

Biosensado de patógenos de interés en acuicultura (Medfishchip)

Luis A. Tortajada Genaro, P. Quintero, B. Martín, F.J. Espinós, A. Maquieira

Universitat Politècnica de València. Departamento Química-Instituto IDM



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



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*

Descripción del Grupo de Trabajo



Diagnóstico basado en sistemas portátiles, efectivos y operativos in situ incorporando tecnologías robustas



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-C17.11) and by *Generalitat Valenciana*



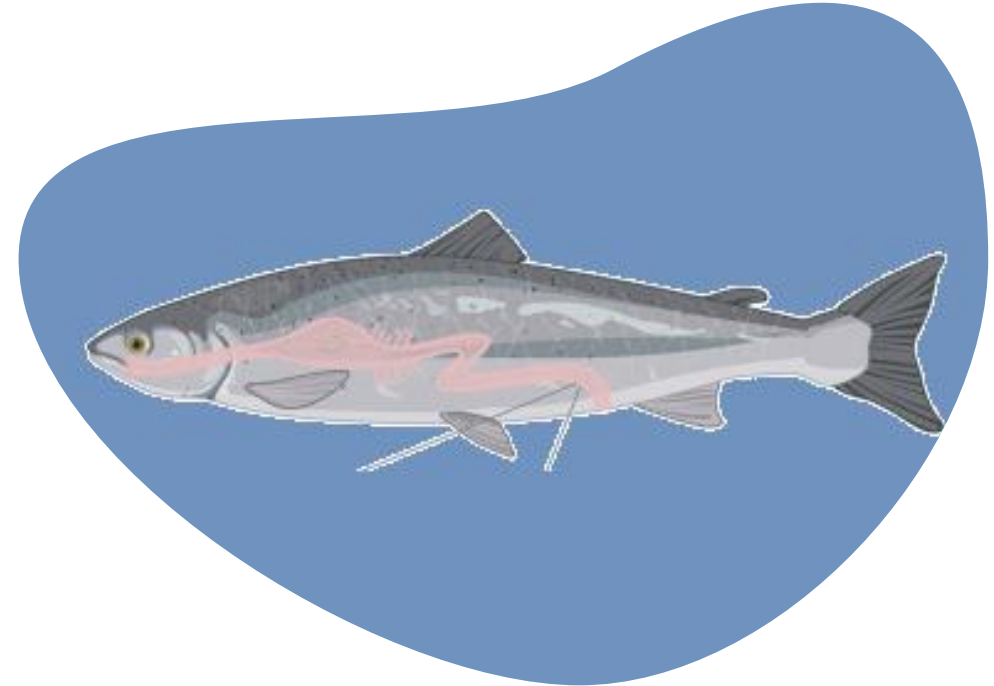
Resultados obtenidos

Tarea 4.1.5 Detección alternativa de patógenos (M6-M35)

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

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-C17.11) and by *Generalitat Valenciana*

