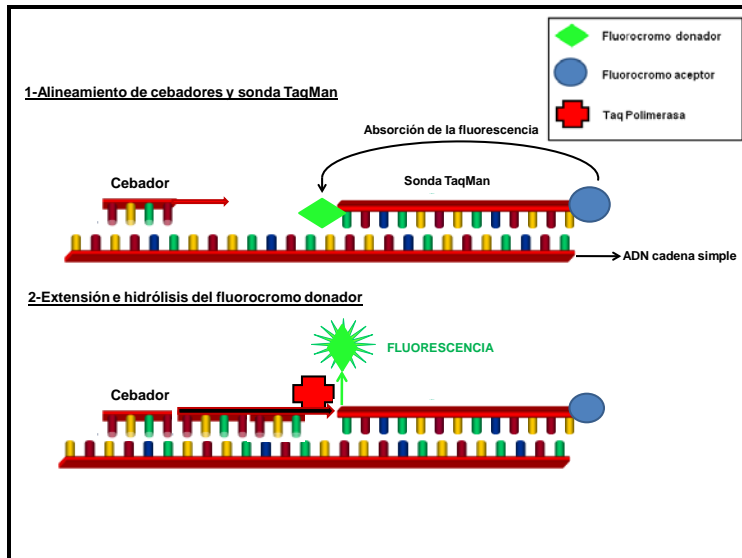


Figura 6. Mecanismo de las sondas de hidrólisis o sondas TaqMan

b. *Molecular beacons*. Son sondas parecidas a las anteriores. Tienen una molécula donadora en el extremo 5' y una aceptora en el extremo 3' pero, además, presentan una estructura secundaria en forma de asa, en la que reside la secuencia de unión específica con el ADN diana. Los extremos permanecen plegados cuando la sonda no está hibridada, lo que conlleva que donador y aceptor estén muy cerca uno de otro. En esta conformación la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor y no es captada por el lector del equipo. Sin embargo, al hibridar con el ADN diana la sonda se abre, alejándose donador y aceptor, pudiendo ser detectada la fluorescencia emitida por el primero (Figura 7).

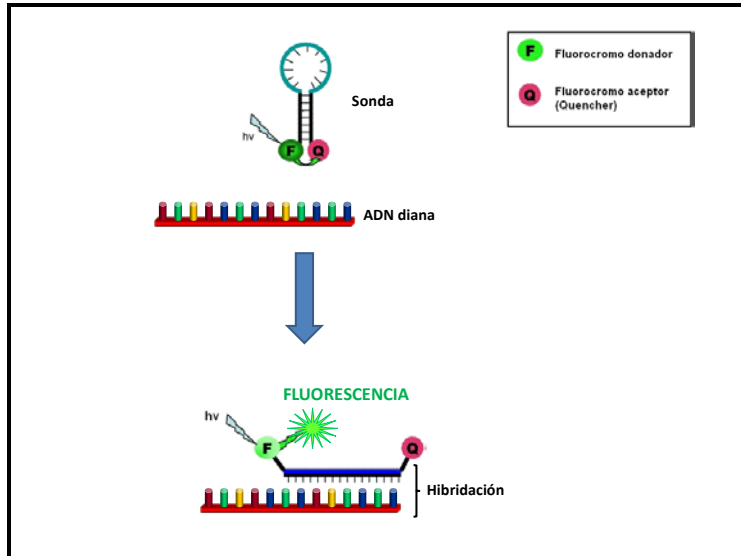
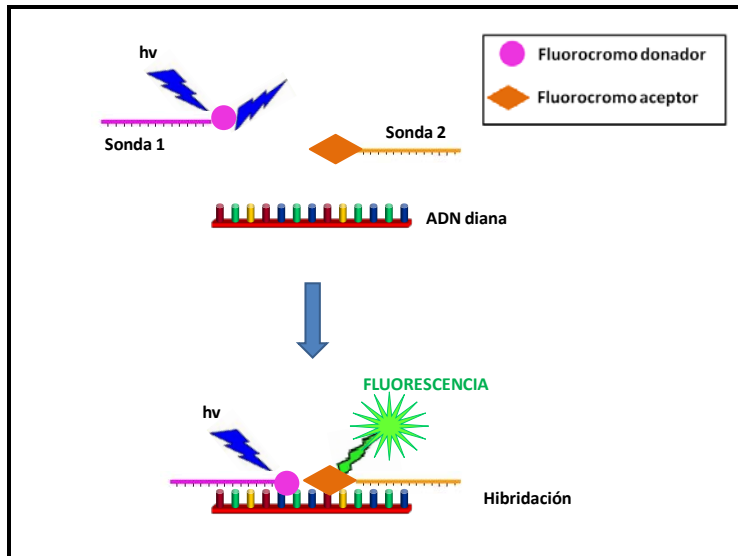


Figura 7. Molecular beacons

- c. *Sondas FRET*. El sistema se compone de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN diana. Una de las sondas lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluorocromos están próximos. Al ser excitado, el donador transfiere su energía al aceptor que, a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo (Figura 8).



**Figura 8. Sondas FRET**

En todos estos sistemas, el incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite detectar polimorfismos o mutaciones puntuales, pero su coste es más elevado que el SYBR Green I y la optimización de las condiciones de la reacción resulta más difícil (Costa J., 2004).

#### **5.2.4. Análisis cuantitativo**

Para realizar el análisis cuantitativo del ADN presente en las muestras es necesario definir una recta patrón. Para ello, se emplean valores de fluorescencia comparables obtenidos con diferentes concentraciones de ADN conocidas, determinando los llamados puntos de corte (crossing points). Estos puntos de corte representan los números de ciclos a partir de los cuáles los niveles de fluorescencia de las muestras son mayores a la fluorescencia de fondo y se les puede asignar un valor. Este número de ciclos específico (y por consiguiente el punto de corte) es dependiente de la cantidad inicial del ADN diana en la muestra: Con cantidades mayores de material inicial serán necesarios menos ciclos para alcanzar el valor específico de fluorescencia.

Existen dos métodos para realizar el análisis de cuantificación con el software del LightCycler, el método "Fit Points" y el método "Second Derivative Maximum". Ambos métodos están referidos a la fase logarítmica, ya que sólo esta fase permite asumir que las reacciones de PCR de todas las muestras ocurren bajo condiciones comparables. Ambos métodos son apropiados para la cuantificación, aunque emplean algoritmos ligeramente diferentes para el cálculo de los puntos de corte.

### Método "Fit Points"

En este método el cálculo de los datos está influenciado por el usuario, ya que se requiere el ajuste manual de diferentes parámetros: línea de base, banda de ruido, línea de corte y puntos de ajuste (fit points). Con este método se permite la optimización de curvas difíciles. Se aplicaría cuando se desea la influencia del usuario en el cálculo de las curvas patrón, y sobre todo, cuando se emplean pocos patrones o éstos son irregulares.

### Método "Second Derivative Maximum"

El método "Second Derivative Maximum" permite un cálculo automático, sin la influencia del usuario. No hay influencia del ruido de fondo, es más rápido y presenta una gran reproducibilidad.

Con este método, el operador indica qué muestras van a emplearse como patrones, y sus concentraciones respectivas. El programa automáticamente muestra la curva estándar (Figura 4), junto con la eficiencia de la reacción y el error cometido en su cálculo.

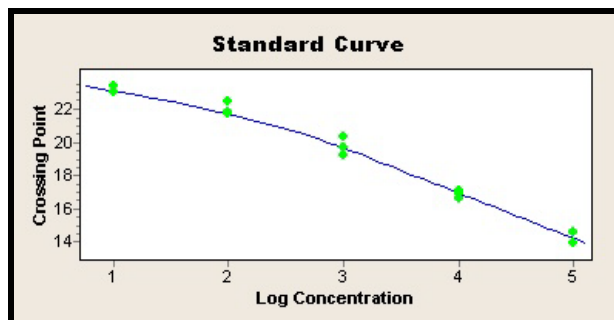


Figura 9. Curva patrón obtenida con el método "Second Derivative Maximum"

En la curva patrón, la concentración de las muestras patrón se enfrenta con los puntos de corte de las muestras. El eje X representa el logaritmo de la concentración inicial de células/ADN, mientras que el eje Y representa el punto de corte para cada concentración, medido en ciclos. Cuando mayor es el punto de corte, menor es la concentración inicial de células/ADN.

La inclinación de la curva indica la rapidez con la que la concentración de células/ADN aumenta con los ciclos de amplificación, es decir la eficiencia de la PCR. Una reacción de amplificación perfecta produciría una curva patrón con una eficiencia de "2", ya que la cantidad de ADN se duplicaría en cada ciclo de amplificación. Realmente, las reacciones suelen tener una eficiencia menor ya que existen muchos factores que la afectan, como la concentración de reactivos, presencia de inhibidores, diseño de los iniciadores, contenido en G+C y tamaño del amplicón, ya que amplicones de menor tamaño tienen una eficiencia mayor (Eckert y Kunkel, 1991).

### **5.2.5. Aplicación de la Q-PCR en alimentos y agua**

La necesidad creciente de asegurar la calidad y seguridad en la industria alimentaria ha supuesto la aceptación y aplicación de una variedad de métodos basados en ácidos nucleicos para la detección y cuantificación rápida y sensible de las bacterias patógenas asociadas a los alimentos. Técnicas como la PCR a tiempo real han acelerado el proceso de detección de patógenos y en algunos casos ha reemplazado a los métodos tradicionales para el recuento de bacterias en los alimentos.

Numerosos grupos de investigación han llevado a cabo sus trabajos mediante el uso de esta técnica. Liming y Bhagwat en 2004 la utilizaron para detectar *Salmonella spp.* en frutas

y vegetales. *Campilobacter jejuni* también ha sido detectado y cuantificado en diferentes tipos de muestras alimentarias, como aves de corral, leche y agua (Yang *et al.*, 2003). También ha servido para detectar resistencias a antibióticos y mutaciones de determinados genes en *C. jejuni* (Dionisi *et al.*, 2004). *Clostridium botulinum* ha sido detectado y cuantificado en salchichas y maíz enlatado (Yoon *et al.*, 2005). Trabajos de cuantificación mediante PCR a tiempo real también han sido llevados a cabo para la detección y cuantificación de distintas especies del género *Vibrio*. *Vibrio parahaemolyticus* ha sido detectado y cuantificado usando sondas TaqMan en ostras, langosta, almejas y diferentes especies de pescados (Cai *et al.*, 2006) y *Vibrio vulnificus* en pescado y en agua del Golfo de Méjico usando SYBR Green I (Panicker *et al.*, 2004).

### **5.3. Detección mediante hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH)**

#### **5.3.1. Introducción**

La hibridación *in situ* está basada en la capacidad que poseen los ácidos nucleicos para hibridar entre sí cuando sus secuencias son complementarias. Su utilidad reside en la capacidad de poder demostrar mediante la utilización de una sonda marcada la presencia de determinada secuencia de ADN o ARN complementaria en la muestra a estudiar.

Esta técnica permite examinar las secuencias de ácidos nucleicos dentro de las células, sin alterar su morfología o la integridad de sus compartimentos. Desde su introducción, la técnica ha sido modificada y adaptada para el estudio de evolución cromosómica y estudios ecológicos y taxonómicos de una gran variedad de especies (Amann *et al.*, 1990; Fuchs *et al.*, 2001).

### 5.3.2. Aspectos metodológicos

La técnica FISH detecta secuencias de ácidos nucleicos mediante una sonda marcada por fluorescencia, que hibrida específicamente con la secuencia complementaria sin dañar la célula. Se emplea como blanco una región del ARN ribosómico 16S o 23S por su estabilidad genética, su estructura, en la que coexisten regiones conservadas con regiones variables y su alto número de copias (Woese C. R., 1987), lo que permite una amplificación de la señal fácilmente detectable.

Esta técnica se ha convertido en una herramienta potente, rápida y sensible para la detección e identificación de microorganismos en diferentes ambientes microbianos (Amann *et al.*, 1995). Presenta ventajas sobre otros métodos, como la PCR o la detección con anticuerpos, ya que no requiere un cultivo previo ni existen sustancias inhibitoras que dificulten la hibridación. Además, FISH combina la precisión de la genética molecular con la información visual de la microscopía, permitiendo la visualización e identificación de células microbianas individuales dentro de su microambiente natural o del tejido enfermo.

Como consecuencia de mejoras continuas, la técnica FISH es hoy en día una herramienta muy útil para llevar a cabo estudios microbiológicos. A través del uso de sondas género-específicas y especie-específicas es posible identificar diferentes microorganismos en las complejas comunidades microbianas, dando así un sólido apoyo a la comprensión de la interacción entre especies. El uso generalizado de FISH permite el estudio de la contribución de cada especie en el medio ambiente, conocer la distribución espacial de las poblaciones microbianas y tener más información del funcionamiento de las comunidades bacterianas multi-



especie (Fuchs *et al.*, 2001). El conocimiento de la composición y distribución de los microorganismos en hábitats naturales puede ser interesante por razones ecológicas en ecología ambiental, y para la seguridad y mejora tecnológica en microbiología de los alimentos.

La mayor limitación del método es su sensibilidad, en función de la propia sonda y de la matriz donde se esté hibridando. El método utilizado para el crecimiento bacteriano, los métodos de fijación de la bacteria y los agentes utilizados para embeber la muestra antes de visualizarla parece que ejercen una importante influencia en la intensidad de la señal (Fuchs *et al.*, 2001).

La parte más crítica de esta técnica es el diseño de las sondas, que deben ser suficientemente específicas para unirse únicamente a la bacteria que se desea detectar. Según la molécula de ARNr que vayamos a estudiar (16S o 23S), hay que tener en cuenta la zona a la que se quiere acceder con la sonda, ya que existen zonas más accesibles que otras debido a la conformación de la molécula de ARN. El tamaño de las sondas oscila entre 15 y 30 pares de bases y las más cortas son las que presentan una mayor accesibilidad, aunque pueden llevar menos marcadores (Fuchs *et al.*, 2001).

### **5.3.3. Marcaje de sondas**

Existen diferentes métodos de marcaje de sondas. El marcaje fluorescente directo es el más usado, ya que es rápido, barato y fácil, y no requiere ningún paso posterior de detección tras la hibridación. Una o más moléculas de colorante fluorescente se unen al oligonucleótido, bien químicamente durante la síntesis a través de un aminoenlace en el extremo 5' terminal de la sonda, o enzimáticamente, utilizando una transferasa terminal que une los nucleótidos

marcados fluorescentemente al extremo 3' terminal (Fuchs *et al.*, 2001).

#### **5.3.4. Especificidad de las sondas**

Para asegurar la especificidad de las sondas, los dos parámetros determinantes van a ser la temperatura y la concentración de formamida en la solución o tampón de hibridación. En la mayoría de protocolos la temperatura de hibridación se mantiene constante y es la concentración de formamida lo que va a dar lugar a unas condiciones más o menos astringentes. La formamida hace que disminuya la temperatura de unión de las sondas mediante el debilitamiento de los puentes de hidrógeno, permitiendo así temperaturas más bajas con condiciones más específicas (Moter y Göber, 2000).

#### **5.3.5. Investigaciones actuales**

Esta técnica es un método relativamente rápido para evaluar la presencia y la actividad de patógenos y otros microorganismos directamente en la muestra estudiada (alimentos, residuos de alimentos, aguas residuales y aguas superficiales). Actualmente son numerosos los trabajos en los que se compara la detección mediante la técnica FISH de especies del género *Vibrio* con técnicas tradicionales en muestras ambientales y clínicas.

En 1999, Giuliano *et al.* diferenciaron qué representantes del género *Vibrio* estaban presentes en superficie y cuáles en la profundidad del mar usando esta técnica de hibridación *in situ*. Moreno *et al.* (1999) usaron sondas de hibridación para detectar *Vibrio spp.* en muestras de agua y limo del hábitat de anguilas. También se han usado sondas específicas para llevar a cabo trabajos de filogenia e identificación de vibrios

patógenos (Aznar *et al.*, 1994). Otro grupo de investigación ha llevado a cabo estudios para diferenciar las poblaciones de *Vibrio spp.* presentes en agua durante las distintas estaciones del año mediante hibridación *in situ* (Thompson *et al.*, 2004). En 2009, Sawabe *et al.* desarrollaron un método basado en la hibridación *in situ* usando diferentes sondas para realizar un recuento rápido de células viables de *Vibrio parahaemolyticus*.

## 6. VALIDACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES

Los laboratorios de diagnóstico microbiológico, tanto clínicos como agroalimentarios y medioambientales, requieren metodologías eficaces en los continuos controles analíticos que realizan. Además, la predisposición de ciertos microorganismos a causar brotes epidémicos, unida a la continua emergencia de patógenos, obliga a los laboratorios a estar preparados para ofrecer respuestas analíticas rápidas y eficaces (Tomás *et al.*, 2007).

Actualmente, los métodos de aislamiento por cultivo son considerados el “gold-standard” o método de referencia para la mayoría de patógenos (Bohaychuk *et al.*, 2005). Sin embargo, a pesar de sus ventajas, éstos presentan inconvenientes y limitaciones tales como elevado tiempo de obtención de resultados, metodología heterogénea y sensibilidad y especificidad bajas. En los últimos años, debido estas limitaciones, el uso de la PCR en el campo del diagnóstico molecular se ha incrementado hasta el punto que se acepta como método estándar para la detección de ácidos nucleicos a partir de gran variedad de tipos de muestras y microorganismos (Mackay, 2004). Debido a las grandes ventajas de estos métodos, la necesidad de incorporarlos en los laboratorios ha crecido espectacularmente y han surgido multitud de dificultades. Una de las causas que ha

perjudicado la extensión de los métodos moleculares entre los laboratorios diagnósticos es la falta de legislación que reconozcan métodos de PCR como métodos oficiales, pese al reconocimiento generalizado de que se tratan de métodos extremadamente potentes. Esto puede ser debido a que los métodos diagnósticos por PCR se han venido empleando como herramientas científicas más que como técnicas analíticas, por lo que existe una carencia de métodos de PCR normalizados (Malorny *et al.*, 2003).

En estos momentos, los laboratorios pueden acreditar, en base a la norma ISO 17025, métodos normalizados, métodos no normalizados y métodos desarrollados por los propios laboratorios o por terceros pero, en cualquier caso, deberán emplear métodos validados.

La validación es el proceso donde se evalúa si un método analítico es aceptable para un propósito definido. Consiste en evaluar las características del procedimiento, y comprobar que dichas características cumplen una serie de requisitos preestablecidos: Se debe tratar de una metodología de fácil aplicación, un tiempo de realización optimizado al mínimo, una interpretación clara y objetiva de los resultados, y disponer de controles internos de reacción para verificar la calidad de la reacción y prevenir la aparición de falsos negativos, con el fin de proporcionar credibilidad y confianza de la información generada y asegurar que las técnicas analíticas utilizadas sean adecuadas, seguras, reproducibles y fidedignas (Tomás *et al.*, 2007).

La validación es un paso importante en el proceso de normalización de un método, ya que proporciona evidencia de que el nuevo método da resultados, al menos tan buenos como el método de referencia en uso actualmente, y acordes con él. También permite confirmar la

reproducibilidad y especificidad del método cuando se utiliza por otros laboratorios (Malorny et al. 2003).

Según la norma ISO 16140:2003, los estudios de validación se dividen usualmente en 2 fases:

La primera fase es un **estudio de comparación del método** alternativo contra el método de referencia, y es desarrollado por el laboratorio organizador. Esta primera fase de la validación tiene como objetivo principal proporcionar toda la información posible respecto al nuevo método: objeto de estudio, límite de detección o de recuperación del microorganismo, rangos óptimos de concentraciones del microorganismo en la muestra donde se obtengan los resultados más satisfactorios, selectividad y especificidad (falsos positivos y negativos), incertidumbres de recuento (analítica y metodológica), y una estimación general de la precisión. Además, se pueden analizar otros requerimientos del método como tiempo y temperatura de incubación, preparación del medio y condiciones de almacenamiento y pre-tratamiento de la muestra, etc.

Para un método cualitativo (presencia/ausencia), el laboratorio deberá obtener experimentalmente, al menos, los valores de los siguientes parámetros: Especificidad, Sensibilidad, Desviación positiva y negativa y Límite de detección. Estos parámetros garantizan su eficacia para detectar un patógeno en particular en un determinado alimento antes de su uso en los laboratorios industriales y de investigación (Bohaychuk *et al.*, 2005).

La **sensibilidad** se define como la proporción de muestras del ensayo que realmente contienen el agente patógeno y responden positivamente a la prueba. La **especificidad** es la capacidad de un método para medir sólo lo que se pretende

medir y se calcula en base a la proporción de muestras del ensayo que realmente no contienen el agente patógeno y responden negativamente a la prueba.

El método alternativo muestra una **desviación positiva** si se obtiene un resultado positivo, mientras que el método de referencia brinda un resultado negativo. Una desviación positiva se convierte en un falso positivo cuando el verdadero resultado puede ser comprobado como negativo. El método presenta una **desviación negativa** si proporciona un resultado negativo cuando el método de referencia brinda un resultado positivo. Una desviación negativa se convierte en un falso negativo cuando el verdadero resultado puede ser comprobado como positivo

La segunda fase de la validación consiste en un **estudio colaborativo interlaboratorio**. El objetivo de esta fase es determinar la variabilidad esperada en los resultados obtenidos en diferentes laboratorios utilizando muestras idénticas, cuando el método sea utilizado en la práctica diaria.

Esta fase de la validación es organizada y controlada por el laboratorio experto, pero desarrollada en otros laboratorios colaboradores. De acuerdo con la norma ISO 16140:2003, para la validación de un método alternativo es recomendable efectuar un ensayo en el que participen al menos 8 laboratorios que no hayan estado involucrados en el desarrollo del método (Malorny, 2007). Este paso es imprescindible si se pretende que el método sea adoptado por laboratorios que dispongan de un sistema oficial de aseguramiento de la calidad (Josefsen *et al.*, 2004).

En el ámbito microbiológico, y en el caso concreto de los métodos de diagnóstico basados en PCR, los ejercicios de

intercomparación constituyen uno de los mejores métodos de que dispone un laboratorio para comprobar la bondad de los métodos que utiliza. Además permiten evaluar externamente la calidad de sus resultados, corregir sus defectos o errores e ir consiguiendo un aval de credibilidad (Malorny *et al.*, 2003).

## **7. TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* Y *VIBRIO VULNIFICUS*. AMPLIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE INICIADORES DE SECUENCIA ALEATORIA (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA, RAPD)**

El objetivo de los estudios de tipificación es averiguar si dos o más cepas están clonalmente relacionadas. Esto supone una herramienta epidemiológica muy valiosa, especialmente para poder determinar las rutas y fuentes de transmisión de infecciones humanas, identificar y controlar, tanto temporal como geográficamente, cepas concretas con importantes características fenotípicas, o desarrollar estrategias para controlar estos organismos dentro de la cadena alimentaria.

Existe una gran variedad de métodos de tipificación, tanto fenotípicos como genéticos. En general, los métodos genéticos presentan mayores niveles de discriminación, a la vez que son más estables y reproducibles que los fenotípicos (Vílchez y Alonso, 2009). Para la tipificación molecular de las especies patógenas del género *Vibrio* se han utilizado numerosas técnicas tales como Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), ribotipado, RAPD-PCR o rep-PCR (Li *et al.*, 2010; Staley and Harwood, 2010).

La amplificación de ADN mediante iniciadores de secuencia aleatoria (RAPD) es una técnica que se usa para detectar pequeñas diferencias genéticas entre microorganismos.

Este método fue descrito por Williams *et al.* (1990), y es uno de los métodos de tipificación molecular más simples. Se basa en la detección de diferencias en la secuencia del ADN genómico total de distintas cepas, amplificando al azar regiones del ADN con secuencias a las que son capaces de unirse iniciadores de secuencia única aleatoria. La amplificación se realiza con una temperatura baja de unión del iniciador. Así, se generan fragmentos de distintos tamaños, que mediante separación en gel de agarosa proporcionan patrones de bandas distintos para aquellas cepas que presentan diferencias en sus secuencias genéticas (Welsh y McClelland, 1990), que son específicas para cada par iniciador-patrón empleados, obteniéndose una huella genómica o “fingerprinting” característica de cada cepa (Tilsala-Timisjarvi y Alatossava, 1998).

Las ventajas de esta técnica son que no es necesario conocer con anterioridad información sobre la secuencia a amplificar y que se puede emplear con gran variedad de especies, requiriéndose poca cantidad de cultivo (Swaminathan y Matar, 1993).

Con cantidades de nanogramos de ADN es suficiente para llevar la reacción a cabo y no tiene por qué ser de doble cadena, altamente purificado o de alto peso molecular (Wang *et al.*, 1993). Estas características hacen que este tipo de amplificación sea especialmente útil para los microorganismos que crecen lentamente, o para los que el cultivo en grandes volúmenes es costoso o peligroso (Wang *et al.*, 1993). RAPD es más rápido que otros métodos (PCR-RFLP, por ejemplo), ya que no se realiza la digestión del producto amplificado. Por el contrario, esta técnica posee una reducida reproducibilidad inter-laboratorios debido a que diferentes parámetros, incluyendo los termocicladores, pueden originar diferencias en el producto de PCR y



traducirse en patrones de bandas distintos. Además, el patrón de bandas que se obtiene en unas determinadas condiciones no siempre es constante (Swaminathan y Barrett, 1995; McPherson *et al.*, 1993).

Numerosos grupos de investigación han demostrado la fiabilidad de la tipificación con RAPD para la diferenciación inter e intra-específica de la mayoría de las especies de *Vibrio*. Actualmente es, junto con la rep-PCR y la secuenciación del ARNr 16S, la técnica más ampliamente utilizada para caracterizar vibrios, y se ha demostrado que distingue de entre biotipos y serovares de diferentes especies del género *Vibrio*, así como entre cepas virulentas y no virulentas. Esta técnica se ha usado en numerosos trabajos para estudiar la virulencia y diferentes biotipos de *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* (Wong *et al.*, 2000; Warner y Oliver, 1999; Wong *et al.*, 1999). Otros autores han usado esta técnica para diferenciar biotipos (Aznar *et al.*, 1993), distintos serovares (Arias *et al.*, 1998) y aislados clínicos de ambientales (Hoi *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1995) de *V. vulnificus*. También ha sido utilizada para examinar la relación genética entre cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de berberechos (Bilung *et al.*, 2005).



## OBJETIVOS



Actualmente *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* son considerados patógenos emergentes debido al aumento en su incidencia y a la mayor distribución geográfica de los casos de intoxicación alimentaria.

El principal problema en la detección e identificación de estas dos especies bacterianas radica en la falta de un sistema eficaz para determinar su presencia en matrices alimentarias y ambientales.

Todo ello nos llevó a establecer tres objetivos globales:

1. Desarrollo y optimización de métodos de detección molecular de *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, basados en el análisis de los ácidos nucleicos, ADN y ARN: PCR tradicional, PCR a tiempo real e Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH).
  - Búsqueda y diseño de iniciadores específicos y puesta a punto de métodos de detección de *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* mediante PCR tradicional.
  - Puesta a punto de métodos de PCR múltiple para la detección simultánea de *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* con la finalidad de minimizar el tiempo y el coste del análisis.
  - Diseño de sondas TaqMan y puesta a punto de métodos de PCR a tiempo real para la detección y cuantificación de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*.
  - Diseño de sondas y puesta a punto de una técnica de detección de *Vibrio spp.* mediante FISH.

- Aplicación de los métodos en muestras de alimentos de origen marino y agua inoculadas artificialmente.
2. Aplicación de las técnicas basadas en el análisis de los ácidos nucleicos para la detección de *Vibrio spp.*, y la detección y cuantificación de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en aguas de playa y depuradora y en alimentos de origen marino.
    - Detección de *Vibrio spp.* en muestras de alimentos y aguas de playa y residuales mediante FISH, PCR tradicional y PCR múltiple.
    - Detección y cuantificación de *V. parahaemolyticus* en muestras de alimentos y aguas de playa y residuales mediante PCR tradicional, PCR múltiple y PCR a tiempo real.
    - Detección y cuantificación de *V. vulnificus* en muestras de alimentos y aguas de playa y residuales mediante PCR tradicional, PCR múltiple y PCR a tiempo real.
  3. Aislamiento, identificación y caracterización molecular de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* aislados de las muestras ambientales y alimentarias.
    - Aislamiento de cepas pertenecientes a las dos especies bacterianas estudiadas en medio de cultivo selectivo TCBS.
    - Caracterización fenotípica: identificación bioquímica de las cepas mediante el uso del sistema comercial API20E.

- Caracterización genética de las cepas mediante amplificación de ADN con iniciadores de secuencia aleatoria (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) y análisis de los perfiles generados.





## *MATERIAL Y MÉTODOS*



## 1. CEPAS BACTERIANAS

Para la realización de este estudio se emplearon un total de 33 cepas de referencia. Entre ellas se incluyeron cepas del género *Vibrio* y cepas representantes de especies bacterianas presentes de forma habitual en las matrices ambientales y alimentarias objeto de este estudio, procedentes de la American Type Culture Collection (ATCC), National Collection of Type Cultures, United Kingdom (NCTC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Germany (DMSZ) y de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Tabla 1).

### 1.1. Condiciones de cultivo

El cultivo de las cepas del género *Vibrio* se llevó a cabo en Agar Triptona y Soja (TSA) adicionado de un 2% de NaCl (mTSA 2% NaCl) a 37°C durante 24 horas.

El resto de especies incluidas en el estudio se sembraron en un agar nutritivo y se incubaron en condiciones adecuadas para su crecimiento, según el manual de la colección de cultivos tipo de la que procedía la cepa.

### 1.2. Conservación de las cepas

Todas las cepas incluidas en el trabajo se conservaron por duplicado a -20°C y -80°C en caldo nutritivo adicionado con un 50 y un 20% de glicerol, respectivamente, y cuentas de plástico.

## Material y métodos

ESPECIE	CEPA	ORIGEN
<i>Arcobacter cibarius</i>	NCTC 11885	
<i>Arcobacter nitrofigilis</i>	CECT 7204	
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	CECT 863 <sup>†</sup>	
<i>Clostridium botulinum</i>	CECT 551	
<i>Clostridium perfringens</i>	CECT 4647	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CECT 648 <sup>†</sup>	
<i>Enterobacter cloacae</i>	CECT 194 <sup>†</sup>	
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 12900	
<i>Escherichia coli</i>	CECT 4953	
<i>Escherichia coli</i>	CECT 4558	
<i>Listeria innocua</i>	CECT 910 <sup>†</sup>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	CECT 935	
<i>Micrococcus luteus</i>	CECT 245	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145	
<i>Pseudomonas sp.</i>	CECT 4355	
<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica	CECT 4138	
<i>Salmonella typhimurium</i>	NCTC 12117	
<i>Shigella dysenteriae</i>	CECT 584 <sup>†</sup>	
<i>Shigella sonnei</i>	CECT 457	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus	CECT 240	
<i>Vibrio fluvialis</i>	CECT 4217	
<i>Vibrio furnissii</i>	CECT 4349	
<i>Vibrio mediterranei</i>	CECT 621	
<i>Vibrio mediterranei</i>	CECT 622	
<i>Vibrio mytili</i>	CECT 632	
<i>Vibrio natriegens</i>	CECT 526	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CECT 511	Humano
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CECT 611	Agua de mar
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CECT 612	Agua de mar
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CECT 588	Mejillón
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CECT 5304	Peces
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	vpC10 *	

<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	vpC32 *	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	9954-4 **	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotipo O3:K4	CECT 5271	Berberechos
<i>Vibrio vulnificus</i>	CECT 529	Clínico (Sangre)
<i>Vibrio vulnificus</i>	CECT 897	Anguila
<i>Vibrio vulnificus</i>	CECT 4863	Humano
<i>Vibrio vulnificus</i>	CECT 5167	Clínico (Sangre)
<i>Vibrio vulnificus</i>	CECT 5198	Anguila
<i>Vibrio vulnificus</i>	CECT 5165	Agua de mar
<i>Vibrio vulnificus</i>	DMSZ 10143	Clínico (Sangre)
<i>Vibrio vulnificus</i>	vvC5 *	
<i>Vibrio vulnificus</i>	vvC34 *	

\*Cepas cedidas por el Departamento de Microbiología, Universidad de Valencia

\*\*Cepa cedida por AINIA, Valencia

<sup>T</sup>: Cepa tipo

**Tabla 1. Cepas de referencia utilizadas**

## **2. PUESTA A PUNTO DE MÉTODOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* Y *VIBRIO VULNIFICUS* MEDIANTE PCR TRADICIONAL**

### **2.1. Aislamiento del ADN genómico bacteriano**

Para el aislamiento del ADN bacteriano se utilizó el sistema comercial de extracción “REAL-PURE EXTRACCIÓN DNA GENÓMICO” (Durviz, Paterna, España, REF: RBMEG02). Se partió de un cultivo puro, del cual se cogió una cantidad aproximada de un asa de siembra cargada que se resuspendió en 1 ml de tampón TE (Tris-EDTA).

Para comprobar que la extracción de ADN se había realizado correctamente se preparó un gel con una concentración de 1% de agarosa en tampón TAE (Tris-Acético-EDTA). Se realizó la electroforesis del gel a 100 voltios durante 30 minutos. Al finalizar, el gel se tiñó con bromuro de etidio (15) durante 15 minutos y la presencia de ADN se comprobó tras visualización a la luz ultravioleta.

### **2.2. Puesta a punto de métodos de detección e identificación de *Vibrio spp.*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* mediante PCR tradicional**

Todos los iniciadores utilizados en este trabajo se encuentran recopilados en el Anexo IV, Tabla 1.

Para la puesta a punto de todas las reacciones de PCR se probaron diversas concentraciones de MgCl<sub>2</sub> e iniciadores. Las concentraciones de MgCl<sub>2</sub> ensayadas fueron de 1, 2, 3, 4 y 5 mM y las concentraciones de iniciadores evaluadas fueron 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 y 1,2 mM. Para cada reacción se estudiaron las temperaturas de unión de los iniciadores y los tiempos de extensión de los productos que resultaran más adecuados.

La especificidad de los iniciadores se comprobó *in silico*, usando la base de datos del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) y el programa BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) e *in vitro* mediante amplificación de todas las cepas bacterianas mencionadas en la Tabla 1.

### 2.2.1. Detección de *Vibrio spp.*

En el caso de la detección de las especies del género *Vibrio* se emplearon los iniciadores descritos por Thompson *et al.* (2004), que amplifican una región de 114 pares de bases del ARNr 16S:

**567F: GCGTAAAGCGCATGCAGGT**

**680R: GAAATTCTACCCCCCTCTACAG**

Se partió de una temperatura de ensayo de 55°C (temperatura teórica de unión del iniciador 680R a la hebra de ADN), que se fue aumentando gradualmente de 2 en 2°C hasta 64°C. Los tiempos de extensión evaluados fueron 30 segundos, 1, 2 y 3 minutos.

### 2.2.2. Detección de *Vibrio parahaemolyticus*

En el caso de *V. parahaemolyticus* se procedió a la amplificación del gen de la hemolisina termolábil (*tlh*) usándose los iniciadores R-TL y L-TL cuyas secuencias fueron descritas por Taniguchi *et al.* (1985). Estos dos iniciadores amplifican un fragmento de 450 pares de bases. Las secuencias de nucleótidos son las siguientes:

**L-TL: AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG**

**R-TL: GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGC**

Los primeros ensayos se realizaron a una temperatura de 55°C, que fue aumentándose de 2 en 2°C hasta una temperatura de 68°C. Los tiempos de extensión evaluados fueron 1, 2 y 3 minutos.

### 2.2.3. Detección de *Vibrio vulnificus*

Para la amplificación de un fragmento del gen de la hemolisina A (*vvhA*) de *V. vulnificus* se utilizaron los iniciadores VVH785 y VVH990 (Panicker *et al.*, 2003). Estos dos iniciadores amplifican un fragmento de 205 pares de bases:

**VVH785: TTCCAACCTCAAACCGAACTATGAC**

**VVH990: ATCCAGTCGATGCGAATACGTTG**

Los primeros ensayos se realizaron a una temperatura de 56°C, que fue aumentándose de 2 en 2°C hasta los 62°C. Los tiempos de extensión evaluados fueron 30 segundos, 1, 2 y 3 minutos.



### **2.3. Detección conjunta de *Vibrio spp.*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* mediante PCR múltiple.**

Para la detección simultánea de *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en la misma reacción de PCR se diseñó un protocolo empleando los iniciadores descritos en apartados anteriores. Para *Vibrio spp.* se usaron 567F y 680R, para *V. parahaemolyticus* R-TL y L-TL y para *V. vulnificus* VVH785 y VVH990.

Se evaluaron diferentes temperaturas de unión del iniciador (desde 56°C hasta 68°C) aumentándose de 2 en 2°C y diferentes tiempos de extensión del producto (30 segundos, 1, 2 y 3 minutos).

### **2.4. Análisis de los productos de PCR**

En todos los casos, 10 µl del producto generado por la PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,8% en tampón TAE 1X sometido a 110 V durante 60 minutos. Los fragmentos se visualizaron bajo luz ultravioleta (UV) tras teñirlos con bromuro de etidio a una concentración del 1%.

## **3. PUESTA A PUNTO DE MÉTODO DE DETECCIÓN DE *VIBRIO SPP.*, *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* Y *VIBRIO VULNIFICUS* MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON SONDAS FLUORESCENTES (FISH).**

### **3.1. Sondas empleadas para la detección de *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus***

Todas las sondas utilizadas en este trabajo se encuentran recopiladas en el Anexo IV, Tabla 2.

### 3.1.1. Detección de *Vibrio spp.*

Para la detección de *Vibrio spp.* mediante hibridación *in situ* se usaron diferentes sondas complementarias a regiones específicas del ARNr 16S. Para comprobar la especificidad teórica de las sondas se llevó a cabo un análisis de las secuencias de la sonda con las secuencias almacenadas en los bancos de datos accesibles en Internet (Anexo IV). La especificidad real fue comprobada mediante hibridación de las mismas con la batería de cepas de referencia (Tabla 1).

Las secuencias de las sondas son las siguientes:

**GV: 5'-AGGCCACAACCTCCAAGTAG** diseñada por Giuliano *et al.* (1999)

**VIB: 5'-ACAGTACTCTAGTCTGCCAG** diseñada por Moreno *et al.* (1999)

### 3.1.2. Detección de *Vibrio parahaemolyticus*

Para la detección de *V. parahaemolyticus* se procedió al diseño de una sonda de secuencia específica dirigida al gen ARNr 23S, obtenida mediante el alineamiento de las secuencias del ARNr 23S de *V. parahaemolyticus* almacenadas en los distintos bancos de datos (Anexo IV). La especificidad de la sonda se comprobó de forma teórica mediante el programa BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)). La secuencia de la sonda fue la siguiente:

**VPA: 5'-AATACATAGGGTAAGGAGGCG**

### 3.1.3. Detección de *Vibrio vulnificus*

Para la detección de *V. vulnificus* mediante hibridación *in situ*, se emplearon sondas descritas por diferentes autores y sondas diseñadas en este trabajo, usando los datos obtenidos del alineamiento de las secuencias de ARNr 16S y 23S de *V. vulnificus*. Para ello se compararon entre sí las secuencias del gen que codifica el ARNr 23S y 16S de *V. vulnificus* con la del resto de microorganismos cuyas secuencias se encontraban almacenadas en diferentes bancos de datos (Anexo IV).

La especificidad de todas las sondas fue comprobada teóricamente mediante el programa BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)).

Las secuencias de las sondas fueron las siguientes:

**Vvul23S296:** 5'-ACTCAATGATACTGGCTTA obtenida a partir de un iniciador para PCR diseñado por Randa *et al.* (2004)

**Vvu3:** 5'-ACCGTTCGTCTAACACAT diseñada por Aznar *et al.* (1994)

**Vul23:** 5'-ATGATACTGGCTTATGCCAG diseñada en este trabajo

**Vvran2:** 5'-TACACAATCTGCTTGCCA diseñada en este trabajo

### 3.1.4. Sondas EUB

Como control positivo del dominio Eubacteria, se empleó una combinación de tres sondas complementarias de una región del ARNr 16S (EUB). Estas sondas hibridan con todas las bacterias que pueden estar presentes en la muestra (Fuchs *et al.*, 1998; Amann *et al.*, 1990):

**EUB338-I: 5´-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3´**

**EUB338-II: 5´-GCAGCCACCCGTAGGTGT-3´**

**EUB338-III: 5´-GCTGCCACCCGTAGGTGT-3´**

Todas las sondas empleadas fueron sintetizadas y marcadas por TIP MOLBIOL (Berlin, Alemania) con 6-carboxyfluoresceína (6-FAM), y con Cy3.

### **3.2. Condiciones de hibridación**

Para llevar a cabo la fijación de las células se tomó un asa de siembra cargada de un cultivo puro y se resuspendió en 1 ml de PBS 1X. Tras la homogeneización, se procedió a la centrifugación (8 minutos-8000 rpm). El precipitado resultante se lavó dos veces con 1ml de PBS 1X (Anexo III). Tras el lavado y centrifugación de la muestra el sedimento se resuspendió en PBS 1X y paraformaldehído en proporción 1:3, y se mantuvo durante 3 horas a 4°C. A continuación se procedió a dos lavados de la muestra con 1 ml de PBS 1X y tras los mismos, se resuspendió el sedimento con etanol y PBS 1X en proporción 1:1 y se almacenó a -20°C.

Una vez fijadas, las muestras se depositaron sobre los pocillos de los portaobjetos de hibridación, tratados previamente con gelatina. A continuación, se dejaron secar al aire, y se procedió a las deshidrataciones, sumergiendo el portaobjetos durante 3 minutos en 50, 80 y 100% de etanol sucesivamente.

Una vez secos los portaobjetos, cada uno de los pocillos se cubrió con 10µl de solución de hibridación conteniendo 50 ng de sonda marcada con el correspondiente fluorocromo:

**SOLUCIÓN DE HIBRIDACIÓN**

**0,9 M/l NaCl**

**0,01% SDS**

**20 mM/l Tris-HCl**

**FORMAMIDA (X%)**

**pH 7,6**

Para la puesta a punto de la técnica se probaron distintas concentraciones de formamida, entre 0 y 40%.

La reacción de hibridación se llevó a cabo a 46°C en condiciones de oscuridad según Moreno *et al.* (2001). El tiempo de hibridación fue de 1,5 a 2 horas. Una vez finalizada la hibridación, se procedió al lavado del portaobjetos con una solución de lavado atemperada a 48°C, durante 15 minutos, en oscuridad:

**SOLUCIÓN DE LAVADO**

**5mM/l EDTA**

**0,01% SDS**

**20 mM/l Tris-HCl**

**NaCl 0,5 M (X µl)**

A la solución de lavado se le añadió una concentración de NaCl condicionada por el porcentaje de formamida utilizado en la hibridación.

<b>% FORMAMIDA</b>	<b>μl de NaCl 0,5M</b>
<b>Solución de Hibridación</b>	<b>Solución de lavado</b>
0	9000
10	4500
20	2150
30	1020
40	460

Tras el lavado, los portaobjetos se lavaron con agua destilada y se secaron al aire en oscuridad. A continuación, se montaron con FluoroGuard Antifade Reagent (Bio-Rad) entre cubre y portaobjetos y se visualizaron mediante un microscopio de fluorescencia Olympus BX 50 con los filtros U-MWB, U-MWIB y U-MWIG. Las fotografías se realizaron con la cámara Olympus DP-71 y el software Cell<sup>^</sup>A Imaging software for life science Microscopy (Olympus soft Imaging Solution, Münster, Alemania).

#### **4. PUESTA A PUNTO DE MÉTODOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* Y *VIBRIO VULNIFICUS* MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL**

##### **4.1. Aislamiento del ADN genómico bacteriano**

La extracción del ADN que se iba a emplear para la reacción de PCR en tiempo real se realizó de la forma explicada en el apartado 2.1.

##### **4.2. Puesta a punto de dos métodos de detección de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* mediante PCR a tiempo real usando agentes intercalantes (SYBR Green I)**

Para la detección de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* se emplearon los mismos iniciadores usados en la detección de ambas especies mediante PCR tradicional, ya que estos iniciadores amplifican una secuencia con un tamaño que está dentro del rango óptimo para la PCR a tiempo real (100-500 pares de bases).

Se procedió a la puesta a punto de la PCR evaluando diferentes temperaturas de unión de los iniciadores (desde 60°C hasta 68°C) y tiempos de extensión (desde 10 hasta 20 segundos).

Para poner a punto el método de detección de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* mediante PCR en tiempo real, se siguieron los protocolos experimentales del manual LightCycler Operator's Manual Version 4.0 ([www.Roche-mb.com](http://www.Roche-mb.com)).

Algunos valores se mantuvieron constantes para el protocolo de amplificación con LightCycler, mientras que otros dependían del ADN diana y de los iniciadores. Por tanto, estos parámetros tuvieron que ser ajustados para la combinación específica del ADN diana y los iniciadores usados en este proceso.

Las condiciones óptimas de la PCR se establecieron probando diferentes concentraciones de iniciadores (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,0  $\mu\text{M}$ ) y de  $\text{MgCl}_2$  (1, 2, 3, 4 y 5 mM). La reacción se llevó a cabo empleando el sistema comercial LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science, Ref. 03 003 230 001).

La especificidad de los iniciadores se comprobó *in silico*, usando la base de datos del NCBI y el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e *in vitro* mediante amplificación de todas las cepas bacterianas mencionadas en la Tabla 1.

#### **4.2.1. Análisis cualitativo**

Para realizar el análisis cualitativo se obtuvieron las curvas de amplificación, donde se representaba el aumento de la fluorescencia obtenido frente al incremento de los ciclos de amplificación (Figura 1).



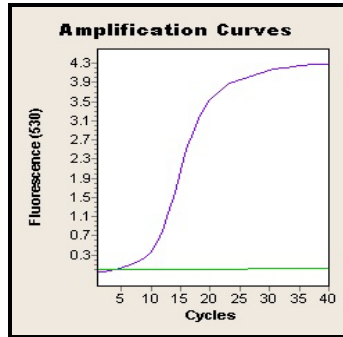


Figura 1. Curva de amplificación: se observa el aumento de la fluorescencia a medida que se incrementan los ciclos de amplificación

También se obtuvieron las curvas de fusión (melting curves), que muestran el descenso brusco de la fluorescencia a una determinada temperatura de fusión. Este descenso de temperatura es debido a que la doble cadena de ADN se separa liberando moléculas del agente intercalante SYBR Green I introducidas entre la misma durante los ciclos de amplificación (Figura 2).

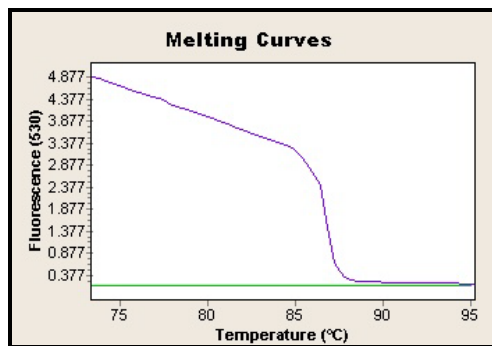


Figura 2. Curva de fusión: se observa un descenso brusco de la fluorescencia a una determinada temperatura

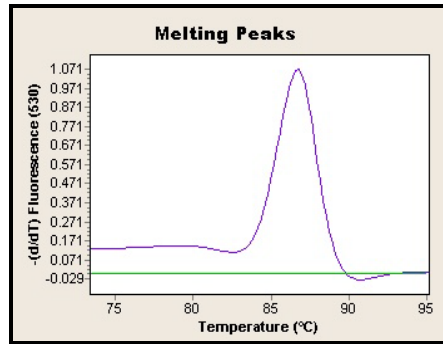


Figura 3. Representación del pico de fusión (melting peak) que muestra la temperatura de fusión

El software LightCycler 4.0 usado en la puesta a punto de este método de detección transforma los datos de fluorescencia de forma que muestra una representación visual más intuitiva de la temperatura de fusión (Figura 3).

#### 4.3. Puesta a punto de un método de detección de *Vibrio vulnificus* mediante PCR a tiempo real usando sondas de hibridación específicas (Sondas TaqMan)

Para poner a punto los métodos de detección de *V. vulnificus* mediante PCR en tiempo real se siguieron los protocolos experimentales del manual LightCycler Operator's Manual Version 4.0 ([www.Roche-mb.com](http://www.Roche-mb.com)). Al igual que en el caso anterior, unos valores se mantuvieron constantes para en el protocolo de amplificación con LightCycler, mientras que otros dependían del ADN diana y de los iniciadores usados. Así pues, estos parámetros tuvieron que ser ajustados para la combinación específica ADN diana-iniciador.

Las condiciones óptimas de la PCR se establecieron probando diferentes concentraciones de iniciadores (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,0  $\mu\text{M}$ ) y de sondas TaqMan (0,05, 0,075 y 0,1  $\mu\text{M}$ ).

Para la detección de *V. vulnificus* se emplearon los mismos iniciadores usados en la detección mediante PCR tradicional. Se procedió a la puesta a punto de la PCR evaluando diferentes temperaturas de unión de los iniciadores (desde 56°C hasta 62°C) y tiempos de extensión (desde 5 hasta 20 segundos). La reacción se llevó a cabo empleando el kit LightCycler TaqMan Master (Roche, Mannheim, Germany. Ref. 04 535 286 001)

Se diseñaron las sondas TaqMan VVH-TM y TaqMan-LNA VVH-TM-LNA, cuyas dianas se encuentran en el producto de la amplificación entre los nucleótidos 190 y 212 del gen de la hemolisina A de *V. vulnificus*. Las sondas están marcadas en el extremo 5' con el fluoróforo (donador de fotones) 6FAM (6-carboxyfluoresceína) y en el extremo 3' con la molécula aceptora de fotones ("quencher") TAMRA (tetra-methylcarboxyrhodamina).

