

# Biosensado de patógenos de interés en acuicultura

Luis A. Tortajada Genaro

Profesor Titular. Universitat Politècnica de València



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

UJI UNIVERSITAT JAUME I



UNIVERSITAT Miguel Hernández



Universidad Católica de Valencia  
San Vicente Mártir



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

think in azul

This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.11) and by *Generalitat Valenciana*



MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN



Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia



GENERALITAT VALENCIANA  
Conselleria de Innovació, Universitats, Ciència i Societat Digital

GVA NEXT

Fondo Next Generation en la Comunidad Valenciana

# Descripción del Grupo de Trabajo



Diagnóstico basado en sistemas portátiles y sencillo



Reconocimiento molecular y detección óptica

Información de apoyo a la acuicultura



This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by *Generalitat Valenciana*



# Objetivos y tareas

- **Objetivo 4.1** (L A2.2, L A2.9, L A.28) Identificar y caracterizar nuevas patologías emergentes, y desarrollar y mejorar métodos de diagnóstico y detección de patógenos en acuicultura.
- **Objetivo 4.5** (L A2.2, L A2.20) Crear una Red Mediterránea de Investigación sobre Sanidad en Acuicultura (REMEDISA) que integre el conocimiento de grandes grupos de agentes infecciosos (virus, bacterias y parásitos) y la diversidad de experiencias y capacidades de grupos de I+D+i de la Comunidad Valenciana.
- **Objetivo 4.6** (L A3.12) Divulgar los resultados del proyecto, transferir las herramientas científico-técnicas generadas al sector y concienciar a la sociedad sobre el desarrollo sostenible de la acuicultura mediterránea.
- **Objetivo 4.7** (L A3.12) Formar personal competente en salud y bienestar animal en acuicultura.



This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by *Generalitat Valenciana*



