

WP4

Ariadna Sitjà Bobadilla & Toni Raga (UV)

Instituto de Acuicultura Torre de la Sal, CSIC



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





Grupo de Patología de Peces IATS (CSIC₃)



Grupo Ichthyoparasites (UV₃)



Grupo Pathogens in Aquaculture: Fish and Zoonotic Pathogens (UV₂)



Grupo Estrategias Antivirales (UMH₂)



Grupo Redolí (UV₁)



Grupo Señal y Medida (UPV₁)



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*



Objetivo 4.1

Identificar y caracterizar nuevas patologías emergentes, y desarrollar y mejorar métodos de diagnóstico y detección de patógenos en acuicultura.

- Tarea 4.1.1 (M12-M34) – Creación de protocolos para toma, envío, recepción y análisis de muestras.
- Participantes: CSIC₃, UV₁, UV₃, UMH₂
- Resultados :Algunos grupos han elaborado los protocolos, pero no se han armonizado contenidos ni formatos.

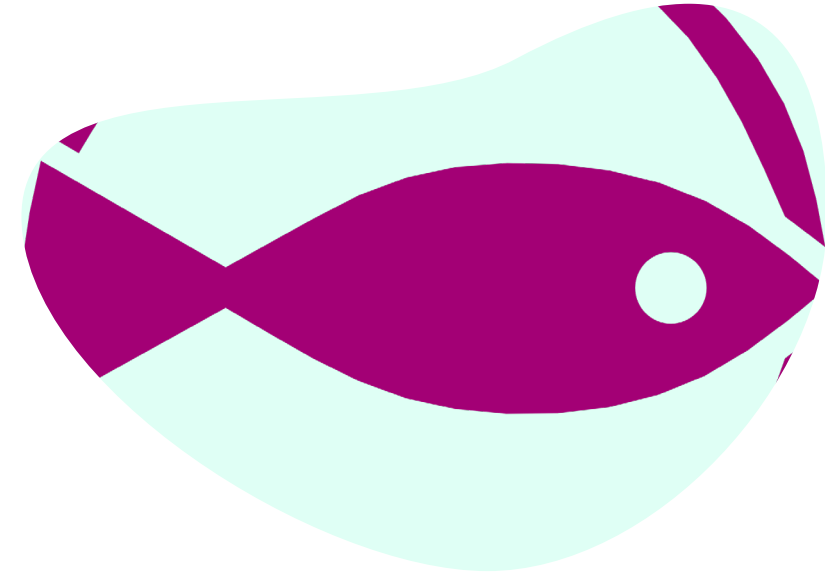
- Tarea 4.1.2 (M1-M34) – Identificación de nuevos patógenos y sus patologías
- Participantes: CSIC₃, UV₁, UV₃, UMH₂
- Resultados: **Bacterias:** Valoración de la virulencia de nuevos aislados de *V. harveyi* (Vh) y *V. vulnificus* (Vv) en múltiples hospedadores. Análisis filogenético y subtipado: clones vs complejos clonales; linajes/serotipos y virulencia; elementos genéticos móviles y virulencia (TGH inter-específica). Virulencia de Vv y toxina RtxA1: ensayos transcriptómicos y funcionales; toxina y tormenta de citoquinas in vivo. Recopilación de cepas y de datos en Europa; descubrimiento de un nuevo linaje europeo en Vv. **Virus:** Se desarrollará un método *in silico* de detección de nuevos virus en secuencias existentes en el consorcio de metagenómica y transcriptómica de peces y agua de cultivo. **Parásitos:** inicio de identificación de nuevos mixosporidios y microsporidios en lubina y seriola (molecular, MO, MET). Descripción detallada de la patología de *S. chrysophrii*. Detección de infección secundaria bacteriana en infecciones de alta intensidad. Nueva especie de microsporidio en atún rojo (col. IEO, Murcia) descripción de nuevas especies de aporocotílidos en atunes y doradas: *Cardicola* spp. Monogenosis en atún rojo



Objetivo 4.1

- **Tarea 4.1.3 (M6-M35) – Diseño y validación de nuevos métodos moleculares de diagnóstico y detección de patógenos**
- **Participantes:** CSIC₃, UMH₂, UPV₁, UV₁, UV₃
- **Resultados:** Se han rediseñado tests para multiplex con sondas TaqMan con varias combinaciones para *Enteromyxum* y *Enterospora*. Hay varias sondas validadas. Búsqueda activa de material para ampliar multiplex (ej. Coccidios). Se está buscando bibliografía para detección de distintas especies de virus (LCDV y RGNNV) que afectan a lubina mediante qPCR multiplex.