#### **VVH-TM: 5'-CTGCTGTTGGTTGACGAGCCCGC-3'**

El diseño de la sonda TaqMan VVH-TM y de la sonda LNA VVH-TM-LNA fue llevado a cabo usando el software Primer Express (Applied Biosystem, USA). La especificidad de la sonda se comprobó usando la base de datos del NCBI y el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y mediante la amplificación de todas las cepas bacterianas nombradas en la tabla 1.

#### **4.4. Análisis de los productos de PCR**

El análisis de los productos de PCR se llevó a cabo usando el LightCycler software 4.0 de Roche.

## 5. PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* Y *VIBRIO VULNIFICUS* MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

### 5.1. Curvas patrón para la cuantificación de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*

Se realizaron las curvas patrón para la cuantificación de cada uno de los microorganismos utilizados en este trabajo. Para ello, se partió de suspensiones de un cultivo en fase exponencial de crecimiento de cada una de las especies analizadas, y se prepararon diluciones decimales seriadas en PBS 1X. De un mililitro de cada dilución se obtuvo el ADN de forma mecánica con el sistema automatizado QIAcube (QIAGEN, Alemania), usando el protocolo de extracción de ADN “QIA Amp DNA Mini Kit” (QIAGEN, Alemania, Cat Nº: 51304). Estas muestras se utilizaron para la medida de la concentración de ADN y como diana para la reacción de amplificación de cada especie.

La medida de la concentración de ADN se realizó mediante fluorimetría, empleando y siguiendo las instrucciones del método comercial “Quant-iT PicoGreen® dsDNA Assay kit” (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), el cual incorpora el fluorocromo “PicoGreen” de alta afinidad al ADN de doble cadena. Para cuantificar cada patrón, fue generada una curva estándar con los tubos que contenían 1,5, 10, 25 y 50 ng de ADN del fago lambda de concentración conocida incluidos en el kit. Tras obtener la curva estándar de ADN del fago lambda se pasó a cuantificar cada patrón mediante el uso del programa de cuantificación de ADN del LightCycler y usando como curva patrón la calculada con el fago lambda.

Paralelamente se realizó una cuantificación de células por recuento en placa para cada especie en agar TCBS. Para ello se sembraron 100  $\mu$ l de cada una de las diluciones seriadas en dos placas de TCBS, se incubaron a 37°C durante 24-48 horas y se contaron las colonias crecidas en cada placa para obtener así el número de unidades formadoras de colonia por mililitro de la suspensión inicial de células.

Las curvas patrón para la cuantificación se obtuvieron representando gráficamente los puntos de corte, obtenidos de tres replicados en cuatro ensayos independientes, frente a la cantidad de células, usando el método "Second Derivative Maximum". Además se realizó paralelamente la misma curva patrón pero relacionando los puntos de corte con la concentración de ADN, para obtener así tanto datos de concentración de ADN como de cuantificación de número de células y del límite de detección teórico del método.

La figura 4 nos muestra las curvas de amplificación de las distintas diluciones de ADN y las tres réplicas de cada dilución, que se emplean como patrones para una de las curvas patrón.

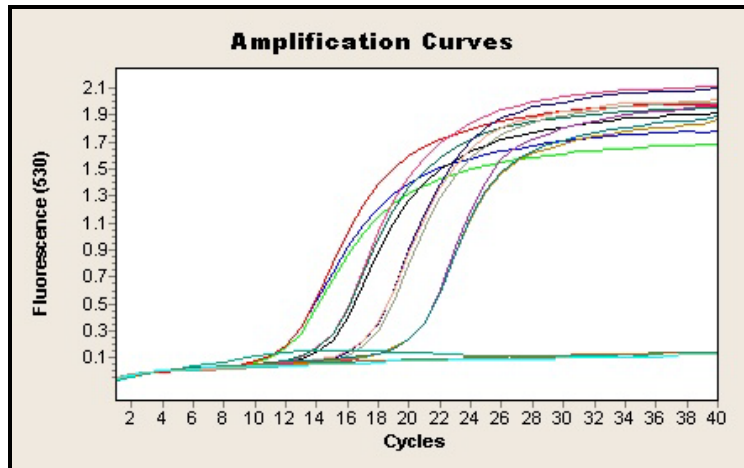


Figura 4. Curvas de amplificación de los distintos patrones de *V. parahaemolyticus*, mostrando dos réplicas de cada patrón

## 6. APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS DESARROLLADOS A LA DETECCIÓN EN MUESTRAS INOCULADAS ARTIFICIALMENTE

### 6.1. Detección de *Vibrio spp.* y *Vibrio parahaemolyticus* en muestras inoculadas artificialmente mediante cultivo, PCR y FISH

#### 6.1.1. Análisis del límite de detección en alimentos de origen marino inoculados artificialmente

Para determinar el límite de detección en alimentos de origen marino, se llevó a cabo un ensayo, por triplicado, con muestras inoculadas artificialmente con diferentes concentraciones de *V. parahaemolyticus*.

Para ello, 10 g de carne de mejillón previamente analizado por PCR y cultivo para comprobar que estaba libre de *Vibrio* se añadieron a bolsas estériles que contenían 90 ml de Agua de Peptona Alcalina adicionada al 2% con NaCl (APW 2%). Cada bolsa se inoculó con 1 mililitro de cada una de las diluciones seriadas de un cultivo en fase de crecimiento exponencial de *Vibrio parahaemolyticus* CECT 511, desde  $10^9$  hasta  $10^0$  ufc/g. La cantidad de células contenidas en cada dilución se calculó mediante recuento en placa de agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa), incubando las placas a 37°C durante 24-48 horas.

Tras la homogeneización de las bolsas con el alimento durante dos minutos se procedió a la extracción de 1 ml de la muestra para la detección y cuantificación de la bacteria mediante PCR tradicional y PCR en tiempo real usando los iniciadores 567F y 680R para *Vibrio spp.*, y los iniciadores R-TL y L-TL para *V. parahaemolyticus*. Otro mililitro se fijó con paraformaldehído para el posterior análisis mediante la técnica FISH.

Por último, se sembraron 100 µl en agar TCBS y se incubaron a 37°C durante 24-48 horas para la detección mediante cultivo.

Los mismos análisis se llevaron a cabo tras enriquecimiento durante 24 horas a 37°C (Figura 5).

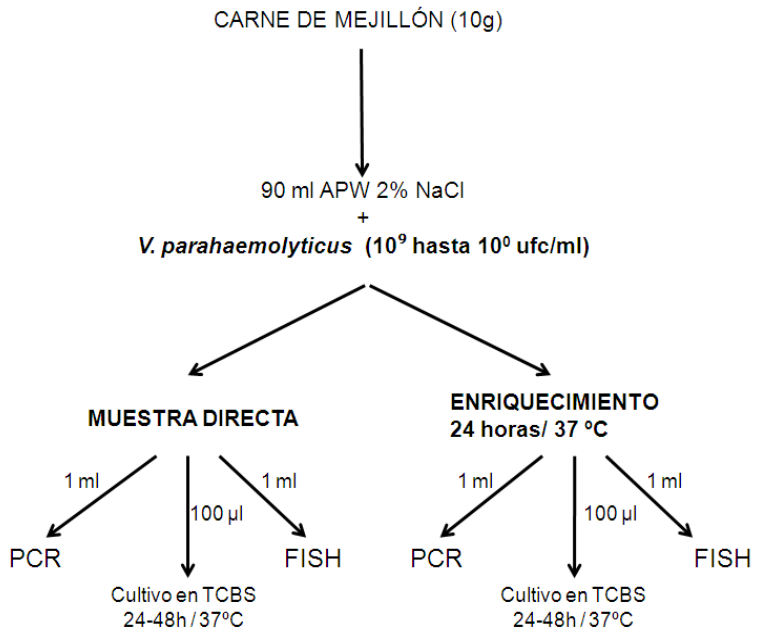


Figura 5. Detección de *V. parahaemolyticus* en muestras de alimentos de origen marino inoculadas con concentraciones crecientes de la bacteria



### 6.1.2. Análisis del límite de detección en aguas inoculadas artificialmente

Para determinar el límite de detección de las distintas técnicas citadas en apartados anteriores en muestras de agua se llevó a cabo un ensayo, por triplicado, con muestras de agua de mar esterilizada.

Se prepararon muestras de 99 ml de agua de mar, previamente analizada por PCR y cultivo para comprobar que estaba libre de *Vibrio*, que se inocularon con un mililitro de cada una de las diluciones seriadas de un cultivo en fase de crecimiento exponencial de *Vibrio parahaemolyticus* CECT 511, desde  $10^9$  hasta  $10^0$  ufc/ml. La cantidad de células contenidas en cada dilución se calculó mediante recuento en placa de agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa) e incubando las placas a 37°C durante 24-48 horas.

Las muestras de agua inoculadas se agitaron y a continuación se procedió a su centrifugación (4200 r.p.m. durante 20 minutos). Para el análisis directo de la muestras, el precipitado obtenido se resuspendió en 2100 µl de PBS 1X. Un mililitro se usó para la extracción de ADN para la detección mediante PCR tradicional y PCR en tiempo real, utilizando los iniciadores 567F y 680R para *Vibrio spp.*, y los iniciadores R-TL y L-TL para *V. parahaemolyticus*. Otro mililitro se destinó para la detección mediante la técnica FISH y los 100 µl restantes se sembraron en una placa de agar TCBS (Figura 6).

Para evaluar la necesidad de un paso previo de enriquecimiento, se procedió a la filtración por una membrana estéril de 0.45µm de tamaño de poro, de 99 ml de agua de mar esterilizada inoculada con 1 mililitro de cada una de las diluciones seriadas del mismo cultivo en fase de crecimiento exponencial de *V. parahaemolyticus* CECT 511 usado para la detección directa, desde  $10^9$  hasta  $10^0$  ufc/ml. Las membranas de filtración se introdujeron en matraces que contenían 100 ml de agua de peptona tamponada adicionada con NaCl al 2% (APW 2%). Los matraces se agitaron para alcanzar una correcta homogeneización y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Una vez incubados, de los caldos de enriquecimiento se procedió a extraer las mismas cantidades y a proceder del mismo modo que para la detección directa (Figura 7).

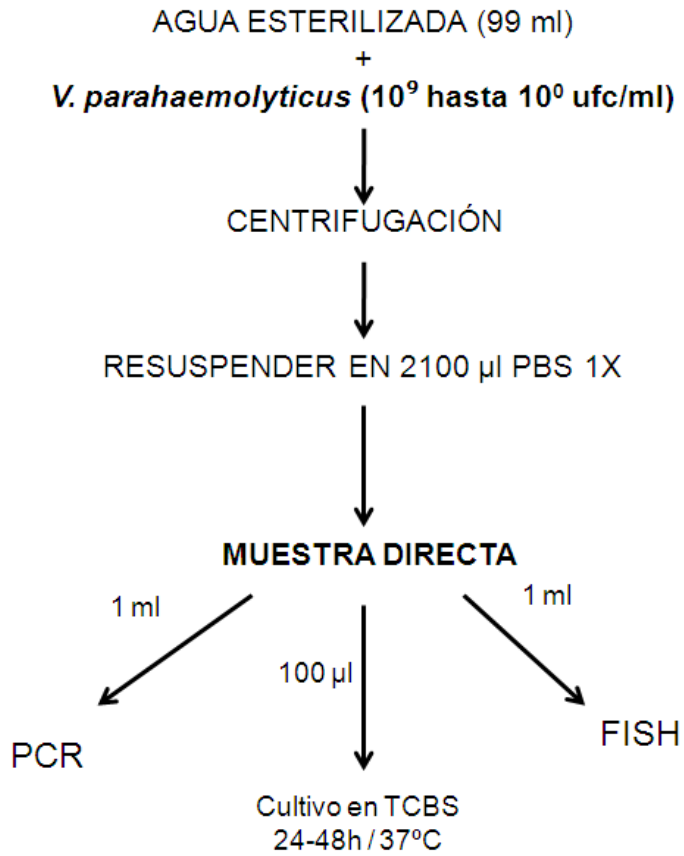


Figura 6. Detección directa de *V. parahaemolyticus* en muestras de agua inoculadas artificialmente con concentraciones crecientes de la bacteria

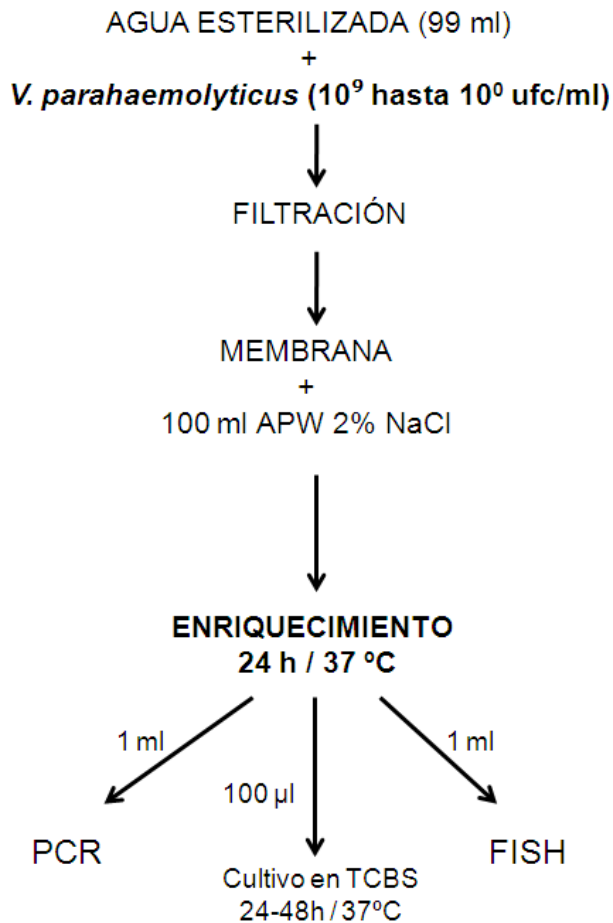


Figura 7. Detección tras enriquecimiento de *V. parahaemolyticus* en muestras de agua inoculadas artificialmente con concentraciones crecientes de la bacteria

## **6.2. Ensayo colaborativo para la evaluación del método de PCR a tiempo real para *V. parahaemolyticus*.**

En este trabajo hemos evaluado el método de PCR a tiempo real para la detección de *V. parahaemolyticus* realizando un ejercicio colaborativo en el que participaron 7 laboratorios situados en distintos puntos de España y que poseen termocicladores para realizar la PCR a tiempo real de diferentes marcas (Tabla 2):

Código del laboratorio	Nombre del laboratorio	Localización del Laboratorio	Tipo de termociclador
Laboratorio 1	CENTRO DE SALUD PÚBLICA DE VALENCIA Laboratorio de microbiología	Valencia	Pocillos
Laboratorio 2	AINIA Laboratorio de bioensayos	Paterna (Valencia)	Pocillos
Laboratorio 3	LABORATORIO SALUD PUBLICA ASTURIAS Laboratorio de Microbiología	Oviedo (Asturias)	Pocillos
Laboratorio 4	ANFACO Laboratorio microbiología y toxinas	Vigo (Pontevedra)	Capilares
Laboratorio 5	AGÈNCIA DE SALUT PÚBLICA DE BARCELONA Laboratorio de Microbiología	Barcelona	Capilares
Laboratorio 6	INSTITUTO DE INGENIERÍA DEL AGUA Y MEDIO AMBIENTE (IIAMA), UNIVERSIDAD POLITÉCNICA VALENCIA Laboratorio de Microbiología	Valencia	Capilares
Laboratorio 7	DPTO. BIOTECNOLOGÍA, UNIVERSIDAD POLITÉCNICA VALENCIA Laboratorio de Microbiología	Valencia	Capilares

**Tabla 2. Nombre, localización y tipo de termociclador de los laboratorios que participaron en el ensayo interlaboratorio para la evaluación del método de PCR a tiempo real para la detección de *V. parahaemolyticus***

El ejercicio se llevó a cabo en dos fases:

- En primer lugar, una vez puesta a punto la técnica en nuestro laboratorio, se procedió a redactar un esquema de los procedimientos de ensayo y a remitir a los diferentes laboratorios participantes el esquema de ensayo, los

reactivos necesarios para su ejecución, según el tipo de termociclador que poseen, así como cepas de referencia. Los laboratorios realizaron una primera fase de puesta a punto y entrenamiento en la ejecución de los ensayos, de forma que todos ellos debían ser capaces de detectar cinco cepas de referencia de *V. parahaemolyticus* y descartar 2 cepas de *V. vulnificus*.

- En la segunda fase, se realizó el ejercicio colaborativo organizado por AINIA Centro Tecnológico, que consistió en el envío de las instrucciones sobre la realización del ensayo, cuatro muestras a analizar y documentación para el envío de resultados, así como la posterior evaluación de los mismos.

Dadas las limitaciones para el desarrollo de material de referencia para la realización del estudio colaborativo, se procedió a solicitar este material a la Agencia de Salud Pública del Reino Unido (HPA), que previamente ha sido caracterizado y utilizado para la realización de ensayos interlaboratorios de control de calidad en laboratorios a nivel mundial. Dicho material consistía en viales de vidrio conteniendo mezclas liofilizadas de diversos microorganismos. Sobre cada lote se realiza un control de calidad consistente en la realización de análisis de 10 viales seleccionados al azar mediante el método de referencia ISO 16140:2003.

El contenido de cada una de las cuatro muestras objeto de ensayo fueron:

<b>CODIGO</b>	<b>A-01</b>
<b>MICROORGANISMOS</b>	<i>Citrobacter spp.</i> ( $10^4$ u.f.c.) <i>Escherichia coli</i> ( $10^4$ u.f.c.) <i>Pseudomonas putida</i> ( $10^5$ u.f.c.) <i>Vibrio cholerae</i> ( $10^3$ u.f.c.) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ( $10^2$ u.f.c.)
<b>VALOR DE REFERENCIA</b>	$7.1 \times 10^2$ u.f.c. /g

<b>CODIGO</b>	<b>A-02</b>
<b>MICROORGANISMOS</b>	<i>Bacillus pumilus</i> ( $10^4$ u.f.c.) <i>Escherichia coli</i> ( $10^4$ u.f.c.) <i>Pseudomonas fluorescens</i> ( $10^5$ u.f.c.) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ( $10^3$ u.f.c.)
<b>VALOR DE REFERENCIA</b>	$8.9 \times 10^2$ u.f.c. /g

<b>CODIGO</b>	<b>A-03</b>
<b>MICROORGANISMOS</b>	<i>Escherichia coli</i> ( $10^4$ u.f.c.) <i>Klebsiella oxytoca</i> ( $10^4$ u.f.c.) <i>Pseudomonas fluorescens</i> (<10 u.f.c.) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ( $10^2$ - $10^3$ u.f.c.)
<b>VALOR DE REFERENCIA</b>	$1.4 \times 10^3$ u.f.c. /g

<b>CODIGO</b>	<b>A-04</b>
<b>MICROORGANISMOS</b>	<i>Escherichia coli</i> ( $10^4$ u.f.c.) <i>Pseudomonas fluorescens</i> ( $10^5$ u.f.c.) <i>Vibrio cholerae</i> ( $10^4$ u.f.c.) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ( $10^4$ u.f.c.)
<b>VALOR DE REFERENCIA</b>	$2,2 \times 10^4$ u.f.c. /g



Para el análisis de resultados se usó el esquema de evaluación incluido en la norma ISO 16140:2003, comparando los resultados obtenidos frente al valor de referencia para determinar los valores de la Especificidad, Sensibilidad, Eficacia relativa, Desviación positiva y Desviación negativa para el ensayo.

### **6.3. Detección de *Vibrio vulnificus* en muestras inoculadas artificialmente mediante cultivo, PCR y FISH**

#### **6.3.1. Análisis del límite de detección en alimentos de origen marino inoculados artificialmente**

Para determinar el límite de detección, de forma directa y después del enriquecimiento, de las distintas técnicas citadas en apartados anteriores en alimentos de origen marino se llevó a cabo un ensayo, por triplicado, con muestras inoculadas artificialmente con diferentes concentraciones de *V. vulnificus*.

Para ello, se aplicó el mismo protocolo que con *V. parahaemolyticus* (ver punto 6.1.1.). Para realizar el inóculo se usó la cepa *Vibrio vulnificus* CECT 529, a concentraciones desde  $10^9$  hasta  $10^0$  ufc/ml (Figura 8).

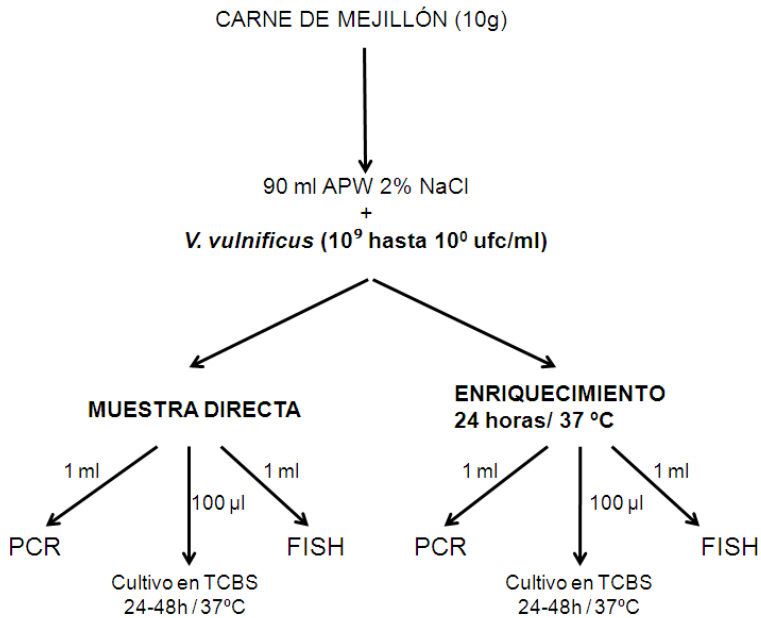


Figura 8. Detección de *V. vulnificus* en muestras de alimentos de origen marino inoculadas con concentraciones crecientes de la bacteria

### 6.3.2. Análisis del límite de detección en aguas inoculadas artificialmente

Para determinar el límite de detección de las distintas técnicas citadas en apartados anteriores, en muestras de agua directamente y después de enriquecimiento, se llevó a cabo un ensayo, por triplicado, con muestras de agua de mar esterilizada.

Para ello, se aplicó el mismo protocolo que con *V. parahaemolyticus* (ver punto 6.1.2.). Para realizar el inóculo se usó la cepa *Vibrio vulnificus* CECT 529, a concentraciones desde  $10^9$  hasta  $10^0$  ufc/ml (Figuras 9 y 10).

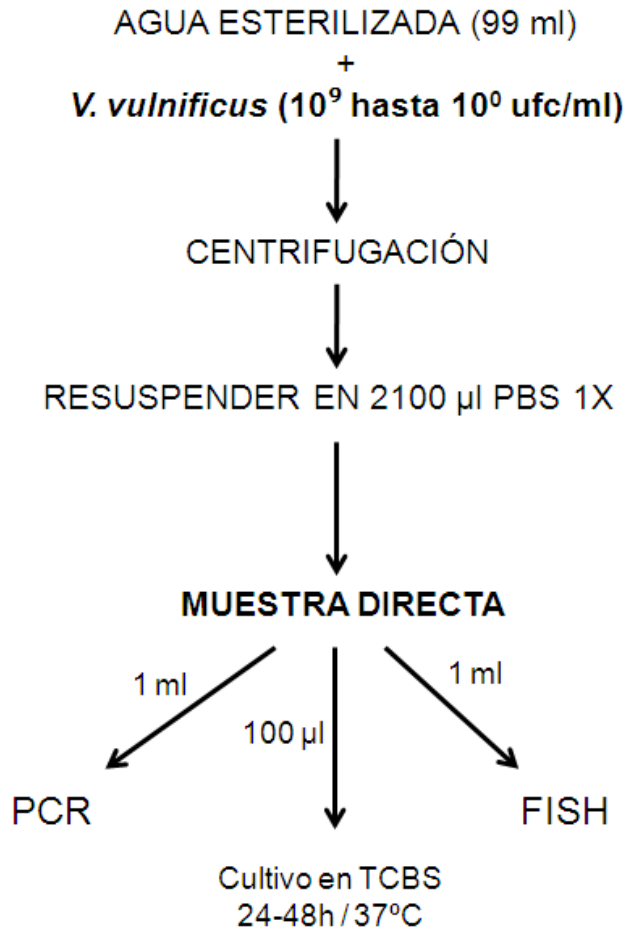


Figura 9. Detección directa de *V. vulnificus* en muestras de agua inoculadas artificialmente con concentraciones crecientes de la bacteria

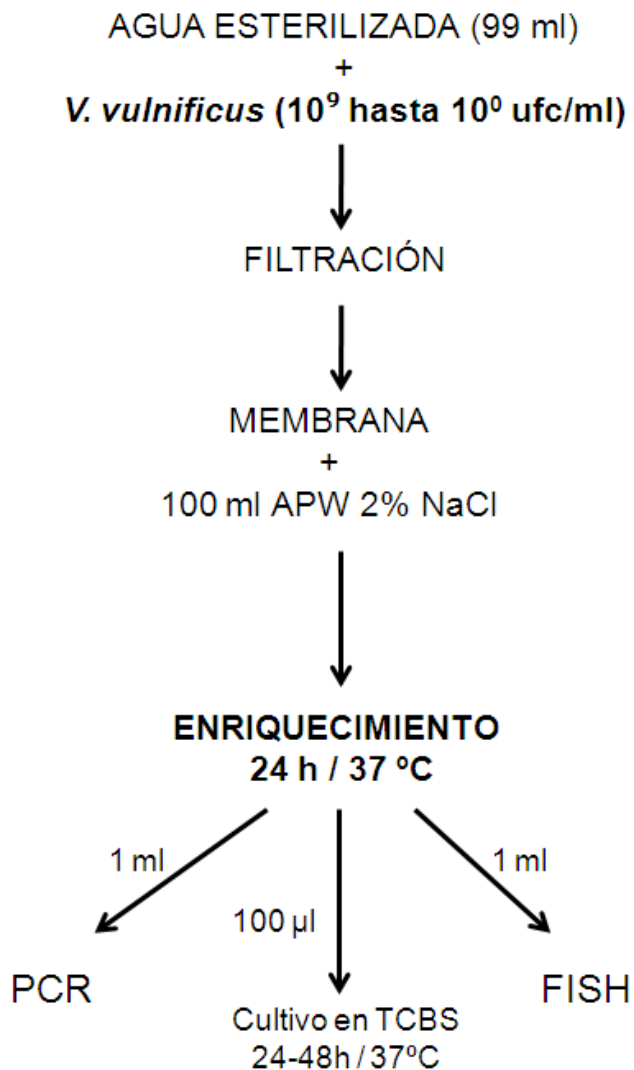


Figura 10. Detección tras enriquecimiento de *V. vulnificus* en muestras de agua inoculadas artificialmente con concentraciones crecientes de la bacteria

## **7. APLICACIÓN EN MUESTRAS DE ALIMENTOS DE ORIGEN MARINO Y AGUAS**

Una vez puestos a punto los métodos de detección para *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, se comprobó la utilidad de éstos en alimentos de origen marino y en aguas, tanto de playa como residuales.

### **7.1. Detección de *Vibrio spp.*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en muestras alimentarias de origen marino**

Se analizaron 83 muestras de alimentos para evaluar la presencia de *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*: 22 muestras de mejillón, 22 muestras de almeja, 12 de ostra, 2 muestras de anguila, 14 de chirla, 2 de tellina, 2 de gamba, 3 muestras de salmón, 2 de cangrejo y dos muestras de percebe (Tabla 1-Anexo VI).

Para el procesado de las muestras se procedió del mismo modo que en los apartados 6.1.1 y 6.3.1, con la única diferencia de que la cantidad usada para cada análisis fue de 25 gr, que se homogeneizaron en 225 ml de APW 2% NaCl.

### **7.2. Detección de *Vibrio spp.*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en muestras de agua**

Se analizaron 120 muestras de agua para evaluar la presencia de *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*: 32 muestras de agua de mar procedentes de las playas más cercanas a la ciudad de Valencia y 88 muestras de agua residual procedentes de tres Estaciones Depuradoras de Agua Residual de la Comunidad Valenciana y de acequia de Valencia (Tabla 2-Anexo VI).

Para el procesado de las muestras se procedió del mismo modo que en los apartados 6.1.2 y 6.3.2.

### **7.3. Aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en medio de cultivo selectivo TCBS**

Para el aislamiento de posibles cepas pertenecientes a las dos especies del género *Vibrio* en estudio, 100 µl de cada muestra de agua, sin y con enriquecimiento, se sembraron por duplicado en agar TCBS. Para alimentos, 10 g de de cada muestra se añadieron a bolsas estériles que contenían 90 ml de Agua de Peptona Alcalina adicionada al 2% con NaCl (APW 2%), y se procedió a su homogeneización durante dos minutos. Posteriormente, 100 µl de cada muestra, sin y con enriquecimiento, se sembraron por duplicado en agar TCBS. Tras 24-48 horas de incubación a 37°C, las colonias con coloración verde se resembraron dos veces en agar TCBS para obtener un cultivo puro.

Tras el crecimiento, se realizó la identificación bioquímica de cada cepa aislada mediante el uso del sistema comercial API20E.

### **7.4. Secuenciación de los productos de amplificación**

Para confirmar la identificación de las cepas aisladas en agar TCBS y caracterizadas fenotípicamente, el ADN extraído de las cepas de *V. parahaemolyticus* se amplificó usando los iniciadores R-TL y L-TL mediante el protocolo descrito en el apartado 2.2.2., y el de las cepas aisladas de *V. vulnificus* se amplificó mediante los iniciadores VVH785 y VVH990 como se describe en el apartado 2.2.3.

Además, se llevó a cabo la amplificación del ARNr 16S de todas las cepas aisladas. Para ello, se usaron los iniciadores

27f (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492r (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3') descritos por Lane (1991). La amplificación se llevó a cabo a una temperatura de unión de los iniciadores de 42°C (Engel *et al.*, 2004). Los productos de las tres amplificaciones fueron purificados con un *kit* de Qiaquick PCR (Qiagen Iberia S.L., Madrid, España), según el protocolo del fabricante.

Todos los productos de amplificación fueron secuenciados. La secuenciación fue llevada a cabo en la empresa Sistemas Genómicos S.L. (Valencia, España). La similitud de los fragmentos obtenidos con las secuencias correspondientes a las especies de *Vibrio* disponibles en las bases de datos se determinó con el programa de alineación BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

## 8. DETERMINACIÓN DEL BIOTIPO DE LAS CEPAS DE *V. VULNIFICUS*

Para la determinación del biotipo de las cepas *de V. vulnificus* aisladas de las muestras de alimentos y de aguas se utilizaron dos parejas de iniciadores diseñados por Senoh *et al.* en 2005.

El primer par de iniciadores amplificaban un fragmento del gen *vvhA* de 813 pares de bases característico de las cepas de *V. vulnificus* biotipo 1, patógenas de anguilas, cuyas secuencias son:

**vvhA-1F: 5'- AGATTAAGTGTGTGTTGCACACAAGCGGTG**

**vvhA-1R: 5'- ACCGAAAACAGCGCTGAAGGAAGAACGGTA**

El segundo par de iniciadores amplificaban también un fragmento del gen *vvhA* de 813 pares de bases pero que es característico de las cepas de *V. vulnificus* biotipo 2, patógenas de humanos. Las secuencias de estos dos iniciadores son:

**vvhA-2F: 5´- AAATTAAGTGCCTGCTACACACAAGTGGTG**  
**vvhA-2R: 5´- ACTGAGAAGAGTGCTGAAGGGATTACCGTA**

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo del modo descrito por Senoh *et al.* (2005) en un volumen de reacción de 40 µl y siguiendo el siguiente protocolo de amplificación:

Nº ciclos	Temperaturas y tiempos	Proceso
1 ciclo	95°C durante 2 min	Desnaturalización
35 ciclos	95°C durante 30 segundos	Desnaturalización
	57°C durante 30 segundos	Unión al iniciador
	72°C durante 90 segundos	Extensión del producto
1 ciclo	72°C durante 90 segundos	Extensión del producto

Para comprobar la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X sometido a 90 V durante 90 minutos. Los fragmentos se visualizaron bajo luz ultravioleta (UV) tras teñirlos con bromuro de etidio a una concentración del 1%.

## **9. AMPLIFICACIÓN DEL ADN MEDIANTE INICIADORES DE SECUENCIA ALEATORIA (“RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA” O RAPD)**

Para la caracterización de las cepas obtenidas en este trabajo se utilizaron 2 iniciadores distintos, de 15 y 10 pares de bases, para la caracterización de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*.



El primero de ellos, fue el iniciador M13, descrito por Huey and Hall en 1989:

**M13: 5' - GAGGGTGGCGTTCT - 3'**

El segundo fue el iniciador 7254, descrito por Lane en 1991:

**7254: 5' - AGTCAGCCAC - 3'**

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen total de 50 µl, conteniendo:

<b>Taq- ADN polimerasa</b>	<b>2,5 U</b>
<b>Tampón Buffer (10 x)</b>	<b>5 µl</b>
<b>Desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP)</b>	<b>200 µM</b>
<b>Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub>)</b>	<b>4 µM</b>
<b>Iniciador</b>	<b>0,4 µM</b>
<b>ADN muestra</b>	<b>5 µl</b>
<b>Agua</b>	<b>32 µl</b>

Y el protocolo de amplificación fue el siguiente:

<b>Nº ciclos</b>	<b>Temperaturas y tiempos</b>	<b>Proceso</b>
1 ciclo	94°C durante 5 min	Desnaturalización
35 ciclos	94°C durante 1 min	Desnaturalización
	32°C durante 2 min	Unión al iniciador
	72°C durante 2 min	Extensión del producto
1 ciclo	72°C durante 2 min	Extensión del producto

Para comprobar la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X sometido a 90 V durante 90 minutos. Los fragmentos se visualizaron bajo luz ultravioleta (UV) tras teñirlos con bromuro de etidio a una concentración del 1%.

### 9.1. Análisis de los perfiles de bandas generados por RAPD

Los perfiles de bandas fueron visualizados bajo luz ultravioleta y se registraron en un soporte informático. A continuación, los perfiles electroforéticos se analizaron con el programa informático TDI-Lane Manager (TDI, España).

El primer paso del análisis consistió en determinar el tamaño de cada banda, mediante extrapolación de la distancia de migración de los fragmentos del marcador (100 pb DNA Ladder, Fermentas). Para ello, se empleó el programa 1D-Manager (TDI), mediante el cual se definen los perfiles de bandas y el perfil de referencia correspondiente al marcador de peso molecular, de modo que el programa estima el tamaño de las diferentes bandas de cada microorganismo.

Posteriormente, se construye una matriz de distribución de los fragmentos. En la matriz, las filas representan las diversas bandas generadas por amplificación del ADN y las columnas se corresponden con los distintos microorganismos analizados. La comparación entre microorganismos se realiza mediante el coeficiente de similitud de Dice (SD), definido como:

$$S_D = \frac{2a}{2a + b + c}$$

siendo: a: número de bandas comunes para ambas cepas.

b y c: número de bandas no comunes en cada cepa.

Con ayuda del programa informático Lane Manager (TDI) se determinan los coeficientes de similitud de Dice para cada combinación de parejas de microorganismos. El programa construye una matriz de similitud cuyas filas y columnas se corresponden con los microorganismos y que está compuesta por los valores del coeficiente de Dice. Aplicando el algoritmo matemático UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Average Linkage) los microorganismos son agrupados basándose en la similitud de sus perfiles de bandas y se construye una representación gráfica de las relaciones entre los microorganismos analizados, denominada "Dendrograma".

Además de la obtención del dendrograma, el programa informático nos permite obtener el grado de correlación cofenética ( $r$ ) entre la matriz de similitud original y el dendrograma. La correlación cofenética es el coeficiente lineal de Pearson, este valor nos mide la proporcionalidad entre ambas matrices. Si el valor de  $r$  está entre 1 y 0,9 la clasificación realizada en el dendrograma es exacta. Cuanto más nos alejemos de este valor, menos fiable será la clasificación que nos marca el dendrograma.



## RESULTADOS



## 1. PUESTA A PUNTO DE MÉTODOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *VIBRIO SPP.*, *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* Y *VIBRIO VULNIFICUS* MEDIANTE PCR CONVENCIONAL

### 1.1. Detección mediante PCR simple

#### 1.1.1. Detección de *Vibrio spp.*

Tras evaluar diversas concentraciones de iniciadores y MgCl<sub>2</sub> con los iniciadores 567F y 680R (Thompson *et al.*, 2004), la reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen de 30 µl conteniendo tampón 10X, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada nucleótido, 0,4 µM de los iniciadores 567F y 680R, 0,75 U del enzima *Taq* ADN polimerasa y 2 µl de ADN molde de cada muestra.

La mezcla de reacción fue sometida a los siguientes ciclos de temperatura:

Nº ciclos	Temperatura	Tiempo	Proceso
1	94°C	2 minutos	Desnaturalización
35	94°C	1 minuto	Desnaturalización
	58°C	1 minuto	Alineación
	72°C	2 minutos	Extensión
1	72°C	3 minutos	Extensión

Una temperatura de unión de los iniciadores de 58°C fue suficiente para conseguir la amplificación de todas las cepas del género *Vibrio* estudiadas.

Se comprobó la especificidad de los iniciadores con la batería de cepas de referencia descritas en Material y Métodos. Las especies del género *Vibrio* mostraron una banda de amplificación de 114 pares de bases (Figura 1). Las especies

no pertenecientes al género no mostraron amplificación cuando se sometieron a PCR empleando estos iniciadores y condiciones de amplificación.

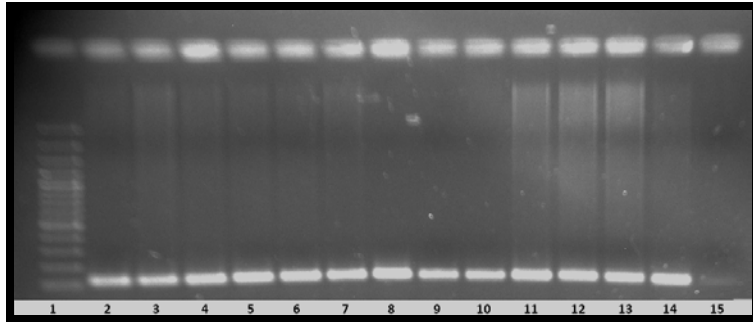


Figura 1. Detección de *Vibrio spp.*: 1, Marcador de peso molecular (100pb); 2, *Vibrio fluvialis* CECT 4217; 3, *Vibrio mediterranei* CECT 621; 4, *Vibrio mytili* CECT 632; 5, *Vibrio furnissii* CECT 4349; 6, *Vibrio natriegens* CECT 526; 7, *Vibrio vulnificus* CECT 529; 8, *Vibrio vulnificus* DMSZ 10143; 9, *Vibrio vulnificus* CECT 5167; 10, *Vibrio vulnificus* CECT 5198; 11, *Vibrio vulnificus* CECT 4863; 12, *Vibrio parahaemolyticus* CECT 511; 13, *Vibrio parahaemolyticus* CECT 612; 14, *Vibrio parahaemolyticus* CECT 5271; 15, Control negativo

El límite de detección de la técnica fue de  $1 \times 10^4$  u.f.c./ml.

### 1.1.2. Detección de *Vibrio parahaemolyticus*

Los iniciadores empleados fueron R-TL y L-TL (Taniguchi *et al.*, 1985). Tras evaluar distintas concentraciones de iniciadores,  $MgCl_2$  y BSA, la reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ l conteniendo: Taq $\alpha$ rp 10X, 5 mM de  $MgCl_2$ , 0.2 mM de cada nucleótido, 0,4  $\mu$ M de los iniciadores R-TL y L-TL, 0,8  $\mu$ g/ml de BSA, 0,75 U del enzima Taq ADN polimerasa y 2,5  $\mu$ l de ADN molde de cada muestra.



La mezcla de reacción se sometió a los siguientes ciclos de temperatura:

Nº ciclos	Temperatura	Tiempo	Proceso
1	94°C	3 minutos	Desnaturalización
35	94°C	1 minuto	Desnaturalización
	68°C	1 minuto	Alineación
	72°C	2 minutos	Extensión
1	72°C	3 minutos	Extensión

La especificidad de los iniciadores R-TL y L-TL se comprobó con las cepas de referencia enumeradas en Material y Métodos. Se observó la banda esperada de 450 pares de bases en las tres cepas de *V. parahaemolyticus* estudiadas (Figura 2). No se observó banda de amplificación en el resto de cepas analizadas.

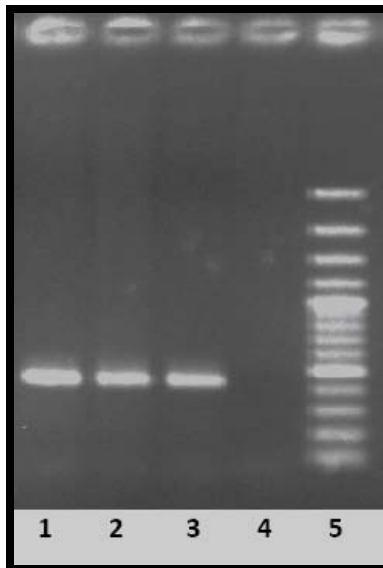


Figura 2. Detección de *Vibrio parahaemolyticus*: 1, *Vibrio parahaemolyticus* CECT 511; 2, *Vibrio parahaemolyticus* CECT 612; 3, *Vibrio parahaemolyticus* CECT 5271; 4, Control negativo; 5, Marcador de peso molecular (100 pb)

El límite de detección de la técnica fue de  $1 \times 10^2$  u.f.c./ml.

### 1.1.3. Detección de *Vibrio vulnificus*

Se emplearon los iniciadores VVH785 y VVH990 (Panicker *et al.*, 2003). Tras evaluar diferentes condiciones, la reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de  $30 \mu\text{l}$  conteniendo: Tampón 10X, 4 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,16 mM de cada nucleótido,  $1 \mu\text{M}$  de cada uno de los iniciadores VVH785 y VVH990, 1,25 U de *Taq* ADN polimerasa y  $2,5 \mu\text{l}$  de ADN molde de cada muestra.

La reacción se sometió a los siguientes ciclos de temperatura:

Nº ciclos	Temperatura	Tiempo	Proceso
1	94°C	3 minutos	Desnaturalización
35	94°C	1 minuto	Desnaturalización
	60°C	1 minuto	Alineación
	72°C	1 minuto	Extensión
1	72°C	1 minuto	Extensión

La especificidad de los iniciadores VVH785 y VVH990 se comprobó con la batería de cepas de referencia descritas en material y métodos. Se observó la banda de amplificación de 205 pares de bases en las siete cepas de *V. vulnificus* analizadas (Figura 3). No se observó dicha banda de amplificación ni en las otras especies del género *Vibrio*, ni en el resto de cepas estudiadas.

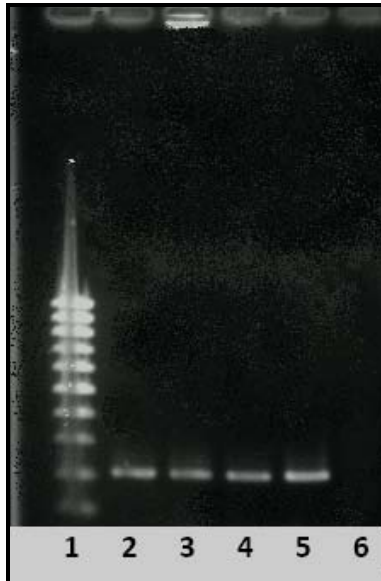


Figura 3. Detección de *Vibrio vulnificus*: 1, Marcador de peso molecular (100 pb); 2, *Vibrio vulnificus* CECT 529; 3, *Vibrio vulnificus* CECT 5167; 4, *Vibrio vulnificus* CECT 5198; 5, *Vibrio vulnificus* DMSZ 10143; 6, Control negativo

El límite de detección de la técnica fue de  $1 \times 10^4$  u.f.c./ml.

### 1.2. Detección conjunta de *Vibrio spp.*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* mediante PCR múltiple

Se usaron los iniciadores 567F/680R, R-TL/L-TL y VVH785/VVH990 para la detección de *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* respectivamente.

La reacción más eficaz consistió en un volumen final de 60  $\mu$ l conteniendo 4  $\mu$ l de ADN molde de cada muestra, 0,4  $\mu$ M de los iniciadores 567F y 680R, 0,4  $\mu$ M de los iniciadores R-TL y L-TL, 1  $\mu$ M de los iniciadores VVH785 y VVH990, 6 mM de

MgCl<sub>2</sub>, 1 µg/ml de BSA, 0.25 mM de cada nucleótido y 2.25 U *Taq* ADN polimerasa.

Una temperatura de unión de las tres parejas de iniciadores al ADN diana de 65°C fue suficiente para la detección específica de todas las especies del género *Vibrio* y las dos especies *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, observándose tres bandas típicas de amplificación de 114, 450 y 205 pares de bases, respectivamente.

Nº ciclos	Temperatura	Tiempo	Proceso
1	94°C	3 minutos	Desnaturalización
35	94°C	1 minuto	Desnaturalización
	65°C	1 minuto	Alineación
	72°C	2 minutos	Extensión
1	72°C	3 minutos	Extensión

La especificidad de los iniciadores se comprobó una vez más con todas las cepas de referencia. Solamente se observaron bandas de amplificación de 114 pares de bases en las cepas del género *Vibrio*, de 450 pb en las diferentes cepas de *V. parahaemolyticus* y de 205 pb en las cepas de *V. vulnificus* (Figura 4 y 5). El resto de cepas analizadas no pertenecientes al género *Vibrio* no presentaron ninguna de las bandas.

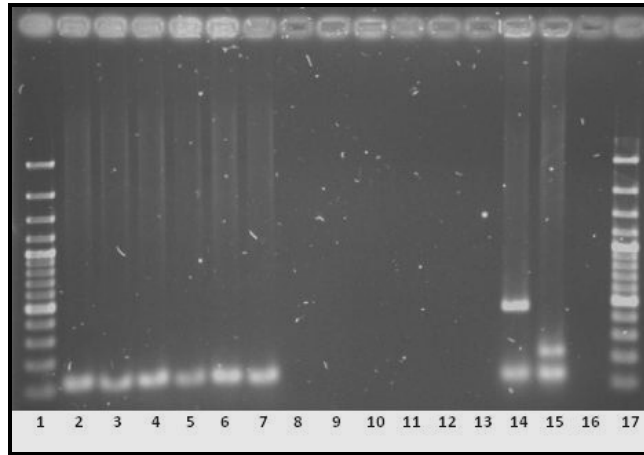


Figura 4. Detección mediante PCR múltiple de *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. 1, Marcador de peso molecular (100 pb); 2, *V. fluvialis* CECT 4217; 3, *V. mediterranei* CECT 621; 4, *V. mediterranei* CECT 622; 5, *V. mytili* CECT 632; 6, *V. furnissii* CECT 4349; 7, *V. natriegens* CECT 526; 8, *Escherichia coli* CECT 4953; 9, *Salmonella typhimurium* NCTC 12117; 10, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145; 11, *Listeria monocytogenes* CECT 935; 12, *Listeria innocua* CECT 910T; 13, *Enterobacter cloacae* CECT 194T; 14, *V. parahaemolyticus* CECT 511; 15, *V. vulnificus* CECT 529; 16, Control negativo; 17, Marcador de peso molecular (100 pb).

El límite de detección de esta técnica de PCR múltiple para *Vibrio spp.* fue de  $1 \times 10^4$  u.f.c./ml, para *Vibrio parahaemolyticus*  $1 \times 10^3$  u.f.c./ml y para *Vibrio vulnificus*  $1 \times 10^4$  u.f.c./ml.

## **2. PUESTA A PUNTO DE MÉTODOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *VIBRIO SPP.*, *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* Y *VIBRIO VULNIFICUS* MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON SONDAS FLUORESCENTES (FISH)**

### **2.1. Detección de *Vibrio spp.***

Para la detección de *Vibrio spp.* mediante la técnica de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes se estudiaron dos sondas:

- a) Sonda GV diseñada por Giuliano *et al.* (1999)

El alineamiento de secuencias de la sonda GV para la detección de *Vibrio spp.* con las secuencias contenidas en el GeneBank mostró su validez teórica (Tabla 1).

