

Uso de la técnica de PCR en el proceso de diagnóstico de enfermedades infecciosas en organismos acuáticos, su validación y su interpretación

Jorge Cáceres-Martínez* y Rebeca Vásquez-Yeomans**

El creciente desarrollo de la acuicultura en el ámbito mundial ha puesto en evidencia la enorme importancia de la sanidad acuícola; en particular, en la tarea de evitar la introducción y la dispersión de enfermedades infecciosas. El cumplimiento de estos objetivos descansa, en primera instancia, en el conocimiento de los agentes patógenos y hospederos, su biología, su distribución y su interacción con el ambiente; en segunda instancia, en su correcto diagnóstico y en su interpretación en el contexto biológico y ambiental. Con el surgimiento de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), sin duda se ha dado un avance sin precedente en el encuentro del ADN de patógenos; sin embargo, por sí misma, no sustituye el proceso de diagnóstico de enfermedades. El diagnóstico de una enfermedad infecciosa es un proceso y no una técnica; el proceso parte del conocimiento de los conceptos básicos de la patología y su aplicación a una situación biológica en particular. Para ello deben utilizarse diferentes técnicas, observaciones y criterios que ayudarán a llegar a la conclusión de si hay una enfermedad infecciosa o no. Los resultados de la aplicación de una técnica de PCR para detectar la presencia o la ausencia de un agente patógeno en particular deben ser evaluados e interpretados por un patólogo especializado. Las pruebas de PCR que quieran usarse en el proceso de diagnóstico de una enfermedad deben ser rigurosamente validadas con respecto a otras técnicas y a conocimientos específicos. Falsos resultados o malas interpretaciones de éstos, tienen como consecuencia un efecto negativo para la industria y desperdicio de recursos económicos.

Palabras clave: Diagnóstico, enfermedad, patógeno, PCR.

Use of the PCR test in the process of diagnosis of infectious diseases in aquatic organisms, its validation and interpretation

The increasing development of aquaculture on a global scale has put in evidence the enormous importance of the aquatic animal health; in particular, avoid the introduction and dispersion of infectious diseases. The fulfillment of these targets rests, in the first instance, in the knowledge of the pathogenic agents and hosts, his biology, distribution and his interaction with the environment; in the second instance, in his correct diagnosis and the interpretation of the same one in the biological and environmental context. With the emergence of the test of the polymerase chain reaction (PCR), undoubtedly an advance has happened without precedent in the detection of the ADN of a particular pathogen; nevertheless, for itself, it does not substitute for the process of diagnosis of diseases. The diagnosis of an infectious disease is a process and not a test; the process, part of the knowledge of the basic concepts of the pathology and his application to a biological situation in particular. For it, different test are needed, remarks and criteria that will take us to the conclusion of if there is an infectious disease or not. The results of the application of a test of PCR to detect the presence or absence of a pathogenic agent in particular must be evaluated and interpreted for a specializing pathologist. The tests of PCR that want to be used in the process of diagnosis of a disease must be rigorously validated with regard to other techniques and specific knowledge. False results or bad interpretations of the same ones, they take a negative effect as a consequence for the industry and waste of economic resources.

Key words: Diagnosis, disease, pathogen, PCR.

* Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Acuicultura. Km 107 Carretera Tijuana-Ensenada No. 3918, Zona Playitas. CP 22860, Ensenada, Baja California, México. jcaceres@cicese.mx

