

---

# OBJETIVO 4.1

---

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

## Conexión con las líneas de actuación del plan nacional

**Líneas de actuación A2:** Acuicultura sostenible, inteligente y de precisión

**Actuación A2.2:** Estudios de fisiología, patología y reproducción de peces cultivables para mejorar el conocimiento sobre procesos que afectan al desarrollo, crecimiento, calidad de las puestas y progenie, y salud y bienestar animal, así como al control rítmico de procesos fisiológicos y su modulación por factores ambientales en especies modelo y de acuicultura.

**Actuación A2.6:** Incentivar la investigación y desarrollo de sistemas de cultivo no convencionales de peces, moluscos y otros grupos taxonómicos: IMTA (offshore y onshore), sistemas de recirculación (RAS) y de acuaponia-BIOFLOC.

**Actuación A2.9:** Mejora de los sistemas de cultivo de peces mediante

- I. El desarrollo de alimentos más eficientes y sostenibles especialmente durante la fase larvaria y la producción de juveniles,
- II. Optimización de los factores ambientales y del control cronobiológico,
- III. Optimización de la producción (Machine Learning) mediante la mejora genética, el bienestar animal y la prevención y el control de patologías con herramientas de diagnóstico, tratamientos y tecnologías novedosas.

## Descripción de tareas

### Tarea 4.1.1 (M12-M34) - Creación de protocolos para toma, envío, recepción y análisis de muestras

- Con indicación de fecha de entrega de resultados y Grupos de Investigación que participan en la Tarea propuesta. El resultado final de esta tarea es: i) producir unos manuales con indicaciones precisas para el sector de la acuicultura de cómo tomar y enviar muestras para el diagnóstico de virus, bacterias y parásitos y ii) creación de las bases para un mapa de riesgos de patógenos.

**Responsable:** CSIC3

**Participantes:** UV1, UV3, UMH2

**Resultado:** CSIC3 ha enviado un primer borrador a todos los participantes y se ha recopilado información recibida de los participantes sobre protocolos para la toma y envío de muestras para el diagnóstico de virus, bacterias y parásitos de peces. Se está trabajando en una versión más avanzada.

**Grado de consecución:** 10%

**Impacto:** Es prematuro hablar del impacto dado el nivel de consecución de la tarea.

**Tarea 4.1.2 (M1-M34). – Identificación de nuevos patógenos y sus patologías-** Caracterización morfológica (MO, SEM, TEM), histopatológica, epizootiológica y filogenética de patógenos (virus, bacterias y parásitos) emergentes (en el caso de las bacterias, los vibrios ligados al cambio climático) y nuevos casos detectados en granjas, incluyendo análisis de riesgos e interacción hospedador-patógeno, con énfasis en factores relacionadas con el cambio climático (temperatura, salinidad, etc.).

**Responsable:** UMH2

**Participantes:** CSIC3, UV1, UV3

**Resultado:** Parásitos: Existen descripciones en curso de nuevos patógenos: lubina (microsporidio y mixosporidio); seriola (mixosporidio); espáridos (*Sparicotyle* n. sp.); y escómbridos (aporocotílido). Se ha descrito una ameba *Endolimax carassius* n.sp. Se ha caracterizado la patología de *S. chrysophrii*: hematología, crecimiento, histopatología. Estudio infecciones secundarias a *S. chrysophrii*: correlación de RNAseq, proteómica y microbiota. Cambios de células goblet y mucinas. Descripción del digestivo del parásito.

Virus: Se han recogido en CSIC3, para UMH2, muestras de cerebro en RNA later de meros encontrados moribundos en las Islas Columbretes, con sintomatología compatible con un nodavirus. Estas muestras se analizarán por RT-qPCR para RGNNV. Se han recopilado secuencias de transcriptómica de lubina y dorada para evaluar virómica de muestras peces de cultivo. Se está creando la base de datos de referencia de genomas de virus para analizar las secuencias.

Bacterias: Hemos caracterizado cepas causantes de vibriosis en peces y camarón de *Vibrio harveyi* (Vh), *V. vulnificus* (Vv) y *V. parahaemolyticus*. Hemos aislado Vv y Vh de agua de lago y salobre en el caluroso verano 2023. En Vv nos hemos centrado en estudiar el linaje europeo, formado por aislados ambientales y clínicos y hemos demostrado que la toxina RtxA1 es el principal factor de virulencia. Hemos descubierto que cepas de Vh de serogrupos concretos y que contienen genes recibidos por TGH son más virulentas.