1	A G G C C A C A A C C T C C A A G T A G	20	Sonda GV
843	A G G C C A C A A C C T C C A A G T A G	824	16S ARNr <i>V. vulnificus</i> (AE016796)
843	A G G C C A C A A C C T C C A A G T A G	824	16S ARNr <i>V. parahaemolyticus</i> (BA000032)
845	A G G C C A C A A C C T C C A A G T A G	826	16S ARNr <i>V. natriegens</i> (JF700507)
808	A G G C C A C A A C C T C C A A G T A G	789	16S ARNr <i>V. mediterranei</i> (HM584044)
824	A G G C C A C A A C C T C C A A G T A G	805	16S ARNr <i>V. mytili</i> (X99761)
825	A G G C C A C A A C C T C C A A G T A G	806	16S ARNr <i>V. fluvialis</i> (FR695475)
798	A G G C C A C A A C C T C C A A G T A G	779	16S ARNr <i>V. furnissii</i> (CP002377)

**Tabla 1. Alineamiento de secuencias de la sonda GV.**

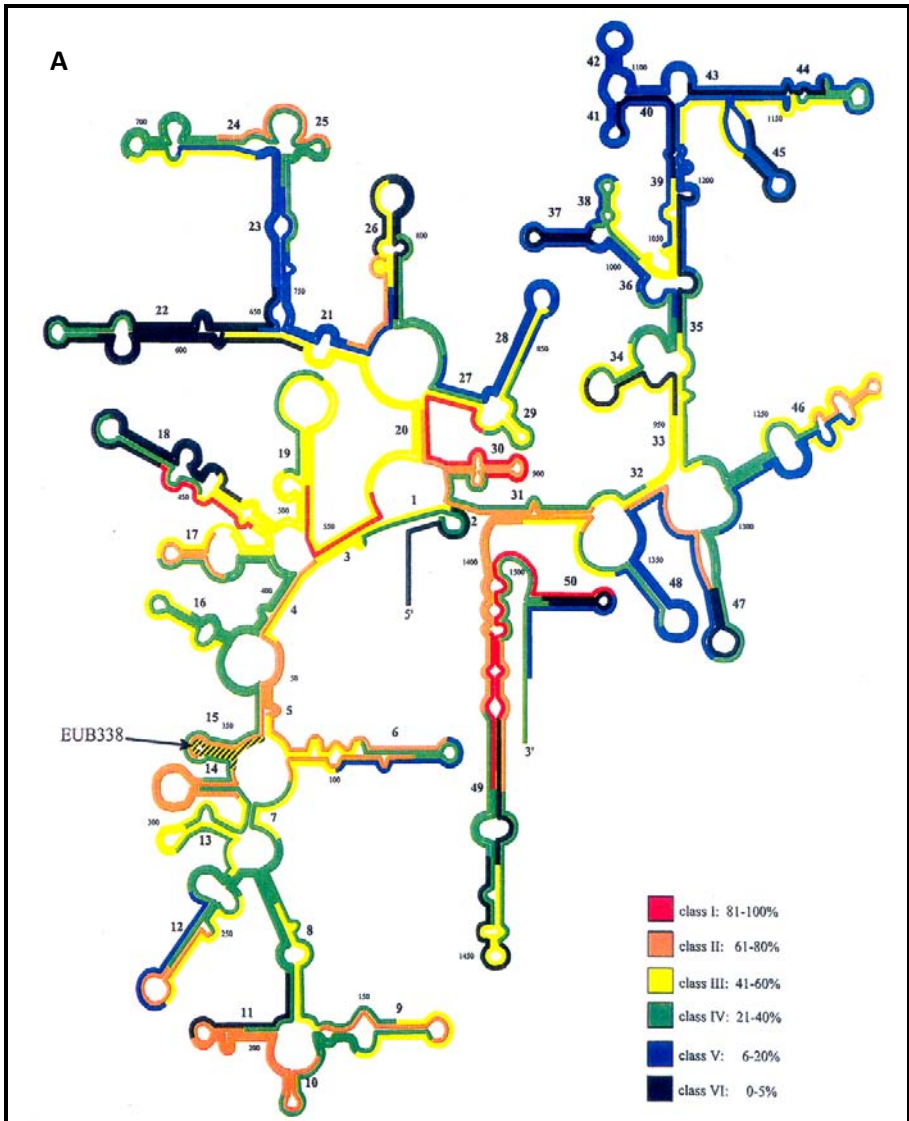
A continuación se procedió a la evaluación de la accesibilidad de la sonda al ARN ribosómico. En la Figura 5 se observa una clasificación de las zonas del ARNr en función de la accesibilidad de las sondas, de forma que las zonas de clase I serían las más accesibles, entre un 81 y 100%, y las zonas de clase VI serían las menos accesibles, entre un 0 y 5%.

La sonda GV, hibridaría en zonas de la clase IV y V, con una accesibilidad de entre el 6 y el 40%, por lo que no sería una buena sonda a pesar de estar publicada y comprobada su especificidad para *Vibrio spp.*

Se procedió a la hibridación de las diferentes cepas de referencia del género *Vibrio* mencionadas en Material y Métodos empleando las sondas GV y EUB (control). Evaluando diferentes concentraciones de formamida en la solución de hibridación y diferentes tiempos de hibridación, tras observar al microscopio no se vio señal de fluorescencia (Figura 6) en ninguna de las células fijadas, mientras que si que se obtuvo fluorescencia con la sonda control EUB (Figura 7).

Se fijaron de nuevo las células para descartar problemas en el paso de fijación de las mismas y se llevó a cabo de nuevo la hibridación, obteniéndose los mismos resultados. Por tanto, procedimos a buscar otra sonda para la detección de las especies del género *Vibrio* y a comprobar su accesibilidad, especificidad y funcionalidad.





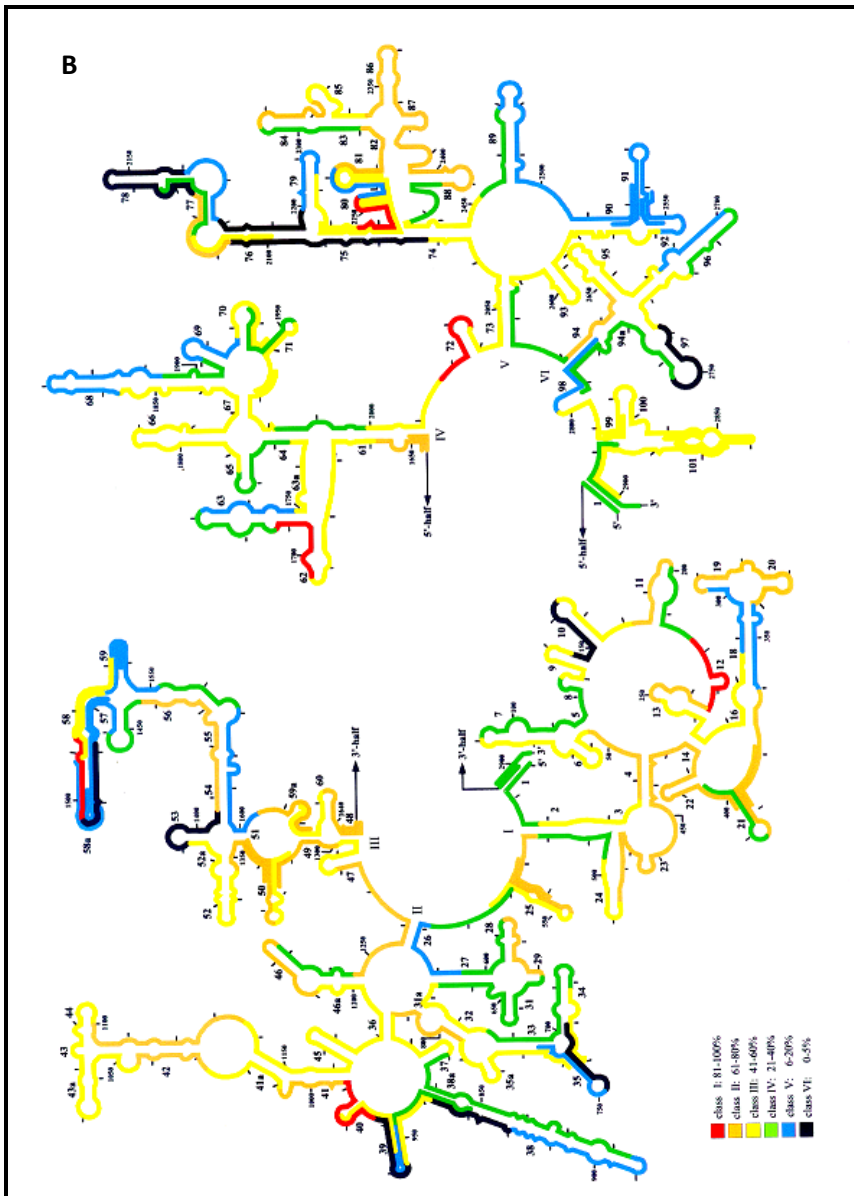


Figura 5. Acceso a las estructuras secundarias del ARNr 16S (A) y 23S (B)

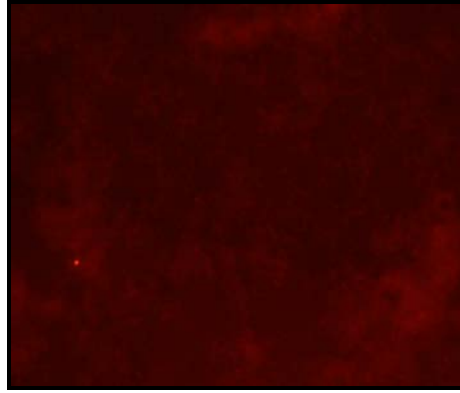


Figura 6. *Vibrio vulnificus* CECT 529 hibridada con GV marcada con el fluorocromo Cy3 (rojo)

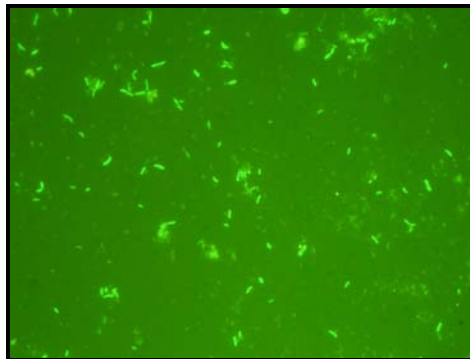


Figura 7. *Vibrio vulnificus* CECT 529 hibridada con las tres sondas EUB marcadas con el fluorocromo 6-FAM (Verde)

b) Sonda VIB diseñada por Moreno *et al.* (1999)

1	A C A G T A C T C T A G T C T G C G A G	20	<b>Sonda VIB</b>
199	A C A G T A C T C T A G T C T G C G A G	180	16S ARNr <i>V. vulnificus</i> (AE016796)
201	A C A G T A C T C T A G T C T G C G A G	182	16S ARNr <i>V. parahaemolyticus</i> (AB029907)
202	A C A G T A C T C T A G T C T G C G A G	183	16S ARNr <i>V.</i> <i>natriegens</i> (JF700507)
402	A C A G T A C T C T A G T C T G C G A G	383	16S ARNr <i>V.</i> <i>mediterranei</i> (NR029257)
198	A C A G T A C T C T A G T C T G C G A G	179	16S ARNr <i>V. mytili</i> (HM584080)
200	A C A G T A C T C T A G T C T G C G A G	181	16S ARNr <i>V. fluvialis</i> (NR036790)
201	A C A G T A C T C T A G T C T G C G A G	180	16S ARNr <i>V. furnissii</i> (NR037067)

**Tabla 2. Alineamiento de secuencias de la sonda VIB**

El alineamiento de secuencias de la sonda VIB con las secuencias contenidas en el GeneBank mostró su validez teórica (Tabla 2) para la detección de las especies del género *Vibrio*, no presentando alineamiento con otras especies de otros géneros.

A continuación se procedió a la evaluación de la accesibilidad de la sonda al ARN ribosómico. La sonda VIB hibridaría según a la especie a la que se una en zonas de clase I y clase II, con una accesibilidad de entre 61 hasta 100%. Por tanto es una

buena sonda para la detección de las distintas especies del género *Vibrio*.

A nivel práctico, la especificidad de esta sonda VIB quedó comprobada mediante hibridación de la misma con la batería de cepas nombrada en Material y Métodos. Habiendo probado diferentes concentraciones (0, 10, 20, 30 y 40%) de formamida en la solución de hibridación y diferentes tiempos de incubación para la hibridación, se vio que mediante la adición al tampón del 30% de formamida e incubando las muestras 1.5 horas para la hibridación, se obtenía el mayor nivel de fluorescencia (Figuras 8, 9, 10 y 11) y se discriminaban perfectamente las células pertenecientes al género *Vibrio* de las que no pertenecen a este género.

Por tanto, esta sonda VIB es la que se seleccionó para la detección de las especies del género *Vibrio* en las diferentes muestras de alimentos de origen marino y aguas costeras y residuales mediante hibridación *in situ*.

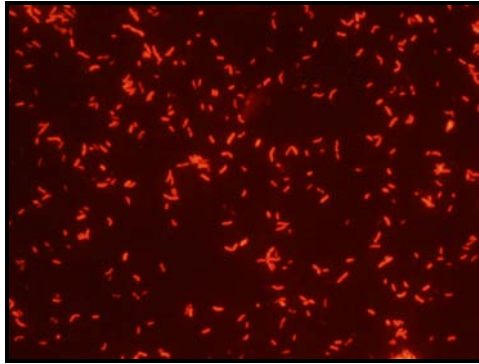


Figura 8. *Vibrio vulnificus* CECT 529 hibridada con VIB marcada con el fluorocromo Cy3 (rojo)

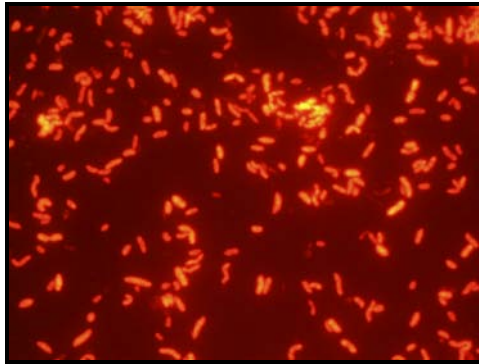


Figura 9. *Vibrio parahaemolyticus* CECT 511 hibridada con VIB marcada con el fluorocromo Cy3 (rojo)

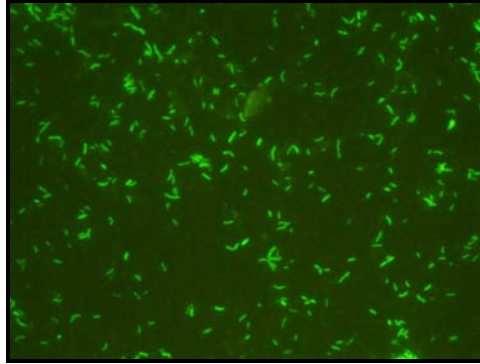


Figura 10. *Vibrio vulnificus* CECT 529 hibridada con las tres sondas EUB marcadas con el fluorocromo 6-FAM (Verde)

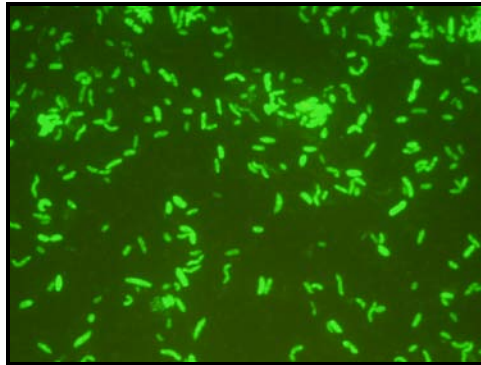


Figura 11. *Vibrio parahaemolyticus* CECT 511 hibridada con las tres sondas EUB marcadas con el fluorocromo 6-FAM (Verde)

## 2.2. Detección de *Vibrio parahaemolyticus*

### a) Diseño de la sonda VPA

En este trabajo se ha diseñado una sonda específica, VPA, para la detección de *V. parahaemolyticus*. El alineamiento de secuencias de la sonda con las secuencias contenidas en el GeneBank mostró su validez teórica (Tabla 3) ya que no presentan alineamiento con otras especies del mismo género ni de géneros próximos.

1	A	A	T	A	C	A	T	A	G	G	G	T	A	A	G	G	A	G	G	C	G	21	Sonda VPA
																							23S ARNr <i>V. parahaemolyticus</i> (DQ863676)
*	A	A	T	A	C	A	T	A	G	G	G	T	A	A	G	G	A	G	G	C	G	*	

\* No está totalmente secuenciado el 23S ARNr de *V. parahaemolyticus*

**Tabla 3. Alineamiento de secuencias de la sondas VPA**

A continuación se procedió a la evaluación de la accesibilidad de la sonda al ARN ribosómico y se vio que hibridaría en zonas de clase IV y V con una accesibilidad de entre el 6 y el 40%, por lo que no sería una sonda óptimas a pesar de ser específica para *V. parahaemolyticus*.

A pesar de ello se procedió a comprobar la especificidad y la funcionalidad de la sondas usando las diferentes cepas de *V. parahaemolyticus* nombradas en Material y Métodos. Se probaron distintas condiciones y distintos tiempos de hibridación. Tras el estudio se comprobó que no existía señal de fluorescencia con la sonda VPA (Figura 12), y sin embargo, la sonda EUB hibridaba adecuadamente con las células de *V.*



*parahaemolyticus*, mostrando una gran fluorescencia (Figura 13).

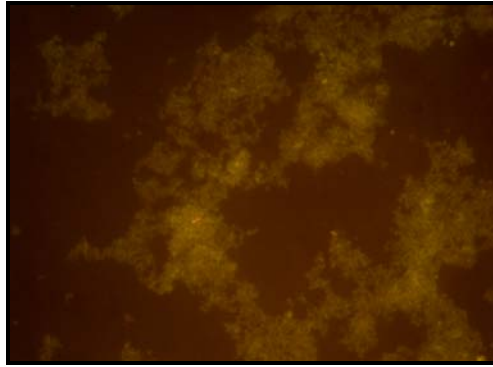


Figura 12. *Vibrio parahaemolyticus* CECT 511 hibridada con la sonda VPA marcada con el fluorocromo 6-FAM (Verde)

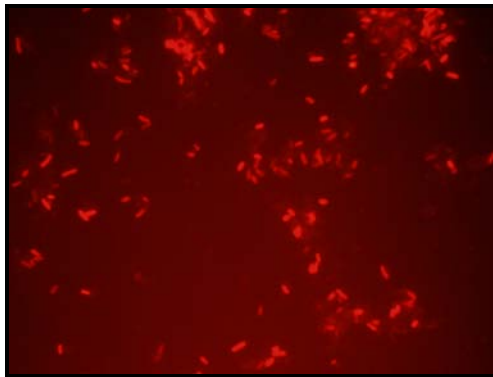


Figura 13. *Vibrio parahaemolyticus* CECT 511 hibridada con las tres sondas EUB marcadas con el fluorocromo Cy3 (Rojo)

Tras varias búsquedas bibliográficas y tras varios intentos de diseño de sondas no se obtuvieron buenos resultados en ningún caso, por lo que se descartó el uso de estas sondas para la detección en muestras ambientales.

### 2.3. Detección de *Vibrio vulnificus*

- a) Sondas Vvul23S296, obtenida a partir de un iniciador para PCR diseñado por Randa *et al.* (2004) y Vvu3 diseñada por Aznar *et al.* (1994)

El alineamiento de secuencias de las sondas Vvul23S296 y Vvu3 para la detección de *V. vulnificus* con las secuencias contenidas en el GeneBank mostró su validez teórica (Tablas 4 y 5), ya que no presenta alineamiento con otras especies del mismo género ni de géneros próximos.

1	A C T C A A T G A T A C T G G C T T A	19	Sonda Vvul23S296
			23S ARNr <i>V. vulnificus</i>
156	A C T C A A T G A T A C T G G C T T A	138	biotipo 1 (X87293)
			23S ARNr <i>V. vulnificus</i>
156	A C T C A A T G A T A C T G G C T T A	138	biotipo 2 (X87294)

Tabla 4. Alineamiento de secuencias de la sonda Vvul23S296

1	A C C G T T C G T C T A A C A C A T	18	Sonda Vvu3
			23S ARNr <i>V. vulnificus</i>
296	A C C G T T C G T C T A A C A C A T	279	biotipo 1 (X87293)
			23S ARNr <i>V. vulnificus</i>
296	A C C G T T C G T C T A A C A C A T	279	biotipo 2 (X87294)
			23S ARNr <i>V. vulnificus</i>
296	A C C G T T C G T C T A A C A C A T	279	27562 ATCC (U10951)

Tabla 5. Alineamiento de secuencias de la sonda Vvu3

A continuación se procedió a la evaluación de la accesibilidad de las sondas al ARN ribosómico y se vio que ambas hibridarían en zonas de clase IV con una accesibilidad de entre el 21 y el 40%, por lo que no serían sondas óptimas, a pesar de ser específica para *V. vulnificus*.

Se procedió a comprobar la especificidad y la funcionalidad de las sondas usando las diferentes cepas de referencia de *V. vulnificus*. Se probaron distintas condiciones y tiempos de hibridación. Tras el estudio se comprobó que no existía señal de fluorescencia ni con la sonda Vvul23S296 (Figura 14), ni con la sonda Vvu3 y sin embargo, la sonda EUB (Figura 15) hibridaba adecuadamente con las células de *V. vulnificus*, mostrando una gran fluorescencia.

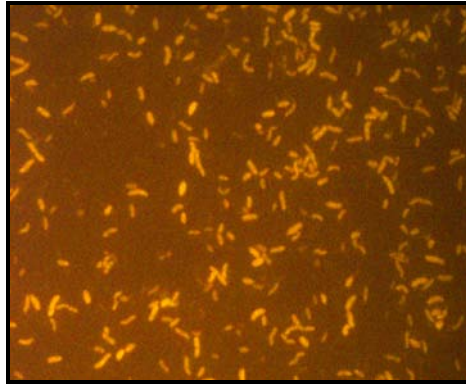


Figura 14. *Vibrio vulnificus* CECT 529 hibridada con la sonda Vvul23S296 marcada con el fluorocromo 6-FAM (Verde)

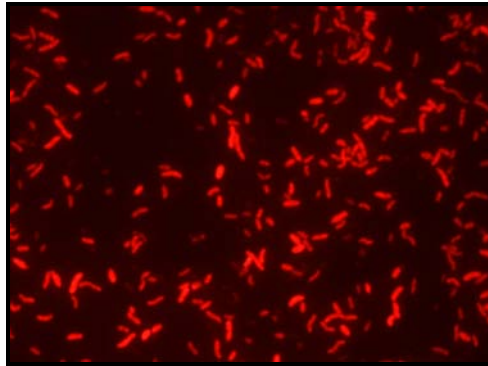


Figura 15. *Vibrio vulnificus* CECT 529 hibridada con las tres sondas EUB marcadas con el fluorocromo Cy3 (Rojo)

Tras varias búsquedas bibliográficas, procedimos al diseño de una nueva sonda para la detección de *V. vulnificus*.

b) Diseño de las sondas Vul23 y Vvran2

Los alineamientos de secuencias de las sondas Vul23 y Vvran2 mostraron su validez teórica (Tablas 7 y 8), ya que solo presentan alineamiento con especies del género *V. vulnificus*.

1	A T G A T A C T G G C T A T G C C A G	19	<b>Sonda Vul23</b>
			23S ARNr <i>V. vulnificus</i> biotipo 1 (X89273)
151	A C A G T A C T C T A G T C T G C G A	132	
			23S ARNr <i>V. vulnificus</i> biotipo 2 (X89274)
151	A C A G T A C T C T A G T C T G C G A	132	
			23S ARNr <i>V. vulnificus</i> 27562 ATCC (U10951)
151	A C A G T A C T C T A G T C T G C G A	132	

**Tabla 6. Alineamiento de secuencias de la sonda Vul23**

1	T A C A C A A T C T G C T T G C C A	18	<b>Sonda Vvran2</b>
			23S ARNr <i>V. vulnificus</i> biotipo 1 (AE16796)
349	T A C A C A A T C T G C T T G C C A	331	
			23S ARNr <i>V. vulnificus</i> biotipo 2 (AE16795)
349	T A C A C A A T C T G C T T G C C A	331	

**Tabla 7. Alineamiento de secuencias de la sonda Vvran2**

Tras la evaluación de la accesibilidad de la sonda Vul23 se obtuvieron resultado del 21-40% de accesibilidad, por lo que se procedió a evaluar la funcionalidad y especificidad a nivel práctico. Esta evaluación se realizó del mismo modo que con las otras dos sondas ya diseñadas para la detección de *V. vulnificus*.

Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, ya que tras hibridar toda la batería de cepas de referencia de *V. vulnificus* no existía señal de fluorescencia con la sonda Vul23 (Figura 16), mientras que la sonda EUB hibridaba

adecuadamente con las células, mostrando una gran fluorescencia (Figura 17).

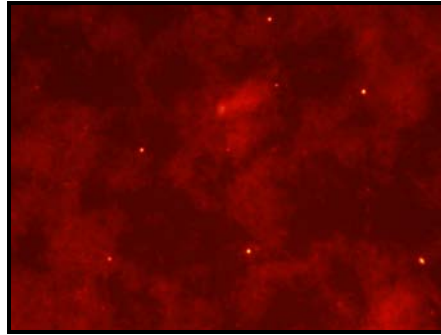


Figura 16. *Vibrio vulnificus* CECT 529 hibridada con la sonda Vul23 marcada con el fluorocromo 6-FAM (Rojo)

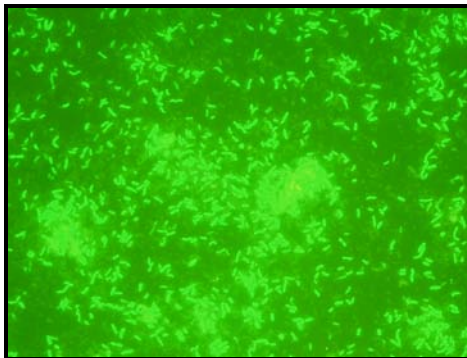


Figura 17. *Vibrio vulnificus* CECT 529 hibridada con las tres sondas EUB marcadas con el fluorocromo Cy3 (Verde)

Del mismo modo se procedió al alineamiento y evaluación de la accesibilidad de la sonda Vvran2 diseñada en este trabajo, y a comprobar la funcionabilidad y especificidad a nivel práctico. Los resultados obtenidos fueron los mismos que con la sonda Vul23.

Por tanto, no obtuvimos ninguna sonda de hibridación adecuada para la detección de *V. vulnificus* en muestras ambientales.

### **3. PUESTA A PUNTO DE MÉTODOS DE DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* Y *VIBRIO VULNIFICUS* MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL**

#### **3.1. Detección y cuantificación de *Vibrio parahaemolyticus* usando el agente intercalante SYBR Green I**

##### **3.1.1. Análisis cualitativo**

Se emplearon los iniciadores R-TL y L-TL, usados también en la detección de *V. parahaemolyticus* mediante PCR convencional.

Tras evaluar distintas concentraciones de MgCl<sub>2</sub> e iniciadores, se estableció un volumen final de 20 µl conteniendo 2 µl de DNA molde, 0.3 µM de cada iniciador, 4 mM de MgCl<sub>2</sub> y 2 µl de LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I que contenía la concentración óptima de nucleótidos, Taq ADN Polimerasa y Taq PCR tampón.

Una temperatura de 68°C fue suficiente para que la reacción fuese específica para esta especie. Las condiciones óptimas de amplificación fueron las siguientes:

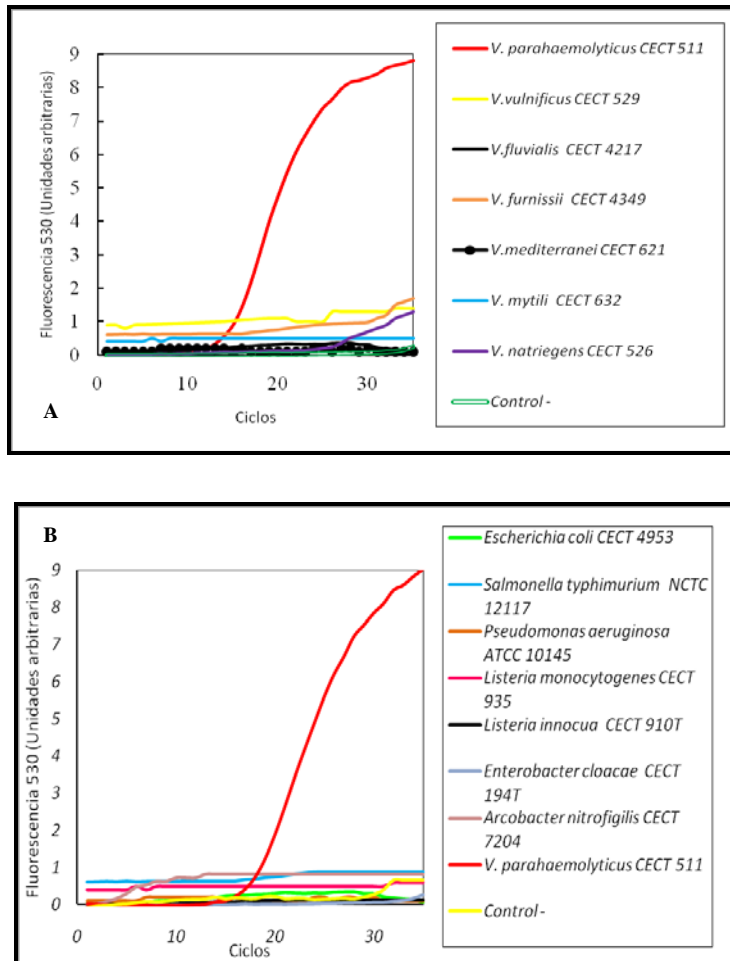
## Resultados

---

Nombre Programa	Ciclos	Tipo análisis	Temperatura (°C)	Tiempo (h:mm:ss)	Rampa Tª (°C/s)	Modo Adquisición
Desnat.	1	Ninguno	95	0:10:00	20	Ninguno
Amplif.	40	Cuantificación	95	0:00:10	20	Ninguno
			68	0:00:04	20	Ninguno
			72	0:00:18	20	Sencilla
Fusión	1	Curvas fusión	95	0:00:00	20	Ninguno
			73	0:00:20	20	Ninguno
			95	0:00:00	0.1	Continuo
Enfriam.	1	Ninguno	40	0:00:30	20	Ninguno

En la figura 18, se muestra el ensayo de especificidad con las distintas cepas del género *Vibrio* (18.A) y con otras cepas (18.B) no pertenecientes al género *Vibrio* nombradas en la Tabla 1 del punto 1 de Material y Métodos respectivamente.





**Figura 18 (A y B).** Ensayo de especificidad de la PCR a tiempo real para *V. parahaemolyticus* (Anexo VII)

La curva de fusión (Figura 19) muestra la temperatura de fusión para *V. parahaemolyticus*, de 87 °C y para el resto de especies ensayadas.

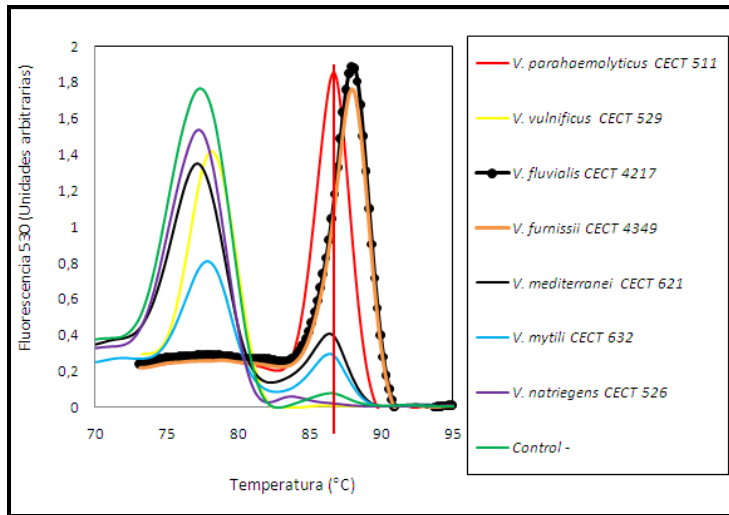
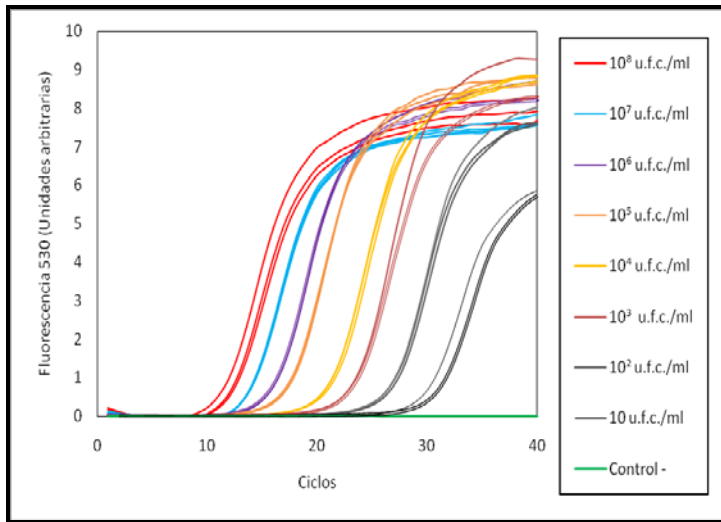


Figura 19. Curvas de fusión de las distintas especies del género *Vibrio* para la PCR de *V. parahaemolyticus* (Anexo VII)

### 3.1.2. Análisis cuantitativo. Curva patrón de *V. parahaemolyticus*

Una vez se hubieron establecido las condiciones idóneas de PCR para conseguir una completa especificidad, se llevó a cabo el análisis de cuantificación. La figura 20 muestra las curvas de amplificación de los distintos patrones usados con las tres réplicas realizadas.



**Figura 20.** Curva de amplificación con las tres réplicas de los distintos patrones y el control negativo para la PCR de *V. parahaemolyticus* (Anexo VII)

Usando el método “Second Derivative Maximum” se obtuvieron los puntos de corte y las concentraciones de cada patrón usadas en el cálculo de la curva. En la tabla 8 se muestran los puntos de corte obtenidos de los cuatro ensayos con 3 réplicas de cada patrón, la media de estos puntos de corte y la concentración media calculada para el ADN y las células cultivables.

	Puntos de Corte					Concentración	Concentración
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Media Puntos de corte	media calculada (u.f.c./ml)	media calculada (ng ADN/ml)
<b>Patrón 1</b>	15,05	14,9	14,9	15,02		1.8 x 10 <sup>8</sup>	1979.28
	15,04	14,79	14,7	15,05			
	15	14,68	15	15,08	14,93		
<b>Patrón 2</b>	18,86	18,88	18,56	18,73		1.1 x 10 <sup>7</sup>	120.956
	18,67	18,89	18,67	18,67			
	18,78	18,76	18,87	18,72	18,75		
<b>Patrón 3</b>	21,63	21,89	21,34	21,32		2.4 x 10 <sup>6</sup>	26.39
	21,43	21,78	21,12	21,43			
	21,45	21,91	21,21	21,37	21,49		
<b>Patrón 4</b>	24,91	24,44	24,01	24,93		3.5 x 10 <sup>5</sup>	3.85
	24,92	24,45	24,03	24,84			
	24,87	24,39	24,13	24,66	24,55		
<b>Patrón 5</b>	27,13	27,31	27,01	27,24		1.6 x 10 <sup>4</sup>	0.176
	27,09	27,45	27,21	27,27			
	27,23	27,32	27,03	27,19	27,21		
<b>Patrón 6</b>	30,1	30,34	30,01	30,12		1.6 x 10 <sup>3</sup>	0.0176
	30,12	30,43	30,21	30,09			
	30,23	30,45	30,33	30,05	30,2		

	31,1	31,12	31,24	31,21		2.3 x 10 <sup>2</sup>	0.00253
	31,05	31,16	31,28	31,31			
<b>Patrón 7</b>	31,14	31,43	31,19	31,28	31,2		
	33,88	34,02	34,09	33,98		4.63 x 10 <sup>1</sup>	0.00051
	33,89	34,01	34,15	33,79			
<b>Patrón 8</b>	33,99	34,12	34,01	33,82	33,97		

**Tabla 8.** Puntos de corte obtenidos de los cuatro ensayos y concentraciones calculadas para la PCR de *V. parahaemolyticus*

Estos datos se usaron para calcular las curvas patrón. La eficiencia de la amplificación de la PCR fue de 1.867 con un error en el cálculo de 0.0651.

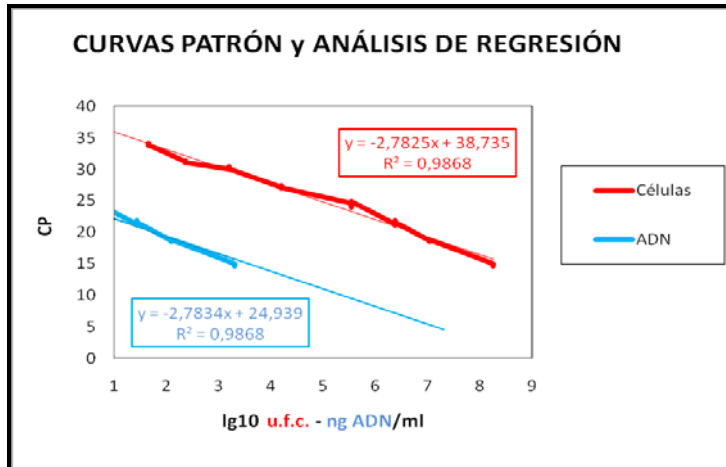


Figura 21. Curvas patrón obtenidas para la PCR de *V. parahaemolyticus* con una eficiencia de 1.867 y un error de 0.0651 y análisis de regresión para los valores de las curvas, a partir de células y a partir de ADN (Anexo VII)

### 3.1.3. Análisis del límite de detección

El análisis de la curva patrón mostró que la reacción de PCR a tiempo real para la detección y cuantificación de *V. parahaemolyticus* era capaz de detectar y cuantificar 0.51 pg de ADN. Cuando se realizó el recuento de las colonias presentes en la dilución, el ensayo detectó hasta 10 u.f.c. (Figura 20) por mililitro.

### 3.2. Detección y cuantificación de *Vibrio vulnificus* usando el agente intercalante SYBR Green I

#### 3.2.1. Análisis cualitativo

En primer lugar se puso a punto la técnica de detección de *V. vulnificus* usando los mismos iniciadores que para el ensayo de PCR convencional, VVH785 Y VVH990.

Se estableció un volumen final de 20 $\mu$ l conteniendo 2  $\mu$ l de ADN molde, 0.4  $\mu$ M de cada iniciador, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> y 2  $\mu$ l de LightCycler-FastStart DNA Master Sybr Green I.

Las condiciones óptimas de PCR para la detección de *V. vulnificus* fueron las siguientes:

Nombre Programa	Ciclos	Tipo análisis	Temperatura (°C)	Tiempo (h:mm:ss)	Rampa Tª (°C/s)	Modo Adquisición
Desnat.	1	Ninguno	95	0:10:00	20	Ninguno
Amplif.	40	Cuantificación	95	0:00:10	20	Ninguno
			56	0:00:05	20	Ninguno
			72	0:00:09	20	Sencilla
Fusión	1	Curvas fusión	95	0:00:00	20	Ninguno
			65	0:00:40	20	Ninguno
			95	0:00:00	0.1	Continuo
Enfriam.	1	Ninguno	40	0:00:30	20	Ninguno

La figura 22 muestra un ensayo de especificidad donde se observan las curvas de amplificación de diferentes cepas del género *Vibrio* (22.A) y de cepas de otros géneros (22.B) nombradas en la Tabla 1 de Material y Métodos. En los ciclos 33 y 34 se observaron inicios de señal de fluorescencia en la detección del ADN de *V. natriegens* y *V. furnissii*, pero en la figura 23, que muestra las curvas de fusión, se observa que la

señal era debida a la formación de dímeros de iniciadores, y no a una amplificación real de las moléculas de ADN de estas bacterias.

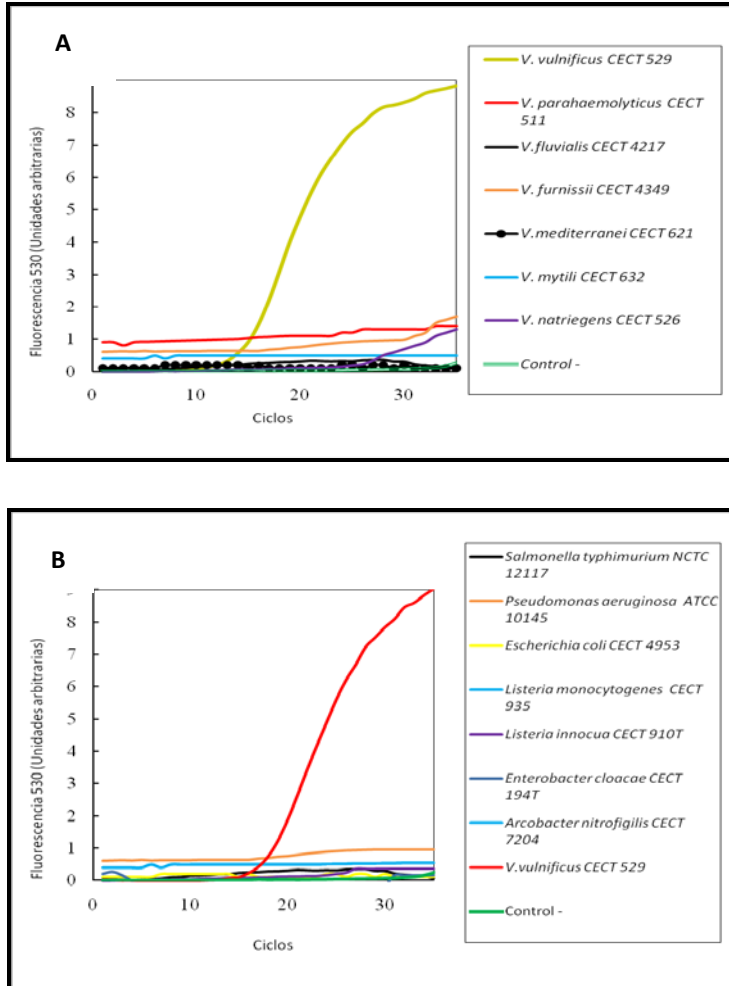
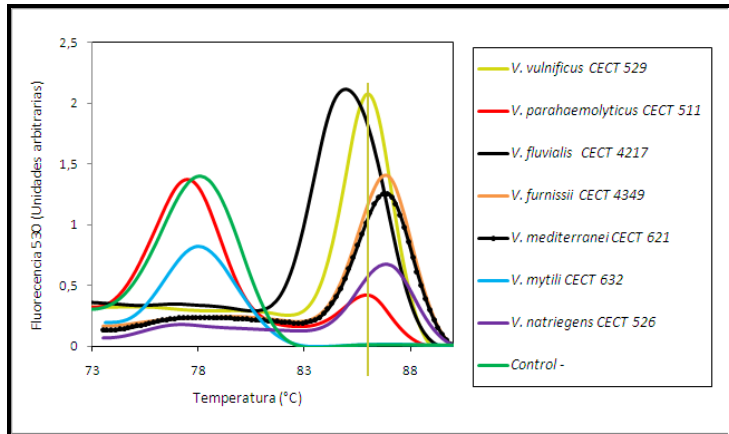


Figura 22 (A y B). Ensayo de especificidad de la PCR a tiempo real para *V. vulnificus* (Anexo VII)



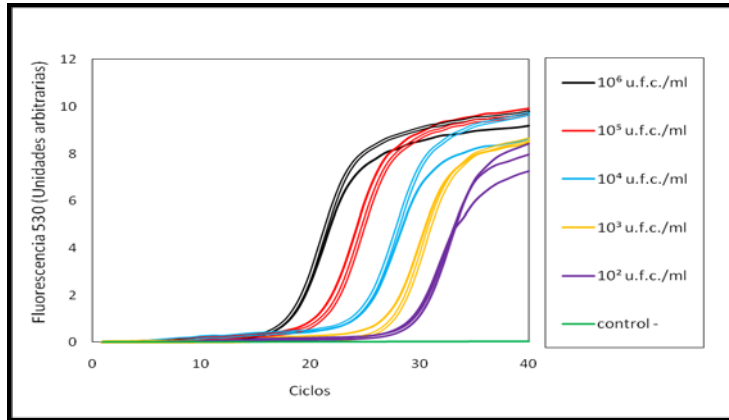
La temperatura de fusión fue de 86°C para este par de iniciadores.



**Figura 23.** Curvas de fusión de las distintas especies del género *Vibrio* para la PCR de *V. vulnificus* (Anexo VII)

### 3.2.2. Análisis cuantitativo. Curva patrón de *V. vulnificus*

Una vez se hubieron establecido las condiciones idóneas de PCR para conseguir una completa especificidad se llevó a cabo el análisis de cuantificación.



**Figura 24. Curva de amplificación con las 3 replicas de los distintos patrones y el control negativo para la PCR de *V. vulnificus* (Anexo VII)**

Usando el método “Second Derivative Maximum” se obtuvieron los puntos de corte y las concentraciones de cada patrón usadas en el cálculo de la curva. En la tabla 9 se muestran los puntos de corte obtenidos de los cuatro ensayos con 3 réplicas de cada patrón, la media de estos puntos de corte y la concentración media calculada para el ADN y las células cultivables.

	Puntos de corte				Media Puntos de corte	Concentración media calculada (u.f.c./ml)	Concentración media calculada (ng ADN/ml)
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4			
<b>Patrón 1</b>	17,65	17,99	17,82	17,29		$1.7 \times 10^7$	51029.3
	17,8	17,99	17,74	17,88			
	17,89	17,84	17,69	17,33	17,74		
<b>Patrón 2</b>	20,05	19,99	19,66	20,01		$1.4 \times 10^6$	4202.41
	20,1	19,86	19,61	20,12			
	20,41	19,67	19,53	20,23	19,94		
<b>Patrón 3</b>	24,34	24,36	24,1	24,76		$2.5 \times 10^5$	750.43
	24,39	24,54	24,03	24,59			
	24,12	24,32	24,8	24,89	24,44		
<b>Patrón 4</b>	26,66	26,45	26,65	26,94		$2.2 \times 10^4$	54.24
	26,76	26,47	26,12	26,76			
	26,79	26,54	26,26	26,89	26,61		
<b>Patrón 5</b>	29,25	29,67	29,43	29,76		$1.8 \times 10^3$	5.424
	29,65	29,76	29,32	29,76			
	29,45	29,51	29,88	29,51	29,58		

	31,65	31,35	31,42	31,65		1.3 x 10 <sup>2</sup>	0.39
	31,45	31,24	31,78	31,49			
<b>Patrón 6</b>	31,31	31,67	31,56	31,67	31,52		

**Tabla 9. Puntos de corte obtenidos de los cuatro ensayos y concentraciones calculadas para la PCR de *V. vulnificus***

Estos datos se usaron para calcular las curvas patrón. La eficiencia de la amplificación de la PCR fue de 1.917 con un error en el cálculo de 0.0128.

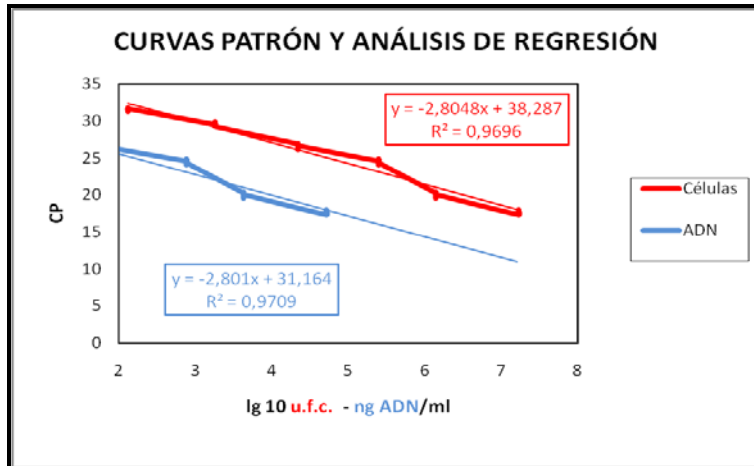


Figura 25. Curvas patrón obtenidas para la PCR de *V. vulnificus* con una eficiencia de 1.917 y un error de 0.0128 y análisis de regresión para los valores de las curvas, a partir de células y a partir de ADN (Anexo VII)

### 3.2.3. Análisis del límite de detección

Las curvas de amplificación mostraron detección de señal de fluorescencia hasta una concentración del orden de  $10^2$  u.f.c. Tras analizar las concentraciones calculadas con estos puntos de corte, se observó que cualitativa y cuantitativamente se pueden detectar y cuantificar muestras con cantidades iguales o superiores a 100 u.f.c. por mililitro.

### 3.3. Detección y cuantificación de *Vibrio vulnificus* usando sondas de hibridación TaqMan

#### 3.3.1. Análisis cualitativo

En primer lugar se puso a punto la técnica de detección de *V. vulnificus* con las dos sondas TaqMan y TaqMan-LNA usando los mismos iniciadores que en la PCR convencional, VVH785 Y VVH990.

Se estableció un volumen final para ambas sondas de 20  $\mu$ l conteniendo 5  $\mu$ l de ADN molde, 1.0  $\mu$ M de cada iniciador, 0.5  $\mu$ g/ml de BSA, 0.075  $\mu$ M de sonda y 4  $\mu$ l de LightCycler TaqMan Master.

Las condiciones de PCR para la detección de *V. vulnificus* también fueron idénticas para ambas sondas y fueron las siguientes:

Nombre Programa	Ciclos	Tipo análisis	Temperatura (°C)	Tiempo (h:mm:ss)	Rampa Tª (°C/s)	Modo Adquisición
Desnat.	1	Ninguno	95	0:10:00	20	Ninguno
Amplif.	40	Cuantificación	95	0:00:10	20	Ninguno
			56	0:00:08	20	Ninguno
			72	0:00:08	20	Sencilla
Enfriam.	1	Ninguno	40	0:00:30	20	Ninguno

Las figuras 26 y 27 muestran los ensayos de especificidad usando la sonda VVH-TM y VVH-TM-LNA respectivamente, donde se observan las curvas de amplificación de diferentes cepas pertenecientes al género *Vibrio* y de cepas no pertenecientes al género nombradas en la Tabla 1 del punto 1 de Material y Métodos. En ambos casos las experiencias muestran que tanto los iniciadores como la sonda tienen una buena especificidad.

