



Alliance

(<https://www.aquaculturealliance.org>)



Global
Aquaculture
Advocate[™]

Health & Welfare

El uso inadecuado de la PCR causa más daño que bien

Monday, 22 March 2021

By Stephen G. Newman, Ph.D.

La reacción en cadena de la polimerasa es una herramienta molecular muy poderosa, pero ¿qué significa realmente una muestra positiva?



Izquierda: una tira de tubos de PCR, cada tubo contiene una reacción de 1000 ul (1 ml). Foto de Madeleine Price Ball, Madprime, CC0, a través de Wikimedia Commons. Derecha: máquina de PCR. Foto de Magnus Manske, dominio público, a través de Wikimedia Commons.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una herramienta molecular muy poderosa que permite la detección de niveles muy bajos de ácido desoxirribonucleico o ADN (el código genético o material hereditario de los organismos). En el núcleo de este método hay una enzima que amplifica la cantidad de ADN presente. La PCR es muy sensible y específica, y una vez que se ha identificado un presunto organismo (generalmente bacterias o virus, aunque puede detectar el ADN de cualquier organismo) de interés, se secuencian el ADN y se caracterizan las secuencias específicas que probablemente sean únicas del organismo.

Estas secuencias de nucleótidos (los componentes básicos del ADN) forman la base de un cebador. El cebador es una plantilla para la reacción. Se mezcla una muestra de ADN del organismo de interés con el cebador. El cebador se une a la secuencia de ADN homóloga (cada una de las cuatro bases, los componentes básicos del ADN que se emparejan específicamente entre sí), si está presente. La PCR se puede usar para determinar si un patógeno está presente, es decir, un simple sí o no, sin indicaciones de cuánto está presente, o se puede usar de manera cuantitativa.

La tecnología de PCR ha revolucionado nuestra comprensión del mundo que nos rodea. Podemos encontrar patógenos potenciales a niveles muy bajos así como determinar que se está produciendo un proceso infeccioso cuantificando cómo cambian con el tiempo los niveles del organismo de interés. Desafortunadamente, la pseudociencia impregna todas las facetas de la mayoría de las actividades en las que se involucran los humanos, incluida la acuicultura, y la PCR se utiliza de manera indebida y no se comprende bien. Esto puede ocasionar serios problemas en cuanto a falsos positivos, falsos negativos o incluso reacciones mixtas que induzcan a error al usuario de la tecnología.

Como ocurre con la mayoría de las reacciones químicas, las condiciones bajo las cuales se llevan a cabo las pruebas de PCR son exigentes e incluso variaciones menores pueden afectar el resultado. Los controles inadecuados, la contaminación de las muestras y de los reactivos, el incumplimiento de los requisitos de ciclos térmicos, etc. pueden dar como resultado resultados de prueba de valor cuestionable. Ésta es una de las razones por las que los laboratorios que realizan estas pruebas de forma rutinaria deben ser auditados por terceros para verificar que efectivamente están midiendo con precisión y coherencia, ya que es demasiado fácil equivocarse.

A pesar de los esfuerzos por educar a los usuarios finales sobre el valor real de la PCR, esto no ha tenido un éxito universal. La mayoría no comprende que se trata de una herramienta y no de una solución. A medida que la herramienta ha evolucionado, ha encontrado un nicho significativo en la acuicultura y la pesca. Aquí discutiré algunas de las falacias más comunes que impactan directamente en el valor potencial de la tecnología de PCR.

“Proyecto piloto de alerta temprana en Tailandia tiene como objetivo reducir el riesgo de enfermedad del camarón (<https://www.aquaculturealliance.org/advocate/proyecto-piloto-de-alerta-temprana-en-tailandia-tiene-como-objetivo-reducir-el-riesgo-de-enfermedad-del-camaron/>)”

Falacia No. 1: los resultados positivos siempre son reales

Los cebadores correctamente contruidos son específicos para un organismo dado. Si bien se espera que la secuencia del cebador sea única, si no lo es, el cebador puede reaccionar de forma cruzada con el ADN de otros organismos. Se hace todo lo posible para minimizar esto centrándose en genes que se cree que son únicos. Para algunos patógenos, como el agente etiológico del Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV), no es sencillo. Se sabe que los camarones incorporan fragmentos de ADN viral en su genoma (todo el material genético).

La secuencia del cebador debe estar dirigida contra secuencias de ADN que sean compatibles con la infección y no con la incorporación en los genomas de los huéspedes. La naturaleza de la tecnología de la PCR es tal que es posible diseñar secuencias de cebadores que no se encuentran en ningún otro organismo. Dicho esto, el espectro de la reactividad cruzada que da como resultado datos engañosos es demasiado real. Aunque se ejecutan los controles

adecuados para garantizar que este no sea el caso, no significa que no pueda suceder. En el caso del IHNV, si buscamos portadores que contengan virus que se puedan propagar, debemos asegurarnos de que las secuencias del cebador sean consistentes con la búsqueda del virus y no con la inclusión no infecciosa.

Falacia No. 2: La filtración de poblaciones mediante PCR es una herramienta estadística muy adecuada para determinar la ausencia de ADN reactivo al cebador

Esta tecnología se usa ampliamente para probar grandes poblaciones. Desafortunadamente, cuando se usa sola, puede dar lugar a falsos negativos. Es más adecuada para realizar pruebas en individuos para determinar el estado de portador y la posibilidad de que estén presentes organismos específicos que podrían conducir a una enfermedad aguda.