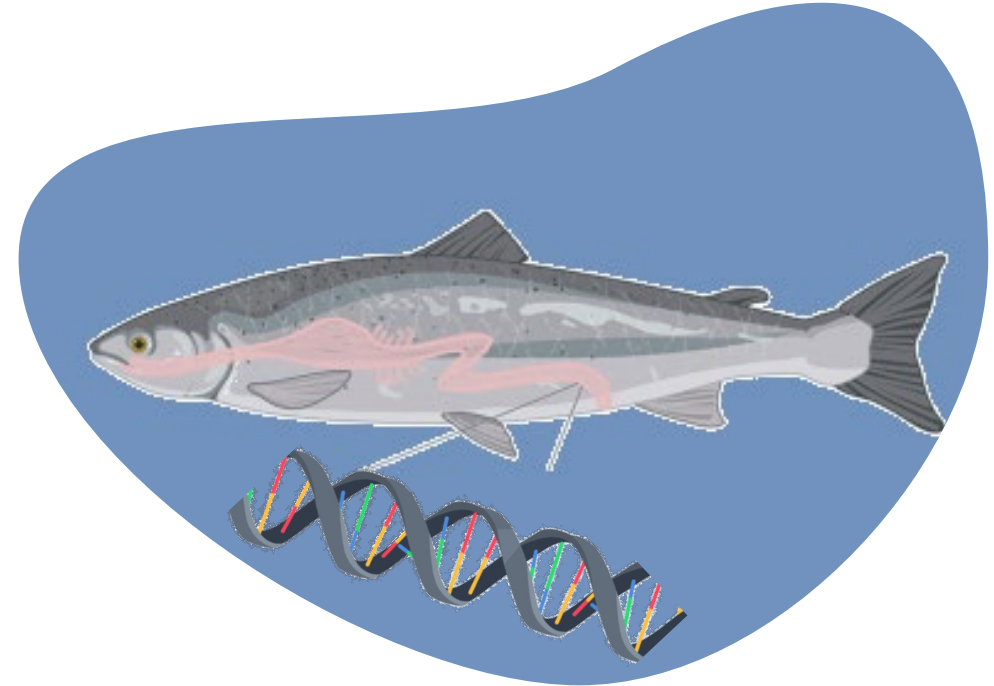
# Objetivos y tareas

## Tarea 4.1.5 Detección alternativa de patógenos (M6-M35)

Supone la toma de muestras sin sacrificio del pez, buscando presencia de patógenos (tanto virus, bacterias o parásitos), en biofouling o en el agua (eDNA), o en hospedadores intermediarios. Incluye la evaluación del riesgo de la transmisión interespecífica entre vectores, hospedadores intermediarios o peces salvajes y animales del sistema de producción; Diseño de ensayo múltiple para obtener el perfil molecular del ADN ambiental en granjas.

**Responsables: UPV1**

**Participantes: CSIC3, UMH2, UPV1, UV1, UV3**



This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by *Generalitat Valenciana*

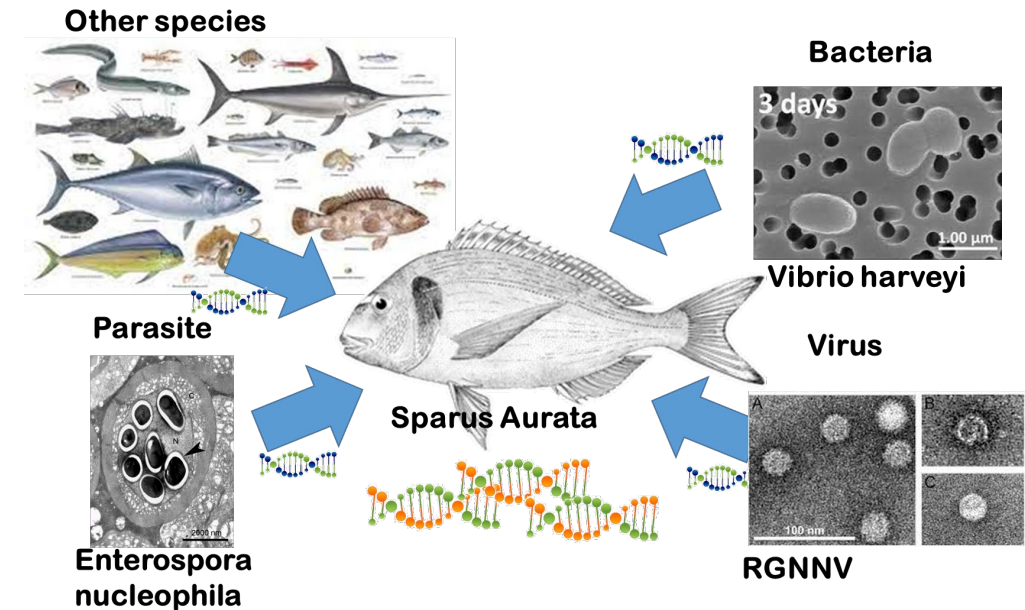


# Resultados obtenidos hasta el momento

- Actividad 1. Selección de dianas

Los diferentes socios han propuesto 1-2 patógenos relevantes para el desarrollo del sistema de biosensado

	Socio	DIANA	Modelo
1	UV	Bacteria	Vibrio vulnificus y V. harveyi
2	IATS-CSIC	Parásito	Enterospora nucleophila
3	UV	Parásito	Cardicola: Cardicola Forsteri, Cardicola Opisthorchis y Cardicola Orientalis
4	UMH	Virus	Red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV)
5	UPV+ empresa	Peces	Especies Mediterráneo