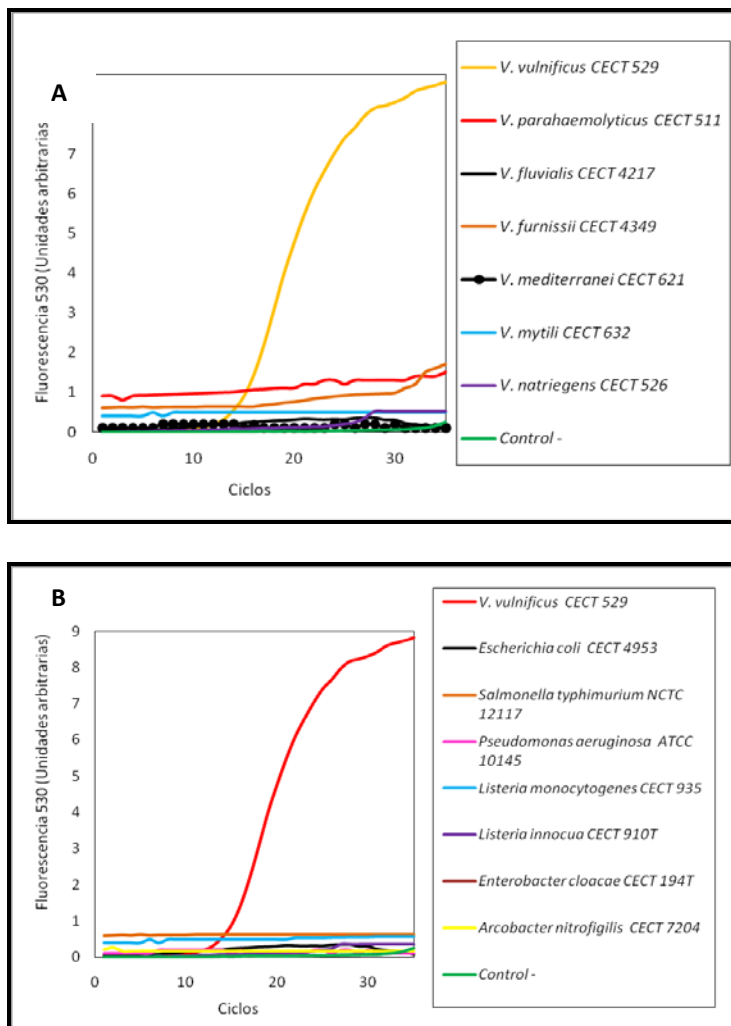


Figura 26 (A y B). Ensayo de especificidad de la PCR a tiempo real para *V. vulnificus* usando la sonda TaqMan VVH-TM (Anexo VII)



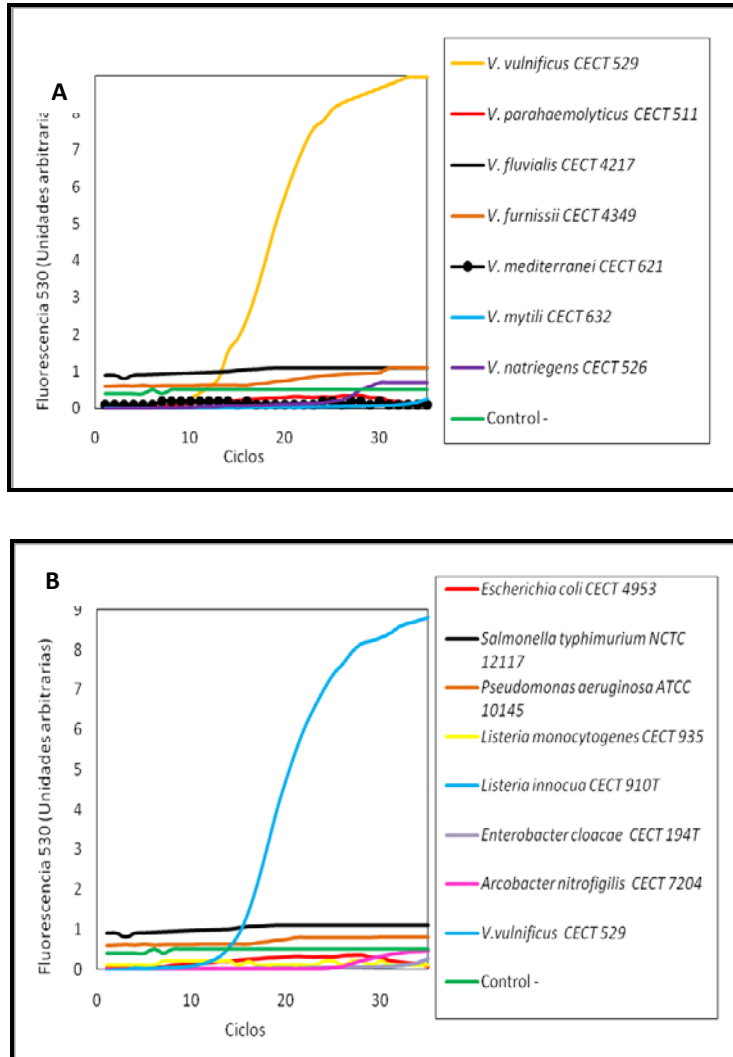


Figura 27 (A y B). Ensayo de especificidad de la PCR a tiempo real para *V. vulnificus* usando la sonda TaqMan-LNA VVH-TM-LNA (Anexo VII)

### 3.3.2. Análisis cuantitativo. Curva patrón de *V. vulnificus*

Una vez se hubieron establecido las condiciones idóneas de PCR para conseguir una completa especificidad, se llevó a cabo el análisis de cuantificación también con ambas sondas.

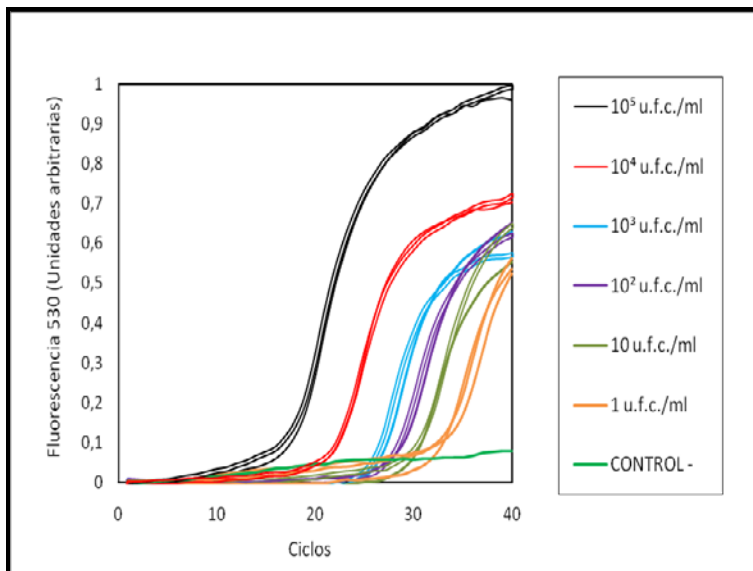
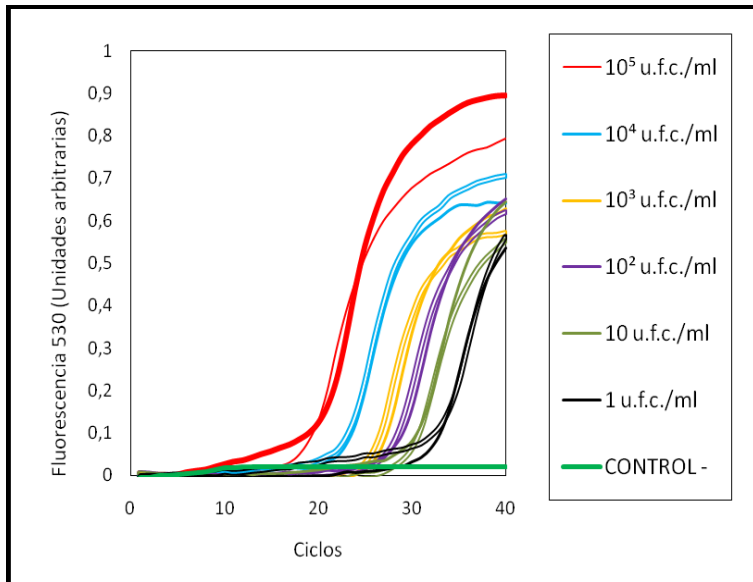


Figura 28. Curva de amplificación con las tres réplicas de los distintos patrones y el control negativo para la PCR de *V. vulnificus* usando la sonda VVH-TM (Anexo VII)



**Figura 29.** Curva de amplificación con los distintos patrones y el control negativo para la PCR de *V. vulnificus* usando la sonda VVH-TM-LNA (Anexo VII)

Usando el método “Second Derivative Maximum” se obtuvieron los puntos de corte y las concentraciones de cada patrón usadas en el cálculo de las curvas. En la tabla 10 se muestran los puntos de corte obtenidos de los cuatro ensayos con 3 réplicas de cada patrón, la media de estos puntos de corte y la concentración calculada para la curva patrón realizada con la sonda TaqMan VVH-TM y en la tabla 11 se muestran los mismos datos pero para la curva realizada con la sonda TaqMan-LNA.

	Puntos de corte				Media Puntos de corte	Concentración media calculada (u.f.c./ml)	Concentración media calculada (ng ADN/ml)
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4			
<b>Patrón 1</b>	16,83	16,32	16,89	16,56		2.28 x 10 <sup>5</sup>	684.40
	16,34	16,37	16,86	16,47			
	16,67	16,43	16,67	16,75	16,6		
<b>Patrón 2</b>	20,35	20,71	20,54	20,45		4.31 x 10 <sup>4</sup>	129.37
	20,44	20,91	20,58	20,59			
	20,43	20,32	20,43	20,44	20,52		
<b>Patrón 3</b>	24,79	24,45	24,54	24,66		1.08 x 10 <sup>3</sup>	3.241
	24,78	24,33	24,65	24,65			
	24,59	24,2	24,57	24,76	24,6		
<b>Patrón 4</b>	28,31	28,35	28,43	28,43		1.76 x 10 <sup>2</sup>	0.53
	28,1	28,41	28,43	28,22			
	28,34	28,36	28,32	28,11	28,32		
<b>Patrón 5</b>	31,78	31,72	31,55	31,57		1.9 x 10 <sup>1</sup>	0.057
	31,65	31,37	31,41	31,25			
	31,21	31,43	31,59	31,24	31,5		

	33,99	33,69	33,98	34,09		3	0.009
	33,87	33,64	34,12	34,14			
<b>Patrón 6</b>	34,02	33,59	34,28	34,54	34		

**Tabla 10. Puntos de corte obtenidos de los cuatro ensayos y concentraciones calculadas para la PCR de *V. vulnificus* usando la sonda VVH-TM**

	Puntos de corte				Media Puntos de corte	Concentración media calculada (u.f.c/ml)	Concentración media calculada (ng ADN/ml)
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4			
<b>Patrón 1</b>	16,79	16,99	17,04	17,21	17	2.28 x 10 <sup>5</sup>	684.40
	16,88	16,89	17,06	17,09			
	16,87	17,01	17,12	17,06			
<b>Patrón 2</b>	20,81	21,02	20,87	21,03	20,94	4.31 x 10 <sup>4</sup>	129.37
	20,89	21,03	20,71	20,96			
	20,99	20,98	20,86	21,22			
<b>Patrón 3</b>	24,97	25,15	24,67	25,02	24,98	1.08 x 10 <sup>3</sup>	3.241
	24,96	25,41	24,57	25,08			
	25,03	24,96	24,89	25,05			
<b>Patrón 4</b>	28,39	28,67	28,49	28,34	28,57	1.76 x 10 <sup>2</sup>	0.53
	28,87	28,56	28,56	28,56			
	28,76	28,99	28,54	28,11			
<b>Patrón 5</b>	32,11	32,35	32,19	32,31	32,26	1.9 x 10 <sup>1</sup>	0.057
	32,56	32,15	32,16	32,34			
	32,21	32,25	32,33	32,15			

	34,34	34,57	34,54	34,19		3	0.009
	34,24	34,65	34,41	34,25			
<b>Patrón 6</b>	34,54	34,35	34,25	34,12	34,37		

**Tabla 11. Puntos de corte obtenidos de los cuatro ensayos y concentraciones calculadas para la PCR de *V. vulnificus* usando la sonda VVH-TM-LNA**

Estos datos se usaron para calcular las curvas patrón para la PCR usando la sonda TaqMan (Figura 30) y las curvas patrón para la PCR usando la sonda TaqMan-LNA (Figura 31).

Las eficiencias de amplificación de ambas PCR se calcularon y dieron los siguientes valores:

- La eficiencia de PCR usando la sonda TaqMan fue de 1.936 con un error en el cálculo de 0.0175.
- La eficiencia de PCR usando la sonda TaqMan-LNA fue de 1.929, con un error de 0.0219.

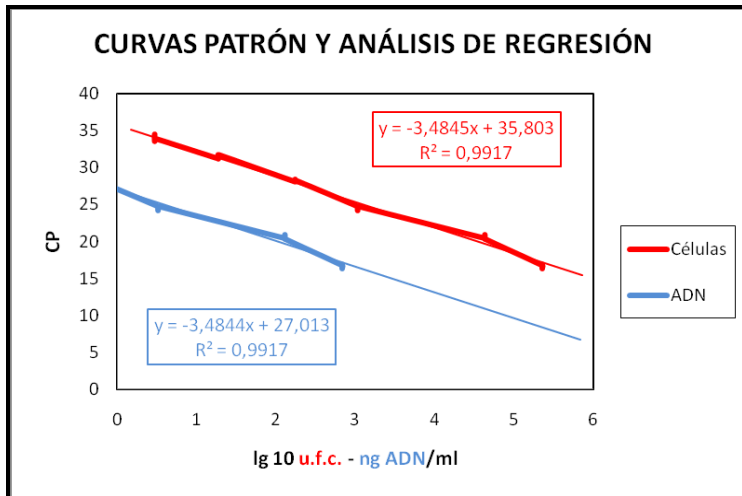
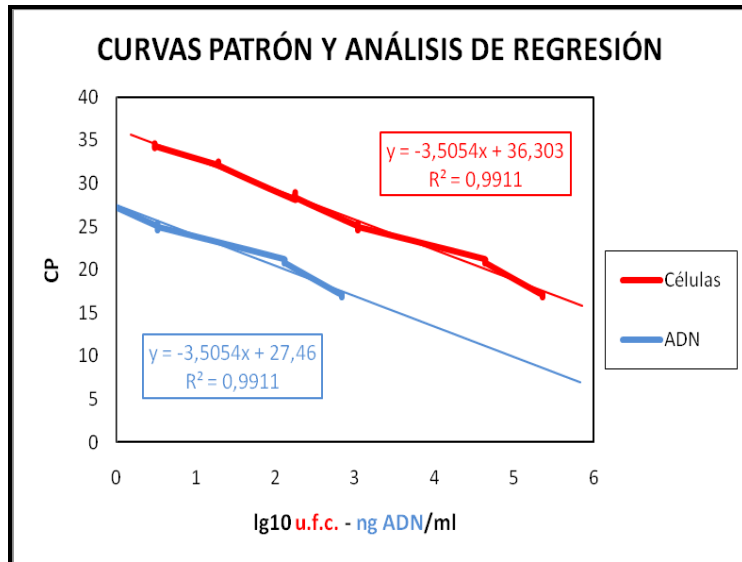


Figura 30. Curvas patrón obtenidas para la PCR de *V. vulnificus* (usando la sonda TaqMan) con una eficiencia de 1.936 y un error de 0.0175 y análisis de regresión para los valores de las curvas, a partir de células y a partir de ADN (Anexo VII)





**Figura 31. Curvas patrón obtenidas para la PCR de *V. vulnificus* (usando la sonda TaqMan-LNA) con una eficiencia de 1.929 y un error de 0.0219 y análisis de regresión para los valores de las curvas, a partir de células y a partir de ADN (Anexo VII)**

### 3.3.3. Análisis del límite de detección

Ambas curvas de amplificación mostraron detección de señal de fluorescencia hasta el orden de 1 u.f.c. (Figura 28 y 29). Tras analizar las concentraciones calculadas con estos puntos de corte, se observó que cualitativa y cuantitativamente se pueden detectar y cuantificar muestras con cantidades iguales o superiores a 1 u.f.c. por mililitro, lo que corresponde en ambos casos a 9 pg de ADN. El límite de detección es idéntico usando las dos sondas TaqMan, por tanto para la detección y cuantificación en muestras de alimentos y agua se decidió utilizar la sonda TaqMan VVH-TM, ya que es más económica y ofrecía los mismos resultados que la sonda TaqMan-LNA.

#### **4. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *VIBRIO SPP.*, *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* Y *VIBRIO VULNIFICUS* EN MUESTRAS DE ALIMENTOS DE ORIGEN MARINO Y AGUAS INOCULADAS ARTIFICIALMENTE**

##### **4.1. Detección de *Vibrio spp.* en muestras inoculadas artificialmente mediante cultivo, FISH y PCR**

###### **4.1.1. Análisis del límite de detección en alimentos de origen marino inoculados artificialmente**

Se llevó a cabo un estudio de sensibilidad de las distintas técnicas, cultivo, PCR y FISH empleando mejillones como matriz alimentaria. Por cultivo en el medio selectivo TCBS se pudo detectar hasta  $3 \times 10^6$  u.f.c./g de muestra analizada antes del enriquecimiento. Tras 24 horas de enriquecimiento en APW 2% NaCl la microbiota acompañante que había crecido enmascaraba el crecimiento de las bacterias del género *Vibrio*, por lo que no fue posible establecer límites de detección.

En cuanto a la técnica FISH, el límite de detección del método para las muestras de mejillones fue de  $3 \times 10^4$  u.f.c./g de material evaluado (Figura 32). Cuando se realizaba enriquecimiento, el crecimiento de los microorganismos presentes que no eran del género *Vibrio* dificultaba enormemente la detección de las bacterias pertenecientes al género (Figura 33), con lo que no fue posible establecer el límite de detección.

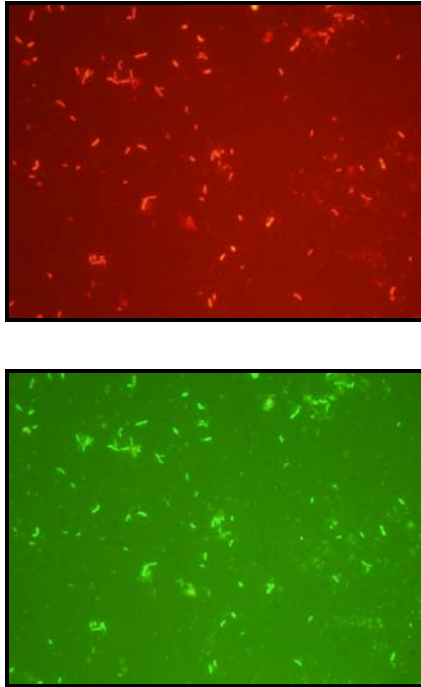
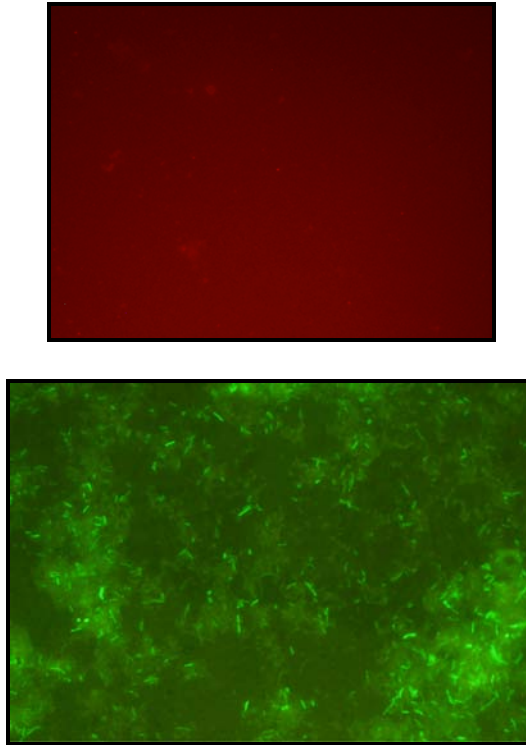


Figura 32. Detección de *Vibrio spp.* mediante FISH en la dilución  $10^4$  sin enriquecimiento empleando las sondas VIB (Cy3) y EUB (6-FAM)



**Figura 33. Detección de *Vibrio spp.* mediante FISH en la dilución  $10^4$  tras 24 horas de enriquecimiento empleando las sondas VIB (Cy3) y EUB (6-FAM)**

En cuanto a la técnica de PCR, el límite de detección del método usando mejillón como matriz fue de  $3 \times 10^5$  u.f.c./g de muestra analizada en ausencia de enriquecimiento, mientras que ésta aumentó hasta 3 u.f.c./g cuando se incubó el alimento en APW 2% NaCl durante 24 horas (Tabla 12).

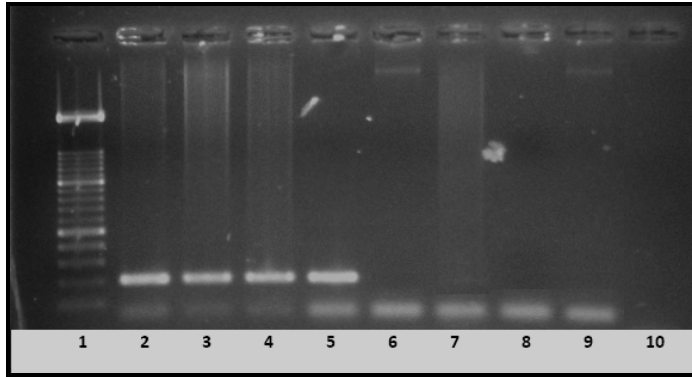


Figura 34. Límite de detección de la PCR de *Vibrio spp.* usando como matriz mejillón, antes del enriquecimiento (1: Marcador de peso molecular (50 pb); 2:  $10^8$  u.f.c./g; 3:  $10^7$  u.f.c./g; 4:  $10^6$  u.f.c./g; 5:  $10^5$  u.f.c./g; 6:  $10^4$  u.f.c./g; 7:  $10^3$  u.f.c./g; 8:  $10^2$  u.f.c./g; 9: 10 u.f.c./g; 10: control negativo)

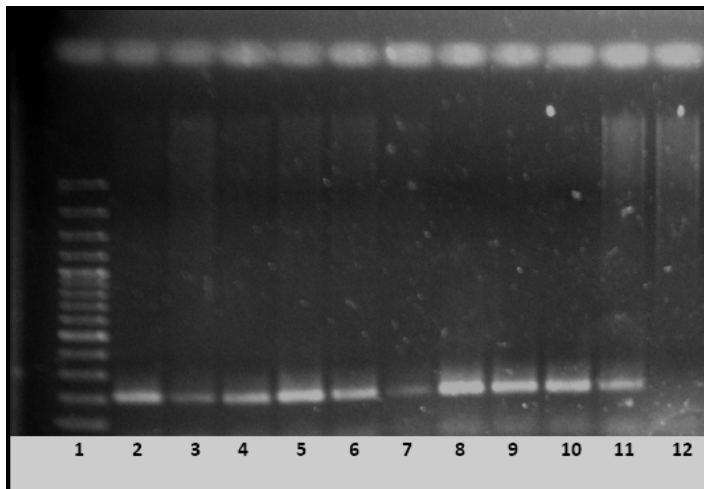


Figura 35. Límite de detección de la PCR de *Vibrio spp.* usando como matriz mejillón, tras enriquecimiento (1: Marcador de peso molecular (50 pb); 2:  $10^9$  u.f.c./g; 3:  $10^8$  u.f.c./g; 4:  $10^7$  u.f.c./g; 5:  $10^6$  u.f.c./g; 6:  $10^5$  u.f.c./g; 7:  $10^4$  u.f.c./g; 8:  $10^3$  u.f.c./g; 9:  $10^2$  u.f.c./g; 10: 10 u.f.c./g; 11: 1 u.f.c./g; 12: control negativo)

MEJILLÓN		
	0 horas	24 horas.
<b>FISH</b>	$3 \times 10^4$	-
<b>PCR</b>	$3 \times 10^5$	$3 \times 10^0$

**Tabla 12.** Comparación de los límites de detección (u.f.c/g) de las distintas técnicas para la detección de *Vibrio spp.* en muestras de mejillón (0 horas: sin enriquecimiento; 24 horas: con enriquecimiento)

#### 4.1.2. Análisis del límite de detección en aguas inoculadas artificialmente

El cultivo en medio selectivo permitió detectar el microorganismo hasta concentraciones de  $4 \times 10^6$  u.f.c/ml de muestra analizada sin enriquecimiento. Tras 24 horas de enriquecimiento en APW 2% NaCl la microbiota acompañante enmascaraba el crecimiento de las bacterias del género *Vibrio*, por lo que no fue posible establecer límites de detección.

En cuanto a la técnica FISH, el límite de detección del método para las muestras de mejillones fue de  $4 \times 10^4$  u.f.c/ml de material evaluado. Cuando se realizaba enriquecimiento, el crecimiento de microbiota acompañante impedía la detección de las bacterias pertenecientes al género, con lo que no fue posible establecer límite de detección.

En cuanto a la técnica de PCR, la sensibilidad del método usando agua como matriz fue de  $4 \times 10^4$  u.f.c/ml de muestra analizada sin enriquecimiento, mientras que ésta aumenta hasta 4 u.f.c/ml cuando se incuba el alimento en APW 2% NaCl durante 24 horas (Tabla 13).

AGUA		
	0 horas	24 horas.
<b>FISH</b>	$4 \times 10^4$	-
<b>PCR</b>	$4 \times 10^4$	$4 \times 10^0$

Tabla 13. Comparación de los límites de detección (u.f.c./ml) de las distintas técnicas para la detección de *Vibrio spp.* en muestras de agua (0 horas: sin enriquecimiento; 24 horas: con enriquecimiento)

#### 4.2. Detección de *Vibrio parahaemolyticus* en muestras inoculadas artificialmente mediante cultivo y PCR

##### 4.2.1. Análisis del límite de detección en alimentos de origen marino inoculados artificialmente

Se llevó a cabo un estudio de sensibilidad de las distintas técnicas, cultivo y PCR empleando mejillones como matriz alimentaria. El cultivo en medio selectivo para la detección de *V. parahaemolyticus* detectó hasta  $5 \times 10^7$  u.f.c./g de muestra analizada sin enriquecimiento. Tras 24 horas de enriquecimiento en APW 2% NaCl los microorganismos presentes en la matriz alimentaria enmascaraban el crecimiento de *V. parahaemolyticus*, por lo que no fue posible establecer límites de detección.

Para PCR convencional, el límite de detección fue de  $5 \times 10^5$  u.f.c./g de muestra analizada sin enriquecimiento, mientras que tras 24 horas de enriquecimiento en APW 2% NaCl fue capaz de detectar hasta 5 u.f.c./g de muestra.

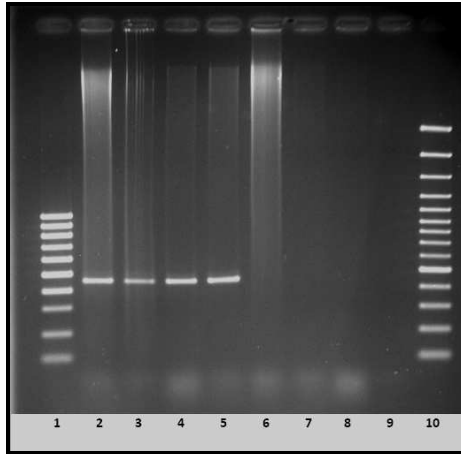


Figura 36. Límite de detección de la PCR de *V. parahaemolyticus* usando como matriz mejillón, sin enriquecimiento (1: Marcador de peso molecular (50 pb); 2:  $10^8$  u.f.c. /g; 3:  $10^7$  u.f.c. /g; 4:  $10^6$  u.f.c. /g; 5:  $10^5$  u.f.c. /g; 6:  $10^4$  u.f.c. /g; 7:  $10^3$  u.f.c. /g; 8:  $10^2$  u.f.c. /g; 9: control negativo; 10: Marcador de peso molecular (100 pb))

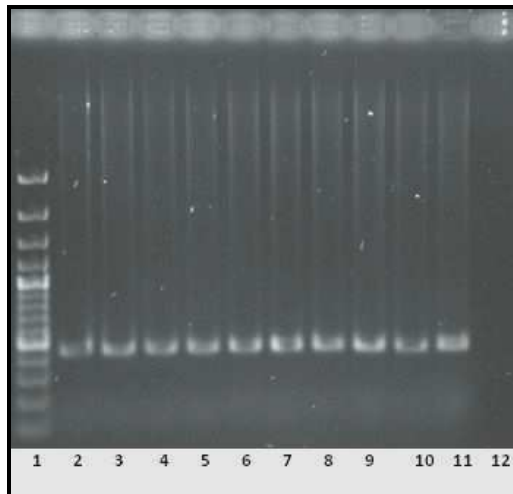


Figura 37. Límite de detección de la PCR de *V. parahaemolyticus* usando como matriz mejillón después de 24 horas de enriquecimiento (1: Marcador de peso molecular (100 pb); 2:  $10^9$  u.f.c./g; 3:  $10^8$  u.f.c./g; 4:  $10^7$  u.f.c./g; 5:  $10^6$  u.f.c./g; 6:  $10^5$  u.f.c./g; 7:  $10^4$  u.f.c./g; 8:  $10^3$  u.f.c./g; 9:  $10^2$  u.f.c./g; 10: 10 u.f.c./g; 11: 1 u.f.c./g; 12: Control negativo)



Para PCR a tiempo real los límites de detección fueron de  $5 \times 10^2$  u.f.c./g de muestra y 5 u.f.c./g de muestra, sin y con enriquecimiento respectivamente (Figura 1- Anexo VIII; Tabla 14).

MEJILLÓN		
	0 horas	24 horas.
<b>PCR convencional</b>	$5 \times 10^5$	$5 \times 10^0$
<b>PCR a tiempo real</b>	$5 \times 10^2$	$5 \times 10^0$

Tabla 14. Comparación de los límites de detección (u.f.c./g) de las distintas técnicas para la detección de *V. parahaemolyticus* en muestras de mejillón (0 horas: sin enriquecimiento; 24 horas: con enriquecimiento)

#### 4.2.2. Análisis del límite de detección en aguas inoculadas artificialmente

Por cultivo en medio selectivo se detectaron hasta  $5 \times 10^7$  u.f.c./ml de muestra analizada sin enriquecimiento. Tras 24 horas de enriquecimiento en APW 2% NaCl los microorganismos presentes en la matriz alimentaria enmascaraban el crecimiento de *V. parahaemolyticus*, por lo que no fue posible establecer límites de detección.

Para PCR convencional, el límite de detección fue de  $5 \times 10^2$  u.f.c./ml de muestra analizada sin enriquecimiento, mientras que tras 24 horas de enriquecimiento en APW 2% NaCl, esta técnica permitió detectar hasta 5 u.f.c./ml de muestra.

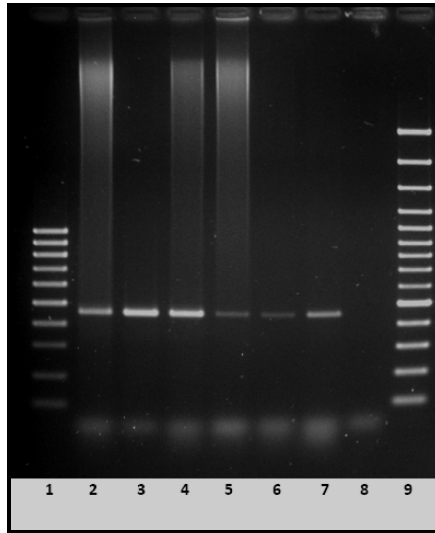


Figura 38. Límites de detección de la PCR de *V. parahaemolyticus* usando como matriz agua, antes del enriquecimiento (1: Marcador de peso molecular (50 pb); 2:  $10^7$  u.f.c./ml; 3:  $10^6$  u.f.c./ml; 4:  $10^5$  u.f.c./ml; 5:  $10^4$  u.f.c./ml; 6:  $10^3$  u.f.c./ml; 7:  $10^2$  u.f.c./ml; 8: 10 u.f.c./ml; 9: marcador de peso molecular (100 pb))

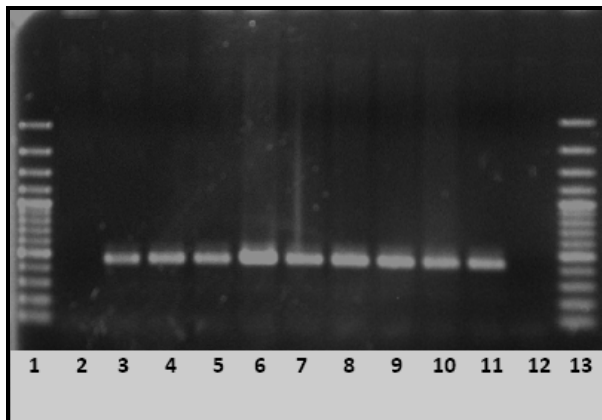


Figura 39. Límite de detección de la PCR de *V. parahaemolyticus* usando como matriz agua, después de 24 horas de enriquecimiento (1: Marcador de peso molecular (100 pb); 2: control negativo; 3:  $10^7$  u.f.c./ml; 4:  $10^7$  u.f.c./ml; 5:  $10^6$  u.f.c./ml; 6:  $10^5$  u.f.c./ml; 7:  $10^4$  u.f.c./ml; 8:  $10^3$  u.f.c./ml; 9:  $10^2$  u.f.c./ml; 10: 10 u.f.c./ml; 11: 1 u.f.c./ml; 12:  $10^{-1}$  u.f.c./ml; 13: Marcador de peso molecular (100 pb))

Para PCR a tiempo real los límites de detección fueron de  $5 \times 10^2$  u.f.c./ml de muestra y 5 u.f.c./ml de muestra sin y con enriquecimiento respectivamente (Figura 2- Anexo VIII; Tabla 15).

<b>AGUA</b>		
	0 horas	24 horas.
<b>PCR convencional</b>	$5 \times 10^2$	$5 \times 10^0$
<b>PCR a tiempo real</b>	$5 \times 10^2$	$5 \times 10^0$

Tabla 15. Comparación de los límites de detección (u.f.c./ml) de las distintas técnicas para la detección de *V. parahaemolyticus* en muestras de agua (0 horas: sin enriquecimiento; 24 horas: con enriquecimiento)

#### 4.2.3. Ensayo colaborativo para la evaluación del método de detección de *Vibrio parahaemolyticus* mediante PCR a tiempo real

Todos los laboratorios obtuvieron resultados satisfactorios en la primera fase del ejercicio: en todos los casos se detectaron las 5 cepas de referencia de *V. parahaemolyticus* y no se detectaron las dos muestras de *V. vulnificus*.

En relación con los resultados de los 7 laboratorios participantes, únicamente pudieron considerarse válidos 6 de ellos, dado que el laboratorio 4 realizó los ensayos con un equipo basado en un sistema de capilares, pero utilizando los reactivos y el protocolo diseñado para los equipos de pocillos, por lo que sus resultados fueron excluidos del estudio.

En la siguiente tabla (Tabla 16), se muestran los resultados de la segunda etapa del ejercicio colaborativo. Se indica entre paréntesis el valor del punto de corte ( $C_T$ ) obtenido en cada muestra:

Laboratorio	MUESTRA			
	A-01	A-02	A-03	A-04
<b>Laboratorio 1. (AB)</b>	Detectado (28,6)	Detectado (31,2)	Detectado (28,5)	Detectado (32,4)
<b>Laboratorio 2. (AB)</b>	Detectado (14,6)	Detectado (14,3)	Detectado (14,9)	Detectado (14,2)
<b>Laboratorio 3. (AB)</b>	Detectado (18,3)	Detectado (19,0)	Detectado (19,6)	Detectado (19,0)
<b>Laboratorio 4. (LC)</b>	No detectado	Detectado (22,0)	No detectado	No detectado
<b>Laboratorio 5. (LC)</b>	Detectado (14,5)	Detectado (14,4)	Detectado (14,2)	Detectado (14,4)
<b>Laboratorio 6. (LC)</b>	Detectado (14,0)	Detectado (15,0)	Detectado (15,0)	Detectado (14,9)
<b>Laboratorio 7. (LC)</b>	Detectado (16,7)	Detectado (12,1)	Detectado (14,5)	Detectado (15,9)

AB: Protocolo basado en el uso de un termociclador con sistema de pocillos.

LC: Protocolo basado en el uso de un termociclador con sistema de capilares

**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**

Todos los laboratorios que realizaron ensayos complementarios de aislamiento en placa lograron resultados coincidentes (presencia de *V. parahaemolyticus*) con los obtenidos mediante el método alternativo.

Para el análisis de resultados se usó el esquema de evaluación incluido en la norma ISO 16140:2003 comparando

los resultados obtenidos frente al valor de referencia, siguiendo el siguiente esquema:

	<b>RESULTADO REFERENCIA: POSITIVO</b>	<b>RESULTADO REFERENCIA: NEGATIVO</b>
<b>RESULTADO MÉTODO ALTERNATIVO: POSITIVO</b>	CONCORDANCIA POSITIVA (PA) = 24	DESVIACIÓN POSITIVA (PD) = 0
<b>RESULTADO MÉTODO ALTERNATIVO: NEGATIVO</b>	DESVIACIÓN NEGATIVA (ND) = 0	CONCORDANCIA NEGATIVA (NA) = 0

Especificidad (SP) = 100%

Sensibilidad (SE) = 100%

Desviación positiva (PD) = 0%

Desviación negativa (ND) = 0%

Dado que los valores discordantes (PD y ND) fueron 0, lo que indica que no se encuentran diferencias entre el método de PCR y el valor de referencia, no se pudo establecer un estudio estadístico para el examen de los mismos.

#### **4.3. Detección de *Vibrio vulnificus* en muestras inoculadas artificialmente mediante cultivo y PCR**

##### **4.3.1. Análisis del límite de detección en alimentos de origen marino inoculados artificialmente**

El cultivo en medio selectivo detectó hasta  $2 \times 10^7$  u.f.c./g de muestra analizada sin enriquecimiento. Tras 24 horas de

enriquecimiento en APW 2% NaCl, de nuevo la microbiota acompañante enmascaraba el crecimiento de *V. vulnificus*.

Por PCR convencional, el límite de detección fue de  $2 \times 10^5$  u.f.c./g de muestra analizada sin enriquecimiento, mientras que tras 24 horas de enriquecimiento en APW 2% NaCl fue capaz de detectar hasta 2 u.f.c./g de muestra. Las figuras 40 y 41 muestran los límites de detección de la técnica de PCR sin enriquecimiento y con enriquecimiento respectivamente.

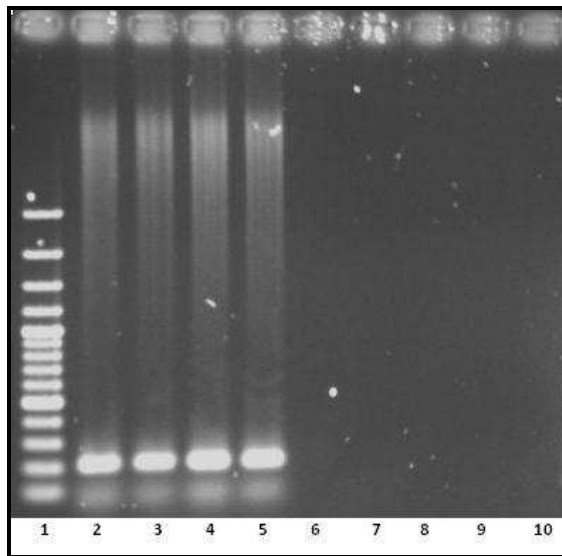


Figura 40. Límite de detección de la PCR de *V. vulnificus* usando como matriz mejillón, antes del enriquecimiento (1: Marcador de peso molecular (100 pb); 2:  $10^8$  u.f.c./g; 3:  $10^7$  u.f.c./g; 4:  $10^6$  u.f.c./g; 5:  $10^5$  u.f.c./g; 6:  $10^4$  u.f.c./g; 7:  $10^3$  u.f.c. /g; 8:  $10^2$  u.f.c./g; 9:  $10^1$  u.f.c./g; 10: Control negativo)

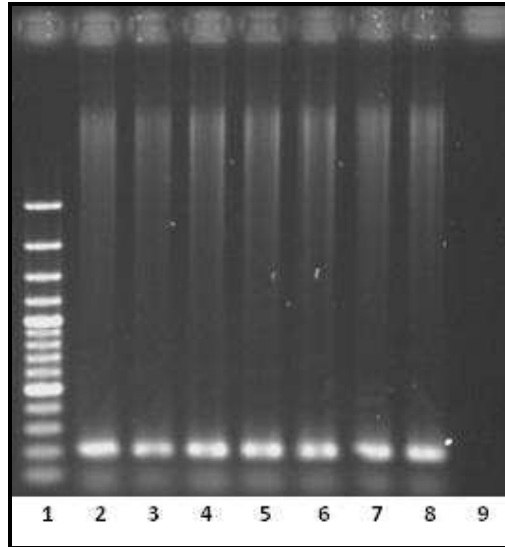


Figura 41. Límite de detección de la PCR para *V. vulnificus* usando como matriz mejillón, después de 24 horas de enriquecimiento (1: Marcador de pesO molecular de 100 pb; 2:  $10^6$  u.f.c./g; 3:  $10^5$  u.f.c./g; 4:  $10^4$  u.f.c./g; 5:  $10^3$  u.f.c./g; 6:  $10^2$  u.f.c./g; 7: 10 u.f.c./g; 8: 1 u.f.c./g; 9: control negativo)

Para la evaluación del método de PCR a tiempo real se probaron tanto los ensayos basados en la metodología SYBR Green I como en la sonda de hibridación TaqMan VVH-TM. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Usando el agente intercalante SYBR Green I, el límite de detección de la PCR a tiempo real sin enriquecimiento fue de  $2 \times 10^2$  u.f.c./g (Figura 3- Anexo VIII) y tras 24 h de enriquecimiento fue de 2 u.f.c./g de mejillón. Usando la sonda TaqMan VVH-TM los límites de detección fueron  $2 \times 10^1$  u.f.c./g sin enriquecimiento (Figura 4- Anexo VIII) y 2 u.f.c./g tras 24 horas de enriquecimiento en APW 2% NaCl (Tabla 17).

<b>MEJILLÓN</b>		
	0 horas	24 horas.
<b>PCR convencional</b>	$2 \times 10^5$	$2 \times 10^0$
<b>PCR a tiempo real con SYBR Green I</b>	$2 \times 10^2$	$2 \times 10^0$
<b>PCR a tiempo real con la sonda TaqMan VVH-TM</b>	$2 \times 10^1$	$2 \times 10^0$

Tabla 17. Comparación de los límites de detección (u.f.c./g) de las distintas técnicas para la detección de *V. vulnificus* en muestras de mejillón (0 horas: sin enriquecimiento; 24 horas: con enriquecimiento)

#### 4.3.2. Análisis del límite de detección en aguas inoculadas artificialmente

Por cultivo en medio selectivo, los resultados fueron de  $2 \times 10^7$  u.f.c./ml.

Sin enriquecimiento, por PCR convencional se detectaron hasta  $2 \times 10^4$  u.f.c./ml de muestra analizada (Figura 42) y tras el enriquecimiento se detectó hasta 1 u.f.c./ml (Figura 43). Para PCR a tiempo real usando SYBR Green I y la sonda TaqMan VVH-TM, los límites de detección se establecieron en  $2 \times 10^2$  (Figura 5- Anexo VIII) y  $2 \times 10^1$  u.f.c./ml (Figura 6- Anexo VIII) respectivamente. Después del enriquecimiento en APW 2% NaCl los límites de detección fueron 2 u.f.c./ml, tanto para PCR convencional como para PCR a tiempo real (Tabla 18).



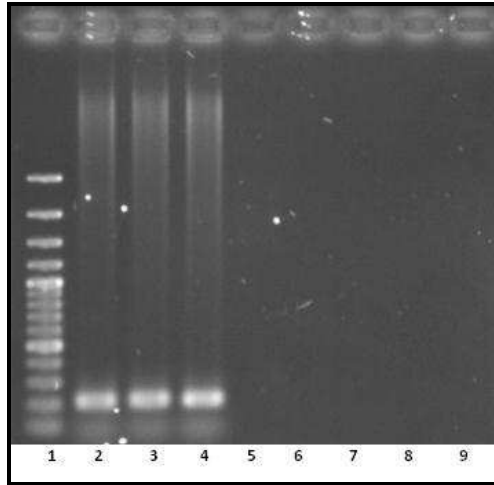


Figura 42. Límite de detección de la PCR de *V. vulnificus* usando como matriz agua, antes del enriquecimiento (1: Marcador de peso molecular (100 pb); 2:  $10^6$  u.f.c./ml; 3:  $10^5$  u.f.c./ml; 4:  $10^4$  u.f.c./ml; 5:  $10^3$  u.f.c./ml; 6:  $10^2$  u.f.c./ml; 7: 10 u.f.c./ml; 8: 1 u.f.c./ml; 9: control negativo)

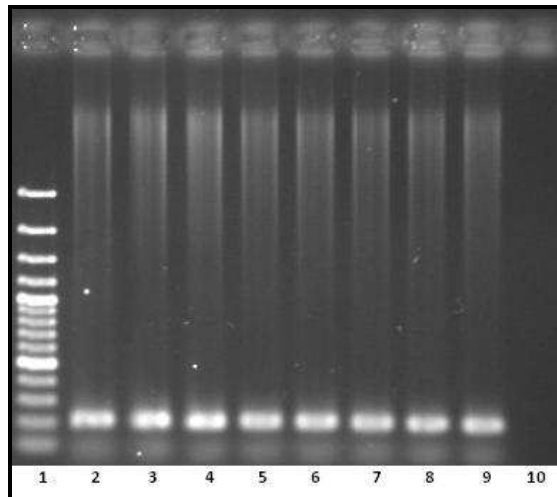


Figura 43. Límite de detección de la PCR de *V. vulnificus* usando como matriz agua, después de 24 horas de enriquecimiento (1: Marcador de peso molecular (100 pb); 2:  $10^7$  u.f.c./ml; 3:  $10^6$  u.f.c./ml; 4:  $10^5$  u.f.c./ml; 5:  $10^4$  u.f.c./ml; 6:  $10^3$  u.f.c./ml; 7:  $10^2$  u.f.c./ml; 8: 10 u.f.c./ml; 9: 1 u.f.c./ml; 10: control negativo)

AGUA		
	0 horas	24 horas.
PCR convencional	$2 \times 10^4$	$2 \times 10^0$
PCR a tiempo real con SYBR Green I	$2 \times 10^2$	$2 \times 10^0$
PCR a tiempo real con la sonda TaqMan VVH- TM	$2 \times 10^1$	$2 \times 10^0$

Tabla 18. Comparación de los límites de detección (u.f.c./ml) de las distintas técnicas para la detección de *V. vulnificus* en muestras de agua (0 horas: sin enriquecimiento; 24 horas: con enriquecimiento)

#### 4.4. Detección conjunta de *Vibrio spp.*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en muestras inoculadas artificialmente mediante PCR múltiple

Se evaluó el límite de detección de la técnica de PCR múltiple para la detección conjunta de *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* obteniéndose los siguientes resultados en las diferentes matrices.

##### 4.4.1. Análisis del límite de detección en alimentos de origen marino inoculados artificialmente

Para *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, el límite de detección de la técnica de PCR múltiple sin enriquecimiento fue de  $4 \times 10^5$  u.f.c./g de muestra analizada. Tras 24 horas de enriquecimiento en APW 2% NaCl se detectó en los tres casos hasta 4 u.f.c./g de muestra analizada (Tabla 19).

	MEJILLÓN	
	0 horas	24 horas.
PCR múltiple		
<i>Vibrio spp.</i>	$4 \times 10^5$	$4 \times 10^0$
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	$4 \times 10^5$	$4 \times 10^0$
<i>Vibrio vulnificus</i>	$4 \times 10^5$	$4 \times 10^0$

Tabla 19. Límites de detección (u.f.c./g) de la técnica de PCR múltiple para la detección de *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en muestras de mejillón (0 horas: sin enriquecimiento; 24 horas: con enriquecimiento)

La siguiente figura (Figura 44) muestra el análisis del límite de detección de la PCR múltiple sin enriquecimiento.

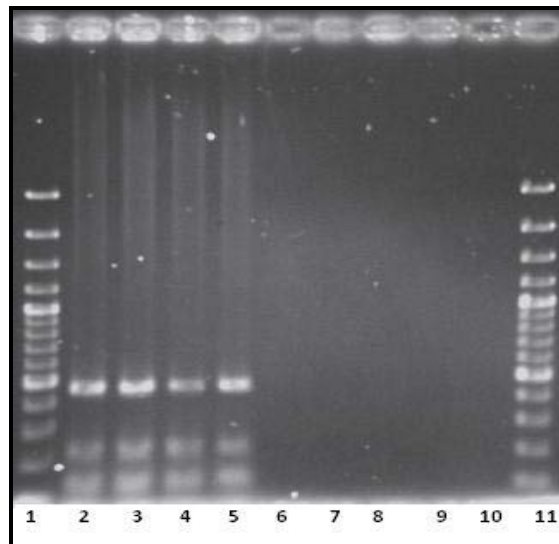


Figura 44. Límite de detección de la PCR múltiple para *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* usando como matriz mejillón, antes del enriquecimiento (1: Marcador de peso molecular (100 pb); 2:  $10^8$  u.f.c./g; 3:  $10^7$  u.f.c./g; 4:  $10^6$  u.f.c./g; 5:  $10^5$  u.f.c./g; 6:  $10^4$  u.f.c./g; 7:  $10^3$  u.f.c./g; 8:  $10^2$  u.f.c./g; 9: 10 u.f.c./g; 10: Control negativo; 11: Marcador de peso molecular (100 pb))

#### 4.4.2. Análisis del límite de detección en aguas inoculadas artificialmente

Para *Vibrio spp.* El límite de detección de la técnica de PCR múltiple sin enriquecimiento fue de  $1 \times 10^4$  u.f.c./ml de muestra analizada, mientras que para *V. parahaemolyticus* fue de  $1 \times 10^2$  u.f.c./ml de muestra analizada y para *V. vulnificus* el límite de detección se estableció en  $1 \times 10^4$  u.f.c./ml de muestra analizada (Figura 45). Tras 24 horas de enriquecimiento en APW 2% NaCl se detectó en los tres casos hasta 1 u.f.c./ml de muestra analizada (Tabla 20).

