

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 acuaponía-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-M45) - 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: Se realizó una reunión para coordinar y organizar la producción de los manuales para toma, envío, recepción y análisis de muestras. Los cuatro grupos participantes asistieron y contribuyeron. Tras la reunión los cuatro grupos aportaron fotos y otras imágenes relevantes y participaron en la redacción de los textos. Con esto, el responsable, CSIC3, preparó un borrador del manual que se envió al resto de participantes que han aportado sus cambios y opiniones. Actualmente se está preparando la primera maqueta. La tarea de creación de bases para un mapa de riesgos de patógenos no se ha iniciado.

Grado de consecución: 60%

Impacto: La disponibilidad de este manual será de gran ayuda tanto para laboratorios como para empresas de acuicultura. El manual aportará información importante para la correcta toma de muestras y manejo de materiales para el diagnóstico de patógenos relevantes.

Tarea 4.1.2 (M1-M42). – 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: 1) Virus: UMH2, analizó muestras de cerebro de meros moribundos de las Islas Columbretes (colaboración con CSIC3) para determinar origen y cepa del nodavirus causante de la patología. También ha creado una base de datos de referencia de genomas de virus para evaluar la virómica en transcriptomas de lubina y dorada. 2) Bacterias: UV1 ha avanzado en su trabajo con *Vibrio harveyi* (Vh), *V. vulnificus* (Vv) y *V. parahaemolyticus* (Vp). Se destaca la demostración de la presencia de Vv en las costas de la ciudad de Valencia, sus mecanismos moleculares de virulencia y respuesta del hospedador, la descripción de un linaje europeo de Vv, y la capacidad de transferencia de genes de virulencia a Vh. También han descrito el primer caso de septicemia por *Lactococcus garvieae* en lubina y de septicemia mortal en seres humanos debida a *V. metoecus*. 3) Parasitos: UV3 ha descrito la especie *Microcotyle Merche*, un microsporidio (*Glugea sp.*), y 2 especies de *Cardicola spp.* También, ha descrito nuevas patologías asociadas al monogeneo *Hexotoma thynni* en cultivos de atún rojo, y la patología asociada a *Skoulekia meningialis* en un nuevo hospedador. CSIC3 ha caracterizado molecularmente un nuevo microsporidio (*Loma sp.*) en lubina, un mixosporidio (*Parvicapsula sp.*) en seriola y una especie de ameba *Endolimax carassius* en carpa dorada. Ha obtenido muestras para caracterizar una nueva microsporidiosis en doradas y ha descrito en detalle la patología debida a *Sparicotyle chrysophrii*.

Grado de consecución: 87%

Impacto: Los resultados de esta tarea han dado lugar a la publicación de una comunicación corta, ocho artículos en revistas indexadas, más de 10 presentaciones en congresos nacionales e internacionales, un premio a la mejor comunicación oral y una reseña en la revista Lancet. La descripción de estos nuevos patógenos, sus patologías y sus mecanismos de virulencia tienen un impacto directo en la producción de especies de gran valor (ej. atún, dorada, lubina) así como en la salud humana (zoonosis como Vv).

Tarea 4.1.3 (M6-M44) - 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: 1) Virus: UMH2 está desarrollando una qPCR multiplex que se va a validar en muestras de lubinas infectadas con RGNNV. 2) Bacterias: UV1 ha desarrollado diferentes aproximaciones moleculares para la detección de vibrios: sistemas de biosensado de impedancia o basados en soportes nanoporosos equipados con puertas moleculares de ácidos nucleicos, protocolos basados en la PCR combinados o no con los sensores, y un protocolo de espectrofotometría de masas MALDITOF para la identificación de grupos clonales de Vv de especial relevancia (zoonóticos). 3) Parásitos: CSIC3 ha rediseñado tests para multiplex con sondas TaqMan para la detección simultánea de *Enteromyxum* y *Enterospora*. Se está realizando una búsqueda activa de lotes de doradas infectadas con coccidios en distintas instalaciones de España y Portugal para desarrollar métodos de detección de estas especies. 4) Por su parte, UPV1 ha analizado las tecnologías de biosensado más adecuadas para ser implementadas en los sistemas de gestión sanitaria de las instalaciones y medio acuícola.

Grado de consecución: 69%

Impacto: Los resultados de esta tarea han dado lugar a cuatro comunicaciones en congresos nacionales e internacionales (incluyendo un premio al mejor póster) y tres artículos indexados. Los desarrollos de estos métodos moleculares de diagnóstico serán de especial relevancia para la detección de patógenos tanto de acuicultura como para la salud humana (vibrios zoonóticos).

Tarea 4.1.4 (M1-M44) - 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: El grupo UPV1 ha examinado las etapas críticas de los métodos de diagnóstico de enfermedades asociadas a la actividad acuícola, para identificar aquellos puntos críticos para la obtención de resultados reproducibles y sensibles. Se han establecido soluciones que permitan mejorar el tiempo de respuesta y la sencillez de uso, sin comprometer la viabilidad y eficacia. El objetivo es encontrar vías para su aplicación masiva y sostenible. Por parte de CSIC3 se ha producido una desviación indicada ya en informes anteriores. El equipo digital droplet PCR 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: 69%

Impacto: Ver Tarea 4.1.3

Tarea 4.1.5 (M1-M44) - 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: UPV1 está colaborando con los diferentes grupos para desarrollar métodos de detección alternativa de patógenos: 1) Con UV1 desarrolló un método de detección simple y rápido para la bacteria Vv, basado en una reacción de amplificación isotérmica por recombinasa polimerasa (RPA) y una tira de flujo lateral embebida en un chip microfluídico. El ensayo mostró una excelente reproducibilidad, con

valores de desviación estándar relativa por debajo del 5%. El límite de detección estimado fue de 1.700 copias, válido para detectar floraciones o brotes de bacterias en muestras de agua. 2) Con UV3, se está trabajando en un método RPA-lateral flow assay para la detección del parásito *Cardicola*. En una segunda fase se testarán las tiras en muestras positivas y control de sangre y músculo de atunes infectados. 3) Con CSIC3 se ha desarrollado un método basado en la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para la detección selectiva de regiones específicas del genoma de *Enterospora nucleophila* y transducción óptica. Se está estudiando la posibilidad de producir un método similar para el parásito *Enteromyxum leei*. 4) UMH2 ha enviado a UPV1 muestras de cDNA de RGNNV e información sobre primers, sondas y secuencias de RGNNV.

Por su parte, CSIC3 está completando un modelo predictivo de intensidad de infección con *Sparicotyle chrysophrii* mediante medida de hemoglobina en sangre en granjas e infecciones experimentales.

Grado de consecución: 70%

Impacto: Los datos de la nueva metodología de detección de *Enterospora* se han presentado en un congreso internacional y se han publicado como abstract extendido. El desarrollo de estos métodos facilitará y abaratará los costes de diagnóstico de múltiples enfermedades relevantes en la acuicultura mediterránea.