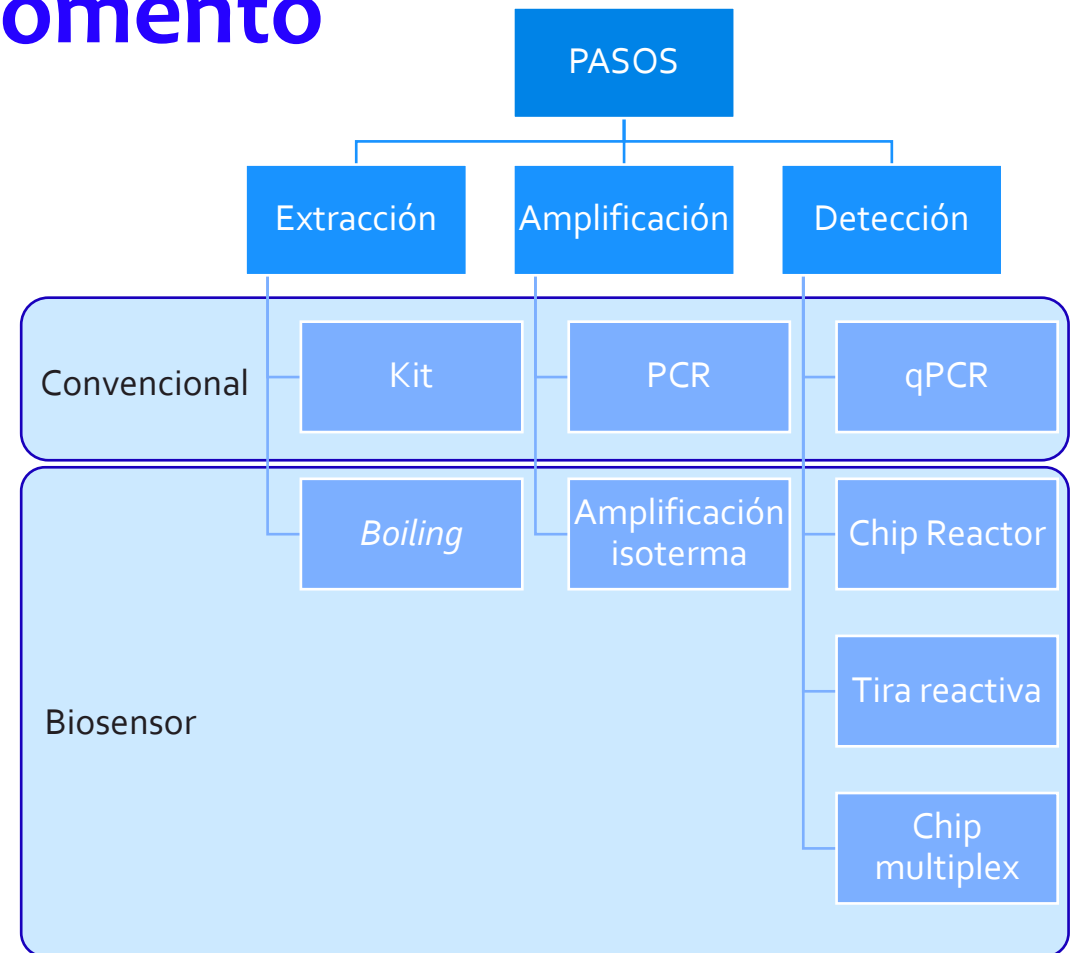
# Resultados obtenidos hasta el momento

## • Actividad 2. Selección de la tecnología de biosensado

Existen diferentes aproximaciones que permita la detección o identificación de un patógeno.

La solución propuesta presenta ventajas frente los métodos actuales basado e qPCR o secuenciación.

