

CERTIFICACIÓN RELATIVA AL CUMPLIMIENTO DE REQUISITOS CIENTÍFICOS Y
TECNOLÓGICOS A EFECTOS DE LA APLICACIÓN E INTERPRETACIÓN DE
DEDUCCIONES FISCALES

Empresa: PISCIFACTORIAS ANDALUZAS, S.A.

Proyecto nº: IDI-20180902

Título: IMMUNE-FISH: HACIA EL CONTROL INTEGRAL DE LA LACTOCOCCOSIS DE LA TRUCHA ARCOIRIS EN PISCICULTURA

Fecha de solicitud del informe: 06/02/2019

De la evaluación del proyecto de la referencia, la Dirección General del CENTRO PARA EL DESARROLLO TECNOLÓGICO INDUSTRIAL, E.P.E. (CDTI) ha emitido el informe motivado que se adjunta a los efectos oportunos previstos en el Real Decreto 1432/2003, de 21 de noviembre. En cumplimiento de lo establecido en el artículo 8.4 de dicho Real Decreto, este informe se emite para los periodos impositivos cuyo plazo voluntario de declaración no haya finalizado con anterioridad a la fecha de su solicitud.

En la instrucción de este procedimiento se ha prescindido del trámite de audiencia al no figurar ni haber sido tenidos en cuenta en la resolución otros hechos u otras alegaciones y pruebas que las aludidas por el interesado.

IDENTIFICACIÓN EMPRESA / PROYECTO

Razón social	PISCIFACTORIAS ANDALUZAS, S.A.	CIF	A-18009597
Domicilio social	CRTA. ANTIGUA DE SIERRA NEVADA, 18 BLOQUE 2 ES.		
Código / Población	18191/PINOS GENIL	Provincia y CCAA	GRANADA/ANDALUCIA
Dirección Desarrollo	BARRIADA DE LA ESPERANZA.MANANTIAL FRONTIL		
Código / Población	18300/ESPERANZA, LA (LOJA)	Provincia y CCAA	GRANADA/ANDALUCIA
Título Proyecto CDTI	IMMUNE-FISH: HACIA EL CONTROL INTEGRAL DE LA LACTOCOCCOSIS DE LA TRUCHA ARCOIRIS EN PISCICULTURA		
Tipo Proyecto CDTI	Proyecto de Innovación FEMP		
Código CDTI	IDI-20180902		
Fecha Inicio	01/07/2018		
Duración	36 MESES		

CALIFICACIÓN FISCAL: Proyecto de I+D

OBJETIVOS TÉCNICOS.

El objetivo general del proyecto es el establecimiento de un programa multidisciplinar para el control de enfermedades infecciosas de naturaleza bacteriana en piscifactorías continentales basado en la combinación de medidas de manejo y nutrición, así como estrategias de inmunización con el fin de evitar el uso de antibióticos y maximizar el bienestar animal. Además, el proyecto está orientado hacia la sostenibilidad ambiental explorando la posibilidad de reutilizar subproductos de la industria oleícola como posible estrategia para la estimulación de la inmunidad de los animales minimizando el uso de antibióticos y proporcionando productos más naturales y ecológicos.

La evaluación de esta nueva aproximación en el control de enfermedades infecciosas de relevancia en acuicultura se realizará en una enfermedad bacteriana que causa grandes pérdidas económicas en las piscifactorías españolas, la lactococcosis de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), si bien los conocimientos generados sentarán las bases para la evaluación y diseño de programas para el control de otras enfermedades bacterianas de trascendencia en el sector acuícola.

La consecución de este objetivo general tiene como objetivos implícitos: (i) ambientales (desarrollo de programas sanitarios que minimicen los residuos de antibióticos, desinfectantes, etc. que pueden ser excretados al agua y otros productos de piscicultura), (ii) bienestar y sanidad animal (reduciendo el estrés animal con el fin de salvaguardar el bienestar animal) y (iii) estratégicos/comerciales (reduciendo los gastos de antibióticos, minimizando los efectos adversos de los mismos como los periodos de supresión y maximizando la rentabilidad productiva por animal –reduciendo la mortalidad/morbilidad derivada de la infección-).

Para alcanzar este objetivo general será necesaria la consecución de los siguientes objetivos técnicos específicos:

1. Diseño, desarrollo y puesta a punto de una técnica ELISA para la monitorización de la respuesta inmune adquirida de los peces inmunizados mediante las diferentes estrategias evaluadas en el proyecto. A su vez, este objetivo pretende:
 - i. Evaluar la inmunogenicidad conferida por los adyuvantes, vacunas e inmunocomplejos evaluados.
 - ii. Establecer una correlación entre los niveles de anticuerpos circulantes y el estado de protección frente a la infección por *L. garvieae* lo que permitirá el diseño de un método indirecto para evaluar el estatus inmunológico de los animales.
2. Valoración del efecto de la alimentación inmunoestimulante en la prevención de la lactococcosis y en otros agentes infecciosos potencialmente presentes en las piscifactorías durante la fase de nursery o alevinaje de producción de la trucha arco iris.
3. Evaluación de la seguridad, inmunogenicidad y eficacia de dos adyuvantes vacunales (hidróxido de aluminio y saponinas) en la prevención y control de la lactococcosis en trucha arco iris.
4. Desarrollo, cuantificación y valoración de inmunocomplejos (molécula formada por la unión antígeno-anticuerpo) y evaluación del efecto de los mismos sobre la intensidad y duración de la respuesta inmune innata y adquirida de alevines.