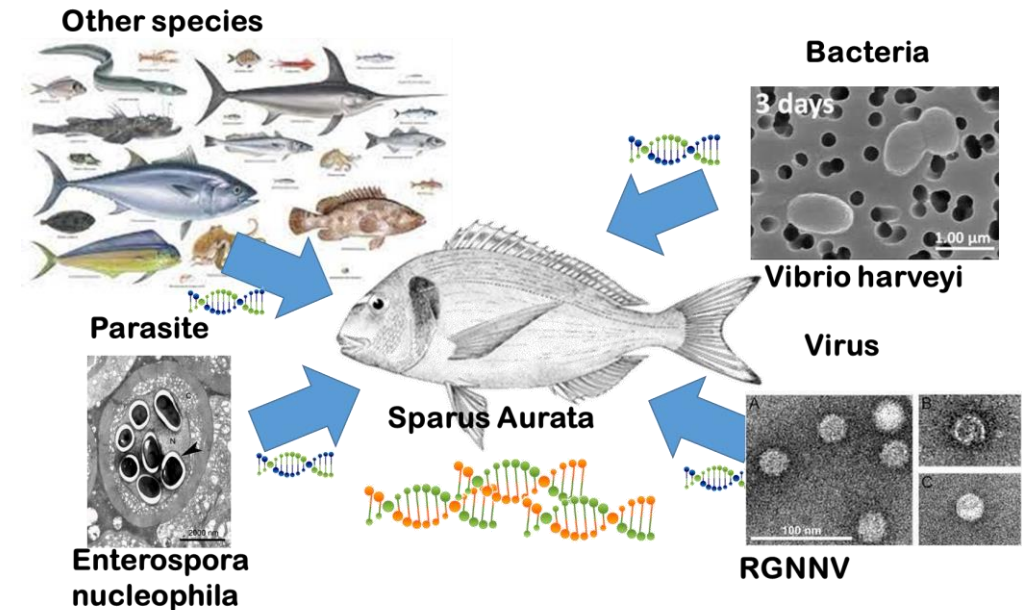


Resultados obtenidos

• 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	<i>Vibrio vulnificus</i> y <i>V. harveyi</i>
2	IATS-CSIC	Parásito	<i>Enterospora nucleophila</i>
3	UV	Parásito	<i>Cardicola</i>
4	UMH	Virus	<i>Red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV)</i>
5	UPV+ empresa	Peces	<i>Especies Mediterráneo</i>



Resultados obtenidos

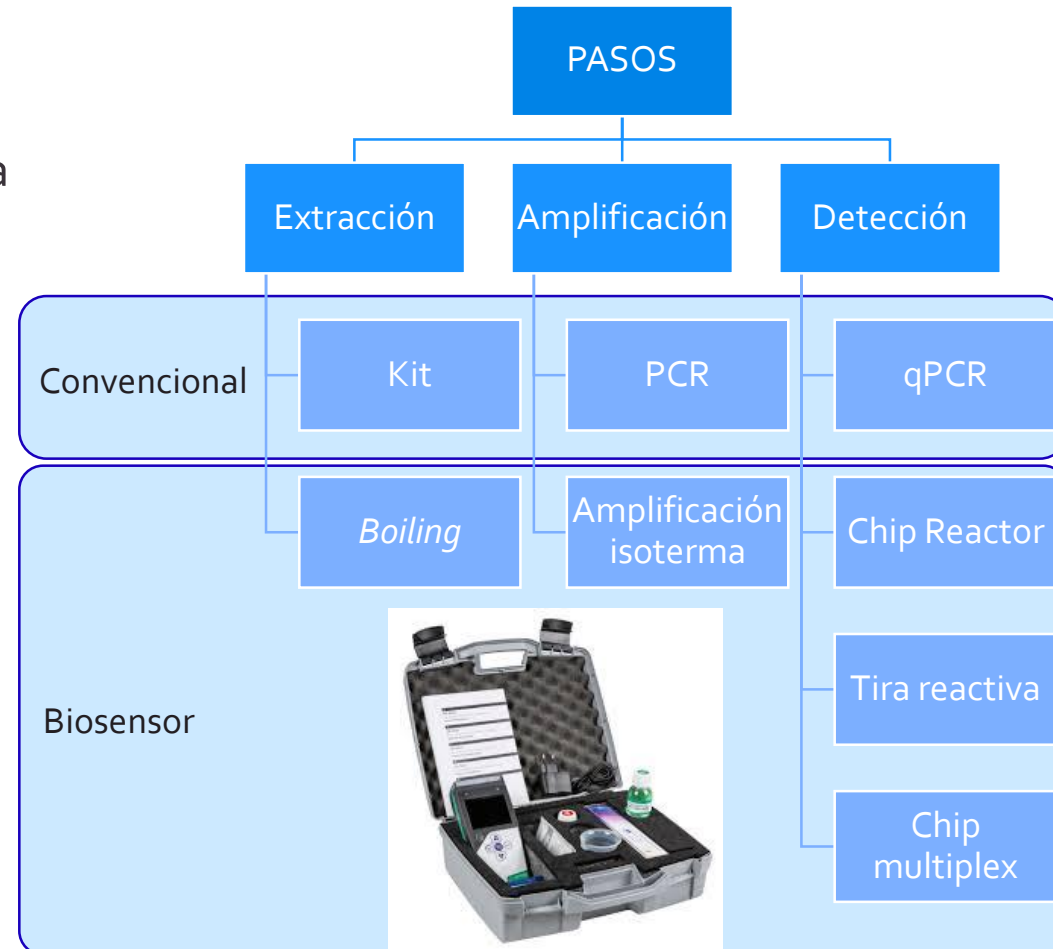
• Actividad 2. Selección de la tecnología de biosensado

Existen diferentes aproximaciones que permita la detección o identificación de un patógeno. La solución propuesta presenta ventajas frente los métodos actuales basado en qPCR o secuenciación.

