



ALLIANCE™

(<https://debug.globalseafood.org>).



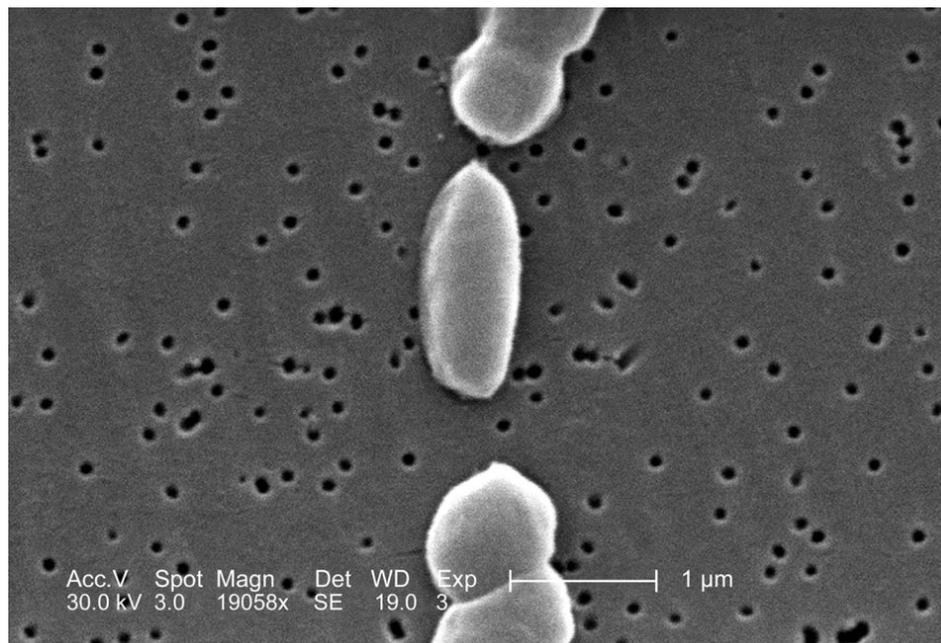
Health &
Welfare

Un ensayo RPA rápido y sensible para la detección de Vibrio parahaemolyticus en productos de mar

13 April 2020

By Dr. Yunyun Geng , Dr. Ke Tan , Dr. Libing Liu , Dr. Xiao Xia Sun , Dr. Baohua Zhao and Dr. Jianchang Wang

Desarrollo exitoso, pruebas son prometedoras para otras industrias



Esta micrografía electrónica de barrido (SEM) muestra una serie de bacterias *Vibrio parahaemolyticus* (Mag. 19058x), un patógeno serio en las industrias de mariscos y otras industrias alimenticias. Foto de CDC / Janice Carr. Dominio público.

La bacteria *Vibrio parahaemolyticus* está naturalmente presente en ambientes costeros salobres y con frecuencia se aísla de una variedad de mariscos. Esta bacteria es un importante patógeno transmitido por mariscos que causa trastornos gastrointestinales debido a la ingestión de mariscos crudos o poco cocidos que contamina. En los últimos años, los brotes de infecciones por *V. parahaemolyticus* han sido un importante problema de salud pública en muchos países. Además, el número de infecciones por *V. parahaemolyticus* ha aumentado y su alcance se ha ampliado a nivel mundial durante los últimos años.

Las personas infectadas con *V. parahaemolyticus* se caracterizan por un trastorno de gastroenteritis aguda con signos clínicos de diarrea, dolor de cabeza y vómitos. Las poblaciones de baja inmunidad que se infectan con *V. parahaemolyticus* pueden desarrollar septicemia en casos graves. Controlar la cantidad de *V. parahaemolyticus* en los mariscos es una forma efectiva de prevenir la infección por este patógeno; por lo tanto, es importante determinar los niveles de esta bacteria en mariscos.

El diagnóstico temprano y rápido es crucial para el tratamiento de la infección por *V. parahaemolyticus*. Se han reportado diferentes métodos de diagnóstico para la infección por *V. parahaemolyticus*. El cultivo convencional y los métodos inmunológicos son técnicas comunes utilizadas para la detección de esta bacteria. Sin embargo, requieren mucho tiempo y tardan unos días en proporcionar un resultado confirmado después de numerosos pasos analíticos.

