

C. Bienestar Animal, o K. Patología y Sanidad

Monitoreo no invasivo del parásito gastrointestinal *Aggregata octopiana* mediante q-PCR en tiempo real como indicador de bienestar y salud en una acuicultura sostenible de pulpo común (*Octopus vulgaris*)

Pérez-Polo, S.; Costa, M.M.; Chil, G.; Álvarez, F.; Gestal, C.
Instituto de Investigaciones Marinas, IIM-CSIC, Vigo.

Resumen

El bienestar animal es un tema de creciente preocupación pública y de gran importancia para el incipiente desarrollo de la acuicultura de pulpo. Los criterios para evaluar el bienestar deben centrarse, entre otros, en el estado de salud de los animales. Uno de los patógenos más importantes que afectan al pulpo común es el parásito gastrointestinal *Aggregata octopiana*, un parásito que reduce la absorción de nutrientes reduciendo el índice de condición de los animales infectados. En este trabajo se ha desarrollado y validado un método no invasivo basado en el estudio de muestras fecales mediante PCR cuantitativa en tiempo real (q-PCR) para detectar y cuantificar el parásito gastrointestinal *A. octopiana*. Este método permite obtener información rápida, fácil y fiable sobre la identificación del parásito y su carga parasitaria en los pulpos cultivados sin generar ningún impacto en los animales, garantizando así su bienestar. La metodología fue validada por comparación con la identificación parasitaria por análisis microscópico clásico de las heces, obteniendo una relación entre ambas y estableciendo un sistema de referencia (bajo, medio y alto) para el grado de infección. Además, esta metodología podría incluirse como un Indicador biológico Operacional de Bienestar (OWI) y ser utilizado para el diagnóstico temprano, incluyéndose en los planes de monitoreo del estado de salud en los sistemas de acuicultura de pulpo.

Introducción

El pulpo común, *Octopus vulgaris*, es una especie de gran interés comercial y un excelente candidato para la diversificación acuícola. La sobreexplotación de las poblaciones naturales (Xunta de Galicia, 2024) y la elevada demanda del mercado hacen que la cría sostenible de pulpo tenga un impacto positivo en las poblaciones naturales, siendo así una herramienta para aliviar la presión pesquera y preservar la especie. Una vez superadas las deficiencias zootécnicas, para lograr un cultivo sostenible es necesario optimizar y estandarizar las prácticas específicas para controlar y asegurar el bienestar animal. Los criterios para evaluar el bienestar deben centrarse principalmente en la dieta, las condiciones adecuadas de alojamiento, el entorno vital y el comportamiento, así como en la salud de los individuos. Con el objetivo de identificar mediante técnicas no invasivas los principales patógenos que pueden afectar a la salud de los pulpos en sistemas de cultivo, se presenta la puesta a punto y optimización de un método de diagnóstico por q-PCR absoluta para el parásito gastrointestinal *Aggregata octopiana*, un parásito que reduce la absorción de nutrientes disminuyendo el índice de condición de los animales infectados (Catellanos-Martínez et al., 2019), a partir de muestras de heces.

Material y métodos

Individuos adultos de pulpo común *O. vulgaris* procedentes de la Ría de Vigo se mantuvieron en las instalaciones de acuario del IIM-CSIC en tanques individuales en condiciones estándar y alimentación ad libitum. Durante un periodo de 30 días, se recogieron muestras de heces presentes en el agua del tanque para su análisis parasitológico y molecular. Una vez que las muestras de heces fueron pesadas, filtradas y tratadas con NaOH (2M) para facilitar el análisis, se visualizaron mediante microscopía óptica para la identificación y recuento de las formas quísticas (esporoquistes) del parásito *A. octopiana*. Además, se

realizó extracción de DNA de cada muestra analizada para la identificación molecular del parásito mediante q-PCR. Con objeto de realizar una cuantificación tanto de la carga parásita por peso de las muestras de heces, como del número de copias de *A. octopiana* por peso de heces, se puso a punto una q-PCR absoluta, para lo cual se clonó un fragmento del 18S de *A. octopiana* en un vector de clonación pGEM-T-Easy Vector System (Promega), y tras transformación mediante bacterias competentes y extracción del plásmido, se construyó una curva estándar por q-PCR del plásmido de *A. octopiana* clonado, mediante la realización de diluciones seriadas y calculando el número de copias.

Resultados y Discusión

Los análisis mediante microscopía óptica de las muestras de heces permitieron identificar las formas esporoquiste de *A. octopiana* presentes en las heces, como formas redondeadas y refringentes de alrededor de 8 µm de diámetro, mostrando un rango de infección de entre 1 y 215 esporoquistes/mg de heces. La q-PCR de las diluciones seriadas del plásmido del 18S de *A. octopiana* permitió la generación de una curva con un gradiente de concentración de 10^9 a 1 copias/µL. La eficiencia de la amplificación obtenida fue del 97%, calculada tras representar el número de Cts frente al número de copias/µL, y mostrando una alta sensibilidad, con un mínimo número de detección (MDL) de 10^2 copias/µL. La correlación obtenida entre el número de esporoquiste/mg de heces identificado por microscopía óptica, y el número de copias/mg de heces fue alta (0.723), mostrando 3 rangos de infección correspondientes a baja (0-23,86 esporoquistes/mg heces; $0-1,48 \times 10^4$ /mg heces); media (23,86- 138,13 esporoquistes/mg heces; $1,48 \times 10^4 - 7,84 \times 10^4$ /mg heces); y alta (más de 138,13 esporoquistes/mg heces; más de $7,84 \times 10^4$ /mg heces). En este trabajo se describe por primera vez un método de q-PCR absoluta altamente sensible, preciso, reproducible y rápido para la identificación y cuantificación de *A. octopiana* en heces de pulpo, siendo este un método de diagnóstico que no necesita experiencia y entrenamiento visual para la identificación del parásito por métodos tradicionales de microscopía óptica. Esta herramienta no invasiva es una técnica fácilmente reproducible que podría incluirse como un OWI biológico y ser utilizada para el diagnóstico temprano incluyéndose en los planes de monitoreo del estado de salud en los sistemas de acuicultura de pulpo.

Palabras clave

pulpo común, patógenos, diagnóstico no invasivo, q-PCR absoluta

Bibliografía

Castellanos-Martínez, S., Gestal, C., Pascual, S., Mladineo, I., Azevedo, C., 2019. Protist (Coccidia) and related diseases. En: *Handbook of pathogens and diseases in cephalopods* (Eds. Gestal, C., Guerra, A., Vieites, J., Pascual, S) 143-152.

Xunta de Galicia. Consellería do mar: <https://mar.xunta.gal/es/informacion/datos>. (accessed January 2024)

Agradecimientos

Programa de Ciencias Mariñas de Galicia. Planes Complementarios. Actuación PT9.2: Avances en el bienestar de pulpo, *Octopus vulgaris*, en cultivo. Una aproximación multidisciplinar para un cultivo sostenible. Marine Science Programme (ThinkInAzul). Ministerio de Ciencia e Innovación y Xunta de Galicia. **Fondos Next Generation** Eu (PRTR-C17.I1) y Fondo Europeo Marítimo pesquero

Correo del autor

cgestal@ iim.csic.es