

# WP4.

## SALUD EN ACUICULTURA: ENFERMEDADES RECURRENTE Y EMERGENTES (AQUAHEALTH)

### Responsables:

- Ariadna Sitjà Bobadilla
- Juan Antonio Raga Esteve

### Grupos participantes

GRUPO	IP1	IP2
CSIC3	Ariadna Sitjà Bobadilla	Carla Piazzon de Haro
UPV1	Ángel Maquiería Catalá	Luis Antonio Tortajada Genaro
UV1	Carmen Amaro González	Belén Fouz Rodríguez
UV2	José Vicente Ros Lis	
UV3	Juan Antonio Raga Esteve	Francisco Montero Royo
UMH2	María del Mar Ortega Villalzan Romo	

## Objetivos Específicos y Conexión con las líneas de actuación del plan nacional

**Objetivo 4.1.** Identificar y caracterizar nuevas patologías emergentes, y desarrollar y mejorar métodos de diagnóstico y detección de patógenos en acuicultura.

**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.

**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.

**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 A2.11:** Mejora del conocimiento sobre el bienestar de los cultivos y desarrollo de sistemas que permitan monitorizar, de modo continuo y fiable:

- I. Nuevos indicadores de bienestar en condiciones normales de cultivo y durante el proceso de sacrificio (cuando corresponda)
- II. Desarrollo de estrategias para mejorar la ingesta y el aprovechamiento del alimento, el crecimiento, la reproducción y el estado de salud (susceptibilidad a enfermedades) de los ejemplares cultivados.

**Objetivo 4.3.** Diseñar nuevas vacunas contra los patógenos más relevantes y estudiar las mejores vías de administración.

**Actuación A2.15:** Establecimiento de medidas biosanitarias y diseño de protocolos y otras medidas de control específicas (vacunas, prebióticos, probióticos, tratamientos alternativos, etc.) para mitigar los efectos del cambio climático y la intensificación de los cultivos de peces sobre epizooticas debida a patógenos recurrentes y emergentes.

**Objetivo 4.4.** Desarrollar nuevos métodos alternativos, eco-sostenibles de tratamiento y control de patógenos en acuicultura, tanto terapéuticos como profilácticos.

**Actuación A2.15:** Establecimiento de medidas biosanitarias y diseño de protocolos y otras medidas de control específicas (vacunas, prebióticos, probióticos, tratamientos alternativos, etc.) para mitigar los efectos del cambio climático y la intensificación de los cultivos de peces sobre epizooticas debida a patógenos recurrentes y emergentes.

**Objetivo 4.5.** Crear una Red Mediterránea de Investigación sobre Sanidad en Acuicultura (REMEDIISA) 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.

**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 A2.20:** Mejora de la cultura medioambiental, la transparencia y la percepción de la acuicultura por parte de todos los estamentos de la sociedad para facilitar la introducción y consolidación en el mercado de una acuicultura segura y de calidad con una alta componente tecnológica fundada en principios de sostenibilidad.

**Objetivo 4.6 (A3.12).** Divulgar los resultados del proyecto, transferir las herramientas científico-técnicas generadas al sector y concienciar a la sociedad sobre el desarrollo sostenible de la acuicultura mediterránea.

**Actuación A3.12:** Divulgación de conocimiento y educación sobre el medio marino hacia la sociedad en general (población infantil, consumidores, profesionales de diferentes ámbitos, etc.) para mejorar de la percepción sobre las actividades de la economía azul (pesca artesanal, acuicultura etc.).

**Objetivo 4.7 (A3.12).** Formar personal competente en salud y bienestar animal en acuicultura.

**Actuación A3.12:** Divulgación de conocimiento y educación sobre el medio marino hacia la sociedad en general (población infantil, consumidores, profesionales de diferentes ámbitos, etc.) para mejorar de la percepción sobre las actividades de la economía azul (pesca artesanal, acuicultura etc.).

## Descripción de tareas

### Objetivo 4.1

**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 monogéneo *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 *Enterospira 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 *Enterospira* 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.