- **Tarea 4.1.4 (M1-M33) – Mejora de tests de diagnóstico de enfermedades parasitarias mediante el uso de plataformas más precisas como la “digital droplet PCR” y comparación con otros métodos, incluyendo los chips de DNA, o de métodos simplificados y asequibles de detección (macro-microscópicos y moleculares).**
- **Participantes:** CSIC₃, UV₃, UPV₁
- **Resultados:** desviación

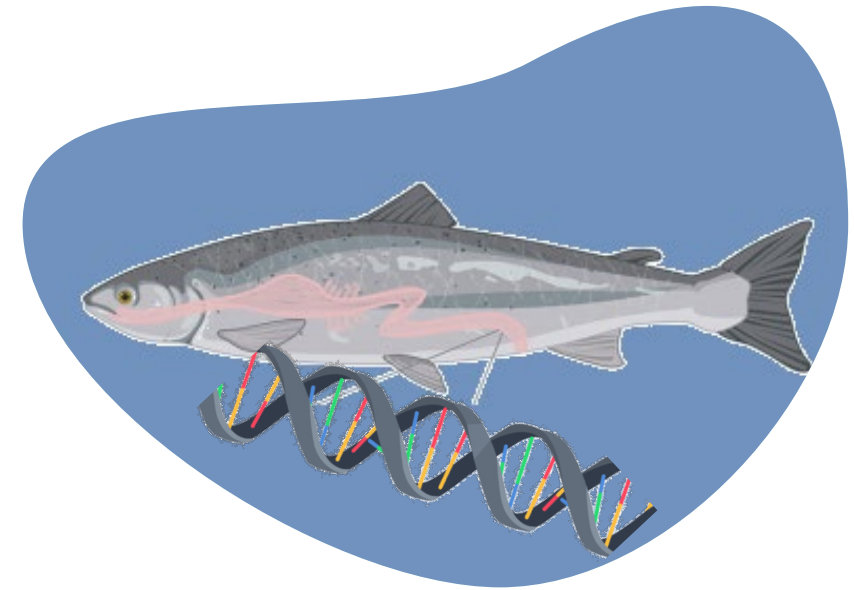


This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by *Generalitat Valenciana*