- Mayor sencillez
- Menor coste
- Respuesta más rápida
- Fácil interpretación
- Compatible con la muestra: agua 1-2 L



# Resultados obtenidos hasta el momento

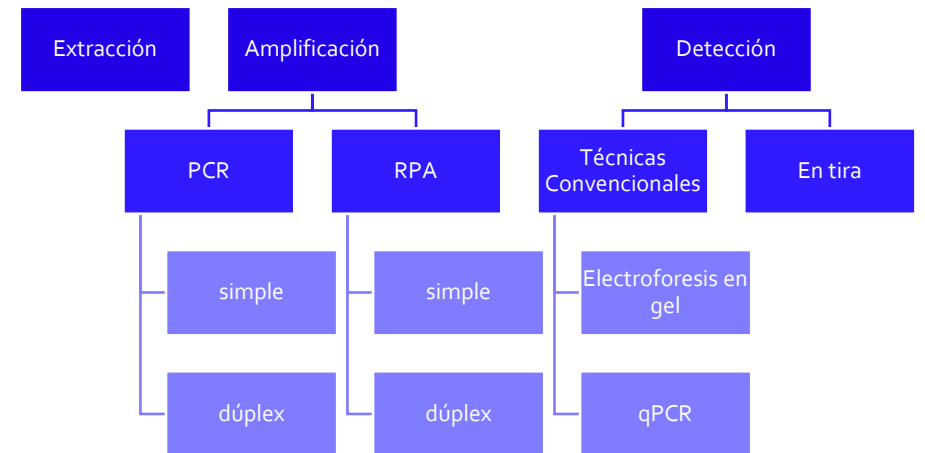
- Actividad 3. Biosensor para bacterias Vibrio (tiras simples)

Desarrollar un ensayo de detección de las bacterias *Vibrio vulnificus* y *Vibrio harveyi* basado en los genes *vvhA* y *toxR*.

- Extracción ADN genómico con kit
- Amplificación isoterma: single y duplex
- Técnicas de confirmación: PCR específica, electroforesis, fluorescencia, hibridación, qPCR

Detección: tira reactiva.

Colaboración con el grupo UV. Microbiología

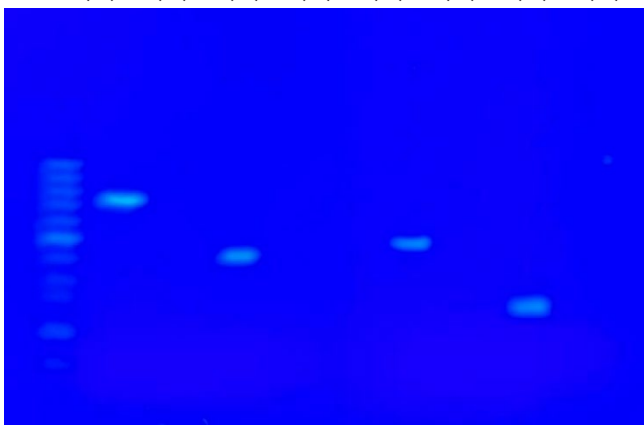


# Resultados obtenidos hasta el momento

Amplificación PCR (termociclado, 90 min)

Amplificación isoterma (37°C, 45 min)

Ladder Vv4 Vv4-Ø Vv4 Vv4-Ø VhB VhB-Ø VhB-Ø VhB-Ø  
(R1) (R1) (R2) (R2) (R1) (R1) (R2) (R2)

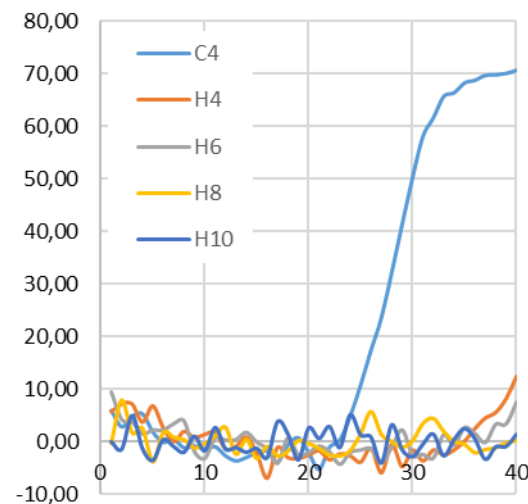


El tamaño de los productos de PCR es el esperado:

- *Vibrio vulnificus*:  
O PCR: 519 pb.  
O PCR anidada: 192 pb.