- Portabilidad. Detección in situ
- Mayor sencillez
- Menor coste
- Respuesta más rápida
- Fácil interpretación
- Compatible con la muestra: agua 1-2 L



Lateral flow assay



• **Actividad 3. Biosensado de bacterias Vibrio (tiras simples)**

Colaboración con el grupo UV. Microbiología

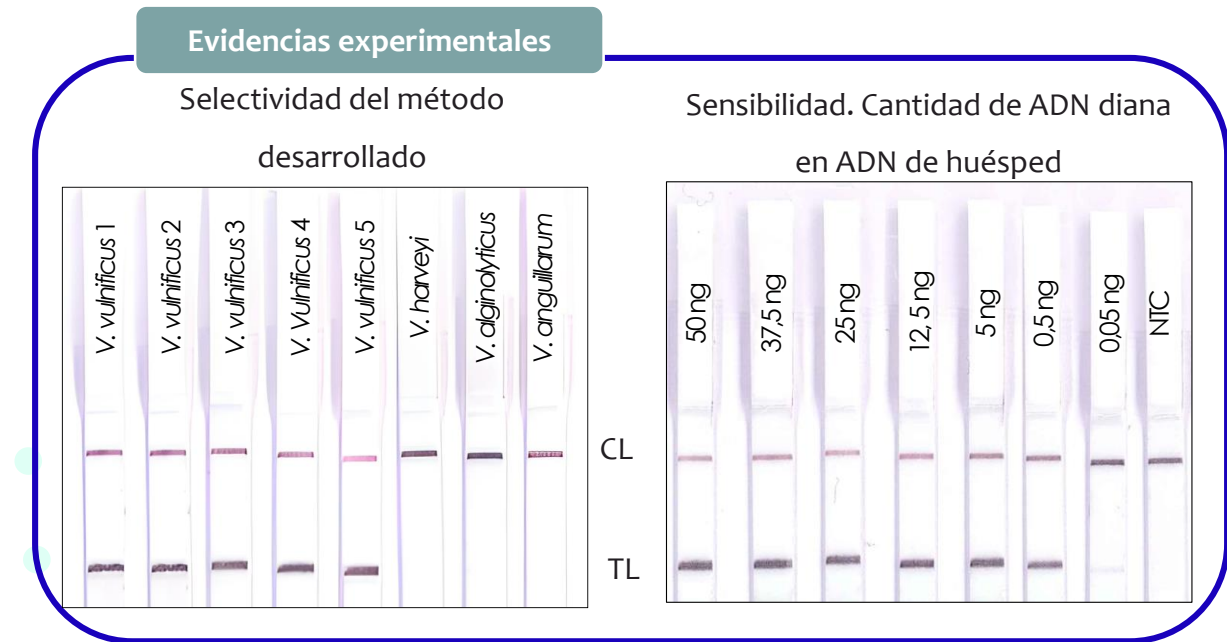
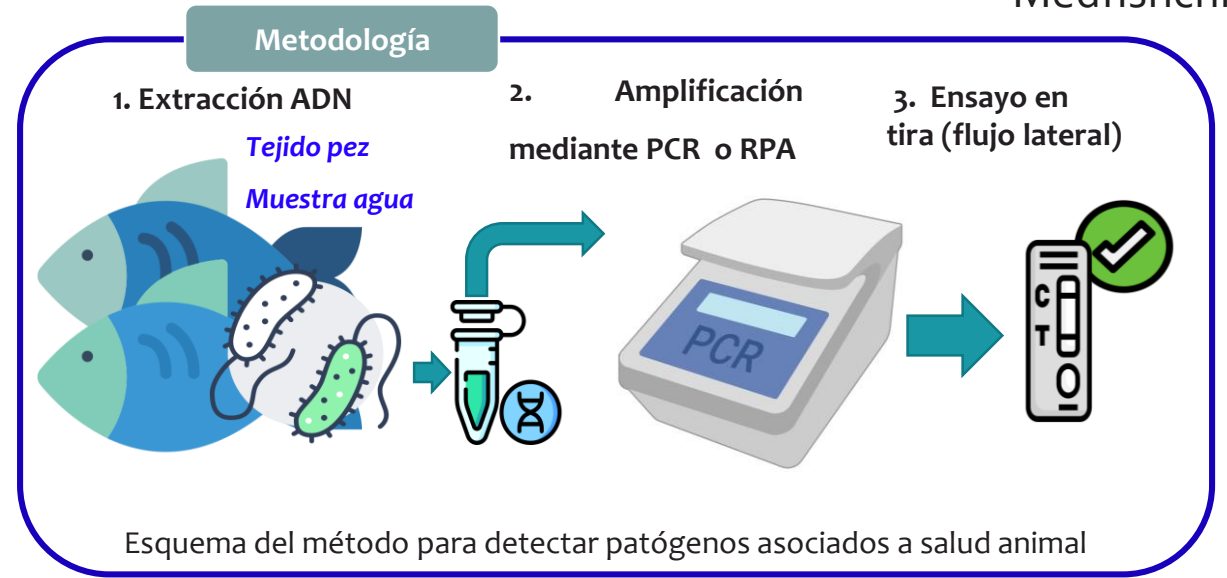
Desarrollar un ensayo de detección de las bacterias *Vibrio vulnificus* y *Vibrio harveyi* basado en los genes *vvhA* y *toxR*.