#### Objetivo 4.2

**Tarea 4.2.1 (M1-M41).** - Identificación ciclos vitales de parásitos de peces, vectores y reservorios – Se realizarán estudios morfológicos y moleculares de posibles patógenos compartidos con la fauna circundante a las granjas y en el *fouling*; estudios de susceptibilidad mediante infecciones experimentales con invertebrados y estudios de análisis de riesgos correspondientes.

**Responsables:** UV3

**Participantes:** CSIC3

**Resultado:** UV3 han publicado numerosos estudios en la caracterización del ciclo de vida, hábitat y transmisión de monogeneos microcotílicos: 1) desarrollo de *Sciaenacotyle pancerii* y 2) desarrollo, tiempos y temperaturas de transmisión, y análisis ecológico de *Sparicotyle chrysophrii*. También han estudiado el proceso infectivo de *Cardiocephaloides longicollis*. CSIC3 está estudiando la posibilidad de transmisión indirecta de *Enteromyxum leei* a través de infección de camarones como posibles vectores. También está determinando las posibles vías de entrada de este parásito en la dorada mediante exposición a tiempos cortos. Se han obtenido resultados preliminares de ambos experimentos. Además, optimizó un protocolo de mantenimiento in vivo experimental de *S. chrysophrii* que cierra el ciclo. Ambos grupos han colaborado en un estudio sobre el proceso de asimilación y absorción de la sangre de dorada por parte de *S. chrysophrii*, demostrando su hematofagia.

**Grado de consecución:** 80%

**Impacto:** Además de dar lugar a diversas publicaciones, estos trabajos han permitido identificar las estaciones con mayor riesgo para la propagación de infecciones, así como elaborar nuevas estrategias adaptadas a la temperatura del agua y otros parámetros, como presencia de posibles vectores, para el control de las infecciones en granjas. Los resultados son claves también para perfeccionar los protocolos rutinarios de análisis parasitológico que se emplean habitualmente en granjas.

**Tarea 4.2.2 (M1-M18).** - Desarrollo de modelos experimentales para las principales patologías de peces – En el caso de los parásitos, se propone como modelo marino el pez molly (*Poecilia latipinna*) y para las infecciones bacterianas se realizarán en los hospedadores principales de cada una de ellas.

**Responsables:** UV3

**Participantes:** UV1

**Resultado:** UV3 ha propuesto al pez pocílido molly (*Poecilia latipinna*) como modelo para infecciones experimentales. Se ha terminado el trabajo experimental donde se aborda el proceso de infección en molly (utilizando *Anisakis sp.*), comparando el éxito de infección con la dorada. En vista de los resultados se proponen hacer nuevos estudios sobre el efecto mecánico de la ingestión en la supervivencia de anisakis. UV1 ha optimizado el modelo de vibriosis para Vh y lubina y para Vp y langostino, en ambos casos infectando por la ruta natural. Estos modelos se están usando en la valoración del grado de virulencia de nuevas cepas, en ensayos de colonización e invasión y en ensayos de respuesta inmunitaria frente a vacunas e inmunoestimulantes.

**Grado de consecución:** 100%

**Impacto:** Los resultados se han presentado en diferentes congresos y se han publicado en revistas indexadas. Se ha contribuido a avanzar en el estudio y comprensión de las patologías causadas por estos patógenos relevantes. Así mismo, UV1 ha consolidado las relaciones de colaboración con empresas del sector acuícola (Culmarex SAU, Igsol Advance S.L.)

### Objetivo 4.3

**Tarea 4.3.1 (M6-M45) - Desarrollo de una vacuna de DNA frente a *Enteromyxum leei*** – Prueba de la capacidad protectora de candidatos vacunales para *E. leei* expresados en vectores de expresión específicos administrados mediante inyección o por vía oral en doradas.