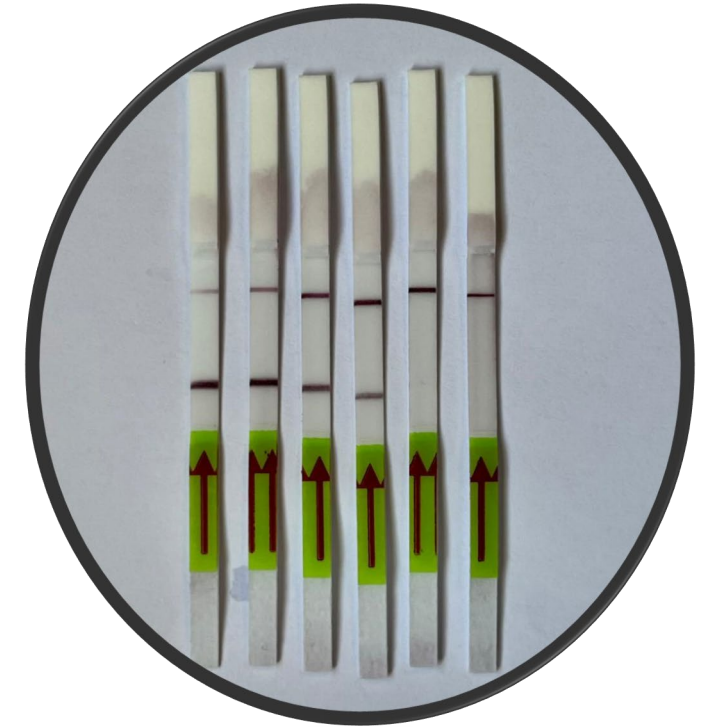
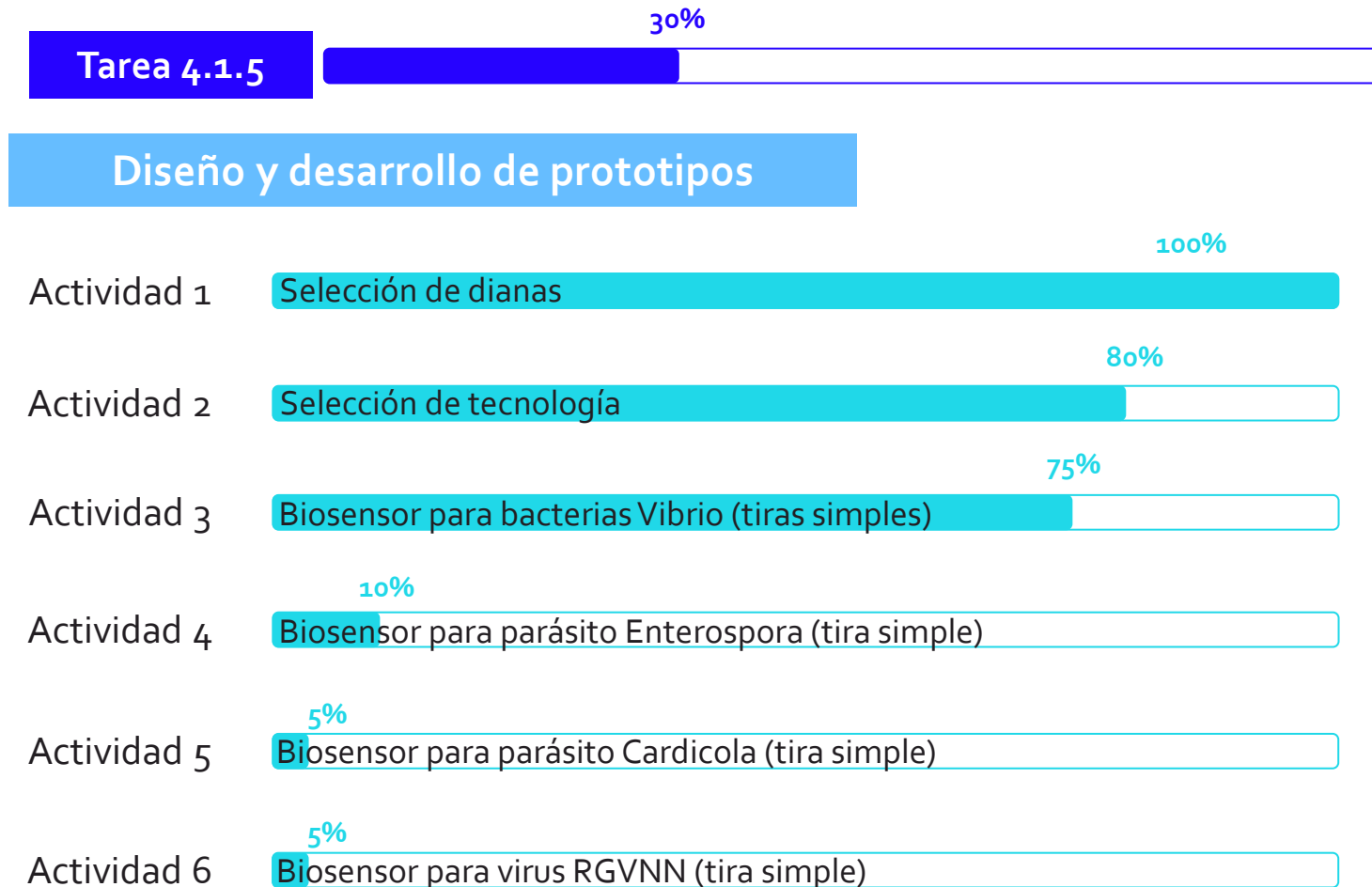
Objetivo 4.1

- Tarea 4.1.5 Detección alternativa de patógenos (M6-M35)
- Participantes: CSIC₃, UMH₂, UPV₁, UV₁, UV₃
- Resultados:
 - Selección de dianas:
 - Selección de la tecnología de biosensado: tiras simples
 - Mas avanzado para bacterias: *Vibrio vulnificus* y *Vibrio harveyi* basado en los genes *vhA* y *toxR*.
 - Extracción ADN genómico con kit
 - Amplificación isoterma: single y duplex
 - Técnicas de confirmación: PCR específica, electroforesis, fluorescencia, hibridación, qPCR
 - Detección: tira reactiva.
- Se está terminando un modelo predictivo de infección con *S. chrysophrii* mediante muestras no letales de sangre y determinación de hemoglobina.
- Detección temprana de aporocotílicos en granjas de atunes y doradas (eDNA y sangre).
- UMH₂ ha enviado a UPV₁ muestra de cDNA de RGNNV así como información sobre primers, sondas y secuencias de RRGNV.