- Extracción ADN genómico
- Amplificación isoterma: RPA, single y duplex
- Detección: tira reactiva.
- Técnicas de confirmación: PCR específica, electroforesis, fluorescencia, hibridación, qPCR
- Aplicado a muestras de agua (campana de muestreo)



TAREAS

- Comparación de experimentos
- Redacción artículo



• Actividad 4. Biosensado del parásito *Enterospora nucleophila*

Colaboración con el grupo IATS-CSIC

Desarrollar un ensayo de detección del parásito *Enterospora nucleophila* basado en el gen SSU RNA.

- Amplificación isoterma: RPA y LAMP
- Detección: tira reactiva.
- Técnicas de confirmación: PCR específica, electroforesis, fluorescencia, hibridación, qPCR

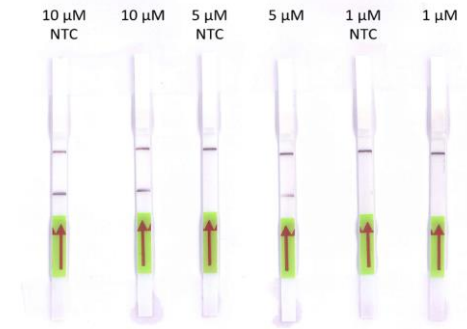
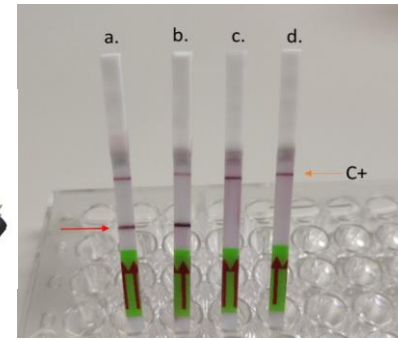


TAREAS

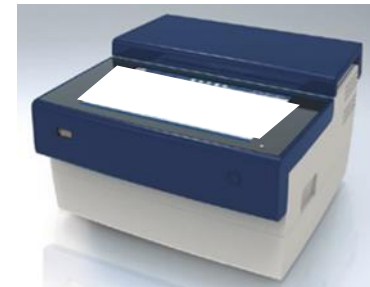
- Divulgación. Congreso
- Establecer prestaciones analíticas
- Aplicar a muestras de peces y agua



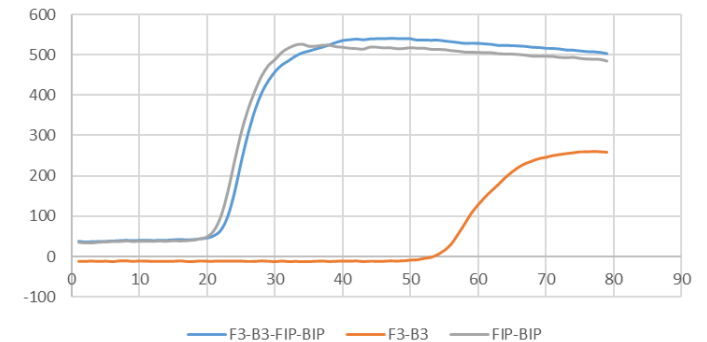
Equipo portable 2,5 Kg
50-400 €



qLAMP



Equipo portable 4 Kg
230 x 200 x 138 mm
< 1000 €



- Actividad 5. Biosensado del parásito Cardicola

Colaboración con el grupo UV-IcPar

Desarrollar un ensayo de detección de los parásitos *Cardicola sp.* basado en el gen ITS.