**Responsable:** CSIC3

**Resultado:** CSIC3 ha clonado en pcDNA3 mediante Gibson assembly dos proteínas transmembrana del parásito que previamente demostraron su potencial antigénico. Durante la clonación se introdujeron en los constructos el péptido señal de la IgM de la dorada para asegurar la ruta secretora en células de pez, y una cola de histidina para poder detectar expresión. Los plásmidos se expresaron en células HEK293 y se comprobó la correcta expresión mediante inmunocitoquímica y citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-cola de histidina, y mediante western-blot con el mismo anticuerpo o con suero de pez resistente. Para asegurar una correcta inserción de la secuencia de interés, se decidió realizar síntesis comercial del plásmido pcDNA3 conteniendo la secuencia más prometedora con potencial antigénico. Se incluyó en la construcción una cola de histidina y la presencia de dos lugares de restricción para facilitar el traslado de la secuencia a otro plásmido en caso de necesitar hacer futuras pruebas de eficiencia de vacunación (eg. pVax1). Actualmente se está amplificando y purificando el nuevo plásmido. Los siguientes pasos incluirán la expresión en cultivos celulares de pez (EPC, RTGut) y pruebas de expresión por células musculares de la dorada tras inyección. En caso de mostrarse expresión en el tejido in vivo y reacción de anticuerpos, se procederá a realizar un reto para probar protección.

**Grado de consecución:** 35%

**Impacto:** La producción de vacunas frente a parásitos en acuicultura es un campo poco explorado y de alta relevancia. La identificación de un antígeno vacunal protector frente a *E. leei* permitirá el diseño de vacunas aplicables en acuicultura frente a una de las enfermedades parasitarias más relevantes.

**Tarea 4.3.2 (M6-M43) - Diseño de vacunas para vibrios zoonóticos** - Se diseñarán una vacuna subunitaria multi-hospedador y una vacuna oral para su aplicación en granjas.

**Responsable:** UV1

**Resultado:** 1) Vacuna oral subunitaria: UV1 ha optimizado el protocolo de expresión y purificación de las proteínas antigénicas seleccionadas, Ftrpr y Fpcrpr, para su obtención en forma de cuerpos de inclusión. Caracterizaron los cuerpos de inclusión comprobado su tamaño y morfología, así como su resistencia a altas temperaturas y pH ácido. Se ha realizado un experimento de inmunización de peces a escala piloto con estas formulaciones, obteniendo resultados prometedores en términos de protección y títulos de anticuerpos. 2) Vacuna oral producida en plantas: UV1 ha producido los fragmentos antigénicos seleccionados en *Nicotiana benthamiana* de forma transitoria, usando como vehículo la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Están poniendo a punto su producción inducible por cobre. En paralelo, se

ha realizado un ensayo de vacunación para valorar el poder inmunógeno de extractos de triturados de la planta transgénica en animales por intubación oral. Todo este trabajo ha sido realizado en colaboración con el Instituto de Biología Celular y Molecular de Plantas CSIC-UPV.

**Grado de consecución:** 70%

**Impacto:** Dado que en ambos casos el objetivo es patentar las nuevas vacunas desarrolladas, los resultados no han sido presentados a congreso ni publicados, con la excepción de dos posters sobre la vacuna subunitarias presentados al congreso Aquaculture Europe-2023 y al CNA. Se han solicitado varias patentes para la protección de la vacuna subunitaria (proteína recombinante, cepa productora y vacuna final).

#### Objetivo 4.4

**Tarea 4.4.1 (M1-M41) - Desarrollo de métodos de control de enfermedades parasitarias** – Mejora de la efectividad y/o sostenibilidad de sustancias alternativas a las ahora en uso (ej. formol contra monogéneos); búsqueda de sustancias atrayentes y diseño de trampas de patógenos, tratamientos del agua, o posibles barreras fisicoquímicas que impidan la colonización del hospedador.