5. Evaluación de la implementación de un sistema de prevención y control de *L. garvieae* en trucha arcoiris basado en el empleo de nutracéuticos y alternativas vacunales, así como evaluación de las medidas de manejo (con especial atención a los procesos de desinfección) atendiendo a parámetros como la oxigenación, la temperatura y el pH con el fin de ajustar el programa sanitario a las mismas.

VALORACIÓN TECNOLÓGICA.

Se considera un proyecto de I+D, desde el punto de vista fiscal, por tratarse de una mejora tecnológica sustancial en el campo de la alimentación, la nutrición y la sanidad animal en el cultivo de truchas con el fin de diseñar e implementar un sistema de control sanitario de enfermedades infecciosas (tomando como modelo *L. garvieae*), suponiendo un avance significativo en el sector acuícola continental en el que se ubica la empresa.

ACTIVIDADES:**Actividad 1: DESARROLLO DE UNA SISTEMA ELISA PARA LA MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA – SEROLÓGICA- DE LA TRUCHA ARCOÍRIS****Descripción:** Descripción

Para valorar la eficacia de los nutraceuticos en la estimulación de la respuesta inmunitaria innata y la eficacia de las estrategias vacunales evaluadas resulta de sumo interés analizar el nivel de anticuerpos circulantes que se van produciendo a lo largo del ciclo de producción de la trucha, tanto la concentración total en suero, como el porcentaje de los mismos que son específicos frente a *L. garvieae*. Para la determinación de la concentración total de anticuerpos en suero se desarrollará un ELISA y para analizar la respuesta inmune humoral que se produce con las distintas formulaciones vacunales se desarrollará un ELISA indirecto frente a *L. garvieae*.

Tareas

- 1.- Desarrollo del ELISA sándwich para determinación de la concentración total de anticuerpos en suero. Se empleará como anticuerpo de captura un anticuerpo monoclonal (AcM) obtenido en ratón y como anticuerpo de revelado un anticuerpo policlonal (AcP) obtenido en conejo. Como estándar se empleará la IgM de trucha purificada por afinidad.
- 2.- Desarrollo de ELISA indirecto de detección de anticuerpos frente a *L. garvieae*. Con el fin de determinar el porcentaje de anticuerpos específicos frente al patógeno realizaremos un ELISA indirecto. Para tapizar la placa se empleará o las bacterias crecidas en medio líquido, o la bacterina o un extracto soluble de *L. garvieae* obtenido por rotura mecánica con Bullet-Blender. Aquel antígeno que proporcione un ensayo con mejor especificidad y sensibilidad será el empleado para analizar la respuesta inmune humoral. Como anticuerpo de revelado se empleará o el AcM o el AcP obtenidos en la tarea 1.

Metodología:

- Purificación de IgM de trucha.

Dada la cantidad y el tipo de inmunoensayos que se necesita realizar es imprescindible obtener al menos un anticuerpo policlonal y un anticuerpo monoclonal propios frente a las inmunoglobulinas de trucha. Para ello será necesario realizar una purificación de IgM mediante técnicas de filtración molecular y cromatografía de intercambio iónico (Magnadóttir 2012).

- Obtención de anticuerpos frente a la inmunoglobulina de trucha.

Inicialmente se obtendrá Anticuerpos Monoclonales (AcM) frente a la IgM de trucha, para ello se emplearán los métodos convencionales descritos por Galfre y Milstein (Galfre y Milstein, 1981; Goding, 2004). Una vez obtenido el AcM, se creará *in vitro*, se purificará y se acoplará a una matriz inerte tipo glyoxal o sepharosa que nos permita realizar una columna de afinidad. Con ella se purificará la inmunoglobulina de trucha a partir de suero normal. Esta preparación de anticuerpo, se empleará para inmunizar conejos New Zealand y obtener el Anticuerpo Policlonal. Además, se empleará como estándar en el ELISA tipo sándwich de semicuantificación.

- Desarrollo de ELISA tipo sándwich para determinar la concentración de IgM total en suero de trucha

Como anticuerpo de captura se empleará los AcM de ratón previamente crecidos y purificados por proteína G, a una concentración de 10ug/ml. Seguidamente tras bloquear uniones inespecíficas BSA al 2% se añadirán los sueros de las truchas a la dilución de trabajo seleccionada, y la IgM purificada a una concentración conocida y en diluciones seriadas para poder determinar la curva patrón. Tras la incubación, se empleará como anticuerpo de revelado suero policlonal de conejo marcado con biotina y estreptavidina-HRP. Los ensayos se realizarán por cuadruplicado, y se calculará la concentración mínima detectable o el límite de detección (LD) y concentración de componente detectado en el punto correspondiente al 50% de la máxima señal (EC50).

- Desarrollo del ELISA indirecto para monitorización de respuesta inmunitaria humoral

Las placas de 96 pocillos se tapizarán con 50 µl de *L. garvieae* (500 x 106/ml) o bien con 10ug/ml de antígeno soluble obtenido por rotura mecánica de las bacterias con Bullet-Blender. Tras incubar toda la noche a 4°C y bloquear (30 min a 37°C) con albumina sérica, se añadirá los sueros de las truchas a la dilución de trabajo previamente establecida. Los sueros se incubarán durante 2 horas a 37°C, se lavará con PBS suplementado con 0.05% de tween y añadiremos el anticuerpo secundario, anticuerpo policlonal de conejo, purificado por afinidad y marcado con Biotina. Tras incubar durante 1h a temperatura ambiente revelaremos con Estreptavidina-HRP. El desarrollo de color se produce cuando añadimos como cromóforo OPD en presencia de H2O2. La reacción se para empleando H2SO4.