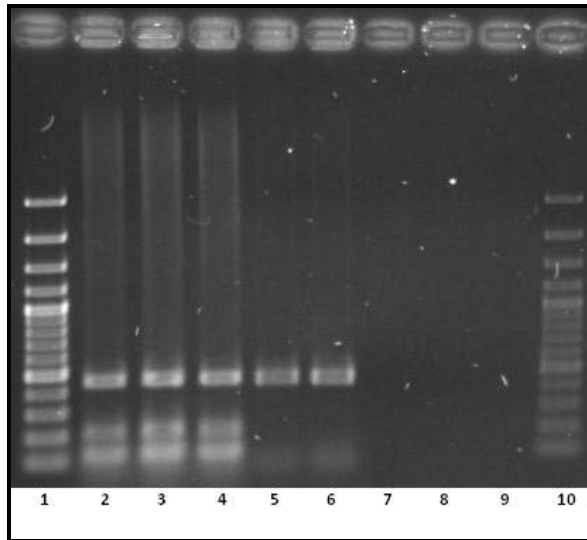


Figura 45. Límite de detección de la PCR múltiple para *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* usando como matriz agua, antes del enriquecimiento (1: Marcador de peso molecular (100 pb); 2:  $10^6$  u.f.c./g; 3:  $10^5$  u.f.c./g; 4:  $10^4$  u.f.c./g; 5:  $10^3$  u.f.c./g; 6:  $10^2$  u.f.c./g; 7:  $10^1$  u.f.c./g; 8: 1 u.f.c./g; 9: Control negativo; 10: Marcador de peso molecular (100 pb))

	AGUA	
<b>PCR múltiple</b>	0 horas	24 horas.
<b><i>Vibrio spp.</i></b>	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^0$
<b><i>Vibrio parahaemolyticus</i></b>	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^0$
<b><i>Vibrio vulnificus</i></b>	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^0$

Tabla 20. Límites de detección (u.f.c./ml) de la técnica de PCR múltiple para la detección de *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en muestras de agua (0 horas: sin enriquecimiento; 24 horas: con enriquecimiento)

## 5. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *VIBRIO SPP.*, *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* Y *VIBRIO VULNIFICUS* EN ALIMENTOS DE ORIGEN MARINO Y AGUAS

Para el análisis de las 83 muestras de alimentos y las 120 de aguas se usaron todas las técnicas optimizadas anteriormente en este trabajo (Anexo VI, Tablas 3 y 4).

### 5.1. Detección y cuantificación de *Vibrio spp.*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en alimentos de origen marino por métodos moleculares

#### 5.1.1. Detección de *Vibrio spp.*

De las 83 muestras de alimentos, 74 (89%) fueron positivas usando la técnica FISH. De todas éstas, 72 muestras (97,3%) fueron positivas sin enriquecimiento, mientras que 2 (2m7%) fueron positivas solamente tras el enriquecimiento.

Usando la PCR convencional y PCR múltiple, se obtuvieron resultados positivos en 75 muestras (90,3%), de las cuales 57 (76%) fueron positivas sin y con enriquecimiento, 11 (14,6%)

fueron positivas solamente tras el enriquecimiento y 7 muestras (9,3%) solamente antes del enriquecimiento.

#### **5.1.2. Detección y cuantificación de *V. parahaemolyticus***

De las 83 muestras de alimentos, 22 muestras (26,5%) dieron positivas mediante PCR convencional y múltiple, todas ellas tras 24 horas de enriquecimiento, excepto una (A3). La técnica PCR a tiempo real permitió detectar 27 muestras positivas (32,5%), todas ellas tras el enriquecimiento, a excepción de tres (A3, A20 y A22), que fueron positivas también antes del enriquecimiento. Estas muestras fueron cuantificadas, obteniéndose valores de concentración del orden de  $10^3$  u.f.c./gr. La muestra A3 no pudo ser cuantificada porque presentaba valores de concentración por debajo del límite de cuantificación.

Todas las muestras positivas por PCR convencional y múltiple, excepto dos, lo fueron también por PCR a tiempo real. En todas las muestras en las que se aislaron cepas de *V. parahaemolyticus*, todos los ensayos de PCR fueron positivos.

#### **5.1.3. Detección y cuantificación de *V. vulnificus***

En el análisis de las muestras de alimentos, de las 83 muestras ensayadas, 6 muestras (7,2%) fueron positivas mediante PCR convencional y múltiple. Dos de las 6 muestras positivas (33,3%) fueron positivas antes del enriquecimiento y negativas después del paso de enriquecimiento, y las 4 muestras restantes (66,6%) fueron positivas solamente después del enriquecimiento.

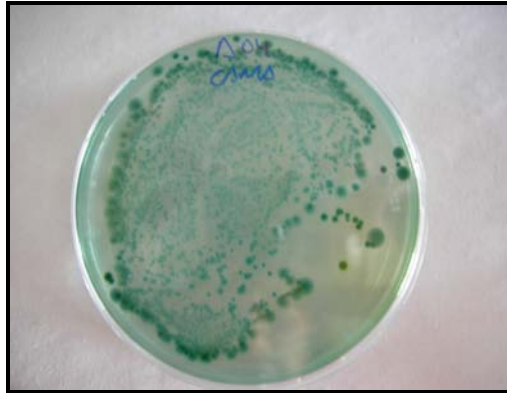
Mediante PCR a tiempo real usando SYBR Green I, de las 83 muestras, 7 (8,4%) dieron positivas, de las cuales una (A20)

fue positiva solamente antes del enriquecimiento y 6 después del paso de enriquecimiento. Usando la sonda VVH-TM, el número de muestras positivas fue de 7 (8,4%). Del total de las positivas, una de ellas (A20) fue positiva solamente antes del enriquecimiento, 5 (71,4%) lo fueron solamente después del enriquecimiento y 1 (14,3%) antes y después del paso previo de enriquecimiento. La muestras fueron cuantificadas dando concentraciones del orden de  $10^2$  u.f.c. /gr, usando tanto SYBR Green I como la sonda TaqMan.

Todas las muestras positivas por PCR convencional y múltiple, excepto una (A57), lo fueron también por PCR a tiempo real. En todas las muestras en las que se aislaron cepas de *V. vulnificus* a las 24 horas de enriquecimiento, todos los ensayos de PCR fueron positivos. Sin embargo, en la muestra A64, en la que se aisló *V. vulnificus* antes y después del enriquecimiento, la PCR convencional, múltiple y a tiempo real sólo permitió observar resultados positivos a las 24 horas, siendo negativos todos los ensayos en la muestra directa.

## **5.2. Aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en alimentos.**

Mediante cultivo en TCBS, en 7 muestras de alimentos fue posible el aislamiento de 12 colonias presuntivas del género *Vibrio* (Figura 46). Se realizó tinción Gram de cada una de las bacterias aisladas e identificación bioquímica con tira API 20E, confirmándose que las bacterias analizadas eran Gram negativas y tenían perfiles bioquímicos característicos de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Tabla 21).



**Figura 46. Colonias presuntivas del género *Vibrio* aisladas de alimentos en el medio selectivo TCBS**

Se procedió a la extracción de ADN genómico de cada aislado y al análisis por PCR de género y de especie, confirmándose que 8 colonias pertenecían a la especie *V. parahaemolyticus* (Figura 47) y 4 colonias a *V. vulnificus* (Figuras 48 y 49). También se llevó a cabo la secuenciación de los fragmentos amplificados en cada PCR, dando resultados del 100% de homología del fragmento amplificado con *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en cada caso y confirmándose así la presencia de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en alimentos de origen marino.



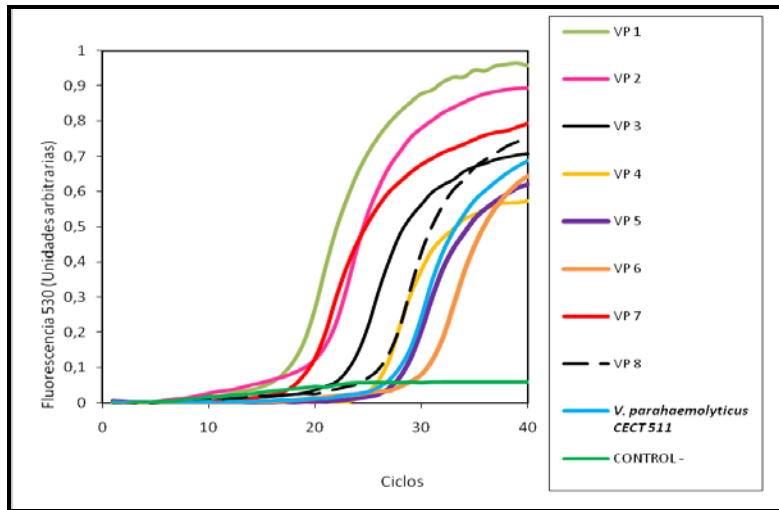


Figura 47. Curvas de amplificación obtenidas del análisis de los aislados de muestras de alimentos, mediante PCR a tiempo real para *V. parahemolyticus*

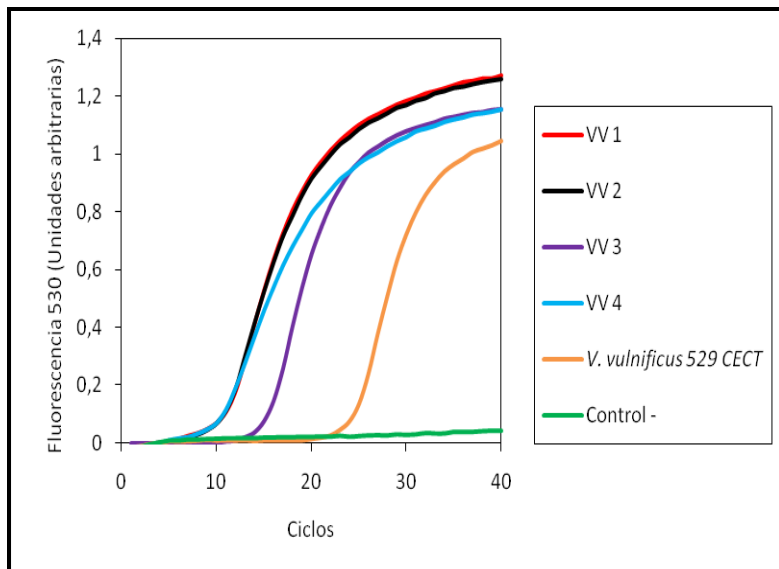
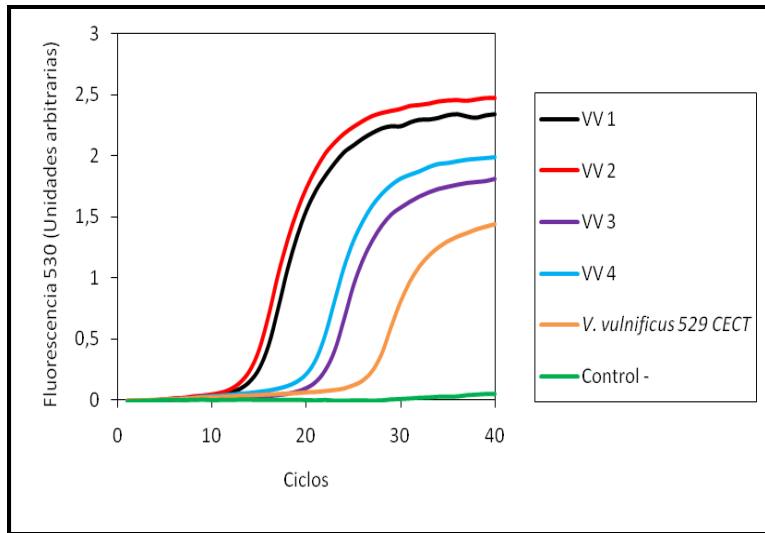


Figura 48. Curvas de amplificación obtenidas del análisis de los aislados de muestras de alimentos, mediante PCR a tiempo real usando SYBR Green I para *V. vulnificus*



**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 *V. vulnificus***

Además de la secuenciación del producto amplificado en la PCR, se procedió a la secuenciación del ARNr 16S confirmándose, de nuevo con el 100% de similitud, la presencia de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en alimentos de origen marino (Tabla 21)

Las tablas 22 y 23 muestran los resultados de los análisis de las muestras de alimentos.

Aislado	Procedencia	Perfil bioquímico Tira API 20E	% Identificación Tira API 20E	Secuenciación producto PCR	Secuenciación ARNr 16S
VP1	A3 (Mejillón)	4146106	<i>V. parahaemolyticus</i> 99.9%	100% similitud <i>V. parahaemolyticus</i>	100% similitud <i>V. parahaemolyticus</i>
VP2	A3 (Mejillón)	4146106	<i>V. parahaemolyticus</i> 99.9%	100% similitud <i>V. parahaemolyticus</i>	100% similitud <i>V. parahaemolyticus</i>
VP3	A3 (Mejillón)	0146106	<i>V. parahaemolyticus</i> 99.9%	100% similitud <i>V. parahaemolyticus</i>	100% similitud <i>V. parahaemolyticus</i>
VP4	A6 (Mejillón)	4347107	<i>V. parahaemolyticus</i> 99.8%	100% similitud <i>V. parahaemolyticus</i>	100% similitud <i>V. parahaemolyticus</i>
VP5	A6 (Mejillón)	4347107	<i>V. parahaemolyticus</i> 99.8%	100% similitud <i>V. parahaemolyticus</i>	100% similitud <i>V. parahaemolyticus</i>
VP6	A7 (Mejillón)	4346107	<i>V. parahaemolyticus</i> 99.6%	100% similitud <i>V. parahaemolyticus</i>	100% similitud <i>V. parahaemolyticus</i>
VP7	A7 (Mejillón)	4346107	<i>V. parahaemolyticus</i> 99.6%	100% similitud <i>V. parahaemolyticus</i>	100% similitud <i>V. parahaemolyticus</i>
VP8	A8 (Mejillón)	0346107	<i>V. parahaemolyticus</i> 99.7%	100% similitud <i>V. parahaemolyticus</i>	100% similitud <i>V. parahaemolyticus</i>
VV1	A60 (Ostra)	5347005	<i>V. vulnificus</i> 93%	100% similitud <i>V. vulnificus</i>	100% similitud <i>V. vulnificus</i>
VV2	A61 (Ostra)	5146005	<i>V. vulnificus</i> 99.9%	100% similitud <i>V. vulnificus</i>	100% similitud <i>V. vulnificus</i>
VV3	A64 (Ostra)	1246005	<i>V. vulnificus</i> 98.7%	100% similitud <i>V. vulnificus</i>	100% similitud <i>V. vulnificus</i>
VV4	A64 (Ostra)	1246005	<i>V. vulnificus</i> 98.7%	100% similitud <i>V. vulnificus</i>	100% similitud <i>V. vulnificus</i>

**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**

<i>V. parahaemolyticus</i>		Cultivo	PCR tradicional	PCR múltiple	Q-PCR-SYBR Green I	
					Análisis cualitativo	Análisis cuantitativo
A2 (Mejillón)	0 horas	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-
A3 (Mejillón)	0 horas	VP1 VP2 VP3	+	+	+	NC
	24 horas	-	-	-	+	-
A4 (Mejillón)	0 horas	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	+	-
A5 (Mejillón)	0 horas	-	-	-	-	-
	24 horas	-	+	+	+	-
A6 (Mejillón)	0 horas	-	-	-	-	-
	24 horas	VP4 VP5	+	+	+	-
A7 (Mejillón)	0 horas	-	-	-	-	-
	24 horas	VP6 VP7	+	+	+	-
A8 (Mejillón)	0 horas	-	-	-	-	-
	24 horas	VP8	+	+	+	-
A10	0 horas	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	+	-

A14	0 horas	-	-	-	-	-
(Mejillón)	24 horas	-	+	+	+	-
A20	0 horas	-	-	-	+	$1.63 \times 10^3$
(Mejillón)	24 horas	-	+	+	+	-
A21	0 horas	-	-	-	-	-
(Mejillón)	24 horas	-	+	+	+	-
A22	0 horas	-	-	-	+	$1.61 \times 10^3$
(Mejillón)	24 horas	-	+	+	+	-
A25	0 horas	-	-	-	-	-
(Almeja)	24 horas	-	+	+	+	-
A29	0 horas	-	-	-	-	-
(Almeja)	24 horas	-	-	-	+	-
A38	0 horas	-	-	-	-	-
(Almeja)	24 horas	-	+	+	+	-
A39	0 horas	-	-	-	-	-
(Almeja)	24 horas	-	+	+	+	-
A42	0 horas	-	-	-	-	-
(Almeja)	24 horas	-	+	+	+	-
A43	0 horas	-	-	-	-	-
(Almeja)	24 horas	-	+	+	+	-
A44	0 horas	-	-	-	-	-
(Almeja)	24 horas	-	+	+	+	-
A53	0 horas	-	-	-	-	-
(Chirla)	24 horas	-	+	+	+	-

A57	0 horas	-	-	-	-	-
(Chirla)	24 horas	-	+	+	+	-
A63	0 horas	-	-	-	-	-
(Chirla)	24 horas	-	+	+	+	-
A65	0 horas	-	-	-	-	-
(Chirla)	24 horas	-	+	+	+	-
A71	0 horas	-	-	-	-	-
(Chirla)	24 horas	-	+	+	+	-
A73	0 horas	-	-	-	-	-
(Salmón)	24 horas	-	+	+	+	-
A74	0 horas	-	-	-	-	-
(Salmón)	24 horas	-	+	+	+	-
A76	0 horas	-	-	-	-	-
(Gamba)	24 horas	-	-	-	+	-
A82	0 horas	-	-	-	-	-
(Percebe)	24 horas	-	-	-	+	-

\*NC: No Cuantificable

**Tabla 22. Resultados de los análisis de muestras de alimentos mediante cultivo y PCR para la detección y cuantificación de *V. parahaemolyticus***

<i>V. vulnificus</i>	Cultivo	PCR tradicional	PCR múltiple	Q-PCR-SYBR Green I		Q-PCR-Sonda TaqMan VVH-TM	
				Análisis cualitativo	Análisis cuantitativo	Análisis cualitativo	Análisis cuantitativo
A3 (Mejillón)	0 horas	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	+	-	+
A4 (Mejillón)	0 horas	-	-	-	-	+	$7.21 \times 10^2$
	24 horas	-	-	-	+	-	+
A19 (Mejillón)	0 horas	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-	-
A20 (Mejillón)	0 horas	-	+	+	+	$8.24 \times 10^2$	+
	24 horas	-	-	-	-	-	-
A56 (Chirla)	0 horas	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	+	+	+	-	+
A57 (Chirla)	0 horas	-	+	+	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-	-
A60 (Ostra)	0 horas	-	-	-	-	-	-
	24 horas	VV1	+	+	+	-	+

A61 (Ostra)	0 horas	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	VV2	+	+	+	-	+	-
A62 (Ostra)	0 horas	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-
A64 (Ostra)	0 horas	VV3	-	-	-	-	-	-
	24 horas	VV4	+	+	+	-	+	-

**Tabla 23. Resultados de los análisis de muestras de alimentos mediante cultivo y PCR para la detección y cuantificación de *V. vulnificus***



### **5.3. Detección y cuantificación de *Vibrio spp.*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en agua de mar y agua de depuradora por métodos moleculares**

Para el análisis de 32 muestras de agua de playa procedentes de las costas cercanas a la ciudad de Valencia y de 88 muestras de agua residual procedentes de distintas EDAR se usaron todas las técnicas optimizadas anteriormente en este trabajo.

#### **5.3.1. Detección de *Vibrio spp.***

En las muestras de agua de playa, usando la técnica FISH, fueron positivas 25 (78,1%) muestras de un total de 32. Del total de las muestras positivas, 20 (80%) fueron positivas sin enriquecimiento y 5 (20%) solamente tras el enriquecimiento. Mediante PCR convencional y múltiple, se obtuvieron los mismos resultados: de las 32 muestras de agua de playa, 28 (87,5%) fueron positivas; del total de las muestras positivas, solamente 3 (10,7%) lo fueron antes y después del enriquecimiento, y el resto (89,3%), solamente tras el paso de enriquecimiento.

En muestras de agua residual, usando la técnica FISH 54 muestras fueron positivas (61,3%), todas ellas antes del paso de enriquecimiento, excepto la muestra AR86 que fue positiva antes y después del enriquecimiento. Analizando estas mismas muestras mediante PCR convencional y PCR múltiple, obtuvimos 73 muestras positivas (83%), de las cuales dos (2,7%) fueron positivas solamente en el análisis directo. Treinta y dos muestras (43,8%) fueron positivas tras el periodo de enriquecimiento y 39 (53,4%) muestras resultaron positivas en ambos análisis.

### 5.3.2. Detección y cuantificación de *V. parahaemolyticus*

De las 32 muestras de agua de playa, usando la PCR convencional y múltiple, 5 muestras (15,6%) fueron positivas tras el enriquecimiento. Mediante PCR a tiempo real, 11 muestras (34,3%) fueron positivas después del enriquecimiento. De ellas, P28 fue positiva también antes del enriquecimiento y aunque no pudo ser cuantificada, porque presentaba valores de concentración del orden de 10 u.f.c./ml, por debajo del límite de cuantificación fiable de la técnica

De las 88 muestras de agua residual, mediante PCR convencional y múltiple ninguna fue positiva. Sin embargo usando la PCR a tiempo real, se obtuvieron resultados positivos en 22 muestras (25%). Del total de las muestras positivas, 11 (50%) lo fueron antes del enriquecimiento, con concentraciones calculadas entre  $10^2$  y  $10^5$  u.f.c./ml. De estas 11 muestras, únicamente una permaneció positiva a las 24 horas (AR59). El otro 50% de muestras positivas lo fueron solamente tras el paso de enriquecimiento.

Todas las muestras positivas por PCR convencional y múltiple lo fueron también por PCR a tiempo real. En la muestra en la que se aisló *V. parahaemolyticus* a las 24 horas de enriquecimiento, la PCR a tiempo real resultó positiva, mientras que el resto de ensayos de PCR fueron negativos.

### 5.3.3. Detección y cuantificación de *V. vulnificus*

De las 32 muestras de agua de playa, mediante PCR convencional y múltiple fueron positivas 3 muestras (9,3%) después del paso de enriquecimiento.

Mediante PCR a tiempo real con la metodología SYBR Green I, 8 muestras fueron positivas tras el enriquecimiento (25%) y solamente 3 de las 11 fueron positivas antes del enriquecimiento, aunque no pudieron ser cuantificadas porque daban valores de concentración menores que los que detecta la técnica. Con el uso de la sonda TaqMan los resultados fueron los mismos. Las tres muestras que daban positivas en el análisis directo pudieron ser cuantificadas, dando valores de entre  $10^3$  y  $10^2$  u.f.c./ml.

Finalmente, en el análisis de las 88 muestras de agua residual, ninguna muestra fue positiva usando la PCR convencional y múltiple. Mediante PCR a tiempo real con SYBR Green I, 10 muestras (3,4 %) fueron positivas. De éstas, 4 lo fueron únicamente tras el paso de enriquecimiento, 3 antes y después del enriquecimiento y tres sólo en la muestra directa. Con esta técnica de las 6 muestras positivas en el análisis directo solamente 2 fueron cuantificables, con valores de entre  $10^2$  y  $10^4$  u.f.c./ml, el resto no pudieron cuantificarse ya que daban valores inferiores al límite de cuantificación de la técnica.

Con la sonda VVH-TM, los resultados fueron los mismos que usando SYBR Green I. Todas las muestras positivas en el análisis directo pudieron ser cuantificadas, presentando valores de entre  $10^2$  y  $10^4$  u.f.c./ml.

En las dos muestras en las que se aisló *V. vulnificus*, la PCR a tiempo real resultó positiva, mientras que el resto de ensayos de PCR fueron negativos.

#### 5.4. Aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en agua de mar y agua de depuradora

Mediante cultivo en TCBS, en 6 muestras de agua ensayadas fue posible el aislamiento de 7 colonias (Figura 50). Se realizó tinción Gram de cada una de las bacterias aisladas e identificación bioquímica con tira API 20E, confirmándose que las bacterias analizadas eran Gram negativos y tenían perfiles bioquímicos característicos de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Tabla 24).

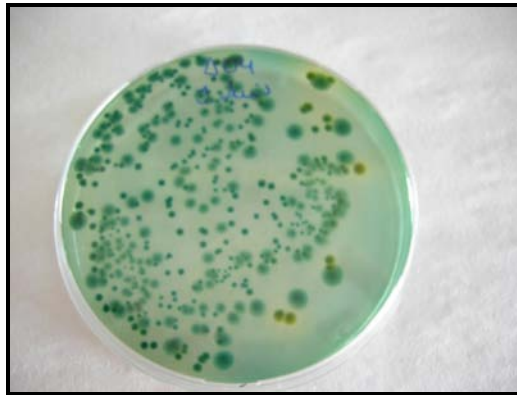
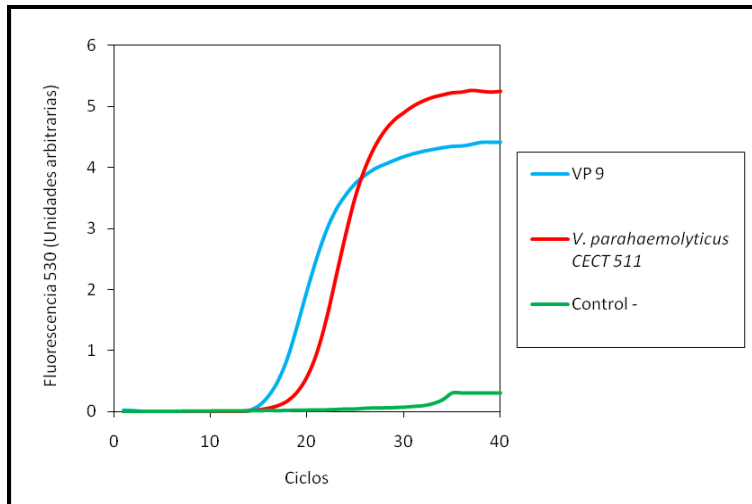


Figura 50. Colonias presuntivas del género *Vibrio* aisladas de alimentos en el medio selectivo TCBS

Se procedió a la extracción de ADN genómico de cada aislado y al análisis por PCR de género y de especie, confirmándose que una colonia pertenecía a la especie *V. parahaemolyticus* (Figura 51) y 6 colonias al género *V. vulnificus* (Figuras 52 y 53).



**Figura 51. Curvas de amplificación obtenidas del análisis de los aislados de muestras de agua, control positivo y control negativo mediante PCR a tiempo real para *V. parahaemolyticus***

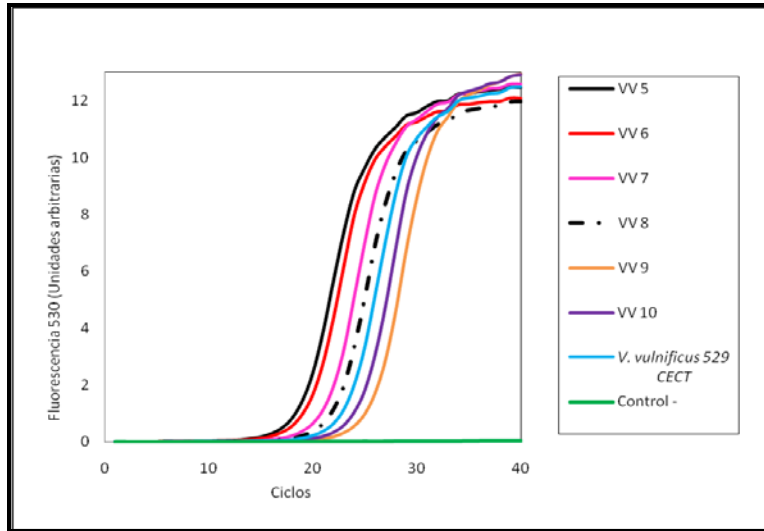


Figura 52. Curvas de amplificación obtenidas del análisis de los aislados de muestras de agua, control positivo y control negativo mediante PCR a tiempo real usando SYBR Green I para *V. vulnificus*

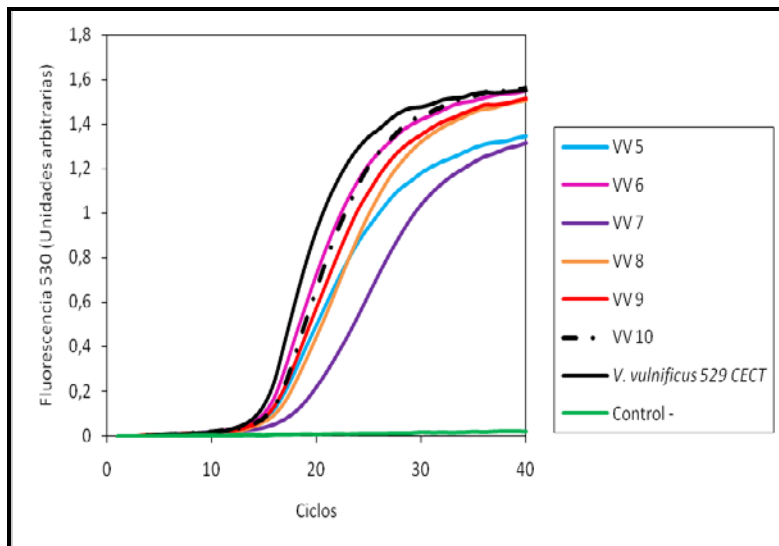


Figura 53. Curvas de amplificación obtenidas del análisis de los aislados muestras de agua, control positivo y control negativo mediante PCR a tiempo real usando la sonda TaqMan para *V. vulnificus*

También se llevó a cabo la secuenciación de los fragmentos amplificados en cada PCR de especie. Además, se procedió a la secuenciación del ARNr 16S, obteniéndose resultados del 100% de similitud del fragmento amplificado con *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en cada caso y confirmándose así la presencia de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en agua de playa y agua residual (Tabla 24).

Las tablas 25 y 26 muestran los resultados de los análisis de las muestras de aguas.

Aislado	Procedencia	Perfil bioquímico Tira API 20E	% Identificación Tira API 20E	Secuenciación producto PCR	Secuenciación ARNr 16S
VP9	AR8 (Residual)	4747106	<i>V. parahaemolyticus</i> 99.9%	100% similitud <i>V. parahaemolyticus</i>	100% similitud <i>V. parahaemolyticus</i>
VV5	P11 (Playa)	5347005	<i>V. vulnificus</i> 93%	100% similitud <i>V. vulnificus</i>	100% similitud <i>V. vulnificus</i>
VV6	P11 (Playa)	5046105	<i>V. vulnificus</i> 99.5%	100% similitud <i>V. vulnificus</i>	100% similitud <i>V. vulnificus</i>
VV7	P14 (Playa)	5046106	<i>V. vulnificus</i> 99.5%	100% similitud <i>V. vulnificus</i>	100% similitud <i>V. vulnificus</i>
VV8	P18 (Playa)	1346105	<i>V. vulnificus</i> 99.4%	100% similitud <i>V. vulnificus</i>	100% similitud <i>V. vulnificus</i>
VV9	AR28 (Residual)	1146105	<i>V. vulnificus</i> 99.9%	100% similitud <i>V. vulnificus</i>	100% similitud <i>V. vulnificus</i>
VV10	AR29 (Residual)	5347005	<i>V. vulnificus</i> 93%	100% similitud <i>V. vulnificus</i>	100% similitud <i>V. vulnificus</i>

**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**



<i>V. parahaemolyticus</i>		Cultivo	PCR tradicional	PCR múltiple	Q-PCR-SYBR Green I	
					Análisis cualitativo	Análisis cuantitativo
P7	0 horas	-	-	-	-	-
	(Agua playa) 24 horas	-	-	-	+	-
P14	0 horas	-	-	-	-	-
	(Agua playa) 24 horas	-	+	+	+	-
P15	0 horas	-	-	-	-	-
	(Agua playa) 24 horas	-	-	-	+	-
P17	0 horas	-	-	-	-	-
	(Agua playa) 24 horas	-	-	-	+	-
P18	0 horas	-	-	-	-	-
	(Agua playa) 24 horas	-	-	-	+	-
P19	0 horas	-	-	-	-	-
	(Agua playa) 24 horas	-	-	-	+	-
P20	0 horas	-	-	-	-	-
	(Agua playa) 24 horas	-	+	+	+	-
P21	0 horas	-	-	-	-	-
	(Agua playa) 24 horas	-	-	-	+	-
P23	0 horas	-	-	-	-	-
	(Agua playa) 24 horas	-	+	+	+	-
P28	0 horas	-	-	-	+	NC*
	(Agua playa) 24 horas	-	+	+	+	-
P29	0 horas	-	-	-	-	-
	(Agua playa) 24 horas	-	+	+	+	-

AR1 (Agua residual)	0 horas	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	+	-
AR2 (Agua residual)	0 horas	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	+	-
AR4 (Agua residual)	0 horas	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	+	-
AR8 (Agua residual)	0 horas	-	-	-	-	-
	24 horas	VP9	-	-	+	-
AR14 (Agua residual)	0 horas	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	+	-
AR15 (Agua residual)	0 horas	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	+	-
AR40 (Agua residual)	0 horas	-	-	-	+	$3.81 \times 10^3$
	24 horas	-	-	-	-	-
AR42 (Agua residual)	0 horas	-	-	-	+	$2.92 \times 10^5$
	24 horas	-	-	-	-	-
AR52 (Agua residual)	0 horas	-	-	-	+	$1.87 \times 10^2$
	24 horas	-	-	-	-	-
AR54 (Agua residual)	0 horas	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	+	-
AR59 (Agua residual)	0 horas	-	-	-	+	$3.88 \times 10^3$
	24 horas	-	-	-	+	-
AR60 (Agua residual)	0 horas	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	+	-

AR61	0 horas	-	-	-	+	2.14 x 10 <sup>2</sup>
(Agua residual)	24 horas	-	-	-	-	-
AR63	0 horas	-	-	-	+	1.95 x 10 <sup>2</sup>
(Agua residual)	24 horas	-	-	-	-	-
AR64	0 horas	-	-	-	+	9.35 x 10 <sup>3</sup>
(Agua residual)	24 horas	-	-	-	-	-
AR66	0 horas	-	-	-	-	-
(Agua residual)	24 horas	-	-	-	+	-
AR68	0 horas	-	-	-	+	1.99 x 10 <sup>2</sup>
(Agua residual)	24 horas	-	-	-	-	-
AR69	0 horas	-	-	-	-	-
(Agua residual)	24 horas	-	-	-	+	-
AR72	0 horas	-	-	-	+	3.49 x 10 <sup>1</sup>
(Agua residual)	24 horas	-	-	-	-	-
AR82	0 horas	-	-	-	+	1.39 x 10 <sup>2</sup>
(Agua residual)	24 horas	-	-	-	-	-
AR86	0 horas	-	-	-	+	8.14 x 10 <sup>1</sup>
(Agua residual)	24 horas	-	-	-	-	-
AR87	0 horas	-	-	-	-	-
(Agua residual)	24 horas	-	-	-	+	-

\*NC: No Cuantificable

**Tabla 25. Resultados de los análisis de muestras de aguas mediante cultivo y PCR para la detección y cuantificación de *V. parahaemolyticus***

<i>V. vulnificus</i>	Cultivo	PCR tradicional	PCR múltiple	Q-PCR-SYBR Green I		Q-PCR-Sonda TaqMan VVH-TM		
				Análisis cualitativo	Análisis cuantitativo	Análisis cualitativo	Análisis cuantitativo	
P1 (Agua playa)	0 horas	-	-	-	+	NC*	+	1.00 x 10 <sup>3</sup>
	24 horas	-	-	-	+	-	+	-
P2 (Agua playa)	0 horas	-	-	-	+	NC*	+	7.41 x 10 <sup>2</sup>
	24 horas	-	-	-	+	-	+	-
P3 (Agua playa)	0 horas	-	-	-	+	NC*	+	8.46 x 10 <sup>2</sup>
	24 horas	-	-	-	+	-	+	-
P7 (Agua playa)	0 horas	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-
P11 (Agua playa)	0 horas	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	VV5 VV6	+	+	+	-	+	-
P14 (Agua playa)	0 horas	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	VV7	-	-	+	-	+	-
P18 (Agua playa)	0 horas	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	VV8	-	-	+	-	+	-

P23 (Agua playa)	0 horas	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-
P25 (Agua playa)	0 horas	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	+	+	+	-	+	-
P31 (Agua playa)	0 horas	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	+	+	+	-	+	-
AR8 (Agua residual)	0 horas	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	+	-	+	-
AR10 (Agua residual)	0 horas	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	+	-	+	-
AR22 (Agua residual)	0 horas	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	+	-	+	-
AR24 (Agua residual)	0 horas	-	-	-	+	NC*	+	$4.30 \times 10^2$
	24 horas	-	-	-	+	-	+	-
AR25 (Agua residual)	0 horas	-	-	-	+	NC*	+	$1.00 \times 10^3$
	24 horas	-	-	-	+	-	+	-

AR28 (Agua residual)	0 horas	VV9	-	-	+	NC*	+	$1.06 \times 10^3$
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-
AR29 (Agua residual)	0 horas	VV10	-	-	+	$5.73 \times 10^2$	+	$1.04 \times 10^3$
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-
AR70 (Agua residual)	0 horas	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	+	-	+	-
AR82 (Agua residual)	0 horas	-	-	-	+	$1.71 \times 10^4$	+	$8.08 \times 10^4$
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-
AR86 (Agua residual)	0 horas	-	-	-	+	NC*	+	$1.00 \times 10^3$
	24 horas	-	-	-	+	-	+	-

\*NC: No Cuantificable

**Tabla 26. Resultados de los análisis de muestras de aguas mediante cultivo y PCR para la detección y cuantificación de *V. vulnificus***

## **6. DETERMINACIÓN DEL BIOTIPO DE LAS CEPAS DE *V. VULNIFICUS***

Una vez aisladas e identificadas las cepas de *V. vulnificus* mediante cultivo, perfil bioquímico, PCR y secuenciación se determinó el biotipo de cada cepa en cuestión. Se llevaron a cabo los análisis de PCR, tal y como describieron Senoh *et al.* (2005), usando las dos parejas de iniciadores nombradas en material y métodos.

Tras los análisis de PCR, vimos que todas las cepas pertenecen al biotipo 2, a excepción de la VV10, aislada de agua residual, y la VV2, aislada de ostra, que pertenecen al biotipo 1.

## **7. ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE BANDAS GENERADOS POR RAPD**

Una vez aisladas e identificadas mediante cultivo, perfil bioquímico, PCR y secuenciación, las cepas de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* fueron caracterizadas mediante la técnica RAPD. Se utilizaron los iniciadores 7254 y M13 para ambas bacterias, obteniendo solamente resultados reproducibles y con un número suficiente de bandas con el iniciador M13.

Los perfiles generados se estudiaron mediante el programa TDI Lane Manager. El análisis numérico combinado de los resultados obtenidos de las cepas aisladas, generó un dendrograma donde se pudo apreciar gráficamente la diversidad existente entre las cepas analizadas

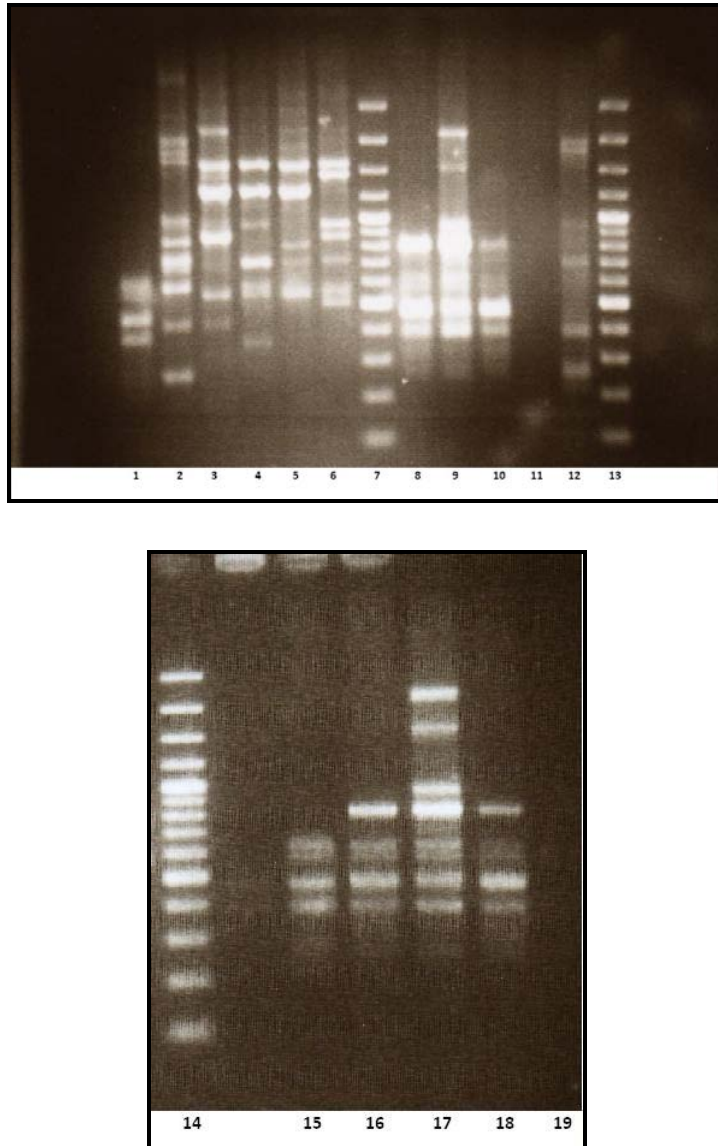
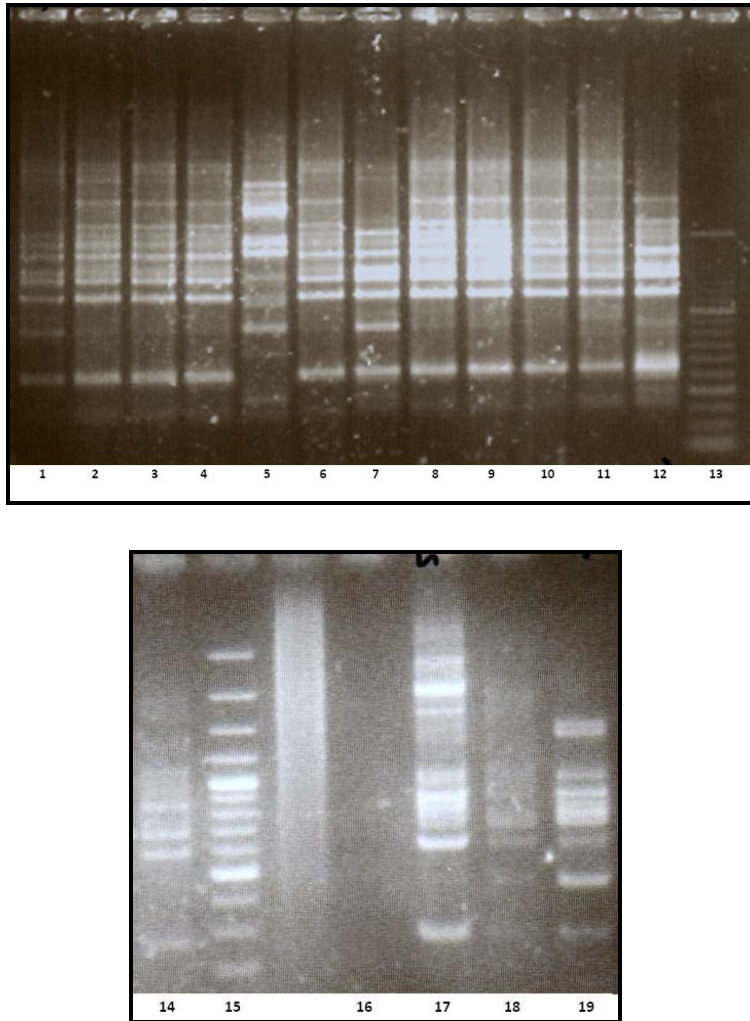


Figura 54. Perfiles generados por el análisis mediante RAPD tras la amplificación con el iniciador M13 de las cepas aisladas de *V. parahaemolyticus*. 1: VP7; 2: VP9; 3: VP3; 4: 9954-9; 5: CECT 5271; 6: VP8; 7: Marcador de peso molecular; 8: CECT 588; 9: VP2; 10: VP4; 11: Control negativo; 12: CECT 612; 13: Marcador de peso molecular; 14: Marcador de peso molecular; 15: VP6; 16: VP5; 17: VP1; 18: CECT 588; 19: Control negativo





**Figura 55.** Perfiles generados por el análisis mediante RAPD tras la amplificación con el iniciador M13 de las cepas aisladas de *V. vulnificus*. 1: CECT 529; 2: VV1; 3: VV2; 4: CECT 5198; 5: VV9; 6: VV3; 7: CECT 5167; 8: VV5; 9: VV6; 10: VV7; 11: VV8; 12: VV10; 13: Marcador de peso molecular; 14: CECT 529; 15: Marcador de peso molecular; 16: Control negativo; 17: VV4; 18: CECT 5167; 19: CECT 5198

### **7.1. Caracterización molecular mediante RAPD de las cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas de agua y alimentos de origen marino**

Todos los aislamientos se unen al 50.3% de similitud genética (Figura 56). En el dendrograma claramente se generan dos clados:

El primer grupo, que está formado por dos cepas, la cepa VP9, que se agrupa al 68% con la cepa de referencia *V. parahaemolyticus* CECT 612. El segundo grupo está formado por los aislados de alimentos, que se agrupan al 73% con las cepas de referencia de *V. parahaemolyticus* CECT 5271 que fue aislada también de alimentos (Berberechos) y 9954-9. Dentro de este grupo se diferencian dos subgrupos con una similitud del 76%: el primer subgrupo está formado por algunos aislados de *V. parahaemolyticus* de distintas muestras de mejillón, que se unen al 85% con la cepa de referencia CECT 588, aislada también de mejillón. En este primer subgrupo se observan que hay cepas agrupadas a mayores niveles de similitud, al 86% (VP6-VP7) y al 100% (VP4-VP5) que son cepas que proceden de la misma muestra. El segundo subgrupo está formado por las cepas aisladas de mejillón VP1, VP2, VP3 y VP8, todas ellas se unen al 80% de similitud. Dentro de este subgrupo las cepas VP1 y VP2 se unen al 100% de semejanza, ya que proceden de la misma muestra, y la cepa VP3 se une a ellas con un 92% de semejanza.

El valor de la correlación cofenética ( $r$ ) obtenido fue de 0,91. Este valor nos indica que la clasificación realizada en el dendrograma es fiable.

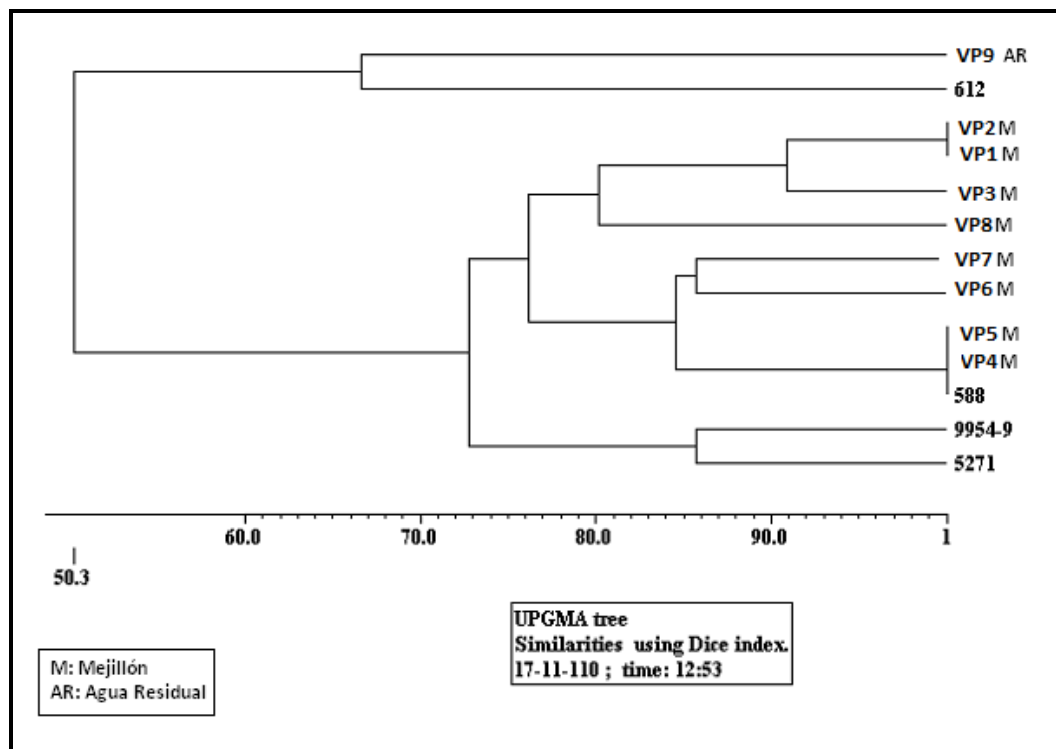


Figura 56. Dendrograma de similitud genética generado para las cepas de *V. parahaemolyticus*

## **7.2. Caracterización molecular mediante RAPD de las cepas de *V. vulnificus* aisladas de agua y alimentos de origen marino**

Con una semejanza de 65.8% se unen todos los aislados de *V. vulnificus* y las cepas de referencia de esta misma especie (Figura 57). En este mismo punto diferenciamos el aislado VV9 que es un aislado de agua residual, del resto de cepas analizadas por RAPD. Podemos diferenciar con una similitud de 73% dos grupos: El primer grupo está formado por el aislado VV10, procedente de agua residual, que presenta una similitud del 79% con las cepas de referencia CECT 5167 y CECT 529. El otro grupo está formado por los aislados de agua de playa y de alimentos, y en él se diferencian dos subgrupos, con un 85% de similitud entre ellos: El primer subgrupo está formado por los aislados de mejillón VV1 y VV2 (100% similitud) y por la cepa CECT 5198 que está aislada también de alimentos (anguila), con una similitud entre ellos del 91%. En el otro subgrupo diferenciamos, con un 92% de similitud, a los aislados de agua de playa (VV5, VV6, VV7 y VV8, 100% de similitud entre ellos) y dos cepas aisladas de la misma muestra de ostra (VV3 y VV4), también con un 100% de similitud entre ellas.