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

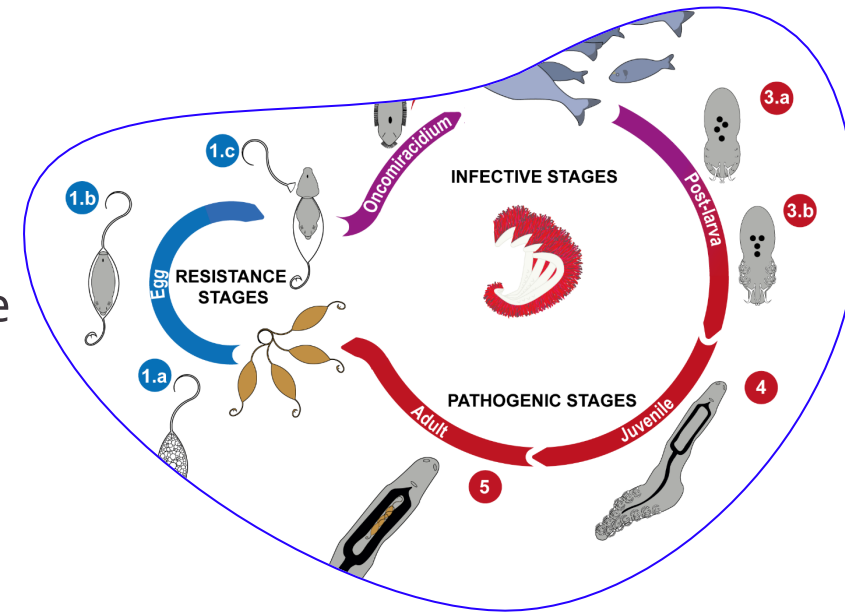
Grado de consecución de las tareas



Objetivo 4.2

Estudiar los ciclos vitales de patógenos de peces, sus vectores y el impacto del cambio climático sobre los agentes etiológicos y su interacción con sus hospedadores.

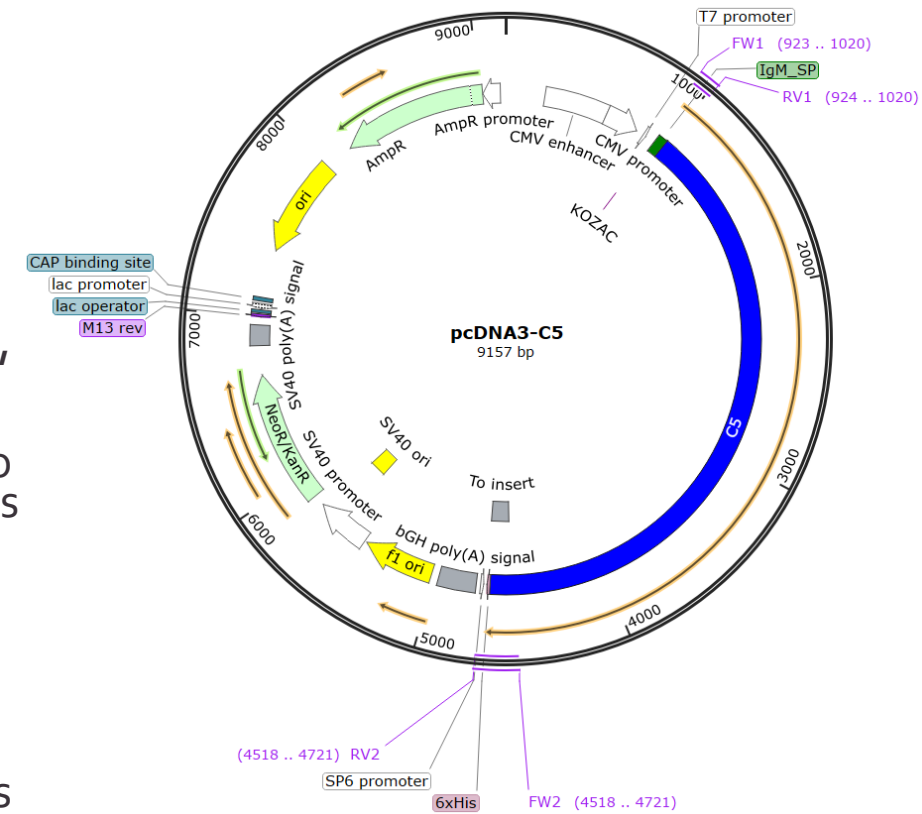
- Tarea 4.2.1 (M1-M34) Identificación ciclos vitales de parásitos de peces, vectores y reservorios
- Participantes: UV3, CSIC3
- Resultados: 2 experimentos de exposición de camarones a *E. leei* acabado e iniciado, en progreso; Estudio de vías de entrada de *E. leei*: mediante PCR e ISH, analizando muestras. Cierre del ciclo de *S. chrysophrii* en condiciones experimentales in vivo. Desarrollo de *Sciaenocotyle pancerii* en corvina (col. Univ. Sassari, Italia). Influencia de temperatura en ciclo de *S. chrysophrii*
- Tarea 4.2.2 (M1-M18) Desarrollo de modelos experimentales para las principales patologías de peces
- Participantes: UV3, UV1
- Resultados: Uso de *Poecilia latipinna* para *Anisakis*. Optimización de modelos de infección a través del agua. *V. harveyi* en lubina. *V. parahaemolyticus* (Vp) y langostino