Un buen ejemplo de esto son las pruebas de la presencia del virus que causa el virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV). Una de las principales vías de transmisión de esta enfermedad son los portadores. Los reproductores de camarones transportan el virus y lo pasan a las postlarvas (PL) de camarón, que a su vez lo llevan al entorno de producción. Para la mayoría de los patógenos altamente virulentos hay CERO tolerancia. Si están presentes y las condiciones son compatibles con permitir que el virus prolifere, todo lo que se necesita es un número muy pequeño (uno) de portadores.

La Sociedad Estadounidense de Pesca (American Fisheries Society) publica su **libro azul sobre la salud de los peces** (<https://units.fisheries.org/fhs/fish-health-section-blue-book-2020/>), para ayudar a los acuicultores a lidiar con la miríada de problemas de enfermedades que pueden afectarlos. Establece la base estadística para el muestreo de poblaciones. Desafortunadamente, estas no son adecuadas para su uso en camarones donde las altas tasas de fecundidad pueden resultar en medio millón o más de huevos de un solo desove.

El muestreo debe realizarse al azar y la tecnología debe ser 100 por ciento precisa. Pero en poblaciones grandes, el mayor grado de precisión es del 98 por ciento, lo que significa que el 2 por ciento de la población todavía puede ser portadora de un patógeno. De un millón de PL de camarón, 20.000 aún podrían portar el patógeno y las pruebas de PCR podrían decirle que no había nada. Por supuesto, muchas veces el muestreo no es aleatorio y la prueba en sí es propensa a errores cuando no se realiza correctamente.

Muchas empresas analizan los reproductores y los PL de forma rutinaria para detectar una serie de patógenos, normalmente los que dicta la Organización Mundial de Sanidad Animal (**OIE** (<http://www.oie.int/>)). Debido al costo de ejecutar las pruebas de PCR y la falta de supervisión regulatoria, generalmente solo se analiza una pequeña submuestra de animales. El resultado final es que los patógenos ingresan rutinariamente a las poblaciones susceptibles. El uso de PCR no puede proteger y no protege a los animales.

Falacia No. 3: La PCR es adecuada para analizar la presencia de cualquier presunto patógeno

No todos los patógenos están presentes en todos los tejidos. Si el nivel de infección es muy bajo, entonces es importante tomar muestras de los tejidos que se sabe que son el objetivo del patógeno. Además, para algunos patógenos no basta con tomar una muestra. Usando WSSV como ejemplo una vez más, este virus se replica muy mal a temperaturas del agua por encima de aproximadamente 31 grados-C. En su mayor parte, a menos que haya factores estresantes graves en juego y evidencia manifiesta de infección, las cargas virales en los animales mantenidos en agua más caliente son demasiado bajas para ser detectadas mediante PCR.

Incluso cuando uno se centra en los tejidos objetivo, el virus puede estar inactivo y encontrarlo es como buscar una aguja en un pajar. Los animales que se van a analizar deben mantenerse en condiciones que forzarán la expresión viral. Bajar gradualmente la temperatura del agua a la mediados de los 20 grados-C y retener a los animales durante unos días es la única forma de asegurarse de que el virus no esté presente en una población cuando se realiza la prueba mediante PCR. Si esto no se hace, entonces no se puede afirmar que la población de interés está libre de WSSV. De hecho, hay muchos casos en los que se afirma que los animales están libres de WSSV cuando el virus está inactivo, y que han provocado brotes masivos de enfermedades.

Falacia No. 4: Se puede utilizar la PCR para establecer que una población es SPF

El concepto de libre de patógenos específicos (SPF) es importante. Si se toma la definición literalmente, significa que un patógeno determinado no está presente en las poblaciones analizadas. Sin embargo, si todo lo que uno está haciendo son los niveles de prueba del libro azul, la población no debe considerarse como SPF sin algunos antecedentes adicionales.

La PCR por sí sola no puede permitir que uno declare una población de animales como SPF. SPF es un proceso y no el resultado de pruebas limitadas de un grupo de animales. La única forma en que uno puede estar seguro de que una población es SPF, a menos que se pruebe cada animal individualmente (reproductores) en las condiciones adecuadas, es a través de su historial. Esta no es una práctica generalizada y muchos productores se encuentran en medio de muertes masivas que son un resultado directo de las PL que portan el virus.

El uso de núcleos de centros de reproducción (NBC) correctamente construidos junto con el filtrado por PCR y las historias de animales es, de manera realista, la mejor manera de garantizar que una población sea realmente SPF. Los animales deben ser mantenidos de una manera que evite la contaminación por alimentos vivos, los animales mal seleccionados, las instalaciones de mantenimiento mal diseñadas y otras consideraciones. Los NBC nunca deben estar abiertos: los animales pueden salir de la instalación, pero no pueden volver a entrar.

Perspectivas

La prueba de PCR es una herramienta valiosa cuando se usa correctamente. Un resultado positivo es importante, mientras que un resultado negativo lo es menos. Un resultado negativo en una submuestra de una gran población junto con la falta de seguimiento y la falta de uso de un NBC diseñado adecuadamente puede conducir a un desastre, y desafortunadamente lo ha hecho y continuará haciéndolo. Esto no significa que la PCR no tenga valor, sino que depender únicamente de ella no es consistente con niveles adecuados de bioseguridad y con una verdadera sostenibilidad.

Author

STEPHEN G. NEWMAN, PH.D.

President and CEO
Aquaintech Inc. – “Biotechnology Benefiting Aquaculture”
Lynnwood, WA 98037 USA

sgnewm@aquain-tech.com (<mailto:sgnewm@aquain-tech.com>)

Copyright © 2016–2021 Global Aquaculture Alliance

All rights reserved.