El valor de la correlación cofenética ( $r$ ) obtenido fue de 0,93, este valor nos indica que la clasificación realizada en el dendograma es fiable y casi exacta.

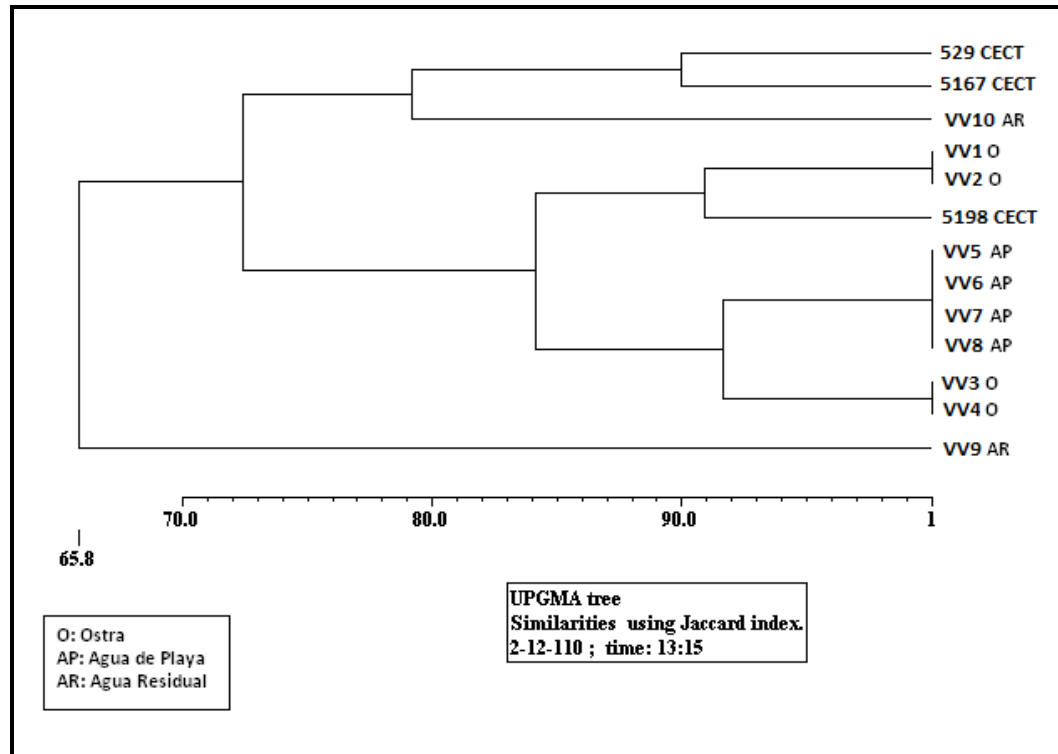


Figura 57. Dendrograma de similitud genética generado para las cepas de *V. vulnificus*.



## *DISCUSIÓN*





En los últimos años, intentando buscar más eficacia en los métodos para la detección de microorganismos, se han desarrollado metodologías basadas en el análisis de los ácidos nucleicos. Entre las técnicas moleculares de mayor aplicación podemos señalar las basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH), técnicas que poseen elevada especificidad y rapidez en la detección de microorganismos (Clifton, 2010).

La técnica de PCR ha sido empleada en numerosos trabajos de investigación para la detección de *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en diferentes matrices. Se ha usado esta técnica para la detección de *Vibrio spp.* en agua de mar (Thompson *et al.*, 2004), para la detección de especies patógenas como *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en mariscos (Panicker *et al.*, 2004), y también para detección de *V. parahaemolyticus* en ostras (Kaufman *et al.*, 2004). En todos los casos, tras el diseño de iniciadores y sondas, y la puesta a punto del método, se han obtenido excelentes límites de detección

La técnica FISH ha sido usada también en numerosos trabajos de investigación, tanto para la detección de bacterias del género *Vibrio* como para bacterias de otros géneros. Giuliano *et al.* en 1999 diferenciaron qué especies del género *Vibrio* estaban presentes en superficie y cuáles en la profundidad del mar. Moreno *et al.* (1999), a su vez, usaron sondas de hibridación para detectar *Vibrio spp.* en muestras de agua y limo del hábitat de anguilas.

Este trabajo se planteó en dos fases diferentes. La primera de ellas consistió en la **puesta a punto de técnicas de detección y cuantificación** de dos especies patógenas del género *Vibrio*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, basadas en la PCR

convencional, PCR a tiempo real e hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH). El objetivo de la segunda parte del trabajo fue la comprobación de la utilidad de estos métodos para la detección y cuantificación de *Vibrio spp.* en muestras de alimentos marinos y en muestras de agua de playa y aguas residuales.

La detección e identificación de patógenos mediante PCR depende de la especificidad de los iniciadores usados en la reacción de amplificación (Gardes y Bruns, 1993). Para la detección de todas las especies de género *Vibrio* se usaron unos iniciadores diseñados por Thompson *et al.* (2004), que amplifican una región de 114 pares de bases del ARNr 16S. Para la detección de la especie *V. parahaemolyticus* se usaron unos iniciadores que amplifican el gen de la hemolisina termolábil (*t1h*) (Taniguchi *et al.*, 1985) y finalmente, para la detección de *V. vulnificus* se usaron los iniciadores descritos por Panicker *et al.* (2004), que producen un fragmento de 205 pares de bases del gen de la hemolisina A (*vhA*).

A pesar de existir datos sobre la especificidad de todos los iniciadores, se realizaron ensayos con distintas cepas del género *Vibrio* y de otros géneros. En los tres casos, para conseguir mayor especificidad se realizaron modificaciones en las condiciones de PCR descritas por los autores, que consistieron básicamente en variaciones de la temperatura y tiempo de unión del iniciador y las concentraciones de  $MgCl_2$  y de los iniciadores en la reacción final. Para *V. parahaemolyticus*, además de modificar la temperatura y las concentraciones de  $MgCl_2$  y de los iniciadores, se usó una concentración de 0,8  $\mu g/ml$  de BSA que ó mejor especificidad de la amplificación, ya que elimina el efecto de las sustancias inhibitoras de la PCR (Guy *et al.*, 2003). Por último, para la reacción de PCR para la detección de *V.*

*vulnificus* se realizaron modificaciones de todos los parámetros para obtener una especificidad y límite de detección más favorables.

Dado que la PCR múltiple permite detectar simultáneamente varias especies o varios genes de una misma especie en una misma muestra y reacción, con el consiguiente ahorro de tiempo, reactivos y volumen de muestra (Linch *et al.*, 2004, Panicker *et al.*, 2004; Bej *et al.*, 1999), se decidió poner a punto un protocolo para la detección conjunta de *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. Existen diversos trabajos en los que se detectan distintas especies del género *Vibrio* usando la PCR múltiple (Panicker *et al.*, 2004) o que usan también esta técnica para diferenciar las cepas patógenas de las no patógenas de *V. parahaemolyticus* (Nordstrom *et al.*, 2007), pero no existe ningún trabajo que haya diseñado una PCR múltiple en la que simultáneamente se detecten todas las especies del género *Vibrio* y se determine, además, la presencia de *V. parahaemolyticus* o *V. vulnificus*. Usando una temperatura de alineación de 65°C durante 1 minuto, se consiguieron resultados específicos para los tres amplicones generados con los iniciadores seleccionados previamente en la PCR convencional.

La PCR a tiempo real proporciona ventajas importantes sobre la PCR convencional: los métodos tradicionales emplean geles de agarosa para la visualización de los productos de amplificación y esto consume mucho tiempo. Además, los resultados se basan en la discriminación de tamaño de una banda en el gel, lo que no resulta muy preciso. Sin embargo, la PCR a tiempo real nos permite la detección de los productos de amplificación en el mismo momento en el que se están amplificando sin necesidad de realización de geles de agarosa. Además, permite la cuantificación de las moléculas de forma rápida y precisa (Costa J., 2004). La PCR a

tiempo real ha sido aplicada por distintos autores para la detección de *Vibrio parahaemolyticus* en ostras, langosta, almejas y diferentes especies de pescados (Cai *et al.*, 2006) y de *Vibrio vulnificus* en pescado y en agua del Golfo de Méjico (Panicker *et al.*, 2004). En todos estos trabajos se han obtenido resultados de detección y cuantificación muy específicos, con un límite de detección muy bajo, demostrando así ser más sensible que el cultivo o la PCR convencional.

En este estudio se pusieron a punto tres protocolos de PCR a tiempo real para la detección de *V. parahaemolyticus*, usando el agente intercalante SYBR Green I, y para la detección de *V. vulnificus*, usando SYBR Green I y sondas de hidrólisis tipo TaqMan, para así poder evaluar cual es el más óptimo para la detección y cuantificación de cada microorganismos estudiado.

En los tres protocolos, al igual que en la PCR convencional, se estudió la especificidad de la reacción. Para obtener la mayor especificidad posible se realizaron ensayos en los que se probaron diferentes temperaturas y tiempos de alineación de los iniciadores y diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> e iniciadores. Tras evaluar las diferentes condiciones se obtuvieron especificidades elevadas, que nos aseguraban su posterior aplicación a matrices alimentarias y ambientales muy contaminadas, además de curvas patrón con unas eficiencias y coeficientes de correlación muy cercanos a los óptimos.

Para la detección y cuantificación de *V. parahaemolyticus* usando SYBR Green I se utilizaron los mismos iniciadores que en la PCR convencional. La curva patrón se elaboró con los datos recogidos en cuatro ensayos diferentes, con tres replicados de cada patrón. Se determinó el límite de

detección para llevar a cabo la cuantificación de *V. parahaemolyticus*, obteniendo unos resultados satisfactorios, ya que esta reacción de PCR a tiempo real es capaz de detectar y cuantificar hasta 10 u.f.c./ml. En 2010, Rizvi y Bej, usando también el gen *tlh* de *V. parahaemolyticus*, pusieron a punto una técnica de PCR en la que se obtuvieron resultados donde el límite de detección de la técnica fue de 10 u.f.c./ml. Podemos mencionar también el trabajo de Nordstrom *et al.* (2007) quienes, usando el mismo gen, obtuvieron un límite de detección de 10 u.f.c./ml.

Para la detección y cuantificación de *V. vulnificus* usando SYBR Green I se usaron también los mismos iniciadores que en la PCR convencional. El límite de detección también fue determinado y se observó que esta reacción de PCR es capaz de detectar y cuantificar muestras con cantidades iguales o superiores a 100 u.f.c./mililitro. Panicker *et al.*, en 2004, llevaron a cabo el desarrollo de una técnica de PCR con SYBR Green I para la detección de *V. vulnificus* usando como diana el mismo gen que hemos utilizado en este trabajo y obtuvieron sensibilidades muy similares a las aquí obtenidas, con un límite de detección de 100 u.f.c.

Además de usar un agente intercalante, para la detección y cuantificación de *V. vulnificus* se puso a punto un ensayo en el que se utilizó una sonda TaqMan diseñada por nosotros. Estas sondas ofrecen mayor especificidad y sensibilidad que el SYBR Green I, ya que poseen una secuencia específica, lo que le permite unirse a una determinada parte del fragmento que queremos amplificar (Heid *et al.* 1996). Una vez diseñada la sonda VVH-TM con el software Primer Express (Applied Biosystem, CA, USA) y usando los mismos iniciadores que en el caso anterior se evaluaron diferentes parámetros para establecer las condiciones óptimas de reacción. Además de obtener una mayor eficiencia con la sonda TaqMan que con

el agente intercalante SYBR Green I, al realizar el análisis del límite de detección observamos que esta reacción de PCR es mucho más sensible, ya que puede detectar y cuantificar muestras con cantidades iguales o superiores a 1 u.f.c./ml. Por tanto, podemos decir que para la detección y cuantificación de *V. vulnificus* el mejor protocolo es la PCR a tiempo real usando la sonda TaqMan.

Las sondas LNA (Locked Nucleic Acids) ofrecen mayor especificidad y sensibilidad, mejor capacidad de hibridación y mayor señal de fluorescencia que las sondas convencionales, debido a las modificaciones en el anillo de ribosa (Astakhova *et al.*, 2011; Koshkin *et al.*, 1998; Obika *et al.*, 1997). Por ello, se decidió realizar una modificación de la sonda TaqMan usada para la detección de *V. vulnificus*. Usando las mismas condiciones que con la sonda TaqMan convencional, se realizó la curva patrón y se calculó la eficiencia de la reacción de la PCR. Tras analizar todos resultados, se vio que al usar la sonda VVH-TM- LNA, la eficiencia no mejoraba notablemente. Además, el límite de detección era idéntico al obtenido con la sonda TaqMan VVH-TM. La obtención de prácticamente los mismos resultados con ambos tipos de sonda, nos hizo rechazar el uso de la nueva sonda LNA, ya que es mucho más cara, debido a que se llevan a cabo más procesos para su síntesis. Alonso *et al.*, en 2011 realizaron una comparación de ambos sistemas de sondas TaqMan y LNA para la detección y cuantificación de *Giardia* y *Cryptosporidium*, obteniendo resultados diferentes a los obtenidos en este trabajo: los límites de detección disminuían considerablemente al usar la sonda LNA. En 2009, Josefsen *et al.* en un trabajo de detección de *Campylobacter*, hicieron una comparación entre las sondas LNA y las sondas convencionales, obteniendo también mayor eficacia con las sondas LNA.

A pesar de que las eficiencias de las tres reacciones fueron ligeramente menores a la óptima, se consideró que los protocolos de detección y cuantificación de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* eran fiables y específicos para la detección y cuantificación de estos microorganismos, ya que los valores obtenidos tras el análisis de regresión nos daban una concordancia positiva, casi perfecta en todos los casos.

La segunda metodología que se ha utilizado en este trabajo ha sido la hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH). Esta técnica permite la visualización, identificación, enumeración y localización simultánea de las células microbianas (Amann *et al.*, 1995). A pesar de que la sensibilidad de esta técnica es menor que la de PCR, presenta la ventaja de distinguir entre las formas bacilares y cocoides del género *Vibrio* (Moreno *et al.*, 1999).

En este estudio se intentó poner a punto 3 protocolos de FISH para la detección de *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, para su posterior aplicación en matrices alimentarias y ambientales.

En primer lugar, procedimos a poner a punto un protocolo de detección de todas las especies del género. Para ello se probaron dos sondas, GV diseñada por Giuliano *et al.* (1999) y VIB diseñada por Moreno *et al.* (1999). Tras realizar los estudios de accesibilidad y ensayos de puesta a punto, vimos que solamente la sonda VIB producía fluorescencia. Por tanto utilizamos esta sonda para la detección de microorganismos del género *Vibrio*, usando una concentración de formamida del 30%, ya que una concentración mayor podría provocar unas condiciones demasiado selectivas y dificultar la unión de la sonda al ARN ribosómico (Moreno *et al.*, 1999), y un tiempo de hibridación de 1.5 horas, que fueron suficientes

para obtener una buena señal de fluorescencia. Los análisis de especificidad mostraron que la sonda era completamente específica para *Vibrio spp.*

En la puesta a punto de la técnica FISH para la detección de *V. parahaemolyticus* se empleó una sonda diseñada por nosotros (VPA). En la puesta a punto de la técnica para la detección de *V. vulnificus* se usaron cuatro sondas: Dos sondas, Vvul23S296 y Vvu3, diseñadas por Randa *et al.* (2004) y Aznar *et al.* (1994) y dos sondas (Vul23 y Vvran2) diseñadas en este trabajo. Tras evaluar la accesibilidad de las sondas al ARN ribosómico se probaron con cultivos puros, observándose que las sondas, aún siendo específicas, no hibridaban con los microorganismos de estas dos especies. Después de numerosos ensayos en los que se probaron distintas concentraciones de sonda y formamida, diferentes tiempos de hibridación, diferentes cantidades de cultivo de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* y diferentes tipos y tiempos de fijación de las células, sin resultado, se concluyó que las sondas no eran capaces de penetrar e hibridar en el ARN ribosómico diana, tal vez debido a que estas zonas eran poco penetrables.

Tras varias búsquedas bibliográficas y tras varios intentos de diseño de nuevas sondas, no se obtuvieron buenos resultados, por lo que se descartó su uso.

Una vez optimizados los distintos protocolos, se procedió a la evaluación del método de detección de *V. parahaemolyticus* mediante PCR a tiempo real, mediante un ensayo colaborativo interlaboratorio. La ausencia de un material de referencia con diferentes niveles de inóculo próximos al límite de detección impidió realizar una evaluación completa (Sensibilidad y Especificidad) acorde a los protocolos internacionalmente establecidos. Con el material disponible



los resultados fueron concordantes en todos los casos y para todos los laboratorios.

Por otra parte, aunque disponíamos del valor de referencia de cada muestra, éstas fueron sometidas a un proceso de pre-enriquecimiento que provocó el crecimiento hasta elevados niveles, por lo que se evaluó únicamente la capacidad de detección. Sí que pudimos asumir que esta etapa de pre-enriquecimiento es adecuada para alcanzar un elevado nivel de microorganismos diana, independientemente de la presencia de flora interfiriente y del nivel inicial de inóculo.

Aunque, como ya se ha mencionado, el objetivo de la validación era utilizar el método como una técnica de detección y no de cuantificación, el empleo de la PCR a tiempo real permitió un estudio más detallado de los resultados, gracias a la evaluación del valor de detección de fluorescencia obtenido por cada laboratorio.

El Centro de Salud Pública de Valencia fue el único que informó de valores de puntos de corte (Ct) elevados, próximos al ciclo máximo de amplificación, por lo que se recomendó a este participante que realizara nuevos ensayos a partir de suspensiones de microorganismos diana de concentración conocida, al objeto de evaluar si había sido un problema en la etapa de pre-enriquecimiento o bien en la extracción de ADN y posterior amplificación.

Se evidenció al mismo tiempo, que no existían diferencias significativas entre el empleo de uno u otro protocolo (AB o LC) puesto que tanto los valores finales como los valores Ct obtenidos han sido muy similares, tanto en los resultados interlaboratorios como intralaboratorio, siendo ésta última diferencia muy inferior a la primera, lo cual de nuevo

muestra la validez de los ensayos. La utilización del marcador SYBR Green I impide la utilización de un control endógeno de la reacción de PCR, por lo que estos valores de Ct no se pueden normalizar al objeto de analizar estadísticamente las diferencias interlaboratorios.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, podemos considerar que el método desarrollado en este trabajo posee un rendimiento válido. Sería necesario continuar con el estudio, mediante su aplicación a muestras reales, para completar su validación y ser, por tanto, aplicable como método alternativo en laboratorios acreditados.

En la **segunda fase** de este trabajo se **estudió la aplicabilidad de todos los protocolos de detección por métodos moleculares a la detección y cuantificación de las especies de *Vibrio* spp. en alimentos y en agua de playa**. Los alimentos de origen marino (mejillones, ostras, almejas,...etc.) y el agua de mar son potenciales transmisores de *Vibrio* al hombre (Deepanjali *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1991). De hecho, *V. parahaemolyticus* es reconocido como la principal causa de gastroenteritis en humanos asociada al consumo de marisco (Kaysner y DePaola, 2001). También las infecciones atribuidas a *V. vulnificus* por el consumo de ostras crudas son frecuentes.

Por otra parte, todas las especies patógenas de este género son eliminadas por las heces en el transcurso de la infección. Por ello, nos planteamos la hipótesis de que tanto *V. parahaemolyticus* como *V. vulnificus* podrían estar presentes en las aguas residuales. Debido a la práctica cada vez más habitual del uso de aguas residuales para el riego de cultivos y debido al posible vertido de estas aguas al agua de mar, su presencia podría indicar un riesgo potencial de transmisión a los humanos por esta vía.

Así pues, en primer lugar se realizó un análisis de sensibilidad de los métodos desarrollados en la etapa anterior en dos tipos de matrices, mejillones y agua. Para ello, se inocularon artificialmente las dos matrices con cantidades conocidas de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* y se procedió a la detección de las bacterias mediante el método de aislamiento por cultivo y las técnicas de PCR, PCR a tiempo real y FISH.

El método de cultivo en medio selectivo TCBS resultó ser un método poco eficaz, en comparación con los métodos moleculares, para la detección de *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, ya que se detectaron tanto en mejillón como en agua sin enriquecimiento previo únicamente hasta concentraciones del orden de  $10^6$  u.f.c./gr o ml, debido a que las colonias típicas de *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* eran pequeñas y aparecían enmascaradas por el resto de microbiota acompañante.

Los resultados de este trabajo mostraron que el cultivo en medio selectivo no es un buen método de detección en muestras enriquecidas, debido a que permite la proliferación masiva de otros microorganismos que enmascaran el crecimiento de las especies de interés. Tras 24 horas de enriquecimiento en APW al 2% de NaCl y posterior cultivo en TCBS, la microbiota acompañante enmascaraba el crecimiento de los microorganismos de este género, por tanto no pudimos establecer ningún límite de detección. Además, el aislamiento de colonias presuntivas de este género en TCBS fue difícil, y se necesitaron varias resiembras en nuevas placas del medio selectivo para obtener cultivos puros.

Otros autores han utilizado otros medios de cultivo selectivo. Yukiko *et al.*, en 2001, usaron el medio CHROMagar Vibrio (CHROMagar Microbiology, Paris, France) que según el estudio llevado a cabo daba menos lugar a confusión a la hora de diferenciar bacterias del género *Vibrio*. Otros autores han usado CPC y han obtenido mejores resultados a la hora del aislamiento que usando TCBS. En nuestro trabajo, después de valorar la capacidad de aislamiento de diferentes medios selectivos, decidimos usar TCBS, ya que en otros medios, tales como CPC y CHROMagar Vibrio, el crecimiento era más lento y el tamaño de las colonias menor, debido a la desmesurada proliferación de otros microorganismos presentes,

La técnica FISH para la detección de *Vibrio spp.* presentó una sensibilidad en los dos tipos de matrices sin enriquecer del orden de  $10^4$  u.f.c./gr o ml. En muestras enriquecidas, no se detectaron, debido fundamentalmente a que su crecimiento se encontraba enmascarado por el resto de la microbiota presente en las muestras (Moreno *et al.*, 1999). Debido a la ausencia de un medio de cultivo suficientemente selectivo, las especies del género *Vibrio*, que tienen una tasa de crecimiento menor que otros géneros presentes en este tipo de muestras, son más sensibles al estrés físico y químico y presentan desventajas en la competencia por los nutrientes, lo que puede explicar esta falta de detección.

La técnica de PCR convencional dio resultados diferentes para las distintas matrices. En las muestras de mejillón los límites de detección de la PCR para *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* fueron del orden del orden de  $10^6$  u.f.c./gr, sin enriquecimiento y de 1 u.f.c./gr tras el paso de enriquecimiento. En las muestras de agua, los límites de detección para *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* fueron del orden de  $10^4$ ,  $10^2$  y  $10^1$  u.f.c./ml ,

respectivamente, sin enriquecimiento y de 1 u.f.c./ml tras el paso de enriquecimiento.

Las matrices alimentarias (Moreira, 1998; Wilson, 1997), así como las aguas residuales (Shieh *et al.*, 1995), contienen más sustancias inhibidoras de la PCR o de la extracción de ADN que otros tipos de agua, lo que lleva consigo a una disminución del límite de detección. Algunos inhibidores existentes en estas matrices son los polisacáridos, ácidos húmicos, urea y hemoglobina que tienen tres formas de actuación: la primera es el bloqueo de la actividad catalítica de la ADN polimerasa termoestable de forma total o parcial; la segunda es la unión directa al ADN de doble cadena y por último la interferencia en el paso de la lisis celular (Radström *et al.*, 2004). Estas sustancias están presentes en diferentes cantidades en las matrices alimentarias, lo que hace que varíe la sensibilidad del método según la matriz que estemos usando.

Comparando los resultados de los análisis del límite de detección podemos concluir que es necesario incluir un paso previo de enriquecimiento para la detección óptima de *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, ya que con ello se consigue un aumento del número de microorganismos, y por lo tanto, una disminución del límite de detección. Además, con el enriquecimiento de la muestra estamos diluyendo los posibles inhibidores de la PCR que pueden encontrarse en la matriz y el ADN de las bacterias que podrían dar lugar a falsos positivos (Radström *et al.*, 2004).

Con la técnica de PCR múltiple para la detección de *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, tras varios análisis en mejillón, el límite de detección de la PCR múltiple para la detección de *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*

fue del orden de  $10^5$  u.f.c./gr sin enriquecimiento y del orden de 1 u.f.c./gr tras el paso de enriquecimiento.

En agua, los límites de detección de la PCR múltiple sin enriquecimiento fueron del orden de  $10^4$  u.f.c./ml para *Vibrio spp.*,  $10^2$  u.f.c./ml para *V. parahaemolyticus* y  $10^4$  u.f.c./ml para *V. vulnificus*. Tras el enriquecimiento, los límites de detección fueron del orden de 1 u.f.c./ml en todos los casos.

Tras el análisis de los límites de detección de la PCR múltiple, también se evidencia la conveniencia de incluir un paso previo de enriquecimiento, ya que con ello se consigue una disminución significativa del límite de detección.

Otros autores han puesto a punto técnicas de PCR múltiple. En 1999, Bej *et al.* pusieron a punto una técnica para la detección de distintas hemolisinas de *V. parahaemolyticus* en alimentos de origen marino, en la cual el límite de detección fue de  $10^4$  u.f.c./g. Con un límite de detección de  $10^2$  u.f.c./250 ml se pueden diferenciar dos serogrupos de *V. cholerae* usando una PCR múltiple (Rivera *et al.*, 2003). Para la detección seis especies de *Vibrio* simultáneamente en muestras alimentarias (moluscos, gambas y cangrejos), Espiñeira *et al.* (2009) pusieron a punto una técnica de PCR múltiple, obteniendo límites de detección de 1 u.f.c./ml. Panicker *et al.*, en 2004 pusieron a punto una PCR múltiple para la detección de dos genes de *V. vulnificus*, obteniendo un límite de detección de  $10^3$  u.f.c./ml.

Además de ahorrar tiempo, reactivos y volumen de muestra, con esta técnica obtuvimos resultados satisfactorios en cuanto al límite de detección en las diferentes matrices, ya que se consiguieron tanto para las muestras de mejillón como para las de agua, valores iguales que los de la PCR convencional. La PCR múltiple podría, por tanto, utilizarse como alternativa a la PCR convencional.

La PCR a tiempo real presenta la gran ventaja del ahorro de tiempo y, teóricamente, de una mayor sensibilidad. Al igual que para las otras técnicas, se realizaron análisis del límite de detección de los distintos protocolos de detección y cuantificación puestos a punto.

Para la detección y cuantificación de *V. parahaemolyticus* se usó el agente intercalante SYBR Green I, y se evaluó el límite de detección en los dos tipos de matrices obteniendo un límite de detección menor que con el resto de técnicas: En matrices alimentarias y en muestras de agua, la PCR a tiempo real es capaz de detectar un valor del orden de  $10^2$  u.f.c./gr o ml sin enriquecimiento. En otros trabajos donde se han puesto a punto protocolos de PCR a tiempo real para la detección de *V. parahaemolyticus*, se obtuvieron límites de detección de 10 u.f.c./gr en muestras de alimentos de origen marino (Nordstrom *et al.*, 2007) e incluso de 1 u.f.c./gr (Blackstone *et al.*, 2003 ).

Para la detección y cuantificación de *V. vulnificus* usando el agente intercalante SYBR Green se obtuvieron límites de detección del orden de  $10^2$  u.f.c./gr o ml en matrices alimentarias y muestras de agua sin enriquecimiento. En 2004, Panicker *et al.*, usando la misma técnica, el mismo agente intercalante y el mismo gen *vvhA*, obtuvieron resultados muy similares, con límites de detección de  $10^2$  u.f.c./10 ml de agua de mar y en ostras de  $10^2$  u.f.c. /g.

En este trabajo se ha comprobado que para la detección y cuantificación de *V. vulnificus* las sondas TaqMan ofrecen mayor sensibilidad que el SYBR Green I debido a que la diana de las sondas se encuentra en el producto de amplificación, lo que constituye un elemento más para conseguir la especificidad y sensibilidad deseada. Con esta técnica se obtuvieron límites de detección del orden de 10 u.f.c./gr o ml

en matrices alimentarias y agua sin enriquecimiento. En otros trabajos también se han obtenido muy similares resultados usando la PCR a tiempo real con TaqMan para la detección de *V. vulnificus*: Panicker *et al.*, en 2005, obtuvieron límites de detección de 1 u.f.c./g de ostra y del orden de 100 u.f.c./g en otros trabajos (Campbell y Wright, 2003).

En los tres protocolos de PCR a tiempo real, tras un paso de enriquecimiento de 24 horas, la sensibilidad aumentó hasta el orden de 1 u.f.c./gr o ml en ambas matrices. Al igual que para los otros tipos de PCR, es conveniente incluir un paso previo de enriquecimiento para la detección de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, porque se consigue un aumento del número de células y con ello, una disminución del límite de detección. En otros trabajos también se ha documentado que tras un paso de enriquecimiento, aunque sea breve, el límite de detección disminuye (Nordstrom *et al.*, 2007; Panicker *et al.*, 2004; Blackstone *et al.*, 2003).

Comparando las distintas técnicas, parece evidente que la PCR a tiempo real es la técnica más adecuada tanto para la detección de *V. parahaemolyticus* como para la de *V. vulnificus*, en muestras tanto alimentarias como de agua. Ésta técnica ofrece una sensibilidad y especificidad muy elevadas, además de ser rápida, simple, que evita la manipulación de las muestras antes de obtener resultados y que además permite cuantificar las moléculas, de forma rápida y precisa, presentes en las muestras. El único inconveniente es que el coste, comparado con la PCR convencional, es mayor.

Una vez determinado el límite de detección de todas las técnicas, se procedió a la detección de *Vibrio spp.*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* en muestras de alimentos de origen marino y aguas.



Un total de 83 muestras de alimentos y 120 de agua (32 de agua de playa y 88 de agua residual) fueron analizadas mediante las distintas técnicas puestas a punto, comparando la efectividad de todas ellas, así como la del método convencional de aislamiento por cultivo.

En la detección de *Vibrio spp.* mediante FISH, todas las muestras positivas, lo fueron sin enriquecimiento a excepción de 8 muestras, que fueron positivas después de las 24 horas de enriquecimiento. Esto puede ser debido a que las muestras que dieron positivas tras enriquecimiento, no estuvieran muy contaminadas y el crecimiento de la microbiota acompañante no interfiriese en la detección.

La gran mayoría de las muestras positivas por PCR lo fueron tras el enriquecimiento, lo que confirma que es necesario introducir un paso de enriquecimiento para la detección de *Vibrio spp.*, como ya se observó en los ensayos con muestras inoculadas artificialmente.

En todos los tipos de muestras analizadas por FISH y PCR, el porcentaje obtenido de muestras sin enriquecimiento es mayor usando la técnica FISH que usando las dos técnicas de PCR. Sin embargo, el porcentaje de muestras positivas obtenido tras el enriquecimiento, es mayor mediante PCR que mediante FISH. El paso de enriquecimiento hace que el número de células aumente, esto podría hacer que usando la técnica FISH no se detecten muestras positivas porque la microbiota acompañante enmascara las células del género *Vibrio* presentes en la muestra, mientras que mediante PCR, el enriquecimiento favorece la detección. Estos resultados confirman, además, los límites de detección obtenidos en las experiencias realizadas en muestras artificialmente contaminadas.

Para la detección y cuantificación de *V. parahaemolyticus* se usaron las técnicas de PCR convencional y múltiple y la PCR a tiempo real. Que el porcentaje de muestras positivas usando la PCR a tiempo real sea mayor y que ésta detecte muestras positivas que la PCR convencional y múltiple no detectan puede deberse a que la sensibilidad de la PCR a tiempo real es mayor, tanto para matrices alimentarias como para aguas. Por tanto, podemos considerar la PCR a tiempo real la mejor técnica estudiada en este trabajo para detectar y cuantificar *V. parahaemolyticus*, ya que nos ofrece mayor rapidez y sensibilidad y nos permite cuantificar la cantidad de células presentes en las muestras.

Para la detección y cuantificación de *V. vulnificus* se usaron cuatro técnicas, la PCR convencional, PCR múltiple, PCR a tiempo real usando SYBR Green I y PCR a tiempo real usando la sonda TaqMan VVH-TM. Mediante el uso de la PCR a tiempo real se obtuvo un número mayor de muestras positivas que con la PCR convencional y múltiple: la PCR tiempo real detectó las mismas muestras que se detectan mediante PCR convencional y múltiple junto con otras muestras que no eran detectadas por la técnica tradicional. El uso de la sonda TaqMan ofreció mejores resultados, ya que permitió obtener más muestras positivas que con la metodología SYBR Green. Además, nos permitió obtener mayor número de valores de cuantificaciones antes del enriquecimiento. Por tanto, consideraríamos la PCR a tiempo real usando la sonda VVH-TM, como el método más eficaz para su uso en el análisis de muestras tanto de origen alimentario como ambiental.

En conjunto, tras el análisis de todas las muestras, se considera necesario introducir un paso de enriquecimiento en la detección de *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V.*

*vulnificus*, mediante PCR convencional, múltiple y a tiempo real.

En los experimentos realizados en laboratorio con muestras inoculadas, la PCR múltiple presentó un límite de detección igual al de la PCR convencional. Las ventajas que en este caso nos ofrece la PCR múltiple es rapidez, ya que en una misma PCR obtenemos los mismos resultados que obtenemos al realizar las 3 PCR por separado, y menor gasto de reactivos.

Un hecho llamativo es que en dos muestras, una de mejillón (A20) y otra de chirla (A57), se obtuvieron resultados positivos para *V. vulnificus* solamente antes del enriquecimiento, mientras que tras el enriquecimiento fueron positivas para *V. parahaemolyticus*. Esto podría hacer pensar que la sensibilidad de las dos especies al medio de enriquecimiento es diferente, de forma que cuando en una misma muestra coexisten *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, al incubar el cultivo, una de ellas predomina sobre la otra. Este fenómeno se ha documentado para otros géneros, como *Arcobacter* en aguas residuales (González et al., 2007).

Por lo que se refiere al aislamiento de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, se aislaron 9 cepas de *V. parahaemolyticus*, ocho de muestras de mejillón y una de una muestra de agua residual. En todos los casos, las colonias se obtuvieron tras enriquecimiento. Por tanto podríamos decir que el paso de enriquecimiento es prácticamente necesario para el aislamiento de *V. parahaemolyticus* en aguas residuales, aunque no podemos descartar la detección directa, ya que se han aislado cepas de otros tipos de muestras sin enriquecer. Además se aislaron 10 cepas de *V. vulnificus*, cuatro de ellas procedentes de muestras de ostras, 4 de muestras de agua de playa y dos de agua residual. El aislamiento de *V. vulnificus* en muestras de ostra y agua de playa ha sido

mayoritariamente después del enriquecimiento, sin embargo, en muestras de agua residual los aislados se han obtenido antes del enriquecimiento. Esto podría deberse al hecho de que las muestras de agua residual tenían un grado de contaminación muy elevado, que aumentaba tras el enriquecimiento, enmascarando el crecimiento de *V. vulnificus*.

La detección de la presencia de *V. vulnificus* en aguas residuales de origen urbano e industrial es uno de los resultados de mayor relevancia obtenidos en este trabajo.

Actualmente solamente existe un grupo de investigación que ha detectado *V. vulnificus* en aguas residuales domésticas en el sur de África (Igbiniosa et al., 2009), y el nuestro es el primer trabajo que demuestra su presencia en Europa. Estos resultados indican la posible transmisión fecal-oral de este microorganismo y plantean la necesidad de establecer un protocolo óptimo para la detección de este patógeno en muestras de agua residual, así como el interés de hacer estudios sobre la efectividad de los tratamientos depuradores antes de la reutilización de estas aguas, especialmente para el riego de vegetales de consumo.

En base a la patogénesis, *V. vulnificus* se puede dividir en 2 grupos. El grupo 1 patógeno solo de humanos, y el grupo 2 patógeno de anguilas y ocasionalmente de humanos (Senoh et al., 2005). Los dos tipos se han encontrado en agua de mar y alimentos de origen marino, como en aislados de origen humano.

La mayor parte de las cepas de *V. vulnificus* aislados en este trabajo, pertenecieron al Biotipo 2, es decir eran patógenos de anguilas. Solo en dos casos (VV10 y VV2) se obtuvo resultado positivo para la PCR del Biotipo 1, patógenos

humanos. Podemos decir que un porcentaje alto de aislados de *V. vulnificus* de distintos orígenes no representan un peligro importante para la salud, pero la presencia del Biotipo 1 en aguas residuales y en ostras hace que no se pueda descartar completamente este riesgo.

Una vez aisladas las colonias, se procedió a su caracterización. Se empleo la técnica RAPD (Random amplified Polymorphic DNA) como técnica de genotipificación para obtener una diferenciación intraespecífica de *V. parahamaemolyticus* y *V. vulnificus*. La caracterización a este nivel es importante ya que nos sirve como herramienta para establecer relaciones epidemiológicas entre las cepas estrechamente relacionadas y nos permite detectar pequeñas diferencias genéticas entre estas. La técnica RAPD es una técnica rápida y sencilla, que permite la identificación y caracterización de cepas, y que se ha usado con fines epidemiológicos y filogenéticos en el estudio de numerosos microorganismos patógenos (Huey y Hall, 1989). Este trabajo ha confirmado la utilidad de la técnica para la identificación y caracterización de cepas de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*.

El análisis por RAPD nos ha permitido la diferenciación de cepas de *V. parahaemolyticus* procedentes de diferentes matrices (agua o alimentos de origen marino). Analizando el dendrograma obtenido, se observa un primer grupo de similitud, formado por la cepa de *V. parahaemolyticus* VP9, aislada de agua residual, que se agrupa al 68% con la cepa de referencia *V. parahaemolyticus* CECT 612, aislada de agua de mar. El segundo grupo está formado por los aislados de alimentos, que se agrupan al 73% con la cepa de referencia *V. parahaemolyticus* CECT 5271, aislada por G.I. Barrow de berberechos que habían causado una grave intoxicación alimentaria (Barrow, 1974) y la cepa 9954-9 que es una

muestra de nuestra colección. Dentro de este grupo se diferencian dos subgrupos con una similitud del 76%: el primer subgrupo está formado por algunos aislados de *V. parahaemolyticus* de distintas muestras de mejillón, que se unen al 85% con la cepa de referencia CECT 588 aislada también de mejillón. En este primer subgrupo se observan que hay cepas agrupadas a mayores niveles de similitud, al 86% (VP6-VP7) y al 100% (VP4-VP5) que son cepas que proceden de la misma muestra. El segundo subgrupo está formado por las cepas aisladas de mejillón VP1, VP2, VP3 y VP8, todas ellas se unen al 80% de similitud. Dentro de este subgrupo las cepas VP1 y VP2 se unen al 100% de semejanza, ya que proceden de la misma muestra, y la cepa VP3 se une a ellas con un 92% de semejanza. Las cepas con el 100% de semejanza se consideraron subclones derivados de la misma cepa original

Esta técnica también nos ha permitido diferenciar cepas de *V. vulnificus* que proceden de muestras muy distintas: Con una similitud de 65,8% diferenciamos el aislado VV9, procedente de agua residual, del resto de cepas analizadas por RAPD. Al 73% de similitud pudimos diferenciar dos grupos: El primero está formado por el aislado VV10 procedente de agua residual, que se une con una similitud del 79% a las cepas de referencia CECT 5167 y CECT 529 aisladas de sangre por A. Kreger (1981) y P. Baumann (1980) respectivamente. El otro grupo está formado por los aislados de agua de playa y de alimentos, y en él se diferencian dos subgrupos: El primero está formado por los aislados VV1 y VV2 (100% similitud) y por *V. vulnificus* CECT 5198, aislado en 1999 de hígado de anguila enferma de vibriosis. En el otro subgrupo diferenciamos a los aislados de la misma muestra de ostra (VV3 y VV4), que presentaban un 100% de similitud, y cuatro aislados de agua de playa (VV5, VV6, VV7 y VV8) que entre

ellos también tenían un 100% de similitud, aunque habían sido aislados de diferentes muestras de agua.





## *CONCLUSIONES*



1. El método de cultivo en medio selectivo TCBS es un método poco eficaz, en comparación con los métodos moleculares, para la detección de *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*.
2. La técnica FISH para la detección de *Vibrio spp.* posee un límite de detección en los dos tipos de matrices antes del paso de enriquecimiento del orden de 10<sup>6</sup> u.f.c./gr o ml. En muestras enriquecidas, el crecimiento de estos microorganismos se ve enmascarado por el resto de la microbiota presente en las muestras.
3. En el uso de PCR convencional, múltiple y a tiempo real es necesario incluir un paso previo de enriquecimiento para la detección del *Vibrio spp.*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, ya que con ello se consigue un aumento del número de microorganismos, y por lo tanto, una disminución del límite de detección.
4. La PCR múltiple podría utilizarse como alternativa a la PCR convencional, ya que permite ahorrar tiempo, reactivos y volumen de muestra, y tiene resultados satisfactorios en cuanto al límite de detección en las diferentes matrices.
5. La PCR a tiempo real es la técnica más adecuada tanto para la detección de *V. parahaemolyticus* como para la de *V. vulnificus*, en muestras tanto alimentarias como de agua, ya que ofrece una sensibilidad y especificidad muy elevadas. Además permite cuantificar las moléculas de ADN, de forma rápida y precisa, presentes en las muestras.
6. El paso de enriquecimiento es conveniente para asegurar el aislamiento de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, aunque no podemos descartar la detección

directa, ya que se han aislado cepas de muestras sin enriquecer.

7. Aunque la mayoría de cepas de *V. vulnificus* aisladas en este trabajo pertenecían al biotipo 2, no patógeno para el ser humano, se han obtenido cepas de biotipos patógenos tanto en aguas como en alimentos. Esto hace que no pueda descartarse el riesgo para la salud de este tipo de muestras.

8. Se ha detectado por primera vez en nuestro país la presencia de *V. vulnificus* en aguas residuales de origen urbano e industrial. Esto indica la posible transmisión fecal-oral de este microorganismo y plantea la necesidad de hacer estudios sobre la efectividad de los tratamientos depuradores antes de la reutilización de estas aguas.

9. La mayor tasa de contaminación en muestras de alimentos de origen marino por *V. parahaemolyticus* se da en mejillón y por *V. vulnificus* se da en ostras. Por tanto el riesgo de intoxicación alimentaria sería elevado ya que el mejillón puede estar poco cocinado ya que se consume tras su preparación al vapor y las ostras se consumen crudas.

10. La mayor tasa de contaminación en muestras de aguas por ambas especies *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* se da en agua de playa, lo que supone un riesgo elevado de contaminación debido al contacto mediante el baño en las playas en los meses de calor, que es cuando más proliferan estos dos microorganismos.

11. La técnica RAPD resulta adecuada para la caracterización molecular y diferenciación de las cepas de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* aisladas de las distintas muestras, observándose diferencias en los perfiles obtenidos para diferentes cepas en función de su origen.

## *BIBLIOGRAFÍA*



**A**

---

Alam, M.J., Tomochika, K.I., Miyoshi, S.I., Shinoda, S. (2002). Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. FEMS Microbiol. Lett. 208, 83–87

Álvarez. M., Buesa. J., Castillo. J., Vila. J. (2008). Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. Protocolos Clínicos de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (S.E.I.M.C.)

Alonso, J.L., Amorós, I., Cañigral, I. (2011). Development and evaluation of a real-time PCR assay for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage samples. Appl Microbiol Biotechnol (2011) 89:1203–1211

Amann, R.I., Krumholz, L. and Stahl, D.A. (1990). Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative phylogenetic and environmental studies of microbiology. J.Bacteriol. 172: 762-770

Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59: 143-169

Amann, R. I., Fuch, B. M., Behrens, S. (2001). The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization. Curr Opin Biotechnol. 12:231-236

Amaro, C., Biosca, E.G., Fouz, B., Toranzo, A.E., Garay E. (1994). Role of iron, capsule, and toxins in the pathogenicity of *Vibrio vulnificus* biotype 2 for mice. Infect. Immun. 62 (1994) 759

Amaro, C., Biosca, E.G. (1996). *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is also an opportunistic pathogen for humans. Appl. Environ. Microbiol. 62 (1996) 1454

Anon. 2005. Food Poisoning in Taiwan, 1981–2003. Department of Health, Taiwan. Available at [/http://food.doh.gov.tw/chinese/academic/academic2\\_1.htmS](http://food.doh.gov.tw/chinese/academic/academic2_1.htmS), accessed July 2, 2006

Arias, C. R., Garay, E., Aznar, R. (1995). Nested PCR Method for Rapid and Sensitive Detection of *Vibrio vulnificus* in Fish, Sediments, and Water. Applied Environmental Microbiology. 0099-2240/95

Arias, C. R., Pujalte, M. J., Garay, E., Aznar, R. (1998). Genetic Relatedness among Environmental, Clinical, and Diseased-Eel *Vibrio vulnificus* Isolates from Different Geographic Regions by Ribotyping and Randomly Amplified Polymorphic DNA PCR. Appl. Environ. Microbiol. Sept. 1998, p. 3403–3410

Astakhova, I.V., Ustinov, A.V., Korshun, V.A., Wengel, J. (2011). LNA for Optimization of Fluorescent Oligonucleotide Probes: Improved Spectral Properties and Target Binding. Bioconjug Chem. 2011 Apr 20;22(4):533-9. Epub 2011 Mar 14.



Aznar, R., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1993). Ribotyping and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Vibrio vulnificus* biotypes.

Syst. Appl. Microbiol. 16:303–309

Aznar, R., Ludwig, W., Amann, R.I. and Schleifer, K.H. (1994). Sequence determination of rRNA genes of pathogenic *Vibrio* species and whole-cell identification of *Vibrio vulnificus* with rRNA-targeted oligonucleotide probes.

International Journal of Systematic Bacteriology 44, 330–337.

Austin B., Austin D.A. (1999). Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish.

3rd rev. New York: Springer 1999

## **B**

---

Baffone, W., Citterio, B., Vittoria, E., Casaroli, A., Pianetti, A., Campana, R. and Bruscolini, F. (2001). Determination of several potential virulence factors in *Vibrio* spp. isolated from sea water.

Food Microbiology, 2001, 18, 479-488

Baffone, W., Tarsi, R., Pane, L., Campana, R., Repetto, B., Mariottini, G.L. y Pruzzo, C. (2006). Detection of freeliving and plankton-bound vibrios in coastal waters of the Adriatic Sea (Italy) and study of their pathogenicity associated properties.

Environmental Microbiology, 8 (7), pp: 1299-1305

Baker-Austin, C., Stockley, L., Rangdale, R. and Martinez-Urtaza, J. (2010). Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: a European perspective.

Environmental Microbiology Reports. 1758-2229

Baumann, P., Schubert, R.H.W. (1984). Family II. Vibrionaceae.

In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp. 516–550

Baumann, P., Furniss, A.L. and Lee, J.V. (1984). Genus I *Vibrio*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore. 1:518-538

Barrow, G.I. (1974). Microbiological and other hazards from seafoods with special reference to *Vibrio parahaemolyticus*.

Postgraduate Medical Journal. 1974. 50, 612-619.

Bej, A. K., Patterson, D. P., Brasher, C. W., Vickery, M. C. L., Jones, D. D., Kaysner, C. A. (1999). Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*.

Journal of Microbiological Methods 36 (1999) 215–225

Bengtsson, M., Karlsson, H. J., Westman, G., Kubista, M. (2003). A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR.

Nucleic Acids Res. 31, DOI: 10.1093/nar/gng045

*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1984. First Edition. Williams and Wilkins, Baltimore, 1985

*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2005. Second Edition. Vol.2. Part 2. Springer, New York, 2005

Bilung, L. M., Radu, S., Bahaman, A. R., Rahim, R. A., Napis, S., Kqueen, C. Y., Murugaiah, C., Hadi, Y. A., Robin, T. and Nishibuchi, M. (2005). Random Amplified Polymorphic Dna-PCR typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from local cockles (*Anadara granosa*).

American Journal of Immunology 1 (1): 31-36, 2005

Blackstone, G. M., Nordstroma, J. M., Vickerya, M. C. L., Bowenb, M. D., Meyerb, R. F., DePaola, A. (2003). Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR.

Journal of Microbiological Methods. 53 (2003) 149– 155

Blanch, A. R., Cerdà-Cuéllar, M., Hispano, C. (2001). Diversity of *Vibrio spp.* populations in several exhibition aquaria with a shared water supply.

Appl Microbiol. 33(2):137-43

Bohaychuk, V.M., Gensler, G.E., King, R.K., Wu, J.T., McMullen, L.M. (2005). Evaluation of Detection Methods for Screening Meat and Poultry Products for the Presence of Foodborne Pathogens.

Journal of Food Protection. Vol. 68. No. 12, 2005. Pages 2637-2647

Bonner J.R., Coker A.S., Berryman C.R., Pollock H.M. (1983). Spectrum of *Vibrio* infections in a Gulf Coast community.