** Instituto de Sanidad Acuícola, AC. Calle 15 No. 265, Zona Centro. CP 22800, Ensenada, Baja California, México.

Introducción

En los últimos años, las noticias sobre la dispersión y los efectos de enfermedades infecciosas que afectan a los organismos acuáticos en cultivo ha venido de la mano con el crecimiento de la acuicultura. De acuerdo con la FAO (2010), la acuicultura generó 46% del suministro total de pescado comestible y constituye un incremento continuo desde 43% en 2006. Entre los ejemplos recientes más destacados sobre dispersión y efectos letales de las enfermedades infecciosas, se encuentra el de la Anemia Infecciosa del Salmón (ISA, por sus siglas en inglés) causada por un ortomixovirus. Esta enfermedad se presentó por primera vez en Europa, en el año 1984; posteriormente se detectó en las costas atlánticas de Canadá, Escocia, Islas Faroe, Estados Unidos y, en 2007, en Chile; nuevos brotes han seguido llamando la atención internacional por el devastador efecto sobre la industria del salmón (Murray *et al.* 2010). El efecto del virus de la Enfermedad de la Mancha Blanca del Camarón (WSSV, por sus siglas en inglés), descubierto en Taiwán en 1992, ha sido de enorme trascendencia para el cultivo. Se han registrado brotes severos en Asia, América Central y hoy se sabe que afecta a las principales zonas de cultivo de camarón en el mundo (Jory 1999, Lightner 2011). En México, este virus se detectó en 1999 y su efecto en el noroeste del país ha supuesto pérdidas millonarias en estos dos últimos años (Hamer 2010¹, Corniola 2012²). La industria ostrícola no ha estado exenta de estos problemas. El cultivo del ostión japonés en Europa se ha visto severamente afectado por el Herpesvirus del ostión variedad μ (OsHV-1 μ -Var por sus siglas en inglés). En los últimos años se han registrado pérdidas de 80% (Segarra *et al.* 2010).

Ante este escenario, el diagnóstico certero y oportuno de enfermedades infecciosas se ha

vuelto indispensable, y la técnica de detección de ADN de organismos patógenos por PCR ofrece rapidez y precisión, por lo que su uso se ha generalizado. Lamentablemente, este uso generalizado y presuroso no ha ido de la mano con el uso correcto de los conceptos básicos de la patología y la sanidad acuícola; se ha difundido que esta técnica y sus variantes han sustituido a todas las demás utilizadas en el proceso del diagnóstico. Hoy por hoy, investigadores, productores, consumidores y estudiantes mal informados ven como obsoleta cualquier técnica que no sean la PCR y sus variantes, para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Esto tiene consecuencias catastróficas para la producción, la economía y la credibilidad de los laboratorios. Esta valoración superficial de las actividades en materia de sanidad acuícola es similar a pensar que los análisis médicos convencionales son obsoletos y que el único análisis adecuado para detectar alguna enfermedad es una PCR; así como creer que estos resultados deben ser evaluados por un experto en biología molecular y no por el médico. Por lo anterior, es indispensable recordar las bases conceptuales del proceso y la interpretación de resultados de técnicas para el diagnóstico correcto de enfermedades infecciosas.

Conceptos

El primer paso para realizar un diagnóstico correcto es tener claro lo que es un agente patógeno, qué es una enfermedad infecciosa, qué es una infección, qué es la susceptibilidad de un hospedero y qué es la virulencia. De acuerdo con Cheng (1986) y OIE (2009a) estos conceptos se refieren a:

- *Agente patógeno* es un organismo o virus que provoca el desarrollo de un padecimiento que se conoce como enfermedad infecciosa.
- *Enfermedad infecciosa* es una desviación negativa del estado de equilibrio fisiológico de un organismo causado por otro organismo o virus; ésta puede ser transitoria o puede llevar a la muerte.
- *Infección* se refiere a la presencia de un agente patógeno que se multiplica, desarrolla o está latente en un huésped.

1. HAMER R. 2010. Mancha blanca provoca pérdidas por 1000 mdp en Sinaloa, México. Actualvet 7.5. <http://actualvet.blogspot.mx/2010/07/mancha-blanca-provoca-perdidas-por-1000.html>.
2. CORNIOLA S. 2012. Cayó 50% la producción de camarón por virus de la mancha blanca. <http://fis.com/fis/worldnews/worldnews.asp?monthyear=&day=23&id=50928&l=s&special=0&ndb=0>.

- *Susceptibilidad* es el grado en que un hospedero reúne las condiciones para que se establezca y desarrolle un patógeno.
- *Patogenicidad* es la capacidad del patógeno para vencer las barreras de defensa del hospedero.