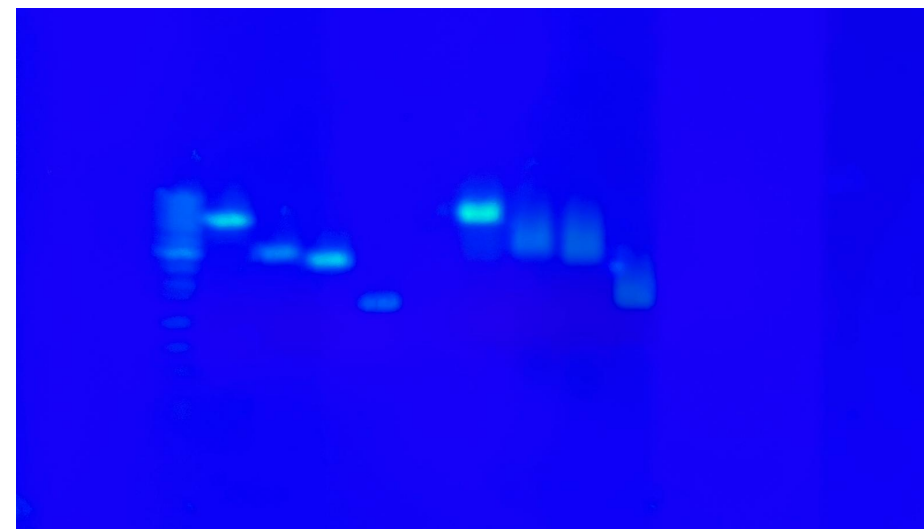
- *Vibrio harveyi*: FIS-Bo6 y FIS-B16  
O PCR: 383 pb.  
O PCR anidada: 180 pb

qPCR



Optimización variables experimentales

Lad	PCR	PCR	PCR	PCR	RPA	RPA	RPA	RPA	RPA	RPA	RPA	RPA
der	2-15	5-16	3-15	6-16	2-15	5-16	3-15	6-16	2-15	5-16	3-15	6-16
					NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC



This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.1a) and by *Generalitat Valenciana*