Ann. Intern. Med. 99 (1983) 464

C

---

Caetano-Anolles, G., Bassam, B. J. and Gresshoff, P. M. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short oligonucleotide primers. *Bio/Technology* 9:553–557

Cai, T., Jiang, L., Yang, C., Huang, K. (2006). Application of real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood in Eastern China. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46 (2006) 180–186

Campbell, M.S., Wright, A.C. (2003). Real-Time PCR Analysis of *Vibrio vulnificus* from Oysters. *Applied and environmental microbiology*. 2003. 7137–7144 Vol. 69. No. 12

Cañigral, I., Moreno, M., Alonso, J.L., González, A., Ferrús, M. A. (2009). Detection of *Vibrio vulnificus* in seafood, seawater and wastewater samples from a Mediterranean coastal area. *Microbiological Research*. 165 (2010) 657—664

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1993). *Vibrio vulnificus* infections associated with raw oyster consumption- Florida, 1981-1992. *MMWR*. 1993/ Vol.42 /No. 21

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1996). *Vibrio vulnificus* infections associated with eating raw oysters- Los Angeles, 1996. *MMWR*. 1996/ Vol.45/ No.29

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1998). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with eating raw oysters— Pacific Northwest, 1997. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 47, 457–462

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1999). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infection associated with eating raw oysters and clams harvested from Long Island Sound—Connecticut, New Jersey and New York, 1998. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 48, 48–51

Center for Disease Control and Prevention (CDC). (2005). *Vibrio* illnesses after Hurricane Katrina—Multiple States, August–September 2005. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 54, 928–931

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2006). *Vibrio parahaemolyticus* Infections Associated with Consumption of Raw Shellfish—Three States, 2006. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 55 (Dispatch), 1–2

Chakraborty, S., Nair, G.B. and Shinoda, S. (1997). Pathogenic vibrios in the natural aquatic environment. *Rev Environ Health.* 12:63-80

Chang, A. K., H. Y. Kim, J. E. Park, P. Acharya, I. S. Park, S. M. Yoon, H. J. You, K. S. Hahm, J. K. Park, and J. S. Lee. (2005). *Vibrio vulnificus* secretes a broad-specificity metalloprotease capable of interfering with blood homeostasis through prothrombin activation and fibrinolysis. *J. Bacteriol.* 187:6909–6916

Chen, S., Liu, S., Zhang, L. (1991). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in seawater and some seafoods in the coastal area of Qingdao.

J. Ocean Univ. Qingdao 21, 43–50

Chiou, C.-S., Hsu, S.-Y., Chiu, S.-I., Wang, T.-K., Chao, C.-S. (2000). *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999.

J. Clin. Microbiol. 38, 4621–4625

Clifton, N.J. (2010). Methods in molecular biology.

Humana Press. ISSN: 1064-3745. OCLC: 24839341

Colodner, R., Raz, R., Meir, I., Lazarovich, T., Lerner, L., Kopelowitz, J., Keness, Y., Sakran, W., Ken-Dror, S., and Bisharat, N. (2004). Identification of the Emerging Pathogen *Vibrio vulnificus* Biotype 3 by Commercially Available Phenotypic Methods.

J Clin Microbiol. 2004 September; 42(9): 4137–4140

Colwell, R. R., Brayton, P., Herrington, D., Tall, B., Huq, A., Levine, M. M. (1995). Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine.

World Journal of Microbiology and Biotechnology. 0959-3993

Cook, D.W., O’Leary, P., Hunsucker, J.C., Sloan, E.M., Bowers, J.C., Blodgett, R.J., DePaola, A. (2002). *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in US retail shell oysters: a national survey from June 1998 to July 1999.

J. Food Prot. 65, 79–87

Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real.

Enferm Infecc Microbiol Clin 2004; 22(5):299-305

## D

---

Dalsgaard A., Frimodt-Moller N., Bruun B., Hoi L., Larsen J.L. (1996). Clinical manifestations and molecular epidemiology of *Vibrio vulnificus* infections in Denmark, Eur.

J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15 (1996) 227

Davis, L. G., Kuehl, W. M., Battey, J. F. (1994). Basic methods in molecular biology.

ISBN 0-8385-0642-9

Deepanjali, A., Kumar, H.S., Karunasagar, I., Karunasagar, I. (2005). Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India.

Appl. Environ. Microbiol. 71, 3575–3580

DePaola, A., Hopkin, L.H., Peeler, J.T., Wentz, B., McPhearson, R.M. (1990). Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in US coastal waters and oysters.

Appl. Environ. Microbiol. 56, 2299–2302

De Paola A., Capers G.M., Alexander D. (1994). Densities of *Vibrio vulnificus* in the intestines of fish from the U.S. Gulf Coast.

Appl. Environ. Microbiol. 60 (1994) 984

DePaola, A., Kaysner, C.A., Bowers, J., Cook, D.W. (2000). Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998).

Appl. Environ. Microbiol. 66, 4649–4654

DePaola JR. A., Kaysner. C.A. (2004). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 9. *Vibrio*.

U.S. Food and Drug Administration, May 2004.

Doyle, M.P. (1990). Pathogenic *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, and *Vibrio parahaemolyticus*.

Lancet. 336(8723):1111-1115.

Duan, J., Su, Y.-C. (2005a). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in two Oregon oyster-growing bays.

J. Food Sci. 70, M58–M63

Daniels, N.A., MacKinnon, L., Bishop, R., Altekruise, S., Ray, B., Hammond, R.M., Thompson, S., Wilson, S., Bean, N.H., Griffin, P.M., Slutsker, L. (2000a). *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973–1998.

J. Infect. Dis. 181, 1661–1666

Daniels, N.A., Ray, B., Easton, A., Marano, N., Kahn, E., McShan, A.L., Rosario, L.D., Baldwin, T., Kingsley, M.A., Puhr, N.D., Wells, J.G., Augulo, F.J. (2000b). Emergence of a new O3:K6 *V. parahaemolyticus* serotype in raw oysters.

JAMA 284, 1541–1545



Dionisi, A.M., Luzzi, I. and Carattoli, A. (2004). Identification of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* and analysis of the *gyrA* gene by the LightCycler mutation assay. *Molecular and Cellular Probes* 18 (2004) 255–261.

D’Mello, J.P.F. (2003) *Food Safety: Contaminants and toxins*. Cambridge, MA, USA: CABI Publishing, p:28.

## E

---

Eckert, K.A. and T.A. Kunkel. (1991). DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *PCR Methods Applic.* 1: 17-24

Engel, A.S., Porter, M.L., Stern, L.A., Quinlan, S., Bennett, P.C. (2004). Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic springs dominated by chemolithoautotrophic “*Epsilonproteobacteria*”. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2004; 27:31–53

Espiñeira, M., Atanassova, M., Vieitesa, J.M., Santaclara, F. J. (2010). Validation of a method for the detection of five species, serogroups, biotypes and virulence factors of *Vibrio* by multiplex PCR in fish and seafood. *Food Microbiology* 27 (2010) 122–131

## F

---

Farmer, J.J. and Hickman-Brenner, F.W. (1992). The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. *A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification. Applications*. Springer-Verlag. New York 3:2952-3011

Food and Drug Administration (FDA). (2005). Quantitative Risk Assessment on the Public Health Impact of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Raw Oysters. Available at [http://www.cfsan.fda.gov/\\_dms/vpratoc.html](http://www.cfsan.fda.gov/_dms/vpratoc.html), accessed June 22, 2006

Fuchs B.M., Syutsubo K., Ludwig W. and Amann R. (2001). In situ accessibility of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 961-968

Fuchs, B.M., Wallner, G., Beisker, W., Schwiapl, I., Ludwig, W., Amann, R. (1998). Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4973-4982

## G

---

García, M., Collazos, J., Martínez, E., Mayo, J. (1998). *Vibrio vulnificus* septicaemia in Spain. *Anales de Medicina Interna (Madrid)*. 15: 485-486

García M. T., Ventosa A., Ruiz-Berraquero F. and Kocur M. (1987). Taxonomic study and amended description of *Vibrio costicola*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1987, 37, 251-256

Gardes, M., Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. DOI: 10.1111/1365-294

Giuliano, L., De Domenico, E., Hofle, M. G., Yakimov, M. M. (1999). Identification of culturable oligotrophic bacteria within naturally occurring bacterioplankton communities of the Ligurian Sea by 16S rRNA sequencing and probing. *Microb. Ecol.* 37: 77-85

Bruno Gomez-Gil, B., Fajer-Avila, E., Pascual, J., Macián, M.C., Pujalte, M.J., Garay, E., Roque, A. (2008) *Vibrio sinaloensis* sp. nov., isolated from the spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869 *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2008), 58, 1621–1624

González, A., Ferrús, M.A., González, R., Hernández, J. (2007). Molecular fingerprinting of *Campylobacter* and *Arcobacter* isolated from chicken and water. *International Microbiology.* (2007) 10:85-90

González-Escalona, N., Cachicas, V., Acevedo, C., Rioseco, M.L., Vergara, J.A., Cabello, F., Romero, J., Espejo, R.T. (2005). *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 129–131

Gooch, J.A., DePaola, A., Bowers, J., Marshall, D.L., 2002. Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest American oysters. *J. Food Prot.* 65, 970–974

Gray, L. D., and A. S. Kreger. (1987). Mouse skin damage caused by cytolysin from *Vibrio vulnificus* and by *V. vulnificus* infection. *J. Infect. Dis.* 155:236–241

Guy, R.A., Payment, P., Krull, U.J., Horgen, P.A. (2003). Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. *Appl Environ Microbiol.* 69:5178–5185

## H

---

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K., Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986-994

Hernández, J., González, F., Provencio, M., Romera, M.A., Portero, M.F., Pérez, R., Masa, C., Martínez, J. (1991). Septicaemia by *Vibrio vulnificus*. *Revista Española de Microbiología Clínica.* 6: 144–145

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., y Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *BIO/TECHNOLOGY.* 11, 1026-1030

Hlady W.G., Klontz K.C. (1996). The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. *J. Infect. Dis.* 173 (1996) 1176

Hlady W.G.(1997). *Vibrio* infections associated with raw oyster consumption in Florida, 1981-1994, *J. Food Prot.* 60 (1997) 353

Hoi L., Larsen J.L., Dalsgaard I., Dalsgaard A. (1998). Occurrence of *Vibrio vulnificus* biotypes in Danish marine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 7

Hoi L., Dalsgaard A., Larsen J.L., Warner, J. L., Oliver, J. D. (1997). Comparison of ribotyping and randomly amplified polymorphic DNA PCR for characterization of *Vibrio vulnificus*.

Appl. Environ. Microbiol. 63:1674–1678

Hollis D.G., Weaver R.E., Baker C.N., Thornsberry C. (1976). Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures.

J. Clin. Microbiol. 3 (1976) 425

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

William & Wilkins. 9<sup>th</sup> ed. ISBN 0-683-00603-7

Honda, S., Goto, I., Minematsu, I., Ikeda, N., Asano, N., Ishibashi, M., Kinoshita, Y., Nishibuchi, M., Honda, T., Miwatani, T. (1987). Gastroenteritis due to Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus*.

Lancet i, 331–332

Honda, T., Ni, Y., Miwatani, T. (1988). Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolates of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin.

Infect. Immun. 56, 961–965

Honda, T., and T. Lida. (1993). The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins.

Rev. Med. Microbiol. 4:106–113

Huey, B., Hall, J (1989). Hypervariable DNA fingerprinting in *E. coli* minisatellite probe from bacteriophage M13.

J. Bacteriol. 171, 2528–2532

I

---

Infectious Disease Surveillance Center (IDSC), 1999. *Vibrio parahaemolyticus*, Japan, 1996–1998.

Infectious Agents Surveillance Report, Vol. 20, No.7 (No.233), Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. Available at [/http://idsc.nih.go.jp/iasr/20/233/tpc233.html](http://idsc.nih.go.jp/iasr/20/233/tpc233.html), accessed June 30, 2006

Ishiguro, T., Saitoh, J., Yawata, H., Yamagishi, H., Iwasaki, S., Mitoma, Y. (1995). Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater.

Anal. Biochem. 229, 207-213

International Organization for Standardization. (2003). ISO 16140:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Protocol for the validation of alternative methods.

International Organization for Standardization. (2005). ISO 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Protocol for the validation of alternative methods.

J

---

Jackson J.K., Murphree R.L., Tamplin M.L. (1997). Evidence that mortality from *Vibrio vulnificus* infection results from single strains among heterogeneous populations in shellfish.

J. Clin. Microbiol. 35 (1997) 2098

Jones S.H., Howell T.L., O'Neill K.R. (1991). Differential elimination of indicator bacteria and pathogenic *Vibrio spp.* from Eastern oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin, 1791) in a commercial controlled purification facility in Maine.

J. Shellfish Res. 10 (1991) 105

Joseph, S.W., Colwell, R.R., Kaper, J.B. (1982). *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic Vibrios.

Crit. Rev. Microbiol. 10, 77–124

Josefsen, M.H., Cook, N., D'Agostino, M.D., Hansen, F., Wagner, M., Demnerova, K., Heuvelink, A.E., Tassios, P.T., Lindmark, H., Kmet, V., Barbanera, M., Fach, P., Loncarevic, S., Hoorfar, J. (2004). Validation of a PCR-Based Method for Detection of Food-Borne Thermotolerant Campylobacters in a Multicenter Collaborative Trial.

Applied and Environmental Microbiology. 2004. 4379-4383

Josefsen, M.H., Löfstrom, C., Sommer, H.M., Hoorfar, J. (2009). Diagnostic PCR: comparative sensitivity of four probe chemistries.

Mol Cell Probes 23:201–203

## **K**

---

Kaneko, T., Colwell, R.R. (1973). Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay.

J. Bacteriol. 113, 24–32

Kang, M. K., E. C. Jhee, B. S. Koo, J. Y. Yang, B. H. Park, J. S. Kim, H. W. Rho, H. R. Kim, and J. W. Park. (2002). Induction of nitric oxide synthase expression by *Vibrio vulnificus* cytolysin.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 290:1090–1095

Kaper, J.B., Campen, R.K., Seidler, R.J., Baldini, M.M., Falkow, S. (1984). Cloning of the thermostable direct or Kanagawa phenomenon-associated hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*.

Infect. Immun. 45, 290–292

Kaspar C.W., Tamplin M.L. (1993). Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish.

Appl. Environ. Microbiol. 59 (1993) 2425.

Kaufman, G.E., Blackstone, G.M., Vickery, M.C., Bej, A.K., Bowers, J., Bowen, M.D., Meyer, R.F., DePaola, A. (2004). Real-time PCR quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters using an alternative matrix.

J Food Prot. 2004 Nov 67 (11): 2424-9.

Kaysner C.A., Abeyta Jr C., Wekell M.M., De Paola Jr A., Stott R.F., Leitch J.M. (1987). Incidence of *Vibrio cholerae* from estuaries of the United States West Coast.

Appl. Environ. Microbiol. 53 (1987) 1344

Kaysner C.A., Abeyta Jr C., Wekell M.M., De Paola Jr A., Stott R.F., Leitch J.M. (1987). Virulent strains of *Vibrio vulnificus* isolated from estuaries of the United States West Coast,

Appl. Environ. Microbiol. 53 (1987) 1349

Kaysner, C.A., DePaola, A. (2000). Outbreaks of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis from raw oyster consumption: assessing the risk of consumption and genetic methods for detection of pathogenic strains.

J. Shellfish Res. 19, 657.



Kaysner, C.A., DePaola, A. (2001). *Vibrio*. In: Downes, F.P., Ito, K. (Eds.). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, fourth ed. American Public Health Association, Washington, DC, pp. 405–420

Kim, H. R., H. W. Rho, M. H. Jeong, J. W. Park, J. S. Kim, B. H. Park, U. H. Kim, and S. D. Park. (1993). Hemolytic mechanism of cytolysin produced from *Vibrio vulnificus*. Life Sci. 53:571–577

Kim, B. S., and J. S. Kim. (2002). Cholesterol induces oligomerization of *Vibrio vulnificus* cytolysin specifically. Exp. Mol. Med. 34:239–242

Klontz K.C., Lieb S., Schreiber M., Janowski H.T., Baldy L.M. (1988). Gunn R.A., Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections. Clinical and epidemiologic features in Florida cases, 1981-1987. Ann. Intern. Med. 109 (1988) 318

Koenig K.L., Mueller J., Rose T. (1991). *Vibrio vulnificus*. Hazard on the half shell. West. J. Med. 155 (1991) 400

Koshkin, A.A., Singh, S.K., Nielsen, P., Rajwanshi, V.K., Kumar, R., Meldgaard, M., Olsen, C.E., Wengel, J. (1998). LNA (locked nucleic acids): synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. Tetrahedron 54:3607–3630

Kothary, M. H., and A. S. Kreger. (1987). Purification and characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*. J. Gen. Microbiol. 13:1783–1791

Krovacek K., Baloda S.B., Dumontet S., Mansson I. (1994). Detection of potential virulence markers of *Vibrio vulnificus* strains isolated from fish in Sweden. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 17 (1994) 63

Kwon, K. B., J. Y. Yang, D. G. Ryu, H. W. Rho, J. S. Kim, J. W. Park, H. R. Kim, and B. H. Park. (2001). *Vibrio vulnificus* cytolysin induces superoxide anion-initiated apoptotic signaling pathway in human ECV304 cells. J. Biol. Chem. 276:47518–47523

## L

---

Lambert, C., Nicolas, J. L., Cilia, V. and Corre, V. (1998). *Vibrio pectenica* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. Int. J. Syst. Bacteriol. DOI 10.1099/00207713-48-2-481

Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics (Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds.), pp. 115–175. Wiley, New York, NY.

Le Pecq, J. B. y Paoletti, C. (1996). A new fluorometric method for RNA and DNA determination. Anal. Biochem, 17, 100-107

Lee, Soo Young Kim, Sei Jong Kim, Hyun Soo Kim. (1998). Direct identification of *Vibrio vulnificus* in clinical specimens by Nested-PCR. J. Clin. Microbiol. 0095-1137/98

Lee, C.Y., Cheng, M.F., Yu, M.S., Pan, M.J. (2002). Purification and characterization of a putative virulence factor, serine protease, from *Vibrio parahaemolyticus*.

FEMS Microbiol. Lett. 209, 31–37

Lee, A. M., Squirrell, D. J., Leslie, D. L., Brown, T. (2004). Homogeneous fluorescent chemistries for Real-Time PCR.

Real-Time an essential guide (ed. By K. Edwards, J. Logan, N. Saunders), pp. 31-70. Horizon Bioscience, London.

Lee, B. C., S. H. Kim, S. H. Choi, and T. S. Kim. (2005).

Induction of interleukin-8 production via nuclear factor-kappaB activation in human intestinal epithelial cells with *Vibrio vulnificus*. Immunology 115:506–515

Li, W., Wang, X., Pei, X., Zhu, H., Guo, Y. (2010). Homology analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolated by MPN method using pulsed-field gel electrophoresis and automated ribotyping

Wei Sheng Yan Jiu. 39(3):374-80

Liming. S.H. and Bhagwat. A.A. (2004). Application of a molecular beacon—real-time PCR technology to detect *Salmonella* species contaminating fruits and vegetables.

International Journal of Food Microbiology. Vol. 95. Pages. 177-187

Linder K., Oliver J.D. (1989). Membrane fatty acid and virulence changes in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*.

Appl. Environ. Microbiol. 55 (1989) 2837

Liston, J. (1990). Microbial hazards of seafood consumption.

Food Technol. 44, 56–62

Liu, X., Chen, Y., Wang, X., Ji, R., 2004. Foodborne disease outbreaks in China from 1992 to 2001—national foodborne disease surveillance system. *J. Hygiene Res.* 33, 725–727

Lozano-León, A., Torres, J., Osorio, C.R., Martínez-Urtaza, J., 2003. Identification of tdh-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. *FEMS Microbiol. Lett.* 226, 281–284

Lynch, T., Livingstone, S., Buenaventura, E., Lutter, E., Fedwick, J., Buret, A. G., Graham, D. and DeVinney, R. (2004). *Vibrio parahaemolyticus* disruption of epithelial cell tight junctions occurs independently of toxin production. *Infection and Immunity.* 0019-9567/05

## **M**

---

Mackay, I.M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol.*

Mackenzie C.L.J., Burrell V.G.J., Rosenfield A., Hobart W.L. (1997). The History, Present Condition, and Future of the Molluscan Fisheries of North and Central America and Europe. Volume 1, Atlantic and Gulf Coasts. Technical Report NMFS 127. Vol. 1, 1997, US Department of Commerce, 234

Malorny, B., Tassios, P.T., Radstrom, P., Cook, N., Wagner, M., Hoorfar, J. (2003). Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens.

Int J Food Microbiol. 2003 May 25. 83(1) 39-48

Mark A. Randa, Martin F. Polz, and Eelin Lim (2004). Effects of Temperature and Salinity on *Vibrio vulnificus* Population Dynamics as Assessed by Quantitative PCR.

Applied and Environmental Microbiology, p. 5469–5476

Martinez-Urtaza, J., Simental, L., Velasco, D., DePaola, A., Ishibashi, M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Carrera-Flores, D., Rey-Alvarez, C., Pousa, A., 2005. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe.

Emerg. Infect. Dis. 11, 1319–1320

Massad, G., and J. D. Oliver. (1987). New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*.

Appl. Environ. Microbiol. 53:2262-2264

Maxwell E.L., Mayall B.C., Pearson S.R., Stanley P.A.(1991). A case of *Vibrio vulnificus* septicaemia acquired in Victoria.

Med. J. Aust. 154 (1991) 214

McKillip, J. L. y Drake, M. A. (2004). Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food.

J. Food Prot. 54, 969-979

McLaughlin, J.B., DePaola, A., Bopp, C.A., Martinek, K.A., Napol, N.P., 2005. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters.

New Engl. J. Med. 353, 1463–1470

McPherson, V. L., J. A. Watts, L. M. Simpson, and J. D. Oliver. (1991). Physiological effects of the lipopolysaccharide on *Vibrio vulnificus* on mice and rats.

Microbios 67:141–149

Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McGaig, L.F., Bresee, J.S., Sharpiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., 1999. Food-related illness and death in the United States.

Emerg. Infect. Dis. 5, 607– 625

Miyamoto, Y., Kato, T., Obara, Y., Akiyama, S., Takizawa, K., Yamai, S. (1969). In vitro hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity.

J. Bacteriol. 100, 1147–1149

Miyoshi, S., and S. Shinoda. (1988). Role of the protease in the permeability enhancement by *Vibrio vulnificus*.

Microbiol. Immunol. 32:1025–1032

Molenda, J.R., Johnson, W.G., Fishbein, M., Wentz, B., Mehlman, I.J., Dadisman Jr., T.A., 1972. *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis in Maryland: laboratory aspects.

Appl. Microbiol. 24, 444–448

Molero, X., Bartolomé, R.M., Vinuesa, T., Guarner, L., Accarino, A., Casellas, F., García, R., 1989. Acute gastroenteritis due to *Vibrio parahaemolyticus* in Spain: presentation of 8 cases. Med. Clin. (Barc) 92, 1–4

Moreira, D. (1998). Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations.

Nucleic Acids Research. 1998. Vol. 26, No. 13 3309–3310

Moreno M.L., Landgraf M. (1998). Virulence factors and pathogenicity of *Vibrio vulnificus* strains isolated from seafood.

J. Appl. Microbiol. 84 (1998) 747

Moreno, Y., Arias, D. R., Meier, H., Garay, E., Aznar, R. (1999). In *situ* analysis of the bacterial communities associated to farmed eel by whole-cell hybridization.

*Applied Microbiology* 1999, **29**, 160-165

Morris Jr J.G., Black R.E.(1985). Cholera and other Vibrioses in the United States.

N. Engl. J. Med. 312 (1985) 343

Morris J.G.J., Wright A.C., Simpson L.M., Wood P.K., Johnson D.E., Oliver J.D. (1987). Virulence of *Vibrio vulnificus*: association with utilization of transferrin-bound iron, and lack of correlation with levels of cytotoxin or protease production. FEMS Microbiol. Lett. 40 (1987) 55

Morris Jr J.G.(1988). *Vibrio vulnificus*, a new monster of the deep?

Ann. Intern. Med. 109 (1988) 261

Morrison, T. B., Weis, J. J., Wittwer, C. T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification.

Bio Techniques. 24, 954-962

Moter A., Leist G., Rudolph R., Schrank K., Choi B. K., Wagner M., Gobel U. B. 1998. Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions.

Microbiol. 144:2459-2467

Motes M.L., De Paola A. (1996). Offshore suspension relaying to reduce levels of *Vibrio vulnificus* in oysters (*Crassostrea virginica*).

Appl. Environ. Microbiol. 62 (1996) 3875

Motes M.L., De Paola A., Cook D.W., Veazey J.E., Hunsucker J.C., Garthright W.E., Blodgett R.J., Chirtel S.J. (1998). Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*).

Appl. Environ. Microbiol. 64 (1998) 1459

Myatt D.C., Davis G.H. (1989). Isolation of medically significant *Vibrio* species from riverine sources in south east Queensland.

Microbios. 60 (1989) 111

## **N**

---

Nazarenko, I., Bhatnagar, S. K., Hohman, R. J. (1997). A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer.

Nucleic Acids Res. 25, 2516-2521

Nichibuchi, M., Kaper, J.B. (1995). Minireview. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium.

Infect. Immun. 63, 2093-2099

Nishibuchi, M., Kaper, J.B. (1985). Nucleotide sequence of the thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*.

J. Bacteriol. 162, 558-564



Nishibuchi, M., Hill, W.E., Zon, G., Payne, W.L., Kaper, J.B. (1986). Synthetic oligodeoxyribonucleotide probes to detect Kanagawa phenomenon- positive *Vibrio parahaemolyticus*.  
J. Clin. Microbiol. 23, 1091–1095

Nordstrom, J. L., Vickery, M. C. L., Blackstone, G. M., Murray, S. L., DePaola, A. (2007). Development of a Multiplex Real-Time PCR Assay with an Internal Amplification Control for the Detection of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Bacteria in Oysters.  
Appl. Environ. Microbiol. Vol. 73, No. 18

## O

---

Obika, S., Nanbu, D., Hari, Y., Andoh, J., Morio, K., Doi, T., Imanishi, T.(1997). Stability and structural features of the duplexes containing nucleoside analogues with a fixed N-type conformation, 2'-O,4'-C-methyleneribonucleosides.  
Tetrahedron Lett 39: 5401–5404

Okuda, J., Ishibashi, M., Hayakawa, E., Nishino, T., Takeda, Y., Mukhopadhyay, A.K., Grag, S., Bhattacharya, S.K., Nair, G.B., Nishibuchi, M., 1997. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from southeast Asian travelers arriving in Japan.  
J.Clin. Microbiol. 35, 3150–3155

Oliver J.D., Warner R.A., Cleland D.R. (1982). Distribution and ecology of *Vibrio vulnificus* and other lactose- fermenting marine Vibrios in coastal waters of the southeastern United States.  
Appl. Environ. Microbiol. 44 (1982) 1404

Oliver J.D., Bockian R. (1995). In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*.

Appl. Environ. Microbiol. 61 (1995) 2620

Oliver J.D., Hite F., McDougald D., Andon N.L., Simpson L.M. (1995). Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment.

Appl. Environ. Microbiol. 61 (1995) 2624

Oliver J. D., Kaper J. B. (2001). *Vibrio* species.

In Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. Eds, MP Doyle, LR Beuchat and TJ Montville. Washington, DC: ASM Press, pp 263–300

Ogura, M. y Mitsuahahi, M. (1994). Screening method for a large quantity of polymerase chain reaction products by measuring YOYO-1 fluorescence on 96-well polypropylene plates.

Anal. Biochem. 218, 458-459

Onarheim, A.M., Wiik, R., Burghardt, J. and Stackebrandt, E. 1994. Characterization and identification of two *Vibrio* species indigenous to the intestine of fish in cold sea water; description of *Vibrio iliopiscarius* sp.

Nov. System Appl Microbiol. 17: 370-379

O'Neill K.R., Jones S.H., Grimes D.J. (1992). Seasonal incidence of *Vibrio vulnificus* in the Great Bay estuary of New Hampshire and Maine.

Appl. Environ. Microbiol. 58

Overman, T. L., Kessler, J. F., Seabolt, J. P. (1985). Comparison of API 20E, API Rapid E, and API Rapid NFT for Identification of Members of the Family *Vibrionaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 0095-1137/85/110778-04

## P

---

Panicker, G., Myers, M. L., Bej, A. K. (2004). Rapid Detection of *Vibrio vulnificus* in Shellfish and Gulf of Mexico Water by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 498–507

Panicker, G., Michael C.L. Vickery, and Asim K. Bej. (2004). Multiplex PCR detection of clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in shellfish. *Can. J. Microbiol.* 50: 911–922

Panicker, G. and Bej, A. K. (2005). Real-Time PCR Detection of *Vibrio vulnificus* in Oysters: Comparison of Oligonucleotide Primers and Probes Targeting *vvhA*. *Applied and Environmental Microbiology*. 0099-2240

Paranjpye, R. N., J. C. Lara, J. C. Pepe, C. M. Pepe, and M. S. Strom. (1998). The type IV leader peptidase/N-methyltransferase of *Vibrio vulnificus* controls factors required for adherence to HEP-2 cells and virulence in iron loaded mice. *Infect. Immun.* 66:5659–5668

Paranjpye, R. N., and M. S. Strom. (2005). A *Vibrio vulnificus* type IV pilin contributes to biofilm formation, adherence to epithelial cells, and virulence. *Infect. Immun.* 73:1411–1422

Paris, E., Ríos, J. C., Bettini, M., Mieres, J. J., Sánchez, P. y De la Barra, T. (2005). Intoxicación por *Vibrio parahaemolyticus*. Centro de información toxicológica Pontificia Universidad Católica de Chile (CITUC)

Park, K., Ono, T., Rokuda, M., Jang, M., Okada, K., Lida, T. and Honda, T. (2004a). Functional Characterization of Two Type III Secretion Systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*. Vol. 72, No. 11, p. 6659–6665

Park, K. H., J. S. Kim, Y. R. Lee, Y. J. Moon, H. Hur, Y. H. Choi, C. H. Kim, U. H. Kim, E. K. Song, W. H. Yoo, C. S. Lee, B. S. Kim, S. H. Lee, P. Y. Ryu, and M. K. Han. (2007). Low-density lipoprotein protects *Vibrio vulnificus* induced lethality through blocking lipopolysaccharide action. *Exp. Mol. Med.* 39:673–678

Pérez-Moreno, M.M.O., Romera, G., Pous, G., Jardí, A.M., Zaragoza, J., Buj J.I., Pérez F.J. (1996). Bacteraemia caused by *Vibrio vulnificus* in a patient with a skin ulcer exposed to seawater. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 14: 512–514

Persing, D. H. (1991). Polymerase Chain Reaction: trenches to benches  
*J. Clin. Microbiol.* 29: 1281-1285

Pinkel, D., Segraves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Kuo, W., Chen, C., Zhai, Y., Dairkee, S. H., Ljung, B., Gray, J. W., Albertson, D. J. (1998). High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature Genetics*. 20: 207–211

Powell, J. L., A. C. Wright, S. S. Wasserman, D. M. Hone, and J. G. Morris, Jr. (1997). Release of tumor necrosis factor alpha in response to *Vibrio vulnificus* capsular polysaccharide in vivo and in vitro models.  
Infect. Immun. 65:3713–3718

## R

---

Raguénès, G.R., Guezennec, J. Pignet, P. and Barbier, G. (1997). *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*.  
Int. J. Syst. Bacteriol. 47:989-995

Radström, P. et al. (2004). Pre-PCR processing: Strategies to generate PCR-compatible samples.  
Mol. Biotechnol. 26, 133–46

Randa, M.A., Polz, M.F., Lim, E. (2004). Effects of Temperature and Salinity on *Vibrio vulnificus* Population Dynamics as Assessed by Quantitative PCR.  
Appl. Environ. Microbiol. 70: 5469–5476

Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., Wittwer, C. T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction.  
Anal. Biochem. 245, 154-160

Rivera, I.N.G., Lipp, E.K., Gil, A., Choopun, N., Huq, A., Colwell, R.R. (2003). Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems.  
Environmental Microbiology 5, 599–606

Rizvi, A.V., Bej, A.K. (2010). Multiplexed real-time PCR amplification of *tlh*, *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* and its rapid detection in shellfish and Gulf of Mexico water.

Antonie Van Leeuwenhoek. 2010. 98 (3): 279-90

Robert-Pillot, A., Gue'nole' , A., Lesne, J., Delesmont, R., Fournier, J.M., Quilici, M.L., 2004. Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France.

Int. J. Food Microbiol. 91, 319–325

Rodrigues D.P., Ribeiro R.V., Hofer E. (1992). Analysis of some virulence factors of *Vibrio vulnificus* isolated from Rio de Janeiro, Brazil.

Epidemiol. Infect. 108 (1992) 463

## S

---

Sawabe, T., Yoshizawa, A., Kawanishi, Y., Komatsu-Takeda, E., Nakagawa, S., Sawabe, T., Ootubo, M., Satomi, M., Yano, Y., Yamazaki, K. (2009). Multi-Probe-Fluorescence in situ Hybridization for the Rapid Enumeration of Viable *Vibrio parahaemolyticus*.

Microbes Environ. Vol. 24, No. 3, 259-264

Sebald, M. and Véron, M. (1963). Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions.

Ann. Inst. Pasteur (Paris). 105: 897-910

Shapiro R.L., Altekruze S., Hutwagner L., Bishop R., Hammond R., Wilson S., Ray B., Thompson S., Tauxe R.V., Griffin P.M. (1998). The role of Gulf Coast oysters harvested in warmer months in *Vibrio vulnificus* infections in the United States., 1988-1996.

J. Infect. Dis. 178 (1998) 752

Shieh, Y.S.C., Wait, D., Tai, L. and Sobsey, M. D. (1995). Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction.

J. Virol. Methods 54:51–66

Senoh, M., Miyoshi, S., Okamoto, K., Fouz, B., Amaro, C., Shinoda, S. (2005). The cytotoxin-hemolysin genes of human and eel pathogenic *Vibrio vulnificus* strains: comparison of nucleotide sequences and application to the genetic grouping.

Microbiol Immunol. 2005. 49(6). 513-9

Shirai, H., Ito, H., Hirayama, T., Nakamoto, Y., Nakabayashi, N., Kumagai, K., Takeda, Y., Nishibuchi, M. (1990). Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis.

Infect. Immun. 58, 3568–3573

Silva, M., Daroch, N., Garrido, N., Luna, R., Sallato, C. (2007). *Vibrio parahaemolyticus*.

Univ. Andrés Bello. Microbiología y Parasitología BIO058

Simpson, D. A. C., Geeney, S., Boyle, C., Stitt, A. W. (2000). Retinal VEGF mRNA measured by SYBR Green I fluorescence: a versatile approach to quantitative PCR.

Mol. Vis. 6, 178-183

Smith, T. and Taylor, M. S. (1919). Some morphological and biological characters of the *Spirilla* (*Vibrio fetus*, n. sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle.

J.E.M. DOI: 10.1084/30.4.299

Staley, C., Harwood, V. J. (2010). The use of genetic typing methods to discriminate among strains of *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*.

Journal of AOAC Int. 93(5):1553-69

Stelma Jr G.N., Reyes A.L., Peeler J.T., Johnson C.H., Spaulding P.L. (1992). Virulence characteristics of clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus*.

Appl. Environ. Microbiol. 58 (1992) 2776

Strom M.S., Lory S. (1993). Structure-function and biogenesis of the type IV pili.

Annu. Rev. Microbiol. 47 (1993) 565

Strom M. S., Paranjpye R. N. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*.

Microbes and Infection, 2, 2000, 177–188

Sun, Yi, Oliver, James D. 1995. Value of Cellobiose-Polymyxin B-Colistin Agar for Isolation of *Vibrio vulnificus* from Oysters

Journal of Food Protection. Volume 58. Number 4. 1995, pp. 439-440

## T

---

Tackett C.O., Brenner F., Blake P.A. (1984). Clinical features and an epidemiological study of *Vibrio vulnificus* infections.

J. Infect. Dis. 149 (1984) 558



Takeda, Y. (1983). Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*.

Pharm. Ther. 19, 123–146

Tamplin M.L., Capers G.M. (1992). Persistence of *Vibrio vulnificus* in tissues of Gulf Coast oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to seawater disinfected with UV light.

Appl. Environ. Microbiol. 58 (1992) 1506

Taniguchi H., Ohta, M. Ogawa, and Y. Mizuguchi. (1985). Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes.

J. Bacteriol. 162:510–515

Thompson, F.L., Li, Y., Gómez-Gil, B., Thompson, C.C., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Rupp, G.S., Pereira, A., De Bem, M.M., Sorgeloos, P., Swings, J. (2003). *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps).

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2003), 53, 245–252

Thompson, J. R., Randa, M. A., Marcelino, L. A., Tomita-Mitchell, A., Lim, E., Polz, M. F. (2004). Diversity and Dynamics of a North Atlantic Coastal *Vibrio* Community.

Appl Environ Microbiol. 70(7): 4103–4110

Tison D.L., Nishibuchi M., Greenwood J.D., Seidler R.J. (1982). *Vibrio vulnificus* biogroup 2: new biogroup pathogenic for eels.

Appl. Environ. Microbiol. 44 (1982) 640

Tison D.L., Kelly M.T. (1986). Virulence of *Vibrio vulnificus* strains from marine environments. Appl. Environ. Microbiol. 51 (1986) 1004

Tomás, D., Bosch, A., Catalán, V., Pintó, R.M., Rodríguez, M., Rodríguez, D. (2007). Informe técnico sobre normalización de métodos moleculares basados en la amplificación de ácidos nucleicos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aplicados al análisis microbiológico de aguas y alimentos. Sociedad Española de Microbiología. Comisión de Normalización y Validación (CNV). Primera Edición: marzo 2007

Turiño-Luque, J. D., Garrido Rasco, R., González Galán, V., de Alarcón, A. (2007). Septicemia y celulitis por *Vibrio vulnificus* en paciente cirrótico.

An. Med. Interna v.24 n.9 2007. doi: 10.4321/S0212-71992007000900011

## V

---

Veenstra J., Rietra P.J., Goudswaard J., Kaan J.A., Van-Keulen P.H., Stoutenbeek C.P. (1993). Extra -intestinal infections caused by *Vibrio spp.* in The Netherlands. Ned. Tijdschr. Geneesk. 137 (1993) 654

Veenstra J., Rietra P.J., Coster J.M., Slaats E., Dirks-Go S. (1994). Seasonal variations in the occurrence of *Vibrio vulnificus* along the Dutch coast  
Epidemiol. Infect. 112 (1994) 285

Véron, M.M. 1965. La position taxonomique des *Vibrio* et de certaines bactéries comparables. C.R. Acad. Sci. Paris 261: 5243-5246

Vílchez, G., Alonso, G. (2009). Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos.

Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 2009. 29:6-12

Vuddhakul, V., Chowdhury, A., Laohaprertthisan, V., Pungrasamee, P., Patararungrong, N., Thianmontri, P., Ishibashi, M., Matsumoto, C., Nishibuchi, M., 2000. Isolation of a pandemic O3:K6 clone of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from environmental and clinical sources in Thailand.

Appl. Environ. Microbiol. 66, 2685–2689

## W

---

Wang, G., Whittam, T. S., Berg, C. M. and Berg, D. E. 1993. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains.

Nucleic Acids Res. 21:5930–5933

Warner J.M., Oliver J.D. (1999). Randomly amplified polymorphic DNA analysis of clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus* and other *Vibrio* species.

Appl. Environ. Microbiol. 65 (1999) 1141

Weichart D., Kjelleberg S. (1996). Stress resistance and recovery potential of culturable and viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*.

Microbiology 142 (1996) 845

Weichert D., McDougald D., Jacobs D., Kjelleberg S. (1997). In situ analysis of nucleic acids in cold-induced nonculturable *Vibrio vulnificus*.

Appl. Environ. Microbiol. 63 (1997) 2754

Wilhelm, J. y Pingoud, A. (2003). Real-time polymerase chain reaction.

Chembiochem. 4, 1120-1128

Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification.

Appl. Environ. Microbiol., 63,3741-3751

Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., Rasmussen, T. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification.

Bio Techniques. 22, 130-138

Woese C. R. (1987). Bacterial evolution.

Microbil. Review. 51: 221-271

Wong, H.C., Liu, S.H., Pan, T.M., Wang, T.K., Lee, C.L., Yang-Chih Shih, D. (1999). Molecular Typing of *Vibrio parahaemolyticus* Isolates, Obtained from Patients Involved in Food Poisoning Outbreaks in Taiwan, by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis.

J Clin Microbiol. 1999 June; 37(6): 1809–1812

Wong, H.C., Liu, S.H., Ku, L.W., Lee, I.Y., Wang, T.K., Lee, Y.S., Lee, C.L., Kuo, L.P., Shin, D.Y.C. (2000). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan.

J. Food Prot. 63, 900–906

Wright A.C., Simpson L.M., Oliver J.D., Morris J.G., Jr. (1990). Phenotypic evaluation of a capsular transposon mutants of *Vibrio vulnificus*.  
Infect. Immun. 58 (1990) 1769

Wright, A. C., and J. G. Morris, Jr. (1991). The extracellular cytolysin of *Vibrio vulnificus*: inactivation and relationship to virulence in mice.  
Infect. Immun. 59:192–197

Wu, J. J., Hor, L. I., Shiau, S. L. (1995). Differentiation of *Vibrio vulnificus* strains by an arbitrarily primed polymerase chain reaction.  
Chin. J. Microbiol. Immunol. 28:70–78

## Y

---

Yang, C., Jiang, Y., Huang, K., Zhu, C., Yin, Y. (2003). Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water.  
Immunology and Medical Microbiology 38 (2003) 265-271

Yoon, S.Y., Chung, G.T, Kang, D.H., Ryu,C., Yoo, C.K., Seong, W.K. (2005). Application of real-time PCR for quantitative detection of *Clostridium botulinum* type A toxin gene in food.  
Microbiol Immunol. 49(6) 505-11

Yoshida, S., Ogawa, M., Mizuguchi, Y. (1985). Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*.  
Infect. Immun. 47 (1985) 446



*ANEXOS*





**ANEXO I: Medios de cultivo****Agua de Peptona Alcalina adicionada con 2% de NaCl (APW 2% NaCl)**

*Agua de peptona tamponada; según ISO 6579 para microbiología (Merk 1.07228):*

Composición g/L:

Peptona de caseína	10,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Dihidrogenofosfato potásico	1,5 g
Hidrogenofosfato disódico dodecaidrato	9,0 g
Peptona de harina	9,0 g
Agar-agar	13,0 g
<i>2% de Cloruro Sódico (Sodium Chloride (Panreac 141659))</i>	

Resuspender en agua destilada y esterilizar a 121°C, 15 min.

**Agar Triptona y Soja modificado adicionado con el 2% de NaCl (mTSA 2% NaCl)**

*Agar CASO (Merk 1.05458):*

Composición g/L:

Peptona de caseína	15,0 g
Peptona de harina	5,0 g
Cloruro sódico	1,0 g
Agar-agar	13,0 g
<i>0,1% de extracto de levadura (Bacto Yeast Extract (BD 212750))</i>	
<i>0.2% de extracto de carne (Difco Beef Extract (BD 212610))</i>	
<i>2% de Cloruro Sódico (Sodium Chloride (Panreac 141659))</i>	

Una vez resuspendido el Agar CASO en agua destilada, se añaden los extractos de levadura y carne y el NaCl y se esteriliza a 121°C, 15 min.

### **Agar TCBS**

*Agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (Merk 1.10263):*

Composición g/L:

Peptona de caseína	15,0 g
Peptona de carne	5,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Citrato sódico	10,0 g
Tiosulfato sódico	10,0 g
Bilis de buey desecad	5,0 g
Colato sódico	3,0 g
Sacarosa	20,0 g
Cloruro sódico	10,0 g
Citrato de hierro (III)	1,0 g
Azul de Bromotimol	0,4 g
Agar-agar	14,0 g

Se disuelve el Agar TCBS en agua destilada calentándolo en un baño de agua hirviendo o en corriente de vapor. No se esteriliza.

---

**ANEXO II: Soluciones y reactivos para PCR****Solución CTAB/CINa**

CTAB 10% en CINa 0,7M

**Tampón TE**

Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM

**Tampón TAE 1X**

Tris-HCl 0,04M

EDTA 0,002M

Ácido acético glacial 0,02M

**Gel de Agarosa**

Agarosa Grado de Biología Molecular (Roche Diagnostics 03573788001)

Pesar la agarosa y transferir a un matraz. Añadir el tampón TAE 1X, calentar hasta que rompa a hervir, agitar, atemperar hasta 50°C y verter en el molde.

**Bromuro de Etidio**

Solución de bromuro de etidio, 0,5  $\mu$ g/ml (MOBIO Laboratories, Inc.)

**Marcadores de peso molecular**

*Gene Ruler 100 Base Pair Plus DNA Ladder*, ready –to-use (Fermentas SM0323): de 100 a 3000 pb

Concentración: 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l

*O'RangeRuler 50bp DNA Ladder*, ready-to-use (Fermentas SM0613): de 50 a 1000 pb  
Concentracion: 0,05 µg/µl

**Tampón de carga 6X**

*6X DNA Loading Dye*

Tris-HCL	10 mM
Azul bromofenol	0,03%
Xileno cianol FF	0,03%
Glicerol	60%
EDTA	60 mM

*6X Orange DNA Loading Dye*

Tris-HCL	10 mM
Orange G	0,15%
Xileno cianol FF	0,03%
Glicerol	60%
EDTA	60 mM

**ANEXO III: Soluciones y reactivos para FISH****PBS 3X**

NaCl	22,8 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,88 g
Agua destilada	1L
PH 7,5	

Disolver los fosfatos y el cloruro sódico por separado.  
Esterilizar a 115°C, 20 min.

**Paraformaldehido (Panreac)**

Calentar 30 ml de agua destilada a 60°C.  
Añadir 2 g de PFA al agua precalentada y agitar. Se adiciona unas gotas de NaOH 5M para disolver el polvo.  
Completar hasta 50 ml con PBS 3X. Ajustar el pH hasta 7,5.  
Eliminar los posibles cristales mediante filtración.  
Guardar a 4°C durante un máximo de 48 h, o a -20°C varias semanas.

**Solución de gelatina**

Gelatina bacteriológica (Cultimed 170-180)	0,1%
Sulfato potásico cromato (Sigma C-5926)	0,01%

Calentar previamente 40 ml de agua destilada en agitación, añadir 50 mg de gelatina y 5 mg de sal de cromato. Una vez disuelta dejar atemperar a 45°C.

### **Portaobjetos cubiertos con teflón (Marienfeld 9782100)**

Lavar los portaobjetos con desengrasante, enjuagar con agua destilada y secar al aire.

Sumergir los portaobjetos en gelatina al 0,1% y dejar escurrir.  
Secar al aire.

### **Tampón de hibridación**

NaCl 5M	360 µl (0,9M)
HCl-Tris 1M	40 µl (20 mM)
SDS 10%	2 µl (0,01%)
Formamida (SIGMA F-7503)	X µl (0-50%)
Agua milliQ	completar hasta 2 ml

Mezclar todos los componentes y añadir en último lugar el SDS 10%. Completar hasta 2 ml y agitar.

### **Tampón de lavado**

NaCl 5M*	(9000-100 µl)
HCl-Tris 1M	1000 µl
SDS 10%	50 µl
EDTA 0,5M**	500 µl
Agua milliQ	completar hasta 50 ml

\* La concentración de NaCl depende de la concentración de formamida en el tampón de hibridación:

0% formamida	9000 µl NaCl
20% formamida	2150 µl NaCl
30% formamida	1020 µl NaCl
35% formamida	700 µl NaCl

\*\* Solo se añade en caso de que el tampón de hibridación contenga un 20% de formamida o más.

### **Sondas**

Diluir en agua MilliQ la solución madre de sondas marcadas con fluorocromos (MWG Biotech, Germany) hasta una concentración 50 ng/μl. Tanto la solución madre como la de trabajo se almacenan a -20°C en oscuridad.