Periodo de ejecución: Primera anualidad o hito.

ACTIVIDADES:**Actividad 2: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE NUTRACÉUTICOS EN LA ESTIMULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA EN ALEVINES HASTA 50G****Descripción:** Descripción:

El microbioma o conjunto de microorganismos del tracto intestinal juega un papel fundamental en la asimilación de nutrientes, el bienestar animal y la respuesta inmune. La administración de probióticos, prebióticos y otras sustancias pueden modificar la microbiota intestinal teniendo beneficios para la salud de los animales. Esta actividad busca evaluar el efecto de alimentación como medida alternativa para la inmunoestimulación de la respuesta innata de las truchas durante las primeras etapas de desarrollo usando tres aproximaciones: uso de probióticos, administración de vitaminas y la ingestión de FOD (fermentado de oliva desengrasado) en el pienso. El uso de nutraceuticos en esta etapa persigue una doble finalidad: i) reducir el empleo de antimicrobianos y ii) retrasar la edad de vacunación mediante la estimulación de la respuesta inmune innata de los alevines.

Tareas:

Tarea 1- Determinación de la actividad antimicrobiana in vitro del FOD frente a *L. garvieae*.

Esta tarea tiene como objetivo evaluar in vitro el antagonismo entre *L. garvieae* y FOD evaluados en el presente proyecto mediante la determinación de la CMI (concentración mínima inhibitoria). Esta tarea permitirá realizar una selección previa de la viabilidad de este producto que se empleará in vivo en los alevines de trucha con el fin de minimizar las sustancias a analizar.

Tarea 2- Administración de nutraceuticos y monitorización del efecto de los mismos sobre la respuesta inmune, estatus sanitario y otros parámetros biológicos en alevines de menos de 50g de peso.

El objetivo de esta tarea es evaluar el impacto de la administración de diferentes nutraceuticos evaluados en la respuesta inmune (nivel de anticuerpos), índices productivos (ganancia de peso), parámetros fisiológicos (hematológicos y composición de la microbiota intestinal), indicadores etológicos y estatus sanitario (índices de mortalidad, aparición de síntomas clínicos, índices de consumo de pienso, etc.). Para la consecución de esta tarea, se dividirán los animales en diferentes grupos de trabajo (1 grupo/tanque). Se incluirán dos grupos control que recibirán la alimentación habitual no suplementada permitiendo detectar posibles alteraciones en cualquiera de los parámetros controlados debidas a factores externos a la alimentación. La administración de nutraceuticos se realizará durante al menos un mes previamente al inicio de la toma de muestras (sangre y contenido intestinal) y la recogida de datos productivos. La observación diaria de los alevines (inspección visual para el análisis del comportamiento, observación de aparición de signos de enfermedad, valoración de la mortalidad detectada, etc.) se realizará desde el inicio de la tarea. Con el fin de determinar el efecto de estos nutraceuticos en la estimulación de la respuesta inmune innata de los peces a largo plazo, la protección inducida por los nutraceuticos se evaluará durante las actividades 3 y 4 con el fin de evaluar si la inmunoestimulación inducida por la alimentación durante la fase de nursery permite retrasar la edad de vacunación.

Tarea 3- Análisis de resultados y toma de decisiones.

El registro de datos productivos de los animales estudiados y aquellos incluidos en los grupos control se realizará al inicio del estudio y mensualmente hasta el paso de los alevines a la fase de preengorde. Los datos productivos podrán evaluarse intra-grupo (con el fin de evaluar el efecto de cada producto per se en el desarrollo de los alevines de trucha y su respuesta inmunitaria) e inter-grupo (como estudio comparativo del efecto de los diferentes productos evaluados). De manera quincenal después de un mes de administración de los productos, se procederá al muestreo de sangre (evaluación de respuesta inmune serológica, parámetros bioquímicos, hematología, etc.) y microbiota intestinal en animales de cada grupo.

Metodología:**• Determinación de la CMI**

La determinación de la CMI se realizará aplicando diferentes protocolos en función de la naturaleza oleosa o acuosa de los productos evaluados. Se realizará una selección de cepas de *L. garvieae* procedentes de casos clínicos de los últimos 10 años aislados en la propia explotación. Los aislados se descongelarán y resembrarán en agar Columbia- sangre de cordero al 5% (BioMérieux, Marcy L'Étoile, Francia) siendo incubados durante 24h a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y en atmósfera de aerobiosis. Para la preparación de inóculo se seguirá las indicaciones del National Commmittee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) ajustando primero el inóculo a 105 CFU y segundo se realizará una dilución 1/200 en caldo Mueller-Hinton (MH).

• Análisis visual

Todas las piscinas serán evaluadas visualmente dos veces al día con el fin de determinar el estado sanitario, comportamiento, mortalidades, etc. de los peces. Cualquier alteración en una piscina debe ser siempre comparada con las

ACTIVIDADES:

piscinas control.