Los avances en biotecnología han llevado al desarrollo de una serie de tecnologías de detección molecular basadas en la amplificación de genes para *V. parahaemolyticus*, con diversos grados de sensibilidad y especificidad. Estos incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otros. Sin embargo, estas pruebas pueden ser poco prácticas para la aplicación in situ debido a los costosos

instrumentos requeridos y la operación que requiere mucho tiempo. Todavía se necesita una plataforma simple, rápida, precisa y fácil de usar para la detección temprana de punto de necesidad (POD) de la infección por *V. parahaemolyticus*.

La amplificación de la polimerasa recombinante (RPA), una novedosa técnica de amplificación de genes isotérmicos, ha demostrado ser un ensayo molecular simple, rápido, específico, sensible y rentable para identificar diversos patógenos. El proceso RPA para la amplificación exponencial de la secuencia objetivo se puede lograr en 20 minutos o menos.

Este artículo, adaptado y resumido de la **publicación** (<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1562-z>). **original** [Geng, Y. et al. 2019. Desarrollo y evaluación de un ensayo RPA rápido y sensible para la detección específica de *Vibrio parahaemolyticus* en mariscos. BMC Microbiol 19, 186 (2019): describe un estudio para desarrollar y evaluar un método de RPA en tiempo real para la detección simple y rápida de *V. parahaemolyticus*.

Configuración del estudio

Se usaron un total de cinco cepas de *V. parahaemolyticus*, otras cinco especies de *Vibrio* y otras 22 cepas bacterianas para determinar la especificidad del RPA en tiempo real. Para obtener información detallada sobre las cepas bacterianas y su extracción de ADN; los cebadores y sonda de RPA; la reacción RPA en tiempo real; el PCR en tiempo real para *V. parahaemolyticus*; análisis de especificidad y sensibilidad analítica; evaluación con muestras contaminadas artificialmente; y métodos estadísticos utilizados, consulte la publicación original.

Este trabajo fue apoyado por el programa de la fundación de investigación científica en las Universidades de la Provincia de Hebei (QN2019025, Hebei, China); la Administración General de Supervisión de Calidad, Inspección y Cuarentena de la República Popular de China (2016IK107, China); y la Ciencia Posdoctoral de Biología de la Universidad Normal de Hebei (183717, Hebei, China).

Resultados y discusión

La reacción RPA en tiempo real se realizó con éxito a 38 grados-C y los resultados se obtuvieron en 20 minutos. El método solo detectó *V. parahaemolyticus* y no mostró reacción cruzada con otras bacterias, exhibiendo un alto nivel de especificidad. El estudio mostró que el límite de detección (LOD) de RPA en tiempo real fue de 1.02×10^2 copias/reacción.

Para muestras contaminadas artificialmente con diferentes concentraciones de bacterias, se pudo detectar *V. parahaemolyticus* en 5 a 12 minutos mediante RPA en tiempo real en salsa de ostras, bacalao y pescado de manga a concentraciones tan bajas como 4 unidades formadoras de colonias (UFC)/25 g, 1 UFC/25 gramos y 7 UFC/25 gramos, respectivamente, después del enriquecimiento durante 6 horas, pero se detectaron en un mínimo de 35 minutos por PCR en tiempo real [con valores de Ct (umbral de ciclo) entre 27 y 32; en un ensayo de PCR en tiempo real, se detecta una reacción positiva mediante la acumulación de una señal fluorescente. Ct es el número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente cruce el umbral y supere el nivel de fondo].

En los últimos años, las enfermedades causadas por patógenos transmitidos por los alimentos se han convertido en un importante problema de salud pública mundial. *V. parahaemolyticus* es uno de los principales patógenos que causan enfermedades transmitidas por los alimentos, y la contaminación de los productos alimenticios con este patógeno se ha convertido en una preocupación vital para la

seguridad alimentaria. Por lo tanto, era necesario contar con técnicas de diagnóstico rápidas, específicas y confiables que se puedan utilizar de manera efectiva para una mejor detección de *V. parahaemolyticus* en mariscos, el medio ambiente y otros tipos de muestras.