Con base en estos conceptos se deben analizar los resultados que se obtengan de una PCR en particular:

Infeción

La sola presencia del ADN de un organismo, o del mismo, en un hospedero determinado no indica que el presunto patógeno esté vivo y establecido en el hospedero y, por tanto, no hay infección. Puede haber ADN, del presunto agente, que esté siendo degradado por las células del hospedero. Mientras el presunto patógeno no se establezca en el hospedero, no hay infección. En el caso de adultos de ostión japonés, *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793), se ha detectado al fragmento de ADN del Herpesvirus del ostión mediante el uso de la técnica de hibridación *in situ*, en el citoplasma de hemocitos, lo que indicó que el virus no se había establecido en las células y, por tanto, no había infección (Vázquez-Yeomans *et al.* 2010). De haberse analizado estas muestras únicamente con la técnica de PCR, el resultado sería positivo y se podría haber concluido la existencia de una infección. Desde luego que el OSHV-1 puede ser letal para larvas y juveniles, como ha sido plenamente demostrado (Renault *et al.* 2000); sin embargo, los adultos parecen haber desarrollado mecanismos de defensa que evitan la infección, como se muestra en el trabajo citado y como lo han sugerido otros autores (Arzul *et al.* 2002). Otro ejemplo interesante es el de Vázquez-Boucard *et al.* (2012) quienes, a través de hibridación *in situ*, muestran que *C. gigas* puede acumular al virus de la mancha blanca del camarón, pero no es infectado por él. Las partículas virales se acumulan en los espacios inter-filamentos de las branquias pero no se establecen en la célula del ostión. Al igual que en el caso anterior, si estos ostiones se hubieran analizado únicamente mediante PCR podría

haberse interpretado, erróneamente, que *C. gigas* estaba infectado por WSSV.

Susceptibilidad

Puede encontrarse el ADN de un agente patógeno, o al patógeno de una especie en un hospedero que no es susceptible, o es menos susceptible y eso tampoco implica, necesariamente, el desarrollo de una infección o una mortalidad en particular. En este sentido, la interpretación para la aplicación de medidas sanitarias debe basarse en el conocimiento preciso de esta interacción. Por ejemplo, *Perkinsus marinus* Levine 1978 es un agente patógeno para el ostión americano *Crassostrea virginica* Gmelin 1791, cuyo efecto ha causado altas mortalidades en la costa este de Estados Unidos (Andrews 1988), mientras que el ostión japonés *C. gigas* puede llegar a infectarse pero rara vez desarrolla la enfermedad sin que ésta llegue a ser letal (Meyers *et al.* 1991, Calvo *et al.* 2001, OIE 2009b). Esta información es fundamental para entender el contexto sanitario y los alcances que, para la producción, puede tener el manejo inadecuado de un resultado por PCR. En el caso de Europa, *C. gigas* se cultiva ampliamente en zonas endémicas para *Perkinsus olseni* (=atlanticus) Lester y Davis 1981, especie que es letal para algunas especies de almeja como *Ruditapes decussatus* (Linnaeus 1758) (Azevedo *et al.* 1990); sin embargo, no existen registros de mortalidad de *C. gigas* relacionada con dicho parásito en la zona. En caso de sospecharse que en alguna otra región del mundo *P. olseni* infecta a *C. gigas*, esto debe ser contundentemente esclarecido, ya que sería una contribución muy importante respecto a la información biológica conocida.

Virulencia

Junto con las consideraciones anteriores se debe reconocer que los diversos agentes patógenos les confieren diferentes virulencias y éstas que deben ser interpretadas de manera correcta al emitirse un resultado de una prueba de PCR. Por ejemplo, en salud humana existen variedades