- Parámetros productivos

Considerando que la administración de estos productos puede afectar a la microbiota intestinal, se valorará el impacto que tienen sobre índices productivos como la ganancia de peso, índice de conversión, consumo de pienso, etc. Estos datos se compararán tanto con los resultados de la piscina que consume el pienso habitual (no complementado, grupo control, tanques 1 y 2) como con los resultados obtenidos en esta fase de producción durante los últimos 5 años de la piscifactoría.

- Anatomía patológica

El impacto de los nutracéuticos sobre la flora intestinal, la condición corporal de los animales incluidos en cada grupo, la aparición de lesiones o alteraciones a nivel tisular así como otros parámetros fisiológicos se evaluará también mediante un estudio anatomopatológico de un número representativo de animales de cada estanque. Se recogerán muestras (intestino, hígado, riñón y cerebro) al inicio del ciclo productivo (día 0 de administración del nutracéutico) y mensualmente hasta su paso a la fase de preengorde (y durante etapas posteriores en la misma).

- Parámetros sanguíneos

La toma de muestra de sangre se realizará al inicio del periodo de ejecución de esta tarea (parámetros basales) y de manera quincenal tras el primer mes de alimentación suplementada. En cada muestreo se recogerán dos muestras de sangre:

o Suero: para la determinación de los niveles de anticuerpos mediante un ELISA específico para trucha arcoiris y perfiles bioquímicos (p.e. ALT, ALP, Urea, etc.).

o Sangre con fluoruro sódico para determinación de glucosa (en algunos muestreos).

- Secuenciación masiva (NGS, Next Generation Sequencing)

Considerando que un alto porcentaje de la microbiota intestinal es no cultivable es necesario la aplicación de técnicas de secuenciación masiva para la caracterización de la composición de la flora intestinal. Se prevé la aplicación de la secuenciación masiva para conocer composición flora intestinal antes y después de la administración de los diferentes nutracéuticos. Además, se realizará un estudio comparativo de la microflora de los animales estudiados (administración nutracéuticos) y aquellos controles en cada grupo experimental para determinar la prevalencia de microorganismos patógenos resistentes a antimicrobianos. La técnica de NGS identificará las familias y géneros de microorganismos que forman la microbiota intestinal, al igual que su abundancia relativa en la población bacteriana total. Se llevará a cabo el estudio del metagenoma (NGS 16SRNA) mediante el uso de cebadores universales dirigidos a la región hipervariable V3-V4. Los amplicones producidos serán preparados usando Nextera XT library prep kit (Illumina) y secuenciados usando MiSeq Sequencer (Illumina). Las OTU (Operative Taxonomic Units) se obtendrán empleando el software QIIME.

Periodo de ejecución: Primera y segunda anualidad o hitos.

Actividad 3: EVALUACIÓN DE LA UTILIDAD DE ADYUVANTES DE ORIGEN NATURAL PARA PROLONGAR LA ESTIMULACIÓN DE UNA RESPUESTA INMUNE PROTECTORA FRENTE A L. GARVIEAE EN TRUCHA ARCOIRIS.**Descripción:** Descripción:

Se realizará en dos etapas: en primer lugar, se evaluará la seguridad y protección conferida por las diferentes formulaciones vacunales en el modelo experimental pez cebra (*Danio rerio*) y, en segundo lugar, aquella formulación vacunal que presente los mejores resultados se evaluará en condiciones de campo.

Tareas

Tarea 1- Evaluación de la seguridad y protección conferida por los adyuvantes estudiados en modelo experimental pez cebra (*Danio rerio*).

El pez cebra (*Danio rerio*) ha demostrado ser un modelo experimental para el estudio de patógenos de peces, incluido *L. garvieae* (Aguado-Urda et al., 2014). En el presente proyecto, se empleará el pez cebra como herramienta de cribado de las diferentes estrategias vacunales.

- Grupos experimentales:

A.- Grupo control: no expuesto.

B.- PBS + inmunoestimulantes:

o B1. Saponina

o B2. Hidróxido de aluminio

o B3. B1+B2

ACTIVIDADES:

C.- Bacterina (autovacuna): actualmente empleada.

D.- Bacterina + inmunoestimulantes:

- D1. Bacterina + saponina
- D2. Bacterina + hidróxido de aluminio
- D3. Bacterina + saponina + hidróxido de aluminio

Estos animales se someterán a dos fases de estudio:

1.- Vacunación: formulaciones vacunales (PBS para grupo control) por vía intraperitoneal. Los animales serán observados diariamente. Un subgrupo será sacrificado para determinar la aparición de lesiones internas derivadas de la inoculación (evaluación de la seguridad).

2.- Desafío: para determinar diferencias en la protección conferida por las diferentes estrategias vacunales. Se realizará una infección experimental mediante inyección intraperitoneal de *L. garvieae*. El grupo control será empleado como indicador de infección. Para valorar la eficacia vacunal, se determinará el índice de supervivencia relativa y grado de infección.