**Responsable:** CSIC3

**Participantes:** UV3

**Resultado:** CSIC3 ha realizado diversas acciones dentro de esta tarea: 1) Dos experiencias *in vivo* con piensos con aditivos comerciales, de tipo nutracéutico, en infecciones por *E. leei* (intestinal) y *S. chrysophrii* (branquial) en dorada. Ninguno de estos aditivos resultó en una mitigación de las infecciones o sus síntomas. 2) Testado *in vitro* frente a *S. chrysophrii* de 7 sustancias fitogénicas, incluyendo productos comercializados como aditivos nutracéuticos con efectividad antiparasitaria en peces. Algunos de los productos testados son altamente efectivos. Se está realizando una prueba *in vivo* con dos de estos productos en un reto con *S. chrysophrii* en el marco de un consorcio constituido con una compañía productora de piensos y otra de aceites esenciales. 3) Testado *in vitro* frente a *S. chrysophrii* de una serie de fármacos antiparasitarios registrados en medicina humana y veterinaria, así como de moléculas análogas seleccionadas por fingerprinting sobre bases de datos farmacológicas. Trabajo realizado en colaboración con investigadoras del CIB, CSIC, en el marco del proyecto Target4cotyle. 4) Dos experiencias *in vivo* para determinar el efecto de suplementos de hierro en los niveles hematológicos de dorada durante una infección experimental por *S. chrysophrii*. Colaboraciones con un grupo productor de dorada, y un contrato con una empresa multinacional productora de aditivos.

**Grado de consecución:** 85%

**Impacto:** El desarrollo de esta tarea está llevándose a cabo de manera altermente colaborativa con otros grupos de investigación y con empresas interesadas (productores de peces o aditivos). El desarrollo de estos métodos de control mejorados y sostenibles es clave para la competitividad de la industria acuícola y el mantenimiento de la salud de los animales de producción.

**Tarea 4.4.2 (M1-M42) - Desarrollo de métodos de control de enfermedades víricas y bacterianas** – Se seleccionarán extractos de distintos tipos tras la evaluación de su toxicidad y su actividad microcida y se evaluará su efectividad *ex vivo* (líneas celulares) e *in vivo* (administración en alimento) mediante la determinación de marcadores inmunológicos/hematológicos y de la protección conferida frente a enfermedades modelo.

**Responsable:** UMH2

**Participante:** UV1

**Resultado:** 1) Bacterias: UV1 estudió la actividad microcida *in vitro* frente a Vv y Vp de productos fitobióticos (suministrados por Igsol Advance S.L) y su poder inmunoestimulante *in vivo* en anguila y langostino. Una de las dietas funcionales (colaboración con el grupo del Dr. Jover-UPV) fue muy beneficiosa para ambas especies en términos de protección. Además, han estudiado nuevos materiales sostenibles con propiedades anti-incrustantes (anti-fouling) realizando ensayos *in vitro* con Vh. Uno de

los materiales inhibió significativamente la formación de biofilm bacteriano y por microalgas en el medio marino. 2) Virus: UMH2 estableció las líneas celulares para ensayos *in vitro*, produjo virus modelo (RGNNV) y estableció la lubina como organismo modelo en su animalario. Evaluó la citotoxicidad de 16 extractos plantas/microalgas y seleccionó tres concentraciones para ensayos *in vitro*. La actividad antiviral de los extractos se evaluó mediante pretratamiento celular, pretratamiento viral y tratamiento después de la infección, resultando en la selección de 5 extractos. Estos 5 extractos se encapsularon en quitosano y se formularon con el pienso para un ensayo *in vivo*. En el ensayo *in vivo* se alimentó a las lubinas durante diferentes tiempos y se recogieron muestras de varios órganos para análisis hematológicos y bioquímicos. Se realizaron dos desafíos experimentales, uno con pretratamiento con los extractos y otro con tratamiento posterior a la infección. Resultados en proceso de análisis.

**Grado de consecución:** 95%

**Impacto:** Parte de estos resultados se han presentado en congresos nacionales e internacionales y se han publicado en revistas indexadas. El compuesto fitobiótico y los extractos de plantas/microalga se podrán incorporar en dietas funcionales comerciales para mejorar la salud de diferentes especies acuáticas. El compuesto anti-fouling se podrá incorporar en polímeros empleados para fabricar acuarios/estructuras acuícolas (en proceso de patente).

**Tarea 4.4.3 (M1-M45) - Evaluación del potencial microcida del agua electrolizada** – Estudios electroquímicos para la generación de agua electrolizada y valoración de su efecto microcida y anti-parasitario, así como de su poder inactivador de sustancias tóxicas y antibióticos.