del *Vibrio cholerae* y no todas son igualmente virulentas. Las más virulentas son la peruana y la O1. Por otro lado, *Vibrio cholerae* es habitante común en lagunas costeras de todo el mundo y para causar un problema de salud humana, tanto las variedades comunes como las virulentas, debe encontrarse en ciertas concentraciones que están directamente asociadas con las condiciones ambientales y el manejo del agua y de productos contaminados (Leyva *et al.* 1996). Por tanto, un resultado positivo por PCR de una variedad en particular debe ser interpretado no sólo con respecto a su presencia, ausencia o virulencia intrínseca, sino también de acuerdo con las condiciones ambientales y con el manejo de la muestra. Esta información permitirá establecer medidas sanitarias apropiadas para el problema. De forma análoga, en sanidad acuícola no es lo mismo detectar un caso de infección por OSHV-1 que uno por la variedad μ de este patógeno, ya que ésta es altamente patógena (Segarra *et al.* 2010) y su efecto en la industria ostrícola Francesa, como se mencionó anteriormente, ha sido devastadora. Diferencias en virulencia también se han descrito para protozoos como *P. marinus* (Robledo *et al.* 1999), la variedad tipo I, que corresponde a aquella dominante en la costa este de EU, es más virulenta que la tipo II, dominante en el Golfo de México (Gullian 2008) y en lagunas costeras del noroeste de México (Cáceres-Martínez *et al.* 2008, 2012). En el caso del camarón, al parecer se ha detectado una variedad no virulenta del virus de la Cabeza Amarilla (YHSV, por sus siglas en inglés) en el noroeste de México, aunque dicha información aún requiere confirmación (Lightner 2011).

Independientemente de los conceptos mencionados y los elementos necesarios para llegar a un diagnóstico certero, es necesario reconocer ciertos aspectos inherentes a la técnica de PCR que deben tomarse en consideración.

Contaminación

Ningún laboratorio reconoce que un resultado no esperado puede provenir de una contaminación, por lo general se asume que sus controles internos (si los hay) y la confianza en sus procedimientos garantizan eliminar esta posibilidad.

Si bien existen protocolos estrictos para evitar contaminación y, en muchos casos, la especificidad de los oligos y la congruencia de la secuencia con las existentes en los bancos de genes (GeneBank) tienden a garantizar un resultado, se debe recordar que la mayor fortaleza de la técnica de PCR es también su mayor debilidad, ya que es capaz de amplificar pequeñísimas fracciones de ADN y el riesgo de contaminación siempre está presente. Teóricamente esta técnica es capaz de detectar una única copia de ADN molde produciendo, cerca de 1×10^{12} copias (dependiendo del número de ciclos) de la secuencia seleccionada en pocas horas; la técnica puede ser víctima de su propio éxito (Lofish *et al.* 1999). Todos los productos de la amplificación por PCR son candidatos importantes para la re-amplificación y podrían, en potencia, producir resultados falsos positivos, si es que no se excluyen de subsecuentes amplificaciones, por lo que se requieren pruebas adicionales que permitan confirmar el resultado. Esto es indispensable en regiones y especies nuevas en donde un patógeno no ha sido encontrado antes; así como en especies que de antemano se sabe que no son susceptibles al presunto agente patógeno detectado.

El tamaño de muestra y el periodo de muestreo

Son otros los factores indispensables para tener éxito en un proceso de diagnóstico. De poco sirve que la técnica sea capaz de amplificar una sola copia de ADN de una muestra, si no se toma el tejido blanco correspondiente, la fracción del tejido blanco que contenga al agente patógeno o partes de tejido que, aun conteniendo al agente patógeno, tengan gran cantidad de inhibidores de la reacción de PCR. Tampoco sirve si no se toman suficientes muestras cuando la infección está en su etapa recesiva. Estos problemas deben resolverse a partir del conocimiento disponible sobre el proceso infeccioso del agente patógeno buscado, lo que permitirá saber qué tejidos blanco son los más adecuados para encontrar a un agente patógeno en determinada parte del proceso infeccioso y el número de muestras de uno o de diferentes tejidos que se debe considerar para ampliar las posibilidades de detección. Existen diferentes métodos para estimar un

tamaño de muestra adecuado. En este sentido, la OIE recomienda calcular el tamaño de muestra a partir del programa FreeCalc (Cameron 2002), que es internacionalmente reconocido para los procesos de diagnóstico; siempre y cuando se conozca y estén validadas la especificidad y la sensibilidad de la técnica por emplear.