Tarea 2- Valoración de la inmunogenicidad y protección conferida por las formulaciones vacunales seleccionadas frente a *L. garvieae* en condiciones naturales:

El adyuvante (o combinación) con mejores resultados en pez cebra será evaluado en esta fase. La formulación de bacterina y adyuvante será comparada con la administración de bacterina exclusivamente. Considerando la actividad 2, los animales serán inmunizados en dos tiempos: al inicio de la fase de preengorde (protocolo actual) y un mes después del inicio (nuevo protocolo). La existencia de resultados diferentes en los tanques que hayan sido inmunizados con la misma formulación estarán asociados con el momento de la vacunación y, por tanto, podrá decidirse si la aplicación de nutracéuticos en la fase de alevinaje permite o no retrasar la edad de inmunización. Los peces están expuestos a un ambiente crónicamente contaminado por *L. garvieae* lo que supondrá un desafío para la protección conferida por la vacuna. Los peces serán inspeccionados visualmente dos veces al día durante las 2-3 semanas posteriores a la inmunización. Después, serán inspeccionados diariamente. Se registrarán datos productivos, aparición de síntomas compatibles, alteraciones en el comportamiento, etc. Se monitorizará la respuesta serológica frente a *L. garvieae* con el fin de determinar diferencias en la inmunogenicidad de las dos formulaciones. Las bajas detectadas serán sometidas a un diagnóstico etiológico (siempre que sea asumible por el laboratorio).

Metodología:

- Preparación de la formulación vacunal (bacterina y adyuvante/s)

En el caso del hidróxido de aluminio y la saponina, Vinay et al. (2014) establecieron que no presentaban problemas de toxicidad a una dosis de 5 µg/animal y 1600 µg/animal, respectivamente en *Paralichthys olivaceus*. Así, las dosis de trabajo no superarán estas cantidades. La bacterina se preparará de acuerdo al protocolo habitual.

- Cepa de desafío experimental en modelo pez cebra

Una cepa aislada en la propia piscifactoría en un caso clínico de lactococosis será empleada en la infección experimental de los peces cebra. La cepa será previamente caracterizada mediante técnicas moleculares para emplear una cepa causante de los brotes de enfermedad acontecidos en España. Se incubará a 22°C en agar sangre durante 24h.

- Vacunación y desafío en pez cebra

Grupos (15-20 peces/grupo):

A. Bacterina (autovacuna, que no serán desafiados –control-).

B. Saponina.

C. Hidróxido de Aluminio.

D. Saponina + hidróxido de aluminio.

E. Bacterina + saponina.

F. Bacterina + hidróxido de aluminio.

G. Bacterina + hidróxido de aluminio + saponina.

H. PBS (no vacunado, sí desafiado)

I. PBS (no vacunado, no desafiado)

Los animales serán inmunizados con las diferentes formulaciones vacunales o PBS mediante la vía intraperitoneal. Tras los primeros 21 días después de la vacunación, todos los animales (excepto los grupos B y J) serán desafiados (107 de *L. garvieae*). La protección inducida se evaluará mediante: índice de supervivencia, índice de aislamiento y análisis anatómico-patológicos.

- Vacunación y desafío en condiciones de campo en especie de destino

El efecto del adyuvante (o combinación de adyuvantes) con mejores resultados en la tarea 1 será analizado mediante dos aproximaciones:

- 1.- La inducción de anticuerpos.

ACTIVIDADES:

2.- La protección conferida.

De acuerdo al esquema de tanques:

- Tanque 8: vacunados según protocolo actual al inicio de la fase de preengorde como control para evaluar el efecto sobre la respuesta inmune de los nutracéuticos de la fase de alevinaje.

- Tanque 9: vacunados según protocolo actual un mes después del inicio de preengorde para comparativa con truchas que han tomado nutracéuticos durante la etapa nursery.

- Tanque 10: vacunados siguiendo el protocolo actual, mediante bacterina y adyuvante al inicio de la fase de preengorde en animales que han tomado nutracéuticos durante la etapa nursery.

- Tanque 11: vacunados un mes después del inicio de la fase de preengorde, mediante bacterina y adyuvante al inicio de la fase de preengorde en animales que han tomado nutracéuticos durante la etapa nursery.

- Tanque 12: vacunados siguiendo el protocolo actual, mediante bacterina al inicio de la fase de preengorde en animales que han tomado nutracéuticos.

- Tanque 13: vacunados un mes después del inicio de la fase de preengorde mediante bacterina en animales que han tomado nutracéuticos.

- Tanque 14: vacunados al inicio de la fase de preengorde mediante bacterina con adyuvante a en animales que han tomado nutracéuticos.

Para evaluar la seguridad de la nueva formulación vacunal, los animales serán inspeccionados diariamente (2-3 veces las tres primeras semanas post-vacunación, al menos). La aparición de signos clínicos de enfermedad, mortalidades, comportamientos anómalos, etc. se estudiará mediante análisis microbiológicos, moleculares y anatomo-patológicos.

- Evaluación de la inmunogenicidad de las formulaciones vacunales objeto de estudio en trucha arcoíris

Mediante la detección y cuantificación de anticuerpos frente a *L. garvieae*. Se recogerán muestras de suero tanto el día de la inmunización y como quincenalmente. El título de anticuerpos será determinado mediante el ensayo de ELISA desarrollado en la actividad 1.

- Análisis microbiológicos y detección molecular en tejido

Con el fin de determinar el grado de protección conferido por las formulaciones vacunales, se realizará un análisis etiológico mediante técnicas de bacteriología y técnicas de biología molecular (detección directa de *L. garvieae* en tejidos). En caso de fallo vacunal, en el que el número de muestras pueda ser muy alto, se realizará el diagnóstico etiológico sobre un número representativo de individuos de cada grupo. Además, se seleccionará un número de animales aparentemente sanos al final de cada ciclo productivo de cada una de las piscinas con el fin de detectar la presencia de animales portadores asintomáticos.

- Análisis anatomo-patológicos

Los animales analizados ser someterán a una necropsia sistemática y reglada incluyendo un examen macroscópico e histológico.