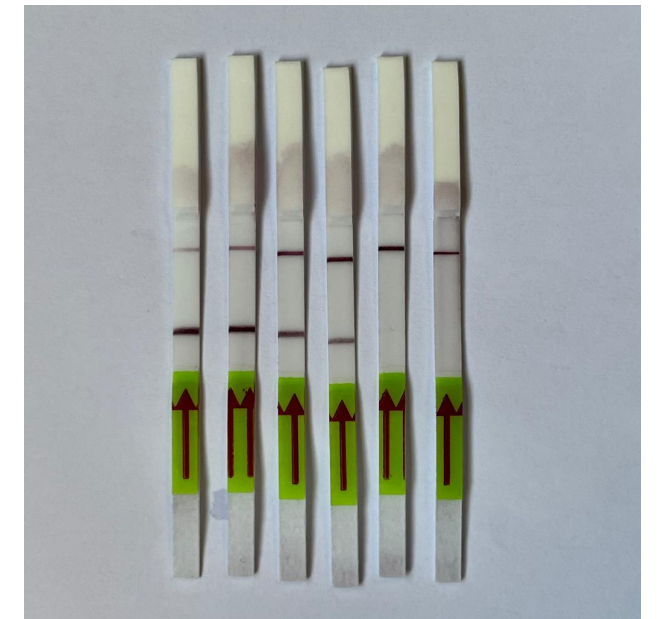
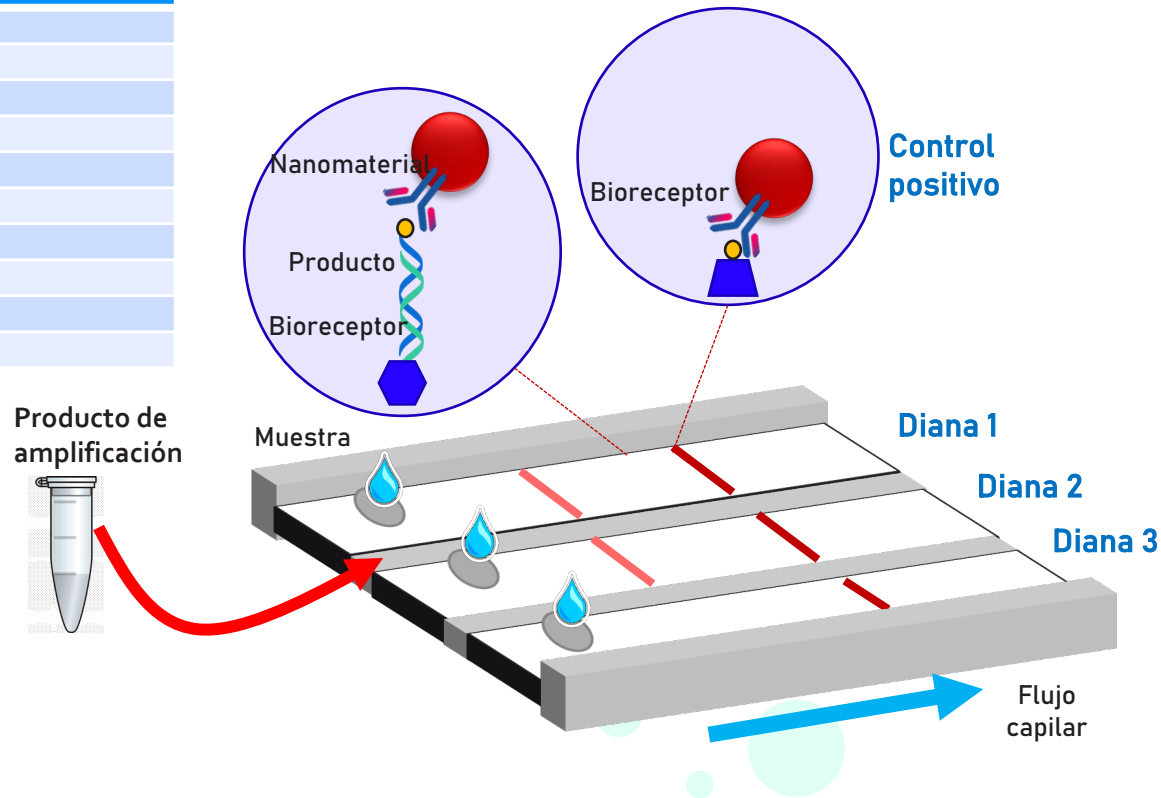




# Resultados obtenidos hasta el momento

## Detección: tira de flujo lateral

	Muestras
Vv1	Vibrio vulnificus
Vv2	Vibrio vulnificus
Vv3	Vibrio vulnificus
Vv4	Vibrio vulnificus
Vv5	Vibrio vulnificus
VhA	Vibrio harveyi
VhB	Vibrio harveyi
VhC	Vibrio harveyi
V. al	Vibrio alginolyticus
V. an	Vibrio anguillarum



Producto, 1, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 y 1/100000.

# Grado de consecución de las tareas

Tarea 4.1.5

30%

## Diseño y desarrollo de prototipos

Actividad 1

Selección de dianas

100%

Actividad 2

Selección de tecnología

80%

Actividad 3

Biosensor para bacterias Vibrio (tiras simples)

75%

Actividad 4

Biosensor para parásito Enterospora (tira simple)

10%

Actividad 5

Biosensor para parásito Cardicola (tira simple)