Objetivo 4.3

Diseñar nuevas vacunas contra los patógenos más relevantes y estudiar las mejores vías de administración.

- Tarea 4.3.1 (M6-M34) Desarrollo de una vacuna de DNA frente a *Enteromyxum leei*
- Participantes: CSIC₃
- Resultados: Estudio *in silico* de posibles proteínas antigénicas del parásito, selección de dos candidatos transmembrana y amplificación. Gibson assembly en pcDNA3 (SP sIgM dorada + HIS tag). Expresión en cultivos celulares y detección con anti-HIS (WB, inmunocitoquímica). Se ha clonado la proteína más prometedora (~1200 aa) en pcDNA3 y expresado en células HEK → Baja eficiencia de transfección y/o expresión. Secuenciación de plásmido vacunal y transfección en células de pez para buscar mejora de expresión. Comprobación de antigenicidad de la proteína expresada.
- Tarea 4.3.2 (M6-M34) Diseño de vacunas para vibrios zoonóticos
- Participantes: UV₁
- Resultados: Vacuna subunitaria: Selección de antígenos y obtención de las proteínas recombinantes. Valoración del poder inmunógeno en anguila. Vacuna oral producida en plantas: Selección de antígenos, diseño y producción en *Nicotiana benthamiana*. Valoración de la toxicidad en anguila (colaboración IBMCP, CSIC)



Objetivo 4.4

Desarrollar nuevos métodos alternativos, eco-sostenibles de tratamiento y control de patógenos en acuicultura, tanto terapéuticos como profilácticos.

- Tarea 4.4.1 (M1-M33) Desarrollo de métodos de control de enfermedades parasitaria
- Participantes: CSIC3, UV3
- **Resultados:** Dos experiencias in vivo con piensos con aditivos para *E. leei* y *S. chrysophrii*. Resultados no muy prometedores. Se testaron 7 sustancias in vitro frente a *S. chrysophrii*. Algunas dieron buenos resultados. Se está produciendo pienso con estos aditivos para probar efecto *in vivo*. Trampas para captura fases libres de monogeneos (por iniciar).
- Tarea 4.4.2 (M1-M35) Desarrollo de métodos de control de enfermedades víricas y bacterianas
- Participantes: UV1, UMH2
- **Resultados:** Se han seleccionado 4 extractos vegetales y 1 extracto de microalga como posibles antivirales frente a RGNNV en lubina. Se ha establecido el rango de concentraciones de los extractos que no genera citotoxicidad. Se ha evaluado la actividad antiviral de los 5 extractos y se han identificado 2 extractos con actividad antiviral. Se han realizado ensayos con fitobióticos (Igsol SA): *in vitro* para valorar la actividad microbicida frente a Vv y Vp; *in vivo* a escala piloto: protección de langostino frente a Vp, protección de la anguila frente a Vv (colaboración con UPV).