**Responsable:** UV2

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

**Resultado:** Los efectos del agua electrolizada se probaron frente a diferentes patógenos en colaboraciones entre el grupo UV2 y otros miembros del WP4. 1) Junto con UV1 se demostró la inhibición del crecimiento de Vv y Vh *in vitro* y en microcosmos con diferentes condiciones de salinidad, pH y concentración de cloro. 2) Con UV3, usando el modelo *Poecilia spp.* y monogéneos girodactílicos, se han determinado las dosis letales para los peces y se realizarán pruebas *in vitro* e *in vivo* con los patógenos. 3) UMH2 probó los efectos antivirales *in vitro* no encontrando resultados prometedores con concentraciones no citotóxicas.

UV2 también 1) está realizando ensayos combinando el agua electrolizada con otro desinfectante, con el objetivo de reducir tanto la concentración de cloro activo como la del desinfectante adicional, el glutaraldehído; 2) está evaluando la capacidad del agua electrolizada para eliminar sustancias contaminantes, mediante el seguimiento por espectroscopía UV-Vis y la posterior obtención de espectros de RMN; y 3) estudia la eliminación tanto de bacterias como de contaminantes haciendo pasar soluciones que los contengan a través del electrolizador, determinando si aplicando la mínima cantidad de energía, es posible hidrolizar los contaminantes y erradicar microorganismos, permitiendo siempre la reutilización del agua tratada. CSIC3 envió los datos de ppm de cloro necesarios para inactivar distintos estadios de *S. chrysophrii in vitro*.

**Grado de consecución:** 90%

**Impacto:** Estos resultados han dado lugar a comunicaciones a congresos internacionales y publicaciones en revistas indexadas. Entre los puntos más relevantes del impacto de estos resultados se destaca que la tecnología de agua electrolizada se podría utilizar como medida preventiva durante periodos de estrés para reducir la carga de patógenos en el agua de instalaciones acuícolas.

**Tarea 4.4.4 (M1-M45) - 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.

**Responsable:** UV2

**Participantes:** UMH2

**Resultado:** UV2 y UMH2 se han reunido para concretar posibles dianas en el caso de la enfermedad por RGNNV para el desarrollo de lenguas o narices electrónicas. UV2 ha preparado los colorantes ópticos para realizar mediciones, junto con la evaluación de los principales parámetros de calidad del agua. Los sensores conductimétricos están listos para su uso. Todos los parámetros a medir están relacionados con la calidad del agua, y el objetivo del conjunto de sensores es identificar el momento adecuado para intervenir, ya sea por la aparición de enfermedades, una concentración elevada de nitratos o signos de estrés en los peces.

**Grado de consecución:** 50%

**Impacto:** El desarrollo de esta tecnología permitirá una monitorización de la calidad del agua y el estado de los peces para alertar de situaciones que requieran intervención, como, por ejemplo, un brote infeccioso.

#### Objetivo 4.5

**Tarea 4.5.1 (M6-M42) - Creación de la red REMEDISA –** Puesta en marcha virtual de la red a través de la introducción de sus contenidos en la web de AQUACHANGE.

**Responsable:** UV3

**Participantes:** CSIC3, UPV1, UV1, UV2, UMH2

**Resultado:** UV3 ha desarrollado la versión beta de web REMEDISA con la distribución y categorización de los distintos apartados. El contenido fue consensado con todos los grupos participantes en el WP4 mediante reuniones y comunicaciones por correo electrónico. La web incluirá los documentos y actividades del consorcio. Aparecen ya disponibles y/o publicitados en la Web de REMEDISA el diseño de protocolos (Tarea 4.1.1), actividades de divulgación (Tarea 4.6.1) y eventos de formación (Tarea 4.7.1). La página está disponible en la dirección <https://remedisa.es/>. UPV1 además ha recopilado información de interés sobre el grupo de investigación Señal y Medida (SYM) de la UPV (grupo UPV1 del proyecto) que puede ser de interés para la Red. CSIC3 ha contribuido con contenidos e ideas para el diseño de la web.

