

<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 V. VULNIFICUS</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 VIBRIO SPP., VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS Y VIBRIO VULNIFICUS 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 $10^4$ 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. parahemolyticus</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