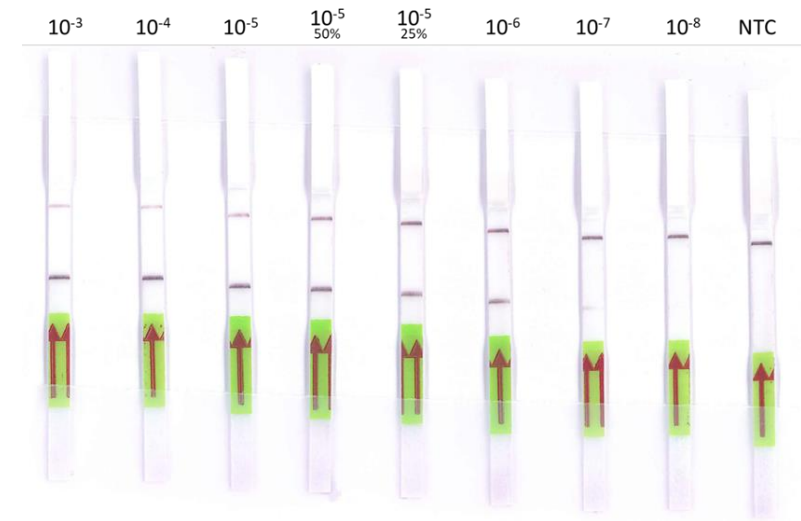
- Amplificación isoterma: RPA
- Detección: tira reactiva.
- Técnicas de confirmación: PCR específica, electroforesis, fluorescencia, hibridación, qPCR



TAREAS

- Optimizar biorreconocimiento y detección
- Establecer prestaciones analíticas
- Aplicar a muestras de peces y agua

PCR
Cardicola sp.



RPA
Cardicola sp.



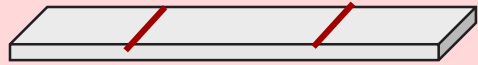
Resultados preliminares

**WORK
IN PROGRESS**

**WORK
IN PROGRESS**

CONFIDENTIAL

VISUAL DIRECTA



Limitaciones

- Subjetividad
- Variabilidad en la iluminación
- Falta de sensibilidad
- Ausencia de documentación
- Limitada capacidad de comparación

PROTOTIPO DE LECTURA

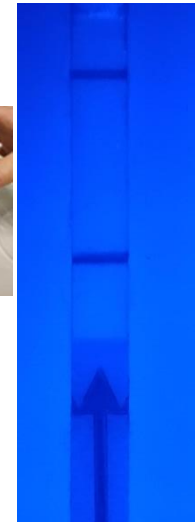
- Compacto
- Portátil
- Robusto
- Barato