**Grado de consecución:** 75%

**Impacto:** La creación de la página web permite una mayor difusión de los resultados, actividades y ofertas del WP4. Se utilizará para hacer públicos recursos de interés como los manuales para toma, envío, recepción y análisis de muestras (Tarea 4.1.1).

#### Objetivo 4.6

**Tarea 4.6.1 (M12-M43) - Divulgación y transferencia de conocimientos y herramientas científico-técnicas –**Desarrollo de una plataforma *on line* para la transferencia del conocimiento generado al sector productivo y al académico para el avance de las investigaciones. Divulgación a la sociedad mediante la participación en foros como Expociencia, actividades de innovación educativa centrada en estudiantes de secundaria, congresos, redes sociales, y otras plataformas transversales y sectoriales para la difusión de resultados.

**Responsable:** CSIC3

**Participantes:** UPV1, UV1, UV2, UV3, UMH2

**Resultado:** Todos los miembros del WP4 han participado activamente en actividades de divulgación y transferencia de los resultados del proyecto. Además de numerosas publicaciones en revistas indexadas y comunicaciones en congresos nacionales e internacionales otras actividades incluyen: creación y colocación de póster resumen del proyecto en edificio 5M, UPV (UPV1); participación anual en jornadas de Puertas Abiertas del Parque Científico de la Universitat de València (EXPOCIENCIA, UV3 y UV1) o en la Jornada Científica IDIBE- UMH (UMH2); participación en la Noche Europea de los Investigadores (UV3 y UV1) o en la XIV Semana de la Ciencia de Torre Vieja (UMH2); presentación del proyecto en másteres universitarios (UV3); publicaciones en revistas especializadas (ej. MisPeces.com, UV3); divulgación en colegios de educación primaria (programa CUENTA-UMH, UMH2); participaciones en ciclos de

conferencias y workshops (CSIC3); mesas redondas con centros tecnológicos e interesados del sector (CSIC3); asistencia técnica en granjas de jaulas marinas (Cerdeña, CSIC3); entrevistas para la Fundación Biodiversidad, RNE, televisión regional Apunt (CSIC3); actividades de docencia colaborativa (UV1); creación de vídeos de divulgación (ej. programa Ciencia Emergente, UV1); participación en la jornada de transferencia Radar de Innovación; y diversas notas de prensa. Los miembros del WP han difundido sus actividades y resultados en sus redes sociales y páginas web de sus centros.

**Grado de consecución:** 80%

**Impacto:** Se han divulgado conocimientos y resultados de investigación a diferentes colectivos educativos y entornos sociales en eventos intra y extraacadémicos, así como en distintos medios de comunicación y foros. Las actividades realizadas tienen mucho éxito y resultan muy enriquecedoras para todos los participantes, independientemente de la edad y entorno social.

#### Objetivo 4.7

**Tarea 4.7.1 (M1-M44) - Formación de los futuros profesionales de la salud en acuicultura a través de jornadas, talleres, cursos de especialización/master en empresas, universidades y centros de investigación**

**Responsable:** UV1

**Participantes:** CSIC3, UPV1, UV2, UV3, UMH2

**Resultado:** El trabajo formativo del WP4 se resume en: 1) Dirección del Máster en Acuicultura (MA) de la UV-UPV-IATS y coordinación de TFMs. Se ha realizado una charla sobre Thinkinazul a los alumnos. >13 TFMs vinculados. 2) Diseño de programas de formación y tutorización de prácticas en empresas/centros de investigación de 28 alumnos del MA en tres cursos académicos. 3) Docencia teórico-práctica y coordinación de las asignaturas de "Patología e Inmunología" y "Control y Diagnóstico de Enfermedades en Acuicultura" del MA. 4) Formación de estudiantes de doctorado (8 tesis, 3 terminadas), de investigadores y de técnicos de apoyo a la investigación (TFM, TFG, INVESTIGO, JAE-Intro-ICU, otros), todos en el área de Salud en Acuicultura. 5) Formación científico-técnica: charlas especializadas sobre salud en acuicultura a estudiantes de grado y postgrado e investigadores senior en BIOTECMED e IDM (Valencia). 6) Docencia en curso de Formación en Investigación con animales A+B+C Roedores y Peces (UV), 2022-24. 7) Docencia teórico-práctica en Máster en Investigación en Biología Molecular, Celular y Genética (Biología Molecular y Celular de la Interacción Hospedador Patógeno). 8) Webinar CIHEAM (ponencia): "Epidemiological model tools for parasite infections" (2023). 9) Ponencia en el VIII Taller Internacional INLARVI2024-Salud y Sistema Inmune de Organismos Acuáticos, Universidad Austral de Chile (on line). 9) Docencia en Fish Immunology Workshop, Universidad de Wageningen (2022 y 24).