En nuestro estudio, establecimos con éxito el ensayo de RPA en tiempo real dirigido a un gen específico de *V. parahaemolyticus*. El RPA convencional se realizó con éxito a 38 grados-C y se completó en 20 minutos. La sensibilidad del ensayo RPA en tiempo real se examinó utilizando diluciones en serie de la plantilla de ADN genómico de *V. parahaemolyticus*. El límite de detección del ensayo RPA en tiempo real fue de 102 copias/reacción.

Si bien los resultados de la detección de *V. parahaemolyticus* por RPA en tiempo real se pudieron obtener en aproximadamente 30 minutos, incluido el tiempo de extracción de ácido nucleico, el tiempo de reacción para muestras positivas alcanzó hasta 1 hora cuando se usa PCR en tiempo real. Además, el ensayo de RPA en tiempo real también fue exitoso en la detección de muestras de mariscos contaminados artificialmente, y funcionó mejor que la PCR en tiempo real con respecto a la velocidad de detección.

Para el ensayo de RPA en tiempo real descrito en este estudio, se pudo detectar *V. parahaemolyticus* en muestras contaminadas artificialmente a concentraciones tan bajas como 1 UFC/25 gramos en 12 minutos. En comparación con otras técnicas de amplificación isotérmica, la RPA no requiere calentamiento inicial para la desnaturalización del ADN y los resultados se pueden obtener en menos de 12 minutos, lo que no incluye el tiempo de enriquecimiento. El ensayo RPA en tiempo real tiene múltiples ventajas sobre otros métodos de amplificación de ADN, incluido un tiempo de resultado más rápido para una sola muestra y otras.

La RPA ha sido ampliamente explorada para la detección molecular de diversos patógenos, y también se han realizado pruebas de campo para el virus del dengue y la infección por el virus de la influenza aviar A. Además, el escáner de tubos portátil utilizado en el estudio, que pesa solo 1.75 kg con dimensiones de 25 cm × 16.5 cm × 8.5 cm, es más simple que la mayoría de las máquinas de PCR en tiempo real y puede usarse en el campo, funcionando con batería para todo un día.

Perspectivas

En este estudio, desarrollamos con éxito un método RPA en tiempo real basado en una exo-sonda para la detección de *V. parahaemolyticus*. Con alta sensibilidad y especificidad, el ensayo puede completarse en 20 minutos y el enfoque es fácil de realizar en entornos clínicos sin necesidad de equipos sofisticados, lo que lo hace aplicable en estaciones de cuarentena, puertos de importación o sitios de brotes.

El ensayo RPA efectivo y rápido en tiempo real desarrollado en este estudio sería muy útil en el monitoreo de la infección por *V. parahaemolyticus* y tiene el potencial de ser una alternativa prometedora a la PCR en tiempo real y otros métodos isotérmicos para probar rápidamente la infección por *V. parahaemolyticus*, un riesgo significativo en la industria pesquera y otras industrias.

Authors

**DR. YUNYUN GENG**

Department of Pharmacology
Hebei University of Chinese Medicine
Shijiazhuang, 050091 Hebei, People's Republic of China

**DR. KE TAN**

College of Life Sciences
Hebei Normal University
No. 20, Road E. 2nd Ring South
Yuhua District, Shijiazhuang, Hebei 050024, People's Republic of China

**DR. LIBING LIU**

Hebei Academy of Inspection and Quarantine Science and Technology
No. 318 Hepingxilu Road
Shijiazhuang, Hebei Province, 050051, People's Republic of China

**DR. XIAO XIA SUN**

Hebei Academy of Inspection and Quarantine Science and Technology
No. 318 Hepingxilu Road
Shijiazhuang, Hebei Province, 050051, People's Republic of China



DR. BAOHUA ZHAO

College of Life Sciences
Hebei Normal University
Shijiazhuang, Hebei Province, 050024, People's Republic of China



DR. JIANCHANG WANG

Corresponding author
Hebei Academy of Inspection and Quarantine Science and Technology
Shijiazhuang, Hebei Province, 050051, People's Republic of China

jianchangwang1225@126.com (<mailto:jianchangwang1225@126.com>)

Copyright © 2023 Global Seafood Alliance

All rights reserved.