5%

Actividad 6

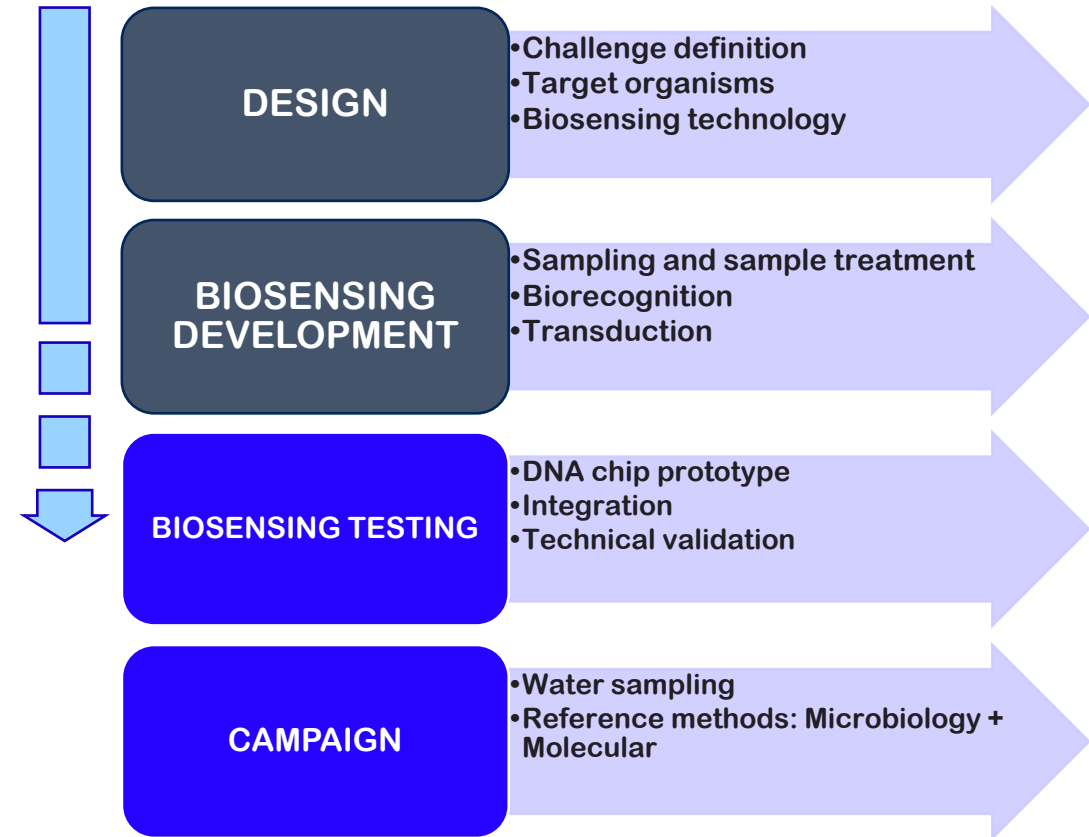
Biosensor para virus RGVNN (tira simple)

5%



# Hoja de ruta 6 próximos meses

- Avanzar con el **desarrollo de los sistemas de biosensado** de los patógenos seleccionados, utilizando el formato de ensayo de amplificación isoterma y detección basada en tira de flujo lateral
- Investigar **sistemas integrados** que faciliten el ensayo: **chip y lector óptico**
- Aplicar las metodologías y prototipos desarrollados al **análisis de muestras de agua** representativas.



# We're thinking in azul

Thanks | Gràcies

## Project Coordinators

Jaume Pérez-Sánchez  
[jaime.perez.sanchez@csic.es](mailto:jaime.perez.sanchez@csic.es)  
Carlos Valle Pérez  
[carlos.valle@ua.es](mailto:carlos.valle@ua.es)

## Project Manager

Leyre Rivero Álvarez  
[leyre.rivero@csic.es](mailto:leyre.rivero@csic.es)



This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by *Generalitat Valenciana*



Luis A. Tortajada Genaro

Profesor Titular. Universitat Politècnica de València