**Grado de consecución:**70%

**Impacto:** Se están formando jóvenes que están iniciando su carrera investigadora/técnica en los diferentes laboratorios. Se destaca la labor realizada desde el MA, especialmente a través de la asignatura Prácticas Externas, que representa el trampolín laboral para un porcentaje significativo del alumnado. En torno al 60% de los estudiantes que han realizado prácticas están trabajando en empresas del sector o contratados en centros de investigación en acuicultura.

**Tarea 4.7.2 (M1-M41) - Fomento del uso compartido de los recursos e infraestructuras de investigación**

–Potenciación del uso compartido de recursos técnicos, métodos, e instalaciones de experimentación en acuicultura entre los miembros del WP4 y con otros WPs. Fomento de la movilidad entre investigadores y estudiantes de los grupos participantes.

**Responsable:** UMH2

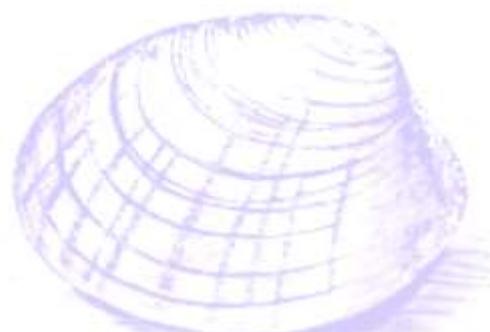
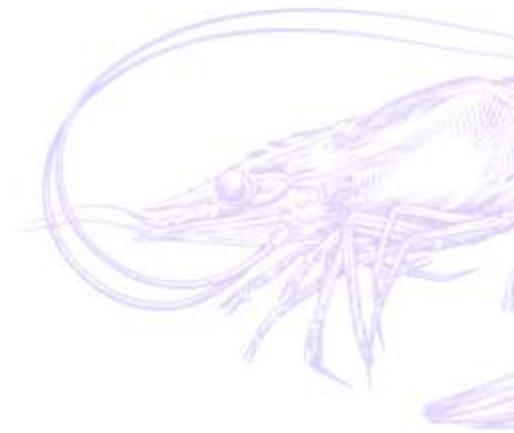
**Participantes:** CSIC3, UPV1, UV1, UV2, UV3

**Resultado:** Todos los miembros del WP4 trabajan para facilitar el uso compartido de recursos y la colaboración. Como responsable, UMH2 ha confeccionado y compartido una tabla Excel para recoger el