Periodo de ejecución: Primera y segunda anual

Actividad 4: UTILIDAD DE LOS INMUNOCOMPLEJOS FRENTE A *L. GARVIEAE* EN LA LUCHA CONTRA LA LACTOCOCOSIS DE LA TRUCHA ARCOÍRIS

Descripción: Descripción:

La utilidad de los inmunocomplejos para modular o mejorar la respuesta inmune de un hospedador se ha demostrado en múltiples ocasiones, de hecho, esta estrategia vacunal contra la difteria en niños fue galardonada con el primer Nobel de honor en el siglo XXI (Hans, 2001). El efecto inmunomodulador de los ICs podría deberse más a su capacidad para redirigir la respuesta inmune del hospedador que la protección pasiva conferida (Brady, 2005). Esta actividad tiene como objetivo principal evaluar el potencial de los ICs formados por bacterina *L. garvieae*-anticuerpos específicos de trucha arcoíris como adyuvantes al ser co-administrados con la vacuna rutinaria frente a *L. garvieae* con el fin de incrementar (intensidad y duración) de la protección conferida por la inmunización.

Tareas:

ACTIVIDADES:

1.- Formación, valoración y cuantificación de inmunocomplejos (ICs) de *L. garvieae*-anticuerpos

1.1. Obtención de suero policlonal de conejo frente a *L. garvieae*.

Se obtendrá el antisuero inmunizando conejos New Zealand con la bacteria. Los animales recibirán al menos, tres dosis de antígeno según protocolos estándares de obtención de antisueros en conejos.

1.2. Determinación de la concentración óptima de Antígeno-Anticuerpo con la que se debe formar los ICs.

Para cuantificar la interacción antígeno-anticuerpo emplearemos un test de Cuantificación por Precipitación basado en el descrito por Heidelberg y Kendall con modificaciones (Heidelberg, 1939).

2.- Evaluar la respuesta inmune innata y adquirida de truchas inmunizadas con bacteria libre y la combinación de bacteria e ICs.

Previamente a la inmunización, se recogerá suero con el fin de determinar los valores control o basales en los diferentes grupos vacunales. Un total de seis grupos de animales (1 grupo/tanque) serán incluidos en el estudio:

- Grupo 8, 10 y 12: serán inmunizados con bacteria libre (vacuna habitual) (junto con co-adyuvantes en caso de que su eficacia se haya demostrado). La diferencia entre estos tres grupos será la edad de vacunación que se realizará en tres momentos diferentes de la fase de preengorde con el fin de: (1) evaluar de nuevo la capacidad de los nutracéuticos empleados en la etapa de nursery en alevines para estimular la respuesta inmune innata permitiendo retrasar la edad de vacunación (inicio del ciclo -piscina 10-, un mes después -piscina 8-, y dos meses después -piscina 12-) y (2) determinar la respuesta inmune adquirida por esta estrategia vacunal.

- Grupos 9, 11 y 13: serán inmunizados con la combinación de bacteria e ICs (junto con co-adyuvantes en caso de que su eficacia se haya demostrado). Del mismo modo de que el grupo anterior, los tres grupos vacunales serán inmunizados en tres momentos diferentes de esta etapa de producción (inicio del ciclo -piscina 11-, un mes después -piscina 9-, y dos meses después -piscina 13-). La comparación de la respuesta inmune inducida por este grupo y el grupo inmunizado con la bacteria libre permitirá deducir el efecto de los ICs como inmunoestimuladores.

Los animales serán inspeccionados visualmente dos veces al día durante las 2-3 semanas posteriores a la inmunización con el fin de detectar cualquier alteración en el comportamiento, aparición de síntomas de enfermedad, etc. Tras este periodo, los animales serán inspeccionados diariamente. Después de la inmunización, se recogerá suero quincenalmente tras la vacunación (en fechas variables según el grupo vacunal) hasta que los animales alcancen el peso de venta. El título de anticuerpos será determinado mediante el ensayo de ELISA desarrollado en la actividad 1.

3.- Valorar la protección conferida por los ICs frente a la infección por *L. garvieae* en condiciones naturales.

Se puede considerar que la explotación tiene un estado de crónicamente infectado por *L. garvieae* donde los animales se infectan por cohabitación en los estanques. Esta circunstancia será utilizada para evaluar la inmunidad inducida por las diferentes estrategias vacunales evaluadas para inducir una protección frente a la infección por *L. garvieae* por contacto natural (sin desafío experimental):

- Tanque 8. Inmunizados con bacteria libre un mes después de su entrada en fase de preengorde.
- Tanque 9. Inmunizados con bacteria + ICs un mes después de su entrada en fase de preengorde.
- Tanque 10. Inmunizados con bacteria libre a la entrada de la fase de preengorde.
- Tanque 11. Inmunizados con bacteria + ICs a su entrada de la fase de preengorde.
- Tanque 12. Inmunizados con bacteria libre dos meses después de su entrada a la fase de preengorde.
- Tanque 14. Inmunizados con bacteria libre + ICs dos meses después de su entrada de la fase de preengorde.

Para la consecución de esta tarea, los animales serán evaluados diariamente respecto a su estado sanitario, comportamiento, mortalidades, etc. Las bajas serán sometidas a una necropsia completa, un análisis bacteriológico y anatomo-patológico con el fin de determinar la etiología de la mortalidad. Además, se recogerán datos productivos (ganancia de peso, consumo de pienso, etc.) de cada piscina.