Validación

Todos los laboratorios se precian de utilizar los mejores iniciadores de regiones altamente específicas del genoma blanco que garantizan la especificidad de sus pruebas. Sin embargo, estos iniciadores y regiones especie específicas del genoma deben ser validados correctamente en el entorno internacional. La OIE (2009c) sugiere el uso de ciertos iniciadores y regiones específicas del genoma que en el ámbito internacional han sido validados y probados. Si un laboratorio usa otro tipo de iniciadores, éstos deberán ser forzadamente validados. La ocurrencia de reacción cruzada es otra de las problemáticas típicas en el uso de la técnica de PCR. Regiones que no han sido validadas apropiadamente pueden con facilidad amplificar regiones del genoma de organismos parecidos que se encuentran con o son parte del microambiente. La información genómica contenida en el GeneBank es aún limitada; existen innumerables organismos sobre los que no se conoce ningún aspecto de su genoma y, por tanto, no pueden ser comparados en los bancos de genes. De tal forma, es fundamental que las regiones blanco del genoma del patógeno buscado sean específicas y hayan sido validadas con métodos tradicionales de identificación de especies. Este problema es en particular importante cuando se aplica esta técnica a moluscos bivalvos y otros organismos filtro-alimentadores, ya que el mecanismo de filtración permite retener microorganismos que, aunque parecidos a un agente patógeno en particular o aun siéndolo para cierta especie, nada tienen que ver con que ese hospedero esté infectado, son mero alimento o serán desechados a través de las pseudo-heces, en el caso de moluscos bivalvos, y por las heces en general. Otro factor fundamental es que el ADN de presuntos agentes patógenos específicos se encuentre en la parte exterior de los tejidos del

presunto hospedero o en el contenido del tracto digestivo (branquias, manto, boca, esófago, estómago, intestino, recto, ano) y no tengan ningún significado infeccioso. Por otro lado, los tejidos del tracto digestivo son órganos blanco para diversas enfermedades infecciosas y, por ende, en una muestra de esos tejidos y un resultado positivo por PCR de un patógeno no esperado, es necesario discernir si se ha establecido en el hospedero o si es mero alimento. Esto se logra con el uso de diferentes técnicas y con el conocimiento de la biología y la ecología del patógeno y el hospedero. La OIE (2009c), establece con claridad los pasos necesarios para la validación de técnicas empleadas en el diagnóstico. Algunos ejemplos de una correcta validación de resultados de técnicas para diagnóstico se observan en Nérette *et al.* (2005), quienes realizan un estudio completo de validación para el diagnóstico del virus ISA del salmón usando una reacción de PCR reversa (RT-PCR), aislamiento del virus (VI) y una prueba de fluorescencia indirecta de anticuerpos (IFAT). Por su parte, Balseiro *et al.* (2010) y Cáceres-Martínez *et al.* (2012), hacen una validación de resultados para la detección de *P. olseni* y *P. marinus*, utilizando el cultivo en medio de fluido de tioglicolato, histología, PCR -secuenciación e Hibridación *in situ*. Una vez demostrada la existencia de una infección, es posible elegir una o más técnicas específicas para su vigilancia. Por ejemplo, para determinar presencia o ausencia de un patógeno en un hospedero susceptible y dentro del intervalo de distribución del patógeno, la PCR ya validada para dicho patógeno, hospedero y región, es una técnica altamente recomendada. Para determinar el efecto en el hospedero, la histología brinda la mejor herramienta.

Diagnóstico oportuno

Un factor que por lo general lleva a conclusiones erróneas y de consecuencias costosas y terribles es la premura en la emisión de un resultado del proceso de diagnóstico. Como se ha mencionado, la técnica de PCR es de corta duración, el resultado puede obtenerse en horas y cuando ocurre un evento de mortalidad de una especie de interés, o cuando se requiere obtener un certificado sanitario para una comercialización inmediata,

el productor, la autoridad correspondiente y el laboratorio de análisis se ven sometidos a una enorme presión que los induce a emitir resultados de forma inmediata. La aplicación y la valoración precipitada de los resultados obtenidos por PCR pueden resultar en casos positivos o negativos erróneos que induzcan a concluir que se ha encontrado al agente causal de una mortalidad en particular o que puede permitirse una comercialización determinada por no detectarse algún patógeno específico. Esta misma valoración precipitada orilla a investigadores a publicar una primicia del resultado de un “diagnóstico” a partir de la utilización de la sola técnica de PCR y secuenciación. Definitivamente se debe trabajar en optimizar el proceso de diagnóstico para dar el mejor resultado en el menor tiempo posible, pero no a costa de una realidad biológica.