**Grado de consecución:** 50%

**Impacto:** Los resultados se han presentado en diferentes congresos nacionales e internacionales (CNA, FEMS, EAS...), se han publicado en revistas internacionales de reconocido prestigio (Scientific Reports, Fish and Shellfish Immunology, Frontiers in Microbiology) y han contribuido a desentrañar los mecanismos de virulencia de especies de vibrios que causan patologías peligrosas en diferentes

especies de animales acuáticos e incluso en el ser humano. Parte de los resultados obtenidos referentes a la toxina RtxA1 y a la vibriosis se han divulgado en forma de artículo internacional en Scientia. Así mismo, se han consolidado las relaciones de colaboración con grupos de investigación del Croatian Veterinary Institute de Zagreb (Croacia) y del German Federal Institute for Risk Assessment de Berlín (Alemania).

**Tarea 4.1.3 (M6-M35) - Diseño y validación de nuevos métodos moleculares de diagnóstico y detección de patógenos** - Incluye el desarrollo de técnicas multiplex para detectar infecciones mixtas, nanobiosensores y DNA arrays.

**Responsable:** CSIC3

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

**Resultado:** Se han desarrollado y optimizado diferentes aproximaciones moleculares para detección de vibrios: a) sistemas de biosensado, b) protocolos basados en la PCR, combinados o no con los sensores y c) protocolo de espectrofotometría de masas MALDITOF, para la identificación de grupos clonales de *Vibrio vulnificus* (Vv). La PCR dúplex de *V. harveyi* (Vh) desarrollada permite distinguir las cepas que han adquirido los genes de virulencia plasmídicos del resto de cepas de la especie. Se han rediseñado y validado tests para multiplex con sondas TaqMan para la detección simultánea de *Enteromyxum* y *Enterospora*. Se ha realizado una búsqueda activa de lotes de doradas infectadas con coccidios en distintas instalaciones de España y Portugal, sin éxito hasta ahora. Se va a validar un método para detección de distintas especies de virus (LCDV y RGNNV) que afectan a lubina mediante qPCR multiplex

(<http://www.aquaticjournal.com/article/doi/10.11758/yykxjz.20150606001>). Se está trabajando en la elaboración de un array de DNA para discriminación simultánea de especies de peces.

**Grado de consecución:** 50%

**Impacto:** Las herramientas desarrolladas permitirán detectar de forma temprana la vibriosis en peces e identificar Vv y/o Vh a partir de cualquier tipo de muestra, distinguir las cepas no patogénicas de las que constituyen un peligro para la salud humana y/o animal y la detección de marcadores de sepsis temprana en anguila. El array de DNA de peces permitirá saber que especies están presentes en un cierto ecosistema y conocer la calidad de vida o evaluar una patología porque la información generada se podrá correlacionar con la cantidad de material genético liberado. El trabajo presentado en el Congreso Nacional de Microbiología sobre el nanosensor de impedancia recibió el premio al mejor póster.

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

**Responsable:** CSIC3

**Participantes:** UPV1, UV3

**Resultado:** Se ha producido una desviación respecto de lo previsto para esta tarea: El equipo digital droplet PCR previsto por CSIC3 no se puede adquirir por ser de un importe económico muy superior al presupuestado para el inventariable. Actualmente, esta tarea queda englobada en la tarea 4.1.3 relativa al diseño de nuevos métodos de diagnóstico y detección de patógenos.

**Grado de consecución:** 0%

**Impacto:** No procede.

**Tarea 4.1.5 (M1-M34) - Detección alternativa de patógenos** - 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.

**Responsable:** UPV1

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

**Resultado:** El primer resultado fue una lista consensuada de los patógenos diana, basándose en las enfermedades más graves que actualmente afectan a ejemplares criados en cautividad. Incluyen bacterias como *Vibrio* spp, parásitos como *Enterospora nucleophila* y *Cardicola* y virus como el de la Necrosis nerviosa (NNV). Se ha desarrollado una técnica analítica basada en ácidos nucleicos, amplificación isotérmica y ensayo de flujo lateral. Para ello, se ha diseñado un conjunto de oligonucleótidos que permiten la detección de las regiones de genes objetivo. La idoneidad de las secuencias propuestas se ha confirmado experimentalmente mediante técnicas como electroforesis en gel y qPCR. Además, esta nueva metodología se ha aplicado con éxito en la detección de *V. vulnificus*. La prueba es específica para esta bacteria y no respondió a otras especies estrechamente relacionadas (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*). La sensibilidad cubre las necesidades analíticas, alcanzándose los límites de detección fueron de 0,01% de ADN patógeno en el ADN del huésped y en un tiempo total de ensayo de menos de una hora.

**Grado de consecución:** 35%

**Impacto:** Las herramientas obtenidas son clave para avanzar en la monitorización masiva y eficaz aplicada para el control de la sanidad en acuicultura. El método desarrollado es sencillo y rápido para la detección de patógenos aplicable también fuera del laboratorio y en el campo. Supone un avance respecto a las soluciones tecnológicas actuales siendo potencialmente válida para varias especies de peces y diversas formas de acuicultura.