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



Objetivo 4.4

- Tarea 4.4.3 (M1-M35) Evaluación del potencial microcida del agua electrolizada
- Participantes: UV₂, UV₁, UV₃, CSIC₃, UMH₂
- **Resultados:** Adquisición de generador de agua electrolizada. Para los ensayos de actividad biocida: inicio de colaboración con los grupos especializados en patógenos de: UV₁, UV₃, UMH₂, CSIC₃ (datos). Se ha establecido el rango de concentraciones de trabajo que puede tener actividad virucida y que no sea citotóxico en cultivo celular, en base a referencias bibliográficas previas (UMH₂) y se han recogido muestras de agua electrolizada para testar. Materiales con propiedades anti-incrustantes: Vh (inhibición biofilm). Efecto microcida de agua electrolizada: Vv y Vh (inhibición crecimiento)

- Tarea 4.4.4 (M1-M35) Desarrollo de lenguas y narices electrónicas – Desarrollo de nuevas familias de sensores; integración de sensores individuales en arrays; entrenamiento y desarrollo de modelos y su validación en granjas para alertar sobre la calidad y salubridad del agua.
- Participantes: UV₂, UMH₂
- **Resultados:** Preparación de indicadores con cambio de color. Preparación de sensores electroquímicos acoplados a sistemas de envío de datos a través de WIFI.



Objetivo 4.5.

Tarea 4.5.1. 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.

Participantes: todos, lidera UV3

Resultados: ha habido reuniones on line para definir contenidos y como articular con la página web de Thinkinazul GVA.



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*



Objetivo 4.6. Divulgación

Tarea 4.6.1. Divulgación y transferencia de conocimientos y herramientas científico-técnicas

Participantes: todos, lidera CSIC3

Divulgación en diferentes foros:

Ejemplo: Participación Expociencia/UV

Objetivo 4.7. Formación

Tarea 4.7.1. Formación de los futuros profesionales (UV1)

Participantes: todos, lidera UV1

Formación especializada:

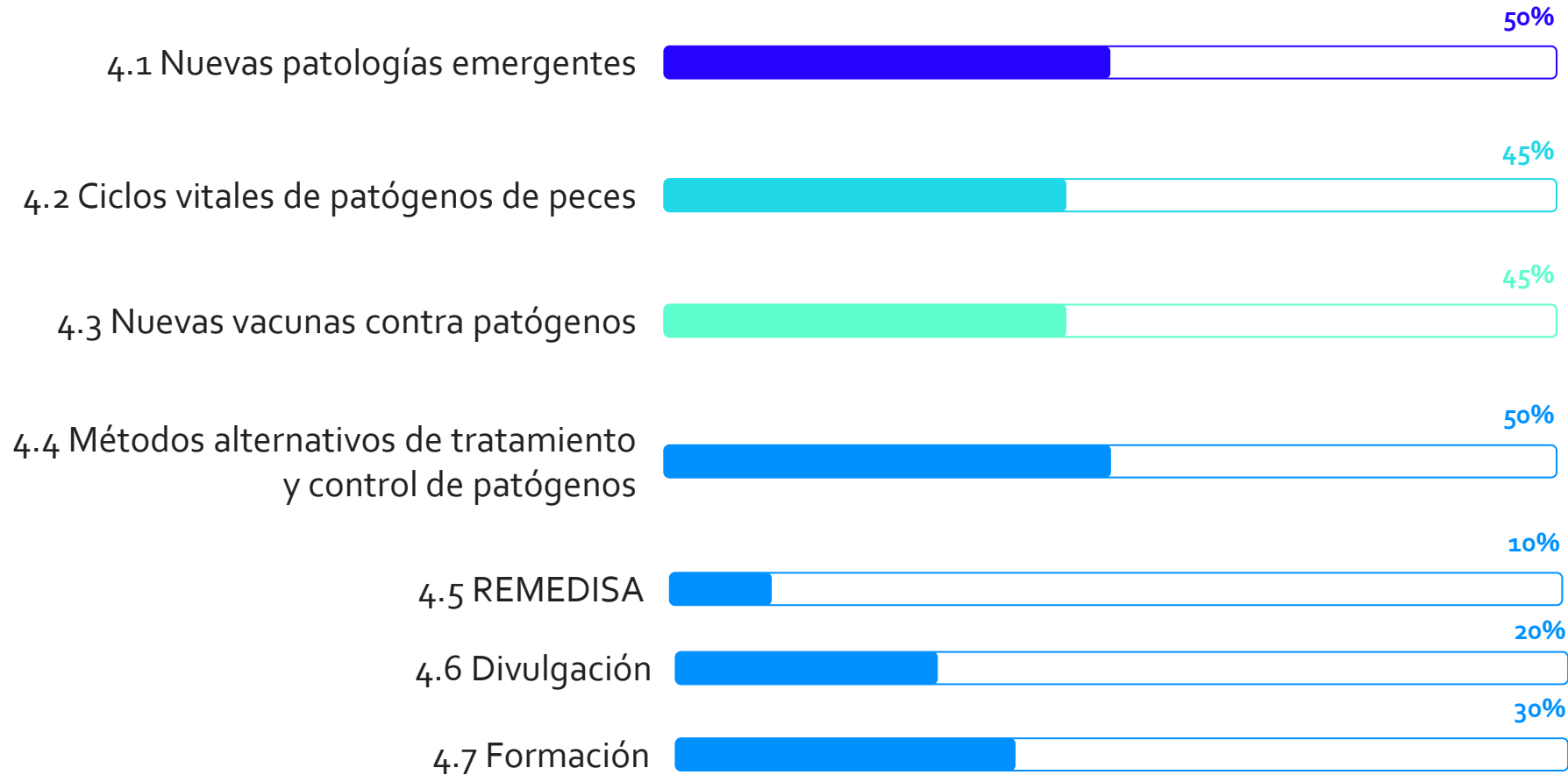
- ✓ Coordinación Máster Universitario en Acuicultura
- ✓ Otros Masters y grados
- ✓ Curso Ilustración y diagnóstico
- ✓ Tesis doctorales, TFGs, TFMs,
- ✓ Formación de personal programa INVESTIGO