Casos

Existen numerosos ejemplos de casos en los que una notificación sobre un patógeno en particular se ha basado únicamente en la detección de ADN por PCR. La incorrecta interpretación de estos resultados han causado dudas y su aclaración ha sido costosa. Ulrich *et al.* (2007) reportaron infección por *Haplosporidium nelsoni* Haskin, Stauber y Mackin, 1966, agente causal de la enfermedad conocida como MSX (por sus siglas en inglés, Multinuclear Sphere X) en el ostión americano *C. virginica* y otras especies de ostión en el Golfo de México, utilizando únicamente análisis de PCR. Esta información amplía el intervalo de distribución del patógeno y documenta nuevos hospederos; sin embargo, el ensayo utilizado no fue validado para las aguas del Golfo de México, y si se considera que en los estudios previos realizados en la zona durante más de 20 años por expertos patólogos no se ha detectado este patógeno (Burreson 2008), es necesaria una validación correcta de la información. Otro ejemplo ha ocurrido en aguas del estado de Sonora, México, donde se ha reportado la infección por *P. marinus* en el ostión japonés asociándolo con mortalidades (Enríquez-Espinoza *et al.* 2010), la información es controversial porque las imágenes histológicas presentadas no corresponden al patógeno y se sabe que *C. gigas* posee proteasas

que impiden el establecimiento y el desarrollo de *P. marinus* (Romestand *et al.* 2002, OIE 2009b) y, salvo en muy raras ocasiones, desarrolla la enfermedad (Meyers *et al.* 1991); por otro lado, estudios sobre carga parasitaria de *C. gigas* en la zona por más de 15 años nunca han mostrado infección por *P. marinus* (Vásquez-Yeomans *et al.* 2010b³). Es evidente que la interacción entre patógeno-hospedero es dinámica, pero sacar conclusiones sin las evidencias completas es cuestionable y tiene efectos muy negativos para la producción y la credibilidad de los laboratorios dedicados al diagnóstico. Otros ejemplos notables son los informes de Carrasco *et al.* (2007a, b) con relación a la infección por *Marteilia* spp., protozoo parásito de mejillones y algunas especies de ostiones, en especies de copépodos del zooplancton a través de un ensayo de PCR anidado, utilizando los iniciadores NTS que ya habían sido previamente invalidados (Hiney 2001). Con la misma prueba de PCR anidado y secuenciación en 2006 se obtuvo un caso presuntamente positivo a *Marteilia refringens* (Grizel, Comps, Bonami, Cousserans, Duthoit y Le Penne, 1974) en *C. gigas* cultivado en el noroeste de México; sin embargo, los análisis histopatológicos y por microscopía electrónica de transmisión (Cáceres-Martínez 2006⁴), no mostraron la presencia del patógeno, confirmando fallas en el uso de la prueba de PCR y la información biológica de que *C. gigas* no desarrolla marteiliosis. Respecto a la enfermedad de la mancha blanca del camarón blanco, *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931), se han publicado registros de falsos positivos de la misma en la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Martens 1868) asociados con la escasa especificidad de los iniciadores utilizados para la reacción de PCR (Claydon *et al.* 2004). Recientemente, en Canadá hubo un reporte afirmando que la Anemia Infecciosa del Salmón

3. VÁSQUEZ-YEOMANS R, J Cáceres-Martínez y P Macías-Montes de Oca. 2010b. Long-term survey of the health status of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from Northwest Mexico. *World Aquaculture 2010*, San Diego Ca. USA. 1 al 5 de marzo de 2010.
4. CÁCERES-MARTÍNEZ J. 2006. Informe sobre la identificación del protozoo esporulado X (PEX). Informe de investigación para el Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora. Instituto de Sanidad Acuícola, AC. 10p.