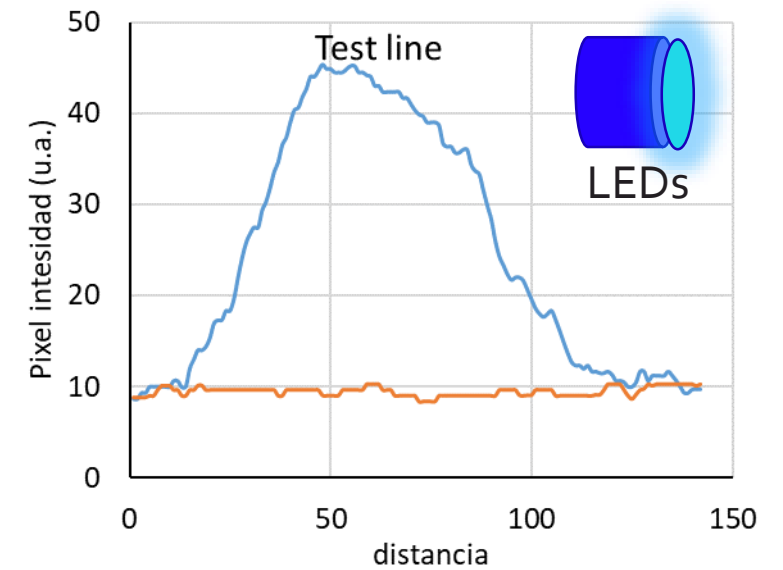
Componentes

- Iluminación
- Cámara
- Conectividad
- Caja protectora

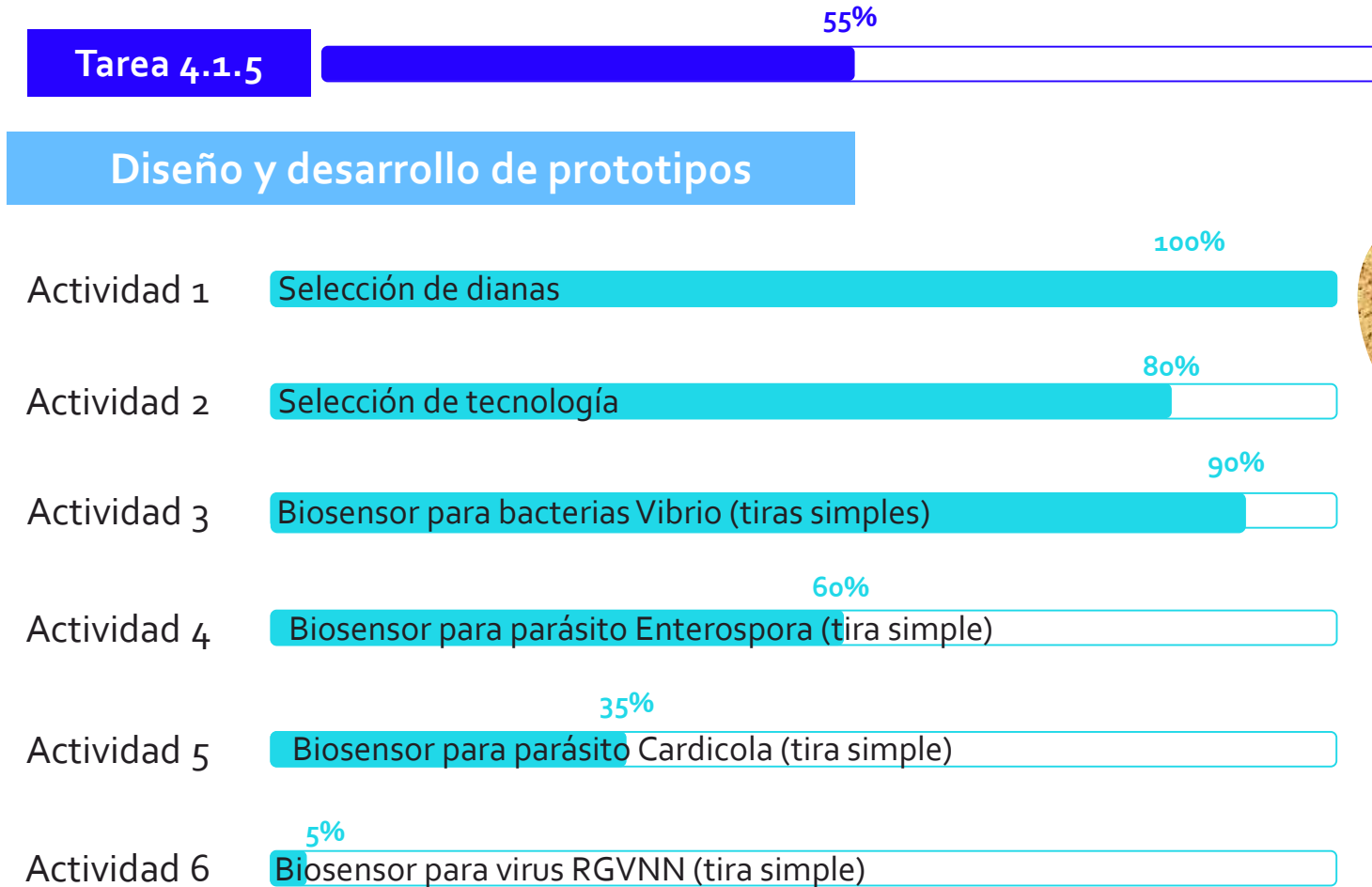
IMAGEN



DATOS



Grado de consecución de las tareas



Desviaciones del programa inicial

- No procede

Colaboraciones con grupos GVA-ThinkInAzul

- A valorar

Colaboraciones con grupos ThinkInAzul Nacionales

- A valorar



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*



Hoja de ruta para 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

Gracias | Gràcies

Project Coordinators

Jaume Pérez-Sánchez
jaime.perez.sanchez@csic.es
Carlos Valle Pérez
carlos.valle@ua.es

Project Manager

Leyre Rivero Álvarez
leyre.rivero@csic.es



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

Luis A. Tortajada Genaro
Profesor Titular. Universitat Politècnica de València