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*



Grado de consecución de los objetivos/tareas



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*



Primeros resultados: congresos

1. Carmona-Salido, H, Wedling CC and C Amaro. 2022. ¿Tienen los fagos algún papel en la transferencia de gene de *Vibrio vulnificus*?. **XIII Reunión del Grupo de Microbiología del Medio Acuático, Granada 22-25 de septiembre.**
2. Carmona-Salido H, Fouz B, Sanjuán E, Carda M, Delannoy CM , García-González N, González-Candelas F, and C Amaro. 2022. What virulence traits tell us about *Vibrio vulnificus* zoonotic potential. **One - Health, Environment, Society- Conference 2022, EFSA (European Food Safety Authority), 21-24 de junio.**
3. Carmona-Salido, H, Wedling C, and C Amaro. 2022. Phages in *Vibrio vulnificus*: The Untold Story. **X Jornada de Bioinformàtica i Genòmica, Universitat de València. 2022**
4. Hernández-Cabanyero, C, E. Sanjuán, y C. Amaro. 2022. Vibriosis en peces por *Vibrio vulnificus*: una enfermedad inflamatoria letal en la que la interacción entre los glóbulos rojos y la toxina RtxA1 es crucial. **XIII Reunión del Grupo de Microbiología del Medio Acuático, Granada 22-25 de septiembre.**
5. Hernández-Cabanyero, C, Pérez-Roig, A, and C. Amaro. 2022. A two-step protocol for the detection and isolation of *Vibrio vulnificus* dangerous in public and/or animal health. **The 2nd FEMS Conference on Microbiology, Belgrade (Serbia), 30 de junio-2 de julio.**
6. Hernández-Cabanyero, C. 2022. *Vibrio vulnificus* T6SS exhibits anti-eukaryotic effect but not anti-bacterial properties and contributes to Virulence. **The 2nd FEMS Conference on Microbiology, Belgrade (Serbia), 30 de junio-2 de julio.**
7. Barriga J., Sanjuán E., Rodrigo M.A., Andreu-Sánchez O., González A., Escrig C., Fouz B. 2022. Nuevos materiales sostenibles con propiedades “antifouling” con aplicaciones en acuicultura. **XVIII Congreso Nacional de Acuicultura. Cádiz.**
8. Sanjuán E., Silva-Hernández F.X., Amaro C. 2022. Pili tipo IV y su papel en la virulencia de *Vibrio vulnificus*. **XIII Reunión del Grupo de Microbiología del Medio Acuático, Granada 22-25 de septiembre.**



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*



Primeros resultados: congresos

9. Celia García-Quintanilla, Veronica Chico, Miguel Ángel García-Álvarez, Jose Antonio Guirau, David Verdiell, Luis Perez, Alberto Cuesta, María del Mar Ortega-Villaizán. Natural extracts for application as antivirals in aquaculture against red grouper nervous necrosis virus. **4th Congress of the International Society of Fish & Shellfish Immunology**. Bodo, Noruega, Dic 2022.
10. Celia García-Quintanilla, Maria Elizabeth Salvador-Mira, Veronica Chico, Manuel Solivella, Luis Perez, Miguel Ángel García-Álvarez, Alberto Cuesta, María del Mar Ortega-Villaizán. The role of European Sea Bass red blood cells in the nervous necrosis virus infection. **4th Congress of the International Society of Fish & Shellfish Immunology**. Bodo, Noruega, Dic 2022.