Metodología:

- Preparación de inóculo

Para todos los ensayos (inducción de anticuerpos en conejo, preparación de bacteria, etc.) se empleará una cepa clínica de *L. garvieae* aislada en la propia piscifactoría en un brote de lactococosis en trucha arcoiris. La cepa se incubará a 22°C en agar sangre durante 24h. La cepa será inactivada de acuerdo al protocolo habitual de preparación.

- Obtención de antisuero anti *L. garvieae*

Se emplearán conejos New Zealand los cuales serán inmunizados con 3 dosis, separadas 21 días, de bacteria (2000 x 10⁶ UFC) emulsionadas en adyuvante incompleto de Freud. Tras la última inoculación se tomará una muestra de sangre (aproximadamente 10ml) de la arteria auricular y se medirá el título de anticuerpos específicos frente a *L. garvieae* empleando un ELISA indirecto o citometría de flujo.

ACTIVIDADES:

- Cuantificación de la bacterina (*L. garvieae* inactivado)

Se estima que una densidad óptica OD 600=1.2 corresponde a 1x10¹¹ UFC/ml (Kubilay et al., 2008). Se analizará y cuantificará la viabilidad del cultivo por citometría de flujo.

- Formación y valoración de ICs

Para determinar la concentración óptima de *L. garvieae*-inmunoglobulina de conejo necesaria para la formación de ICs se empleará el método de precipitación (Heidelberger y Kendall). Brevemente se basa en que el ICs precipita espontáneamente o por centrifugación cuando la proporción de antígenos y anticuerpos de la mezcla es equivalente. La precipitación es máxima allí donde la proporción entre ambos es óptima, pero disminuye a medida que predomina el anticuerpo o el antígeno.

- Formulación de los preparados vacunales e inmunización

La bacterina de *L. garvieae* se preparará mediante inactivación con formaldehído ajustando la concentración a la dosis eficaz de trabajo. La bacterina de *L. garvieae* inactivada con formaldehído, lavada y resuspendida en PBS será mezclada con el adyuvante o adyuvantes para ser inoculada en los animales de las piscinas. Con respecto a la formulación de los ICs se elegirá la concentración determinada en el anterior punto.

- Valoración de la respuesta inmune adquirida en animales inmunizados con bacterina y aquellos inmunizados con bacterina e ICs.

Se recogerán muestras de suero en animales de cada grupo experimental tanto el día de la inmunización como quincenalmente hasta el final de la experiencia. El título de anticuerpos será determinado mediante el ensayo de ELISA (actividad 1) comparando la evolución del mismo dentro de cada grupo experimental (comparación del título detectado antes y después de la inmunización y evaluación post-vacunal del nivel de anticuerpos circulantes) como entre los diferentes grupos (animales inmunizados con al bacterina comparados con los vacunados mediante bacterina e ICs con el fin de evaluar el impacto de los ICs sobre el nivel de anticuerpos vacunales circulantes).

Actividad 5: IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE *L. GARVIEAE* BASADO EN EL EMPLEO DE NUTRACÉUTICOS Y ALTERNATIVAS VACUNALES, ASÍ COMO EVALUACIÓN DE LAS MEDIDAS DE MANEJO**Descripción:** Descripción

La reducción de uso de antibióticos, la preservación del bienestar animal (reducción del número de capturas y manipulaciones que causan estrés animal) y una producción sostenible desde el punto de vista ambiental son los principales objetivos que persigue este proyecto y que se evaluarán en el presente paquete de trabajo. Este paquete de trabajo tiene como objetivo evaluar en la práctica el conjunto de medidas evaluadas en el presente proyecto (nutracéuticos/adyuvantes/inmunocomplejos) así como determinadas prácticas de manejo, como la desinfección que permite reducir la carga bacteriana, pero puede tener un efecto sobre la calidad del agua y la salud de los animales. Para ello, se monitorizarán dos grupos de animales desde la etapa de alevinaje hasta la fase de engorde. Estos animales recibirán la alimentación complementada con nutracéuticos hasta alcanzar el peso de vacunación (paquete de trabajo 3) y serán inmunizados frente a *L. garvieae* con la formulación vacunal que haya presentado mejores resultados (paquetes de trabajo 4 y 5). Los animales serán monitorizados periódicamente con el fin de valorar rendimientos productivos, parámetros fisiológicos, estado inmunológico, etc. que permitan obtener conclusiones sobre la eficacia de las medidas implantadas para la prevención y control de *L. garvieae* en trucha arcoiris. Los animales pertenecerán a distintas épocas del año con el fin de evaluar el impacto de variables como la oxigenación o la temperatura del agua en la aparición de lactococosis y, por tanto, en la eficacia de las medidas implementadas en la prevención de la misma.

Tareas

- 1.- Evaluación del efecto de inmuoestimulación mediante complementos nutricionales y estrategias vacunales sobre los índices de morbilidad y mortalidad asociados a *L. garvieae*.
- 2.- Análisis de las medidas de manejo (oxigenación, temperatura y pH) en el desarrollo del programa IMMUNE-FISH- impacto sobre la eficacia del programa.

Metodología

- Análisis visual

Todas las piscinas serán evaluadas visualmente al menos una vez al día con el fin de determinar el estado sanitario, comportamiento, mortalidades, etc. de los peces.