## ANEXO IV: SONDAS E INICIADORES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

**Tabla 1: Iniciadores usados en este trabajo**

INICIADOR	SECUENCIA	LONGITUD (pb)	DIANA	Tª melting (°C)	AMPLICON (pb)	REFERENCIA
567F	5' - GCGTAAAGCGCATGCAGGT	20	ARNr 16S	55,9	114	Thompson <i>et al.</i> , 2004
680R	5' - GAAATTCTACCCCTCTACAG	22	ARNr 16S	54,8	114	Thompson <i>et al.</i> , 2004
L-TL	5' - AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG	24	gen <i>tlh</i>	55,7	450	Taniguchi <i>et al.</i> , 1985
R-TL	5' - GCTACTTTCTAGCATTCTCTGC	24	gen <i>tlh</i>	54	450	Taniguchi <i>et al.</i> , 1985
VVH785	5' - TTCCAAC TTCAAACCGAACTATGAC	25	gen <i>vvhA</i>	54,4	205	Panicker <i>et al.</i> , 2003
VVH990	5' - ATTCCAGTCGATGCGAATACGTTG	24	gen <i>vvhA</i>	55,7	205	Panicker <i>et al.</i> , 2003
27f	5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	20	ARNr 16S	51,8	ARNr 16S	Lane, 1991
1492r	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT	19	ARNr 16S	46,8	ARNr 16S	Lane, 1991
vvhA-1F	5' - AGATTAAGTGTGTGTTGCACACAAGCGGTG	30	gen <i>vvhA</i>	61,6	813	Senoh <i>et al.</i> , 2005
vvhA-1R	5' - ACCGAAAACAGCGCTGAAGGAAGAACGGTA	30	gen <i>vvhA</i>	63	813	Senoh <i>et al.</i> , 2005
vvhA-2F	5' - AAATTAAGTGCCTGCTACACACAAGTGGTG	30	gen <i>vvhA</i>	60,3	813	Senoh <i>et al.</i> , 2005
vvhA-2R	5' - ACTGAGAAGAGTGCTGAAGGGATTACCGTA	30	gen <i>vvhA</i>	61,6	813	Senoh <i>et al.</i> , 2005
M13	5' - GAGGGTGGCGTTCT	15	RAPD	47,4	RAPD	Huey and Hall, 1989
7254	5' - AGTCAGCCAC	10	RAPD	32	RAPD	Lane, 1991



**Tabla 2: Sondas usadas en este trabajo**

SONDA	SECUENCIA	LONGITUD (pb)	TEMPERATURA HIBRIDACIÓN	CONCENTRACIÓN FORMAMIDA EMPLEADA	DIANA	REFERENCIA
Vib3	5'-ACCTGCATGCGCTTTACGCC	20	46°C	30%	ARNr 16S <i>Vibrio spp.</i>	Thompson <i>et al.</i> , (2004)
GV	5'-AGGCCACAACCTCCAAGTAG	20	46°C	30%	ARNr 16S <i>Vibrio spp.</i>	Giuliano <i>et al.</i> , (1999)
VIB	5'-ACAGTACTCTAGTCTGCCAG	20	46°C	30%	ARNr 16S <i>Vibrio spp.</i>	Moreno <i>et al.</i> , (1999)
VPA	5'- AATACATAGGGTAAGGAGGCG	21	46°C	30%	ARNr 23S <i>V. parahaemolyticus</i>	Este trabajo
Vvul23S296	5'-ACTCAATGATACTGGCTTA	19	46°C	30%	ARNr 23S <i>V. vulnificus</i>	Randa <i>et al.</i> , 2004
Vvu3	5'-ACCGTTCGTCTAACACAT	18	46°C	30%	ARNr 23S <i>V. vulnificus</i>	Aznar <i>et al.</i> , 1994
Vvran2	5'-TACACAATCTGCTTGCCA	18	46°C	30%	ARNr 23S <i>V. vulnificus</i>	Este trabajo
Vul23	5'-ATGATACTGGCTTATGCCAG	20	46°C	30%	ARNr 23S <i>V. vulnificus</i>	Este trabajo
EUB338-I	5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT	18	46°C	30%	ARNr 16S Eubacterias	Amann <i>et al.</i> , 1990
EUB338-II	5'-GCAGCCACCCGTAGGTGT	18	46°C	30%	ARNr 16S Eubacterias	Amann <i>et al.</i> , 1990
EUB338-III	5'-GCTGCCACCCGTAGGTGT	18	46°C	30%	ARNr 16S Eubacterias	Amann <i>et al.</i> , 1990
VVH-TM	5'- TGCTGTTGGTTGACGAGCCCGC	23	sonda TaqMan	sonda TaqMan	Gen Hemolisina A <i>V. vulnificus</i>	Este trabajo



### **ANEXO V: Direcciones de interés en Internet**

**Direcciones de grupos especializados consultadas en este trabajo:**

<b><i>Dirección</i></b>	<b><i>Portal</i></b>
National Center for Biotechnology Information (USA)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
European Molecular Biology Laboratory (Europe)	<a href="http://www.embl.org/">www.embl.org/</a>
Food and Drug Administration	<a href="http://www.fda.gov/">http://www.fda.gov/</a>
Infectious Disease Society of America	<a href="http://www.idsociety.org">www.idsociety.org</a>
Infectious Disease Surveillance Center	<a href="http://idsc.nih.go.jp/">http://idsc.nih.go.jp/</a>
Centres for Disease Control and Prevention	<a href="http://www.cdc.gov/">http://www.cdc.gov/</a>
List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature LPSN	<a href="http://www.bacterio.cict.fr">http://www.bacterio.cict.fr</a>
Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica - SEIMC	<a href="http://www.seimc.org/">http://www.seimc.org/</a>

**Herramientas de análisis:**

<b><i>Dirección</i></b>	<b><i>Portal</i></b>
1. <i>In silico</i> simulation of molecular biology experiments	<a href="http://insilico.ehu.es/">http://insilico.ehu.es/</a>
2. BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST">www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST</a>
3. RNA world	<a href="http://www.imb-jena.de/RNA.html">www.imb-jena.de/RNA.html</a>
4. PCR electrónica	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/STS/">www.ncbi.nlm.nih.gov/STS/</a>

**Buscadores de publicaciones periódicas utilizados en este trabajo:**

<b><i>Dirección</i></b>	<b><i>Portal</i></b>
Buscador investigación genómica	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed">www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed</a>
BioMedNet Journal Collection	<a href="http://journals.bmn.com/journals">http://journals.bmn.com/journals</a>
Science Direct	<a href="http://www.sciencedirect.com/">www.sciencedirect.com/</a>
Ingenta	<a href="http://www.ingenta.com">www.ingenta.com</a>
Journal search	<a href="http://www.blackwell-science.com/">www.blackwell-science.com/</a>
Association of <i>Vibrio</i> Biologists	<a href="http://www.vibriobiology.net">http://www.vibriobiology.net</a>
Journal of Nutrition	<a href="http://www.nutrition.org/">www.nutrition.org/</a>
Biblioteca UPV	<a href="http://www.upv.es/revistas/">www.upv.es/revistas/</a>

**ANEXO VI: MUESTRAS ANALIZADAS****Tabla 1. Tipo de muestra, lugar de muestreo y fecha de recogida de las muestras de alimentos de origen marino analizados**

<b>MUESTRA</b>	<b>TIPO DE MUESTRA</b>	<b>LUGAR DE MUESTREO</b>	<b>FECHA DE RECOGIDA</b>
A1	MEJILLÓN	Valencia	22/02/2007
A2	MEJILLÓN	Valencia	21/03/2007
A3	MEJILLÓN	Valencia	21/03/2007
A4	MEJILLÓN	Valencia	21/03/2007
A5	MEJILLÓN	Valencia	21/03/2007
A6	MEJILLÓN	Valencia	02/05/2007
A7	MEJILLÓN	Valencia	02/05/2007
A8	MEJILLÓN	Valencia	02/05/2007
A9	MEJILLÓN	Valencia	23/05/2007
A10	MEJILLÓN	Valencia	23/05/2007
A11	MEJILLÓN	Valencia	23/05/2007
A12	MEJILLÓN	Valencia	23/05/2007
A13	MEJILLÓN	Valencia	14/02/2008
A14	MEJILLÓN	Valencia	28/02/2008
A15	MEJILLÓN	Valencia	06/03/2008
A16	MEJILLÓN	Valencia	17/04/2008
A17	MEJILLÓN	Valencia	17/04/2008
A18	MEJILLÓN	Valencia	01/10/2008
A19	MEJILLÓN	Valencia	01/10/2008
A20	MEJILLÓN	Valencia	01/10/2008
A21	MEJILLÓN	Valencia	01/10/2008
A22	MEJILLÓN	Valencia	01/10/2008
A23	ALMEJA	Valencia	21/03/2007
A24	ALMEJA	Valencia	21/03/2007
A25	ALMEJA	Valencia	21/03/2007
A26	ALMEJA	Valencia	18/04/2007
A27	ALMEJA	Valencia	18/04/2007
A28	ALMEJA	Valencia	02/05/2007
A29	ALMEJA	Valencia	02/05/2007
A30	ALMEJA	Valencia	02/05/2007
A31	ALMEJA	Valencia	23/05/2007
A32	ALMEJA	Valencia	23/05/2007

A33	ALMEJA	Valencia	23/05/2007
A34	ALMEJA	Valencia	23/05/2007
A35	ALMEJA	Valencia	17/04/2008
A36	ALMEJA	Valencia	17/04/2008
A37	ALMEJA	Valencia	01/10/2008
A38	ALMEJA	Valencia	01/10/2008
A39	ALMEJA	Valencia	01/10/2008
A40	ALMEJA	Valencia	01/10/2008
A41	ALMEJA	Valencia	01/10/2008
A42	ALMEJA	Valencia	15/10/2008
A43	ALMEJA	Valencia	15/10/2008
A44	ALMEJA	Valencia	15/10/2008
A45	CHIRLA	Valencia	28/02/2007
A46	CHIRLA	Valencia	21/03/2007
A47	CHIRLA	Valencia	21/03/2007
A48	CHIRLA	Valencia	21/03/2007
A49	CHIRLA	Valencia	28/02/2008
A50	CHIRLA	Valencia	06/03/2008
A51	CHIRLA	Valencia	17/04/2008
A52	CHIRLA	Valencia	17/04/2008
A53	CHIRLA	Valencia	01/10/2008
A54	CHIRLA	Valencia	01/10/2008
A55	CHIRLA	Valencia	01/10/2008
A56	CHIRLA	Valencia	15/10/2008
A57	CHIRLA	Valencia	15/10/2008
A58	CHIRLA	Valencia	15/10/2008
A59	OSTRA	Valencia	12/12/2006
A60	OSTRA	Valencia	12/12/2006
A61	OSTRA	Valencia	01/10/2008
A62	OSTRA	Valencia	01/10/2008
A63	OSTRA	Valencia	01/10/2008
A64	OSTRA	Valencia	15/10/2008
A65	OSTRA	Valencia	15/10/2008
A66	OSTRA	Valencia	15/10/2008
A67	OSTRA	Valencia	15/10/2008
A68	OSTRA	Valencia	15/10/2008
A69	OSTRA	Valencia	15/10/2008
A70	OSTRA	Valencia	15/10/2008
A71	SALMÓN	Valencia	21/03/2007
A72	SALMON	Valencia	21/03/2007
A73	SALMÓN	Valencia	21/03/2007
A74	GAMBA	Valencia	18/04/2007

A75	GAMBA	Valencia	18/04/2007
A76	ANGUILA	Valencia	12/12/2006
A77	ANGUILA	Valencia	12/12/2006
A78	TELLINA	Valencia	28/02/2008
A79	TELLINA	Valencia	06/03/2008
A80	PERCEBE	Valencia	28/02/2007
A81	PERCEBE	Valencia	28/02/2007
A82	CANGREJO	Valencia	28/02/2007
A83	CANGREJO	Valencia	28/02/2007

**Tabla 2. Tipo de muestra, lugar de muestreo y fecha de recogida de las muestras de agua analizadas**

<b>MUESTRA</b>	<b>TIPO DE MUESTRA</b>	<b>LUGAR DE MUESTREO</b>	<b>FECHA DE RECOGIDA</b>
P1	AGUA DE MAR	Pinedo	06/04/2006
P2	AGUA DE MAR	Pinedo	06/04/2006
P3	AGUA DE MAR	Pinedo	06/04/2006
P4	AGUA DE MAR	Pinedo	06/04/2006
P5	AGUA DE MAR	Pinedo	06/04/2006
P6	AGUA DE MAR	Pinedo	06/04/2006
P7	AGUA DE MAR	Pinedo	06/04/2006
P8	AGUA DE MAR	Pinedo	06/04/2006
P9	AGUA DE MAR	Albufera	18/04/2006
P10	AGUA DE MAR	Albufera	18/04/2006
P11	AGUA DE MAR	Albufera	18/04/2006
P12	AGUA DE MAR	Albufera	18/04/2006
P13	AGUA DE MAR	Puerto de Sagunto	17/09/2006
P14	AGUA DE MAR	Puerto de Sagunto	17/09/2006
P15	AGUA DE MAR	Port Saplanya	19/09/2006
P16	AGUA DE MAR	Port Saplanya	19/09/2006
P17	AGUA DE MAR	Port Saplanya	19/09/2006
P18	AGUA DE MAR	Port Saplanya	19/09/2006
P19	AGUA DE MAR	Port Saplanya	19/09/2006
P20	AGUA DE MAR	Port Saplanya	19/09/2006
P21	AGUA DE MAR	Puzol	27/09/2006
P22	AGUA DE MAR	Puzol	27/09/2006
P23	AGUA DE MAR	Port Saplanya	19/11/2008
P24	AGUA DE MAR	Port Saplanya	19/11/2008
P25	AGUA DE MAR	Puerto de Sagunto	20/11/2008
P26	AGUA DE MAR	Puerto de Sagunto	20/11/2008
P27	AGUA DE MAR	Puerto de Sagunto	20/11/2008
P28	AGUA DE MAR	Pobla Farnals	25/11/2008
P29	AGUA DE MAR	Pobla Farnals	25/11/2008
P30	AGUA DE MAR	Pobla Farnals	25/11/2008
P31	AGUA DE MAR	Pobla Farnals	25/11/2008



P32	AGUA DE MAR	Pobla Farnals	25/11/2008
AR1	AGUA RESIDUAL	EDAR A	20/04/2007
AR2	AGUA RESIDUAL	EDAR A	20/04/2007
AR3	AGUA RESIDUAL	EDAR A	24/05/2007
AR4	AGUA RESIDUAL	EDAR A	24/05/2007
AR5	AGUA RESIDUAL	EDAR A	06/06/2007
AR6	AGUA RESIDUAL	EDAR A	06/06/2007
AR7	AGUA RESIDUAL	EDAR B	13/06/2007
AR8	AGUA RESIDUAL	EDAR B	13/06/2007
AR9	AGUA RESIDUAL	EDAR B	04/07/2007
AR10	AGUA RESIDUAL	EDAR B	04/07/2007
AR11	AGUA RESIDUAL	EDAR C	10/07/2007
AR12	AGUA RESIDUAL	EDAR C	10/07/2007
AR13	AGUA RESIDUAL	EDAR C	02/10/2007
AR14	AGUA RESIDUAL	EDAR A	02/10/2007
AR15	AGUA RESIDUAL	EDAR B	02/10/2007
AR16	AGUA RESIDUAL	EDAR A	04/10/2007
AR17	AGUA RESIDUAL	EDAR C	04/10/2007
AR18	AGUA RESIDUAL	EDAR A	11/10/2007
AR19	AGUA RESIDUAL	EDAR B	16/10/2007
AR20	AGUA RESIDUAL	EDAR C	16/10/2007
AR21	AGUA RESIDUAL	EDAR A	16/10/2007

AR22	AGUA RESIDUAL	EDAR C	18/10/2007
AR23	AGUA RESIDUAL	EDAR A	18/10/2007
AR24	AGUA RESIDUAL	EDAR B	19/10/2007
AR25	AGUA RESIDUAL	EDAR C	23/10/2007
AR26	AGUA RESIDUAL	EDAR B	23/10/2007
AR27	AGUA RESIDUAL	EDAR A	23/10/2007
AR28	AGUA RESIDUAL	EDAR C	25/10/2007
AR29	AGUA RESIDUAL	EDAR A	25/10/2007
AR30	AGUA RESIDUAL	EDAR C	30/10/2007
AR31	AGUA RESIDUAL	EDAR B	31/10/2007
AR32	AGUA RESIDUAL	EDAR A	31/10/2007
AR33	AGUA RESIDUAL	Acequia VERA Oeste	19/11/2007
AR34	AGUA RESIDUAL	Acequia VERA Este	19/11/2007
AR35	AGUA RESIDUAL	Acequia VERA Este	21/11/2007
AR36	AGUA RESIDUAL	Acequia VERA Oeste	21/11/2007
AR37	AGUA RESIDUAL	Acequia VERA Oeste	26/11/2007
AR38	AGUA RESIDUAL	Acequia VERA Este	26/11/2007
AR39	AGUA RESIDUAL	EDAR C	28/11/2007
AR40	AGUA RESIDUAL	EDAR C	05/12/2007
AR41	AGUA RESIDUAL	EDAR B	11/12/2007
AR42	AGUA RESIDUAL	EDAR B	12/12/2007

AR43	AGUA RESIDUAL	EDAR C	19/12/2007
AR44	AGUA RESIDUAL	EDAR C	19/12/2007
AR45	AGUA RESIDUAL	EDAR A	21/10/2009
AR46	AGUA RESIDUAL	EDAR A	21/10/2009
AR47	AGUA RESIDUAL	EDAR A	21/10/2009
AR48	AGUA RESIDUAL	EDAR A	04/11/2009
AR49	AGUA RESIDUAL	EDAR A	04/11/2009
AR50	AGUA RESIDUAL	EDAR A	04/11/2009
AR51	AGUA RESIDUAL	EDAR B	05/11/2009
AR52	AGUA RESIDUAL	EDAR B	05/11/2009
AR53	AGUA RESIDUAL	EDAR B	05/11/2009
AR54	AGUA RESIDUAL	EDAR B	05/11/2009
AR55	AGUA RESIDUAL	EDAR A	18/11/2009
AR56	AGUA RESIDUAL	EDAR A	18/11/2009
AR57	AGUA RESIDUAL	EDAR A	18/11/2009
AR58	AGUA RESIDUAL	EDAR B	19/11/2009
AR59	AGUA RESIDUAL	EDAR B	19/11/2009
AR60	AGUA RESIDUAL	EDAR B	19/11/2009
AR61	AGUA RESIDUAL	EDAR B	19/11/2009
AR62	AGUA RESIDUAL	EDAR A	02/12/2009
AR63	AGUA RESIDUAL	EDAR A	02/12/2009

AR64	AGUA RESIDUAL	EDAR A	02/12/2009
AR65	AGUA RESIDUAL	EDAR B	03/12/2009
AR66	AGUA RESIDUAL	EDAR B	03/12/2009
AR67	AGUA RESIDUAL	EDAR B	03/12/2009
AR68	AGUA RESIDUAL	EDAR B	03/12/2009
AR69	AGUA RESIDUAL	EDAR A	16/12/2009
AR70	AGUA RESIDUAL	EDAR A	16/12/2009
AR71	AGUA RESIDUAL	EDAR A	16/12/2009
AR72	AGUA RESIDUAL	EDAR B	17/12/2009
AR73	AGUA RESIDUAL	EDAR B	17/12/2009
AR74	AGUA RESIDUAL	EDAR B	17/12/2009
AR75	AGUA RESIDUAL	EDAR B	17/12/2009
AR76	AGUA RESIDUAL	EDAR A	13/01/2010
AR77	AGUA RESIDUAL	EDAR A	13/01/2010
AR78	AGUA RESIDUAL	EDAR A	13/01/2010
AR79	AGUA RESIDUAL	EDAR B	14/01/2010
AR80	AGUA RESIDUAL	EDAR B	14/01/2010
AR81	AGUA RESIDUAL	EDAR B	14/01/2010
AR82	AGUA RESIDUAL	EDAR B	14/01/2010
AR83	AGUA RESIDUAL	EDAR A	03/02/2010
AR84	AGUA RESIDUAL	EDAR A	03/02/2010

AR85	AGUA RESIDUAL	EDAR A	03/02/2010
AR86	AGUA RESIDUAL	EDAR B	04/02/2010
AR87	AGUA RESIDUAL	EDAR B	04/02/2010
AR88	AGUA RESIDUAL	EDAR B	04/02/2010

**Tabla 3: Resultados del análisis de las 83 muestras de alimentos usando las técnicas optimizadas anteriormente en este trabajo**

MUESTRA	CULTIVO		PCR CONVENCIONAL			PCR MÚLTIPLE			FISH	
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio spp.</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio spp.</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio spp.</i>	
A1	0 horas	-	-	-	-	-	-	-		
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	+	
A2	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	+	
	24 horas	-	-		-	-		-		
A3	0 horas	VP1 VP2 VP3	-	+	+	-	+	+	-	+
	24 horas	-	-		-	-		-	-	
A4	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	
A5	0 horas	-	-		-	-		-	-	
	24 horas	-	-	+	+	-	+	+	-	+

A6	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	VP4 VP5	-	+	+	-	+	+	-	-
A7	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	VP6 VP7	-	+	+	-	+	+	-	-
A8	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	VP8	-	+	+	-	+	+	-	-
A9	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A10	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A11	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A12	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-

A13	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A14	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	+	-	+	+	-	-
A15	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A16	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A17	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A18	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A19	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-





A27	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A28	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A29	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A30	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A31	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A32	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A33	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-

A34	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A35	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A36	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A37	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A38	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	+	-	+	+	-	-
A39	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	+	-	+	+	-	-
A40	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-

A41	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A42	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	+	-	+	+	-	-
A43	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	+	-	+	+	-	-
A44	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	+	-	+	+	-	-
A45	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A46	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A47	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-

A48	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A49	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A50	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A51	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A52	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A53	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	+	-	+	+	-	-
A55	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-

A56	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	+	+	-	+	-
A57	0 horas	-	-	+	-	+	+	-	+	+
	24 horas	-	-	+	+	-	+	+	-	-
A58	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A59	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A60	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	VV1	+	-	+	+	-	+	-
A61	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	VV2	+	-	+	+	-	+	-
A62	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-

A63	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	+	+	+	+	+	-
A64	0 horas	-	VV3	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	VV4	+	-	-	+	-	-	-
A65	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	+	-	+	+	-	-
A66	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A67	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A68	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A69	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-

A70	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A71	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	+	-	+	+	-	-
A72	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A73	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	+	-	+	+	-	-
A74	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	+	-	+	+	-	-
A75	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A76	0 horas	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-



A77	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A78	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A79	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A80	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A81	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A82	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A83	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-

**Tabla 4: Resultados del análisis de las 120 muestras de agua usando las técnicas optimizadas anteriormente en este trabajo**

MUESTRA	CULTIVO		PCR CONVENCIONAL			PCR MÚLTIPLE			FISH
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio spp.</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio spp.</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio spp.</i>
P1	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-
P2	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	+
P3	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	+
P4	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-
P5	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-



P13	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
P14	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	VV7	+	+	-	+	+	-	-
P15	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
P16	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
P17	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
P18	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	VV8	+	-	-	+	-	-	+
P19	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-

P20	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	+	-	+	+	-	-
P21	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
P22	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
P23	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	+	-	+	+	-	-
P24	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
P25	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	+	+	-	+	-
P26	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-

P27	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
P28	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	+	-	+	+	-	-
P29	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	+	-	+	+	-	+
P30	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
P31	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	+	+	-	+	+
P32	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR1	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-

AR2	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR3	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR4	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR5	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR6	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR7	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR8	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	VP9	-	+	-	-	+	-	-	-

AR9	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AR10	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR11	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR12	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR13	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR14	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR15	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-



AR16	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AR17	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR18	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR19	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR20	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR21	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR22	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-

AR23	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR24	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AR25	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR26	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR27	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR28	0 horas	-	VV9	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR29	0 horas	-	VV10	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-

AR30	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR31	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AR32	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AR33	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR34	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AR35	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR36	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-

AR37	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR38	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR39	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR40	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AR41	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR42	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR43	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-





AR58	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AR59	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR60	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR61	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR62	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR63	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR64	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-

AR65	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR66	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR67	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR68	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AR69	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR70	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR71	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-



AR72	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR73	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR74	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AR75	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AR76	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AR77	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR78	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-

AR79	0 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AR80	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR81	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR82	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR83	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR84	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-
AR84	0 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	24 horas	-	-	+	-	-	+	-	-	-





**ANEXO VII: FIGURAS PROPORCIONADAS POR EL SOFTWARE  
LIGHTCYCLER 4.0**

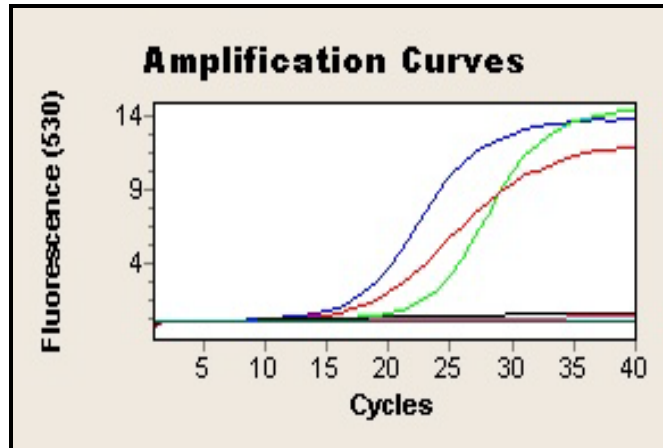


Figura 18. Ensayo de especificidad de la PCR a tiempo real para *V. parahaemolyticus*

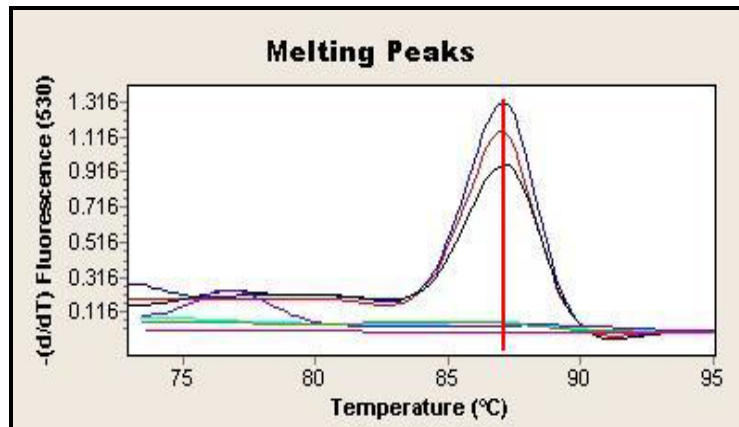


Figura 19. Curvas de fusión de las distintas especies del género *Vibrio* para la PCR de *V. parahaemolyticus*

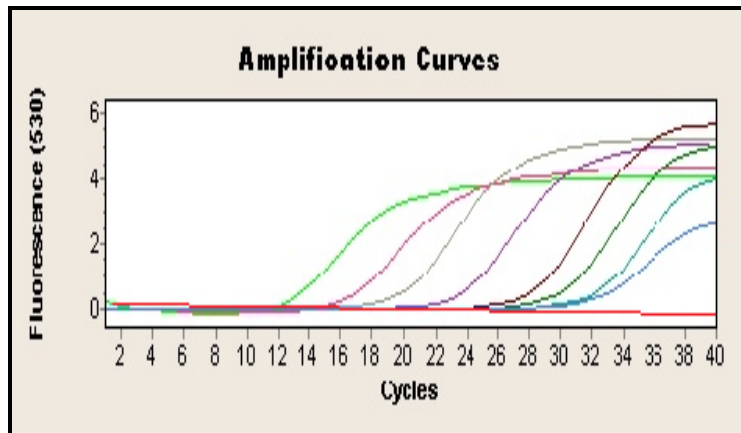


Figura 20. Curva de amplificación de los distintos patrones y el control negativo para la PCR de *V. parahaemolyticus*

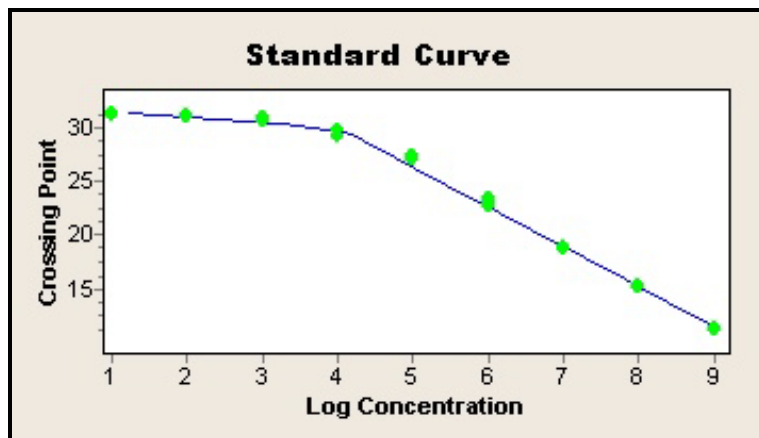


Figura 21. Curva patrón obtenidas para la PCR de *V. parahaemolyticus* con una eficiencia de 1.867 y un error de 0.0651

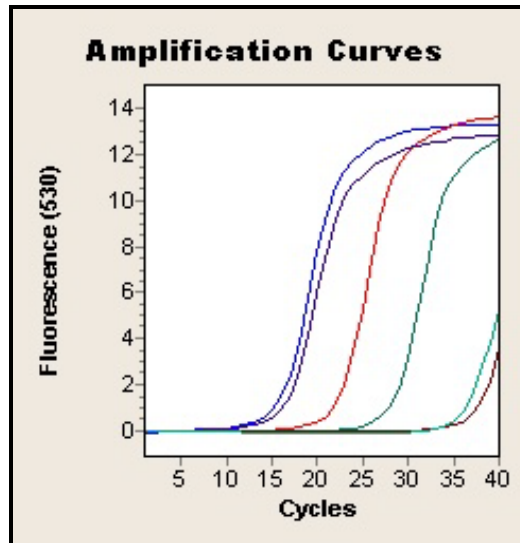


Figura 22. Ensayo de especificidad de la PCR a tiempo real para *V. vulnificus*

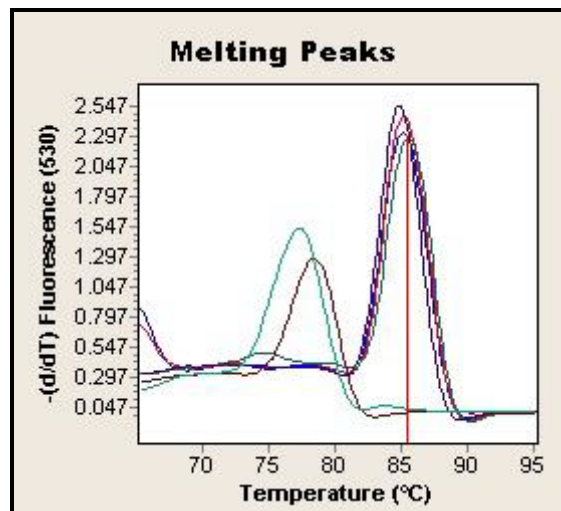


Figura 23. Curvas de fusión de las distintas especies del género *Vibrio* para la PCR de *V. vulnificus*

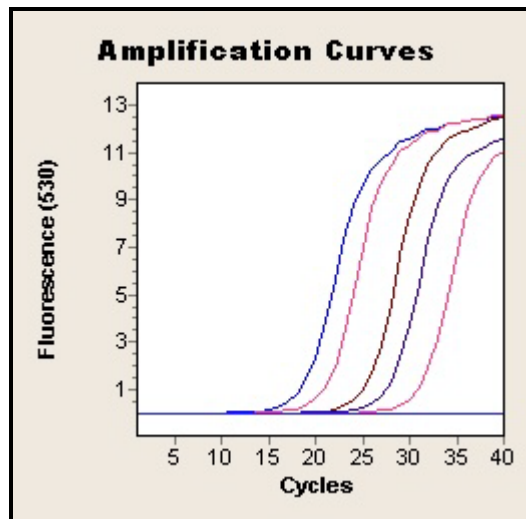


Figura 24. Curvas de amplificación de los distintos patrones y el control negativo para la PCR de *V. vulnificus*

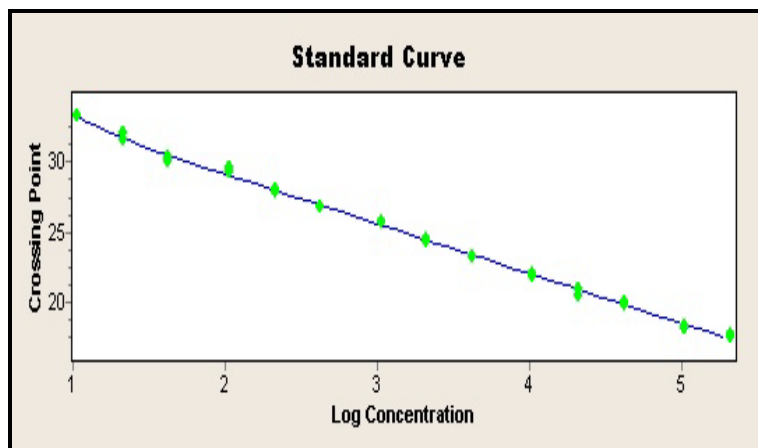


Figura 25. Curva patrón obtenida para la PCR de *V. vulnificus* con una eficiencia de 1.917 y un error de 0.0128



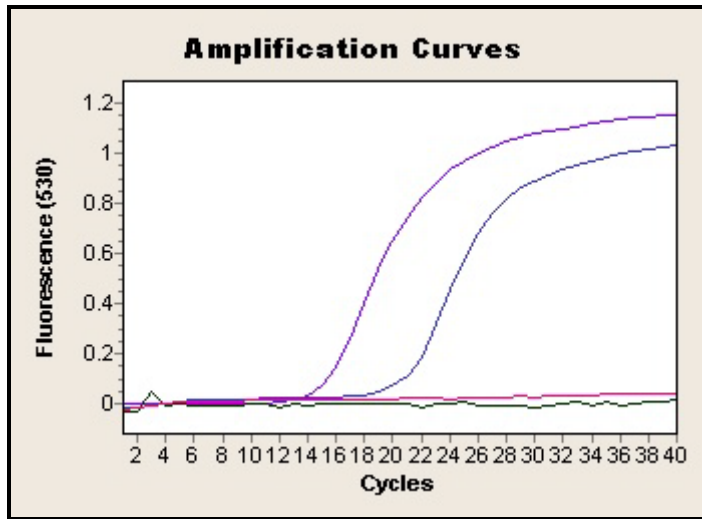


Figura 26. Ensayo de especificidad de la PCR a tiempo real para *V. vulnificus* usando la sonda TaqMan VVH-TM

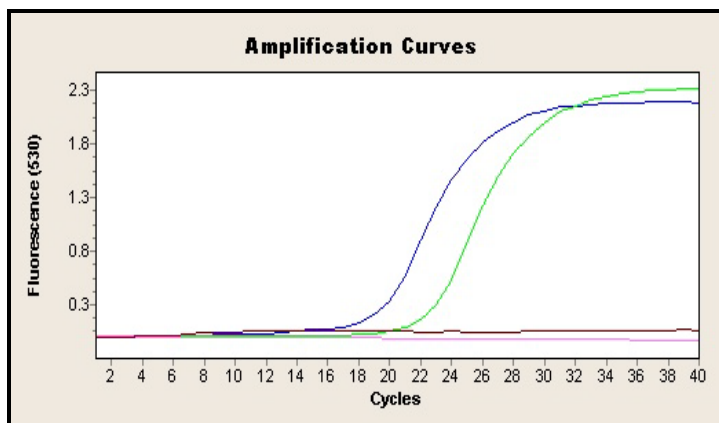


Figura 27. Ensayo de especificidad de la PCR a tiempo real para *V. vulnificus* usando la sonda TaqMan-LNA VVH-TM-LNA

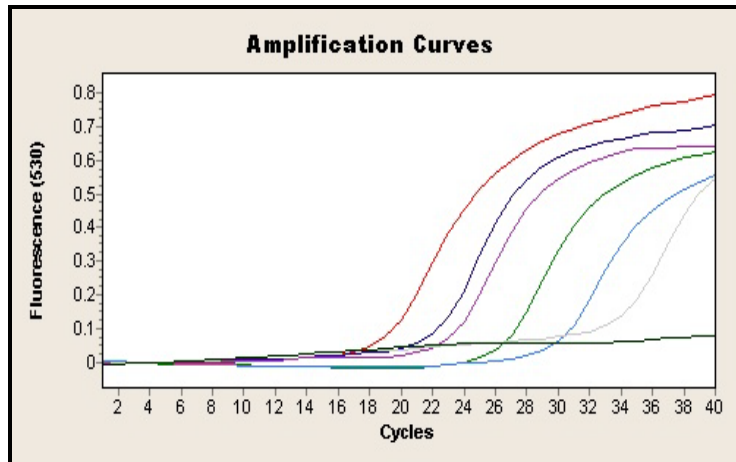


Figura 28. Curvas de amplificación de los distintos patrones y el control negativo para la PCR de *V. vulnificus* usando la sonda VVH-TM

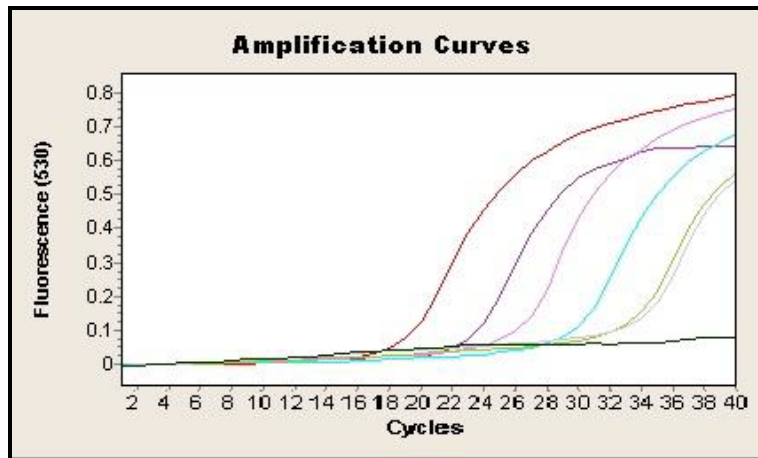


Figura 29. Curvas de amplificación de los distintos patrones y el control negativo para la PCR de *V. vulnificus* usando la sonda VVH-TM-LNA

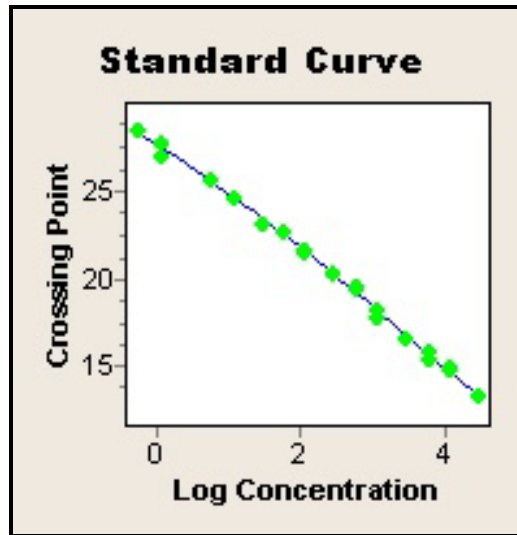


Figura 30. Curva patrón obtenida para la PCR de *V. vulnificus* (usando la sonda TaqMan) con una eficiencia de 1.936 y un error de 0.0175

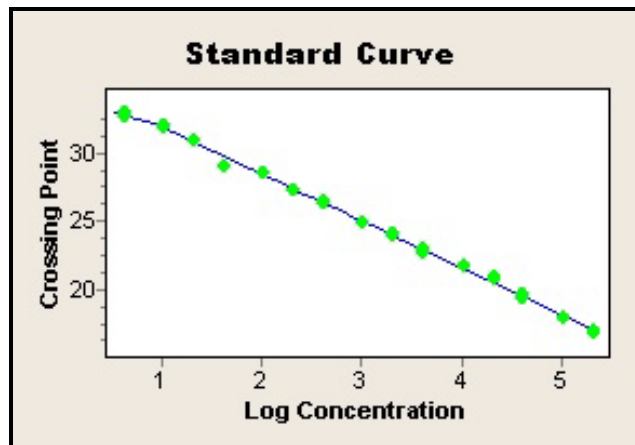


Figura 31. Curva patrón obtenida para la PCR de *V. vulnificus* (usando la sonda TaqMan-LNA) con una eficiencia de 1.929 y un error de 0.0219



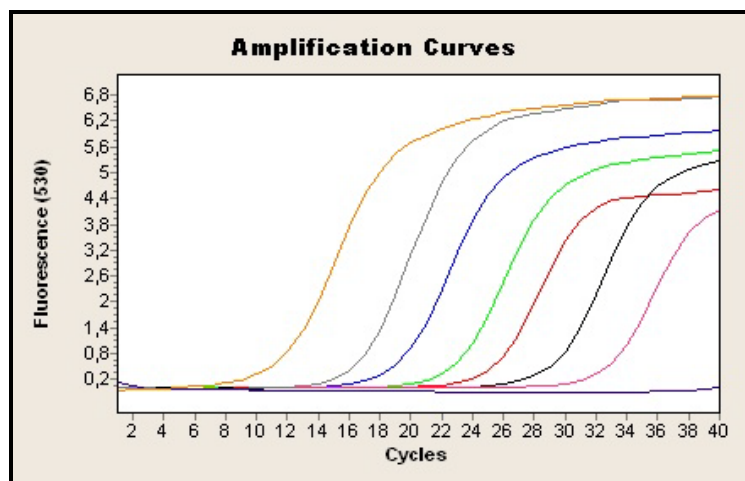
**ANEXO VII: OTRAS FIGURAS**

Figura 1. Límite de detección de la PCR a tiempo real de *V. parahaemolyticus* usando como matriz mejillón, antes del enriquecimiento

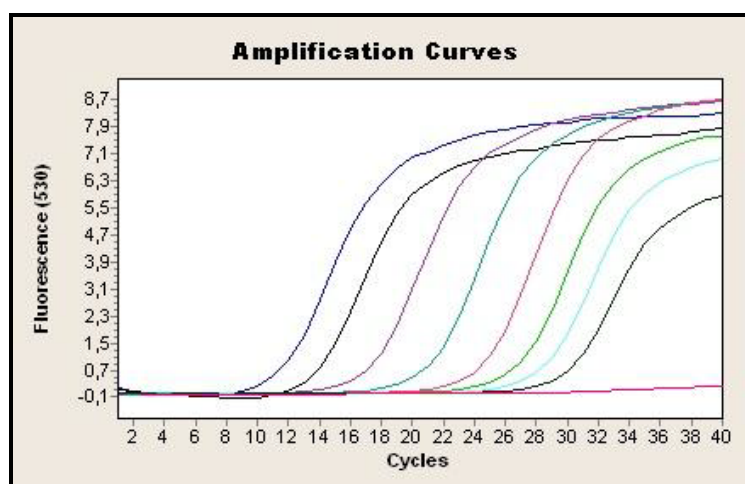


Figura 2. Límite de detección de la PCR a tiempo real de *V. parahaemolyticus* usando como matriz agua, antes del enriquecimiento

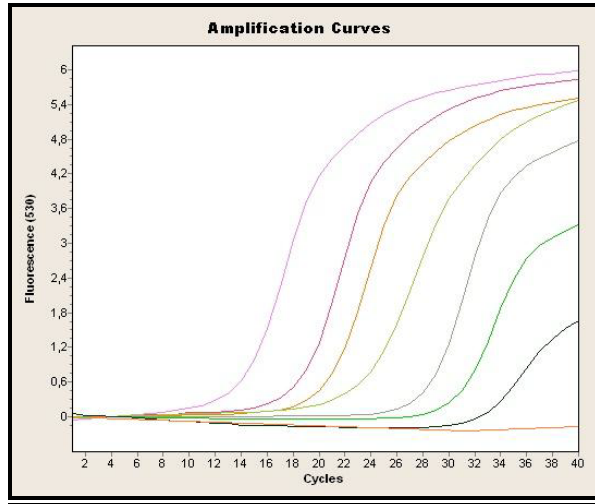


Figura 3. Límite de detección de la PCR a tiempo real de *V. vulnificus* usando como matriz mejillón, antes del enriquecimiento

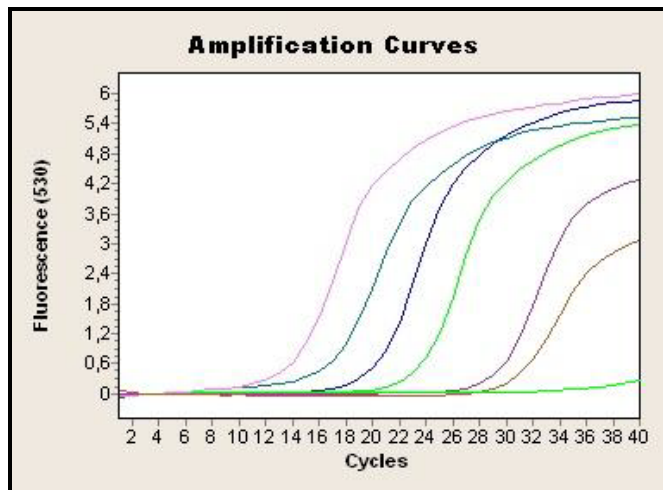


Figura 4. Límite de detección de la PCR a tiempo real de *V. vulnificus* usando como matriz agua, antes del enriquecimiento

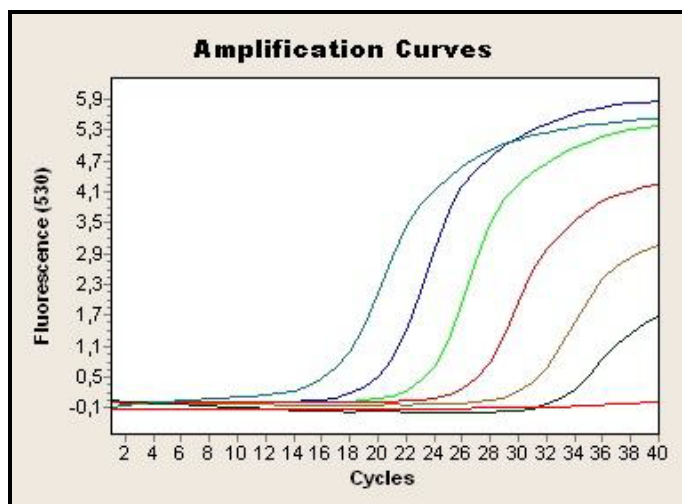


Figura 5. Límite de detección de la PCR a tiempo real de *V. vulnificus* usando como matriz mejillón, antes del enriquecimiento

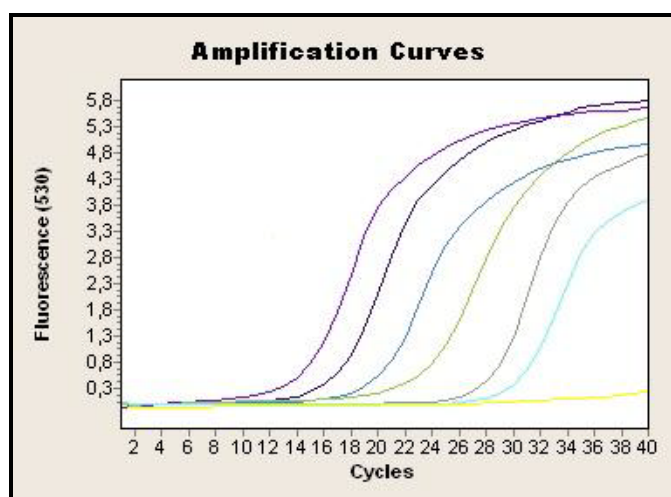


Figura 6. Límite de detección de la PCR a tiempo real de *V. vulnificus* usando como matriz agua, antes del enriquecimiento





**ANEXO VIII: PUBLICACIONES CIENTÍFICAS**

Author's personal copy

Microbiological Research 165 (2010) 657–664

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
**Microbiological  
Research**
[www.elsevier.de/micres](http://www.elsevier.de/micres)

## Detection of *Vibrio vulnificus* in seafood, seawater and wastewater samples from a Mediterranean coastal area

Irene Cañigral<sup>a</sup>, Yolanda Moreno<sup>a</sup>, Jose L. Alonso<sup>b</sup>,  
Ana González<sup>a</sup>, María A. Ferrús<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Biotechnology, Polytechnic University of Valencia, Valencia, Spain<sup>b</sup>Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente, Polytechnic University of Valencia, Valencia, Spain

Received 30 October 2009; received in revised form 23 November 2009; accepted 28 November 2009

**KEYWORDS**

*Vibrio vulnificus*;  
Seafood;  
Sewage;  
Detection;  
Real-time PCR

**Summary**

*Vibrio vulnificus* is an opportunistic human pathogen that may cause gastroenteritis, severe necrotizing soft-tissue infections and primary septicemia, with a high lethality rate. Illness is associated to ingestion of seafood or to the exposure of contaminated water.

The aim of this work was to determine the occurrence of *V. vulnificus* in water and seafood samples from a coastal area near the Mediterranean (Valencia, Spain). A TaqMan probe-based real-time PCR assay was optimised and applied to 22 sea water, 42 raw sewage and 40 seafood samples. Results were compared with those obtained for culture isolation. The detection level of the PCR assay was 10 CFU g<sup>-1</sup> in inoculated samples. Seven seawater, four shellfish and six wastewater samples were positive by real time PCR. *V. vulnificus* was isolated from two oyster, three sea water and two wastewater samples. All the strains were obtained after 20 h enrichment, except for wastewater strains, which were isolated directly from the sample. To our knowledge, this is the first report on the isolation of *V. vulnificus* from sewage in Spain. Our results about the presence of *V. vulnificus* in food and environmental samples are strong enough to consider that the organism may represent a human health hazard in our geographical area.

© 2009 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Introduction**

*Vibrio vulnificus* is a Gram-negative halophilic bacterium natural inhabitant of estuarine and coastal waters. In healthy individuals, this pathogen

\*Corresponding author. Tel.: +34 963877423;

fax: +34 963879429.

E-mail address: [mferrus@btc.upv.es](mailto:mferrus@btc.upv.es) (M.A. Ferrús).

**“Aislamiento e identificación de *Vibrio vulnificus* de agua y alimentos”**

I.Cañigral, Y. Moreno, A. Jimenez, A. González, M. Hernández, M.A. Ferrús

I.S.B.N: 978-84-96377-98-9. p. 87

XXI CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA SEVILLA DEL 17 AL 20 DE SEPTIEMBRE DE 2007

**“Development and optimization of two real-time pcr system to detect and quantify *Vibrio vulnificus*”**

Irene Cañigral, Yolanda Moreno, E. Millán, P. Olmos, M. Antonia Ferrús

BP-476. p. 257

Abstract book Hosted by the Turkish Microbiological Society, Society of Microbial Ecology and Society of Chemotherapy  
XII INTERNATIONAL CONGRESS OF BACTERIOLOGY AND APPLIED MICROBIOLOGY . 5-9 AUGUST 2008, ISTANBUL

**“Development and optimization of a real-time PCR system to detect and quantify *Vibrio parahaemolyticus*”**

I.Cañigral, Y.Moreno, M.L.Camaró, A. de Benito and M.A.Ferrús

FOOD MICRO 2008. Progamme and abstract book. P Y9

THE 21ST INTERNATIONAL ICFMH SYMPOSIUM “EVOLVING MICROBIAL FOOD QUALITY AND SAFETY”. 30 AUGUST-04 SEPTEMBER 2008, ABERDEEN.

**“Aislamiento e identificación de *Vibrio vulnificus* en agua residual”**

Irene Cañigral, Yolanda Moreno, Inmaculada Amorós y M. Antonia Ferrús

ISBN: 978-84-691-4565-4. p. 13

VII REUNIÓN CIENTÍFICA MICROBIOLOGÍA DEL MEDIO ACUÁTICO. 25-27 SEPTIEMBRE DE 2008. BILBAO

**“Detection of *Vibrio vulnificus* in wastewater samples from different treatment plants of Mediterranean coastal area”**

Irene Cañigral, Y. Moreno, P. Santiago, M. A. Castillo, S. Botella, A. Jiménez, M. A. Ferrús

International Water Association (IWA), The Water Research Conference. Lisboa, 11-14 Abril 2010

**“Use of a Polymerase Chain Reaction Assay for rapid detection and identification of *V.vulnificus*”**

Irene Cañigral, Y. Moreno, A. Adrados, A. González and M. A. Ferrús

20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)

Viena, 10-13 Abril 2010