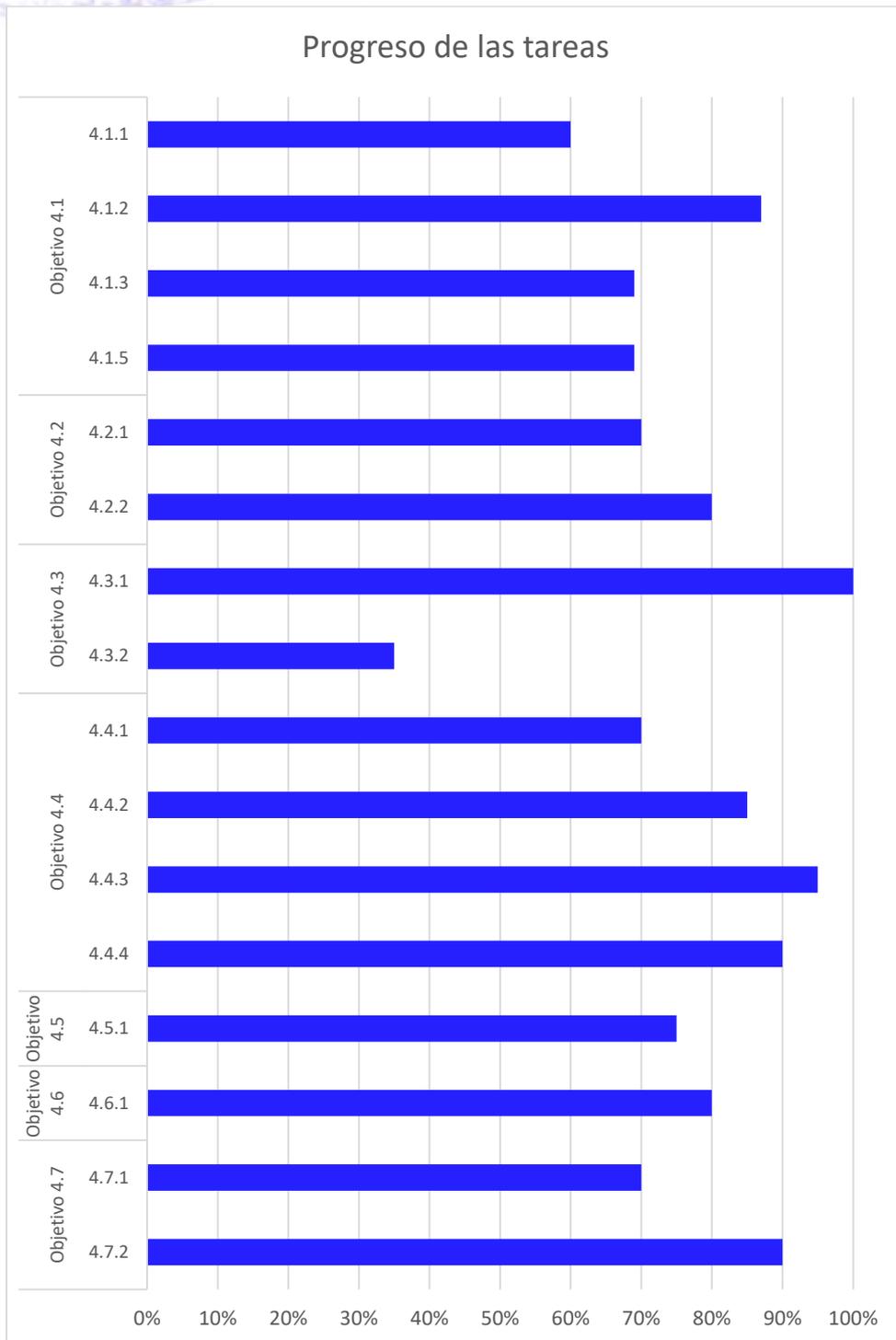
equipamiento de cada grupo. Se prevé su compleción antes de final de 2024. UPV1 ha recopilado información sobre el grupo de investigación Señal y Medida en Química (SYM) de la UPV (UPV1) de interés para el uso compartido de los recursos e infraestructuras de investigación. UV1 fomenta el uso de infraestructuras integradas en el Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental de la UV destacando la Planta Experimental de Acuarios, el servicio de Producción Animal y los servicios de Secuenciación, Microscopía y Cultivos celulares. Existen vínculos de colaboración entre todos los grupos participantes demostrados con trabajos conjuntos. Por ejemplo, UV1 ha o está produciendo trabajos conjuntos con UV2 y UPV1 y también colabora con CSIC7 (WP3) y UA4 (WP1). UV2 ha realizado dos publicaciones y comunicaciones en congresos colaborativas, y trabaja con UV3 para desarrollar la tarea 4.4.1. UV3 colabora con UV2 y CSIC3 en trabajos con microscopía electrónica, con UMH2 para cesión de muestras de virología, o con UPV1 en la cesión de muestras de parásitos.

**Grado de consecución:** 90%

**Impacto:** Las colaboraciones y el uso compartido de recursos son fundamentales para llevar a cabo correctamente los objetivos del WP4.



## Progreso de las tareas a M33



Siendo el M1 enero del 2022