- Evaluación de la inmunogenicidad de las estrategias de inmunomodulación aplicadas en trucha arcoiris

ACTIVIDADES:

La capacidad de la alimentación suplementada para estimular la respuesta inmune innata de los animales durante la fase nursery será evaluada en un grupo de animales determinando la evolución del título de anticuerpos desde el inicio de la alimentación hasta que estos se vacunan. Para ello se empleará el ELISA desarrollado en el paquete de trabajo 2 (ELISA sándwich para determinación de la concentración total de anticuerpos en suero). Del mismo modo, la inmunogenicidad del adyuvante (o combinación de adyuvantes) se evaluará mediante la detección y cuantificación de anticuerpos frente a *L. garvieae* circulantes a lo largo del experimento (desde la vacunación hasta que alcancen el peso comercial) mediante un ELISA indirecto para monitorización de respuesta inmunitaria humoral.

- Parámetros sanguíneos

La toma de muestra de sangre se realizará al inicio de cada etapa de producción y de manera mensual desde entonces. En cada muestreo se recogerán dos tipos de muestras:

- o Una muestra de suero: para la determinación de los niveles de anticuerpos mediante un ELISA específico para trucha arcoíris y perfiles bioquímicos (Albúmina, ALT, ALP, Urea, Creatinina, Proteínas totales, Globulinas, Albúmina/Globulinas, AST, Calcio Total, Fósforo Inorgánico, Triglicéridos, Colesterol).

- o Una muestra de sangre con fluoruro sódico para determinación de glucosa (en algunos muestreos).

- Parámetros productivos

El efecto del nuevo sistema de control de lactococosis se evaluará también en términos de producción durante todas las fases del ciclo de la trucha desde alevín hasta alcanzar peso comercial. Se valorará el impacto que tienen sobre índices productivos como la ganancia de peso, índice de conversión, consumo de pienso, etc. Estos datos se compararán con los resultados obtenidos en todas estas fases de producción durante los últimos 5 años de la piscifactoría para evaluar fluctuaciones en los mismos.

- Análisis microbiológicos y detección molecular en tejido

Del mismo modo a lo explicado anteriormente, se realizará un diagnóstico etiológico mediante cultivo y/o detección directa de todas las bajas y animales con sintomatología compatible con lactococosis siempre que el número pueda ser asumido por el laboratorio. En caso de que el número de muestras sea excesivo, se realizará el diagnóstico etiológico sobre un número representativo de individuos de cada piscina. Además, se seleccionarán un número de animales aparentemente sanos que hayan alcanzado el peso comercial de cada una de las piscinas con el fin de detectar la presencia de animales portadores asintomáticos.

- Análisis anatomo-patológicos

El diagnóstico etiológico por detección de *L. garvieae* (aislamiento y/o PCR) se complementará mediante un análisis de anatomía patológica (análisis macroscópico e histológico) en todos aquellos peces enfermos o que sean bajas. Además, justo antes de la vacunación y tras la administración del nutracéutico, un número representativo de animales será sometido a un examen histológico del intestino de los animales evaluados.

Periodo de ejecución: Tercera anualidad o hito.

PRESUPUESTO DE LA EMPRESA -

Proyecto calificado como I+D	Presupuesto aprobado por CDTI	Dedicación exclusiva a I+D
Amortización de Activos		
Amortización Laboratorio		
Amortización Planta Piloto		
Amortización Otros Activos Fijos		
<i>Amortización Otros Activos Tecnológicos</i>		
<i>Amortización Otros Activos No Tecnológicos</i>		
Amortización Patentes, licencias, know-how y diseños		
Personal	211.206,00	
Materiales	334.284,00	
<i>PIENSO PECES ESTUDIO</i>	177.544,00	
<i>PECES ESTUDIO</i>	121.440,00	
<i>VACUNAS PARA PECES ESTUDIO</i>	25.800,00	
<i>FUNGIBLE VARIO PARA LA TOMA DE MUESTRAS, CONTROLES AMBIENTALES, BIOSEGURIDAD, LIMPIEZA Y DESINFECCION DE PISCINAS ESTUDIO, ETC.</i>	7.500,00	
<i>ANESTESICO PARA EUTANASIA Y SEDACION DE PECES ESTUDIO</i>	2.000,00	
Colaboraciones Externas	257.156,00	
Centros de Investigación	257.156,00	
<i>UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA.</i>	257.156,00	
Centros Tecnológicos / Innovación		
Otras Colaboraciones		
<i>Otras Colaboraciones Técnicas</i>		
<i>Otras Colaboraciones No Técnicas</i>		
Otros Gastos		
Otros Gastos	3.600,00	
Auditoría	3.600,00	
Presupuesto Total	837.927,00	

CONSIDERACIONES DE CARÁCTER GENERAL

- Los conceptos de investigación y desarrollo y de innovación, así como las bases de la deducción y los porcentajes de la misma serán los establecidos en la Ley de Impuesto de Sociedades (LIS)
- Puede haber otros gastos e inversiones que no estén recogidos en el presupuesto aprobado según los criterios CDTI - E.P.E. pero que pueden formar parte de la base de deducción por actividades de I+D+i según los criterios establecidos en la LIS.
- En los proyectos NEOTEC el CDTI - E.P.E. financia otros gastos e inversiones que no están relacionados directamente con las actividades I+D+i, por lo que únicamente podrán formar parte de la base de la deducción aquellos gastos que reúnan los requisitos establecidos en la LIS.