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*



Primeras publicaciones

1. Pavlinec, Ž, Zupičić, IG, Oraić, D, Lojkić I, Fouz B, and S Zrnčić. 2022. Biochemical and molecular characterization of three serologically different *Vibrio harveyi* strains isolated from farmed *Dicentrarchus labrax* from the Adriatic Sea. **Scientific Reports** 12, 7309. (Q2, IF = 4,996).
2. Pérez Roig, A, Carmona-Salido, H, Sanjuán, E, Fouz B, and Amaro C. 2022. A multiplex PCR for the detection of *Vibrio vulnificus* hazardous to human and/or animal health from seafood. **International Journal of Food Microbiol.**, 377.(Q1, IF = 5,911)
3. López-Verdejo et al. 2022. Infection process, viability and establishment of *Anisakis simplex* s.l. L3 in farmed fish; A histopathological study in gilthead seabream. **Veterinary Parasitology**, 311: 1-8 (Q1, IF =2,821)
4. López-Verdejo et al. 2022. A severe microsporidian disease in cultured Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). **IMA Fungus**, 13(1): 1-5 (Q1, IF = 8,044).
5. Villar-Torres et al. 2022. From development to taxonomy: The case of *Sciaenacotyle pancerii* (Monogenea: Microcotylidae) in the Mediterranean meagre. **Parasitology**, 149(13): 1695-1701. (Q2, IF= 3,243)
6. Riera-Ferrer, E., Del Pozo, R., Piazzon, C., Sitjà-Bobadilla, A., I. Estensoro., O. Palenzuela. 2023. *Sparicotyle chrysophrii* experimental infection of gilthead sea bream (*Sparus aurata*): establishment of an *in vivo* model reproducing the pathological outcomes of sparicotylosis. **Aquaculture** 573, 739588 (Q1; IF = 5,13).
7. Villar-Torres et al. 2023. The influence of water temperature on the life-cycle of *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Microcotylidae), a common parasite in gilthead seabream aquaculture. **Aquaculture**, 563, 739103 (Q1; IF = 5,13).



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



Desviaciones del programa inicial

Tarea 4.1.1. Retraso en recopilación de protocolos.

Tarea 4.1.4: planteaba la producción de nuevos test diagnósticos basados en el uso de Digital droplet PCR. El equipo no se puede adquirir. Actualmente, esta tarea queda englobada en la tarea 4.1.3 relativa al diseño de nuevos métodos de diagnóstico y detección de patógenos.

Tarea 4.4.2: Retraso en los ensayos *in vivo* del objetivo 1, debido al retraso en la aprobación del mantenimiento de lubinas por parte de la OIR (oficina de investigación responsable) de la UMH, así como a problemas asociados a la aclimatación de las lubinas en el animalario. Ampliación del número de extractos vegetales/microalgas a testar. Actualmente se están testando nuevos extractos *in vitro*.

Tarea 4.5.1. Retraso en recopilación contenidos de REMEDISA.



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 6 próximos meses: actuaciones principales

- Continuar con las tareas iniciadas y colaboraciones bilaterales dentro del WP₄
- Tarea 4.1.1. Definir el esqueleto de los protocolos para el envío y toma de muestras.
- Tarea 4.5. 1 Definir los contenidos de la red REMEDISA y enlazarlos con la web oficial del Proyecto ThinkinAzul
- Tarea 4.6.1. Contactar con coordinación y WP7 para estrategias de divulgación y transferencia. Organización de ciclos de conferencias en la Casa de la Ciencia de Valencia del CSIC. Ver posible interacción con ThinkinAzul otras CC.AA.
- Tarea 4. 7.1. Definir los contenidos y participantes de un curso de especialización de Patología en Acuicultura para 2024 o 2025



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*





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



We're thinking in azul

Thanks | 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



ia



Financiado por
la Unión Europea
NextGenerationEU

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*