(ISA, por sus siglas en inglés) se había encontrado en salmones de la Columbia Británica. Esto causó un efecto inmediato en el sector, dado que las autoridades de Pesquerías y Océanos de Canadá realizan análisis sanitarios con regularidad para determinar la presencia de una amplia variedad de agentes patógenos, incluido el virus del ISA en salmones cultivados y silvestres, si bien hasta el momento con resultados negativos. Adicionalmente, de 2003 a 2010, el Ministerio de Agricultura de Columbia Británica opera un programa de vigilancia diseñado científicamente sobre más de 4 700 salmones cultivados. Como en el caso anterior, todas las muestras fueron negativas al ISA. Ante esta situación, se hace absolutamente indispensable la confirmación de un caso positivo en una nueva localidad o especie y eso lleva su tiempo. El análisis de los resultados positivos mostró fallas en el seguimiento del protocolo de laboratorio y los análisis finales, realizados por las autoridades Canadienses, un laboratorio independiente y el Laboratorio Nacional de Referencia para el ISA, no confirmaron la presencia del virus (Canadian Food Inspection Agency 2012⁵).

La realización de estudios para aclarar informaciones dudosas toma tiempo e implica un enorme gasto económico. En el caso del ejemplo mencionado de Canadá, las autoridades indicaron que: “Until time testing is finalized, it is important that Canadians and others reserve judgment and let the appropriate scientific process run its course. Public debate and any forward action on this issue must be based on the best science”⁶. Es decir, que las bases en las que se tiene que apoyar son los conocimientos científicos y la aplicación del método científico para llegar a un diagnóstico certero. El apresurarse en estos casos trae consigo consecuencias devastadoras

para todos. Tal como indica Burreson (2008), malas interpretaciones en análisis por PCR son especialmente controversiales, porque algunos de esos patógenos, como *M. refringens*, *P. marinus*, el virus de la mancha blanca o el virus del ISA, son de declaración obligatoria ante la OIE, por lo que sus infecciones deben ser plenamente comprobadas. Incluso, la propia OIE (2009a) establece con mucha claridad los protocolos que se deben seguir en caso de sospecharse la existencia de una enfermedad de notificación obligatoria y recomienda el apoyo de sus laboratorios de referencia para ayudar a dilucidar los casos controversiales. Burreson (2008) hace un llamado, al que se suman los autores del presente trabajo, a investigadores, revisores y editores de revistas, a ser particularmente cautos respecto a la interpretación de este tipo de resultados y, en su caso, mostrar las evidencias completas y contundentes sobre el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

Literatura citada

- ANDREWS JD. 1988. Epizootiology of the disease caused by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* and its effects on the oyster industry. *American Fisheries Society. Special Publication* 18: 47-63.
- ARZUL I, T Renault, A Thebault y A Gerard. 2002. Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Research* 84: 151-160.
- AZEVEDO C, L Corral, R Cachola y FO Perkins. 1990. Fine structure of a new parasite (*Perkinsus*-like species) of *Ruditapes decussatus* (Bivalvia) from Portugal. En: FO Perkins y TC Cheng (eds.). *Pathology in Marine Science*. Academic Press, San Diego, pp: 181-187.
- BALSEIRO P, J Montes, R Fernández-Conchas, B Novoa y A Figueras. 2010. Comparison of diagnostic techniques to detect the clam pathogen *Perkinsus olseni*. *Diseases of Aquatic Organisms* 90: 143-151.
- BURRESON E. 2008. Misuse of PCR assay for diagnostic of mollusk protistan infections. *Diseases of Aquatic Organisms* 80: 81-83.
- CÁCERES-MARTÍNEZ J, R Vásquez-Yeomans, G Padilla-Lardízabal y MA Del Río-Portilla.
5. CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY. 2012. Canada Completes Infectious Salmon Anaemia Testing: No Confirmed Cases in BC Salmon. <http://www.inspection.gc.ca/about-the-cfia/newsroom/news-releases/infectious-salmon-anaemia-testing/eng/132365243491>.
6. Hasta que finalice el periodo de pruebas, es importante que los canadienses y demás personas guarden su opinión y permitan que el proceso científico siga adelante. El debate público y cualquier otra acción sobre este tema deben basarse en los mejores resultados científicos.

2008. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of Mexico. *Journal of Invertebrate Pathology* 99(1): 68-73.
- CÁCERES-MARTÍNEZ J, M García-Ortega, R Vásquez-Yeomans, TJ Pineda-García, NA Stokes y RB Carnegie. 2012. Natural and cultured populations of the mangrove oyster *Saccostrea palmula* from Sinaloa, México, infected by *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 110: 321-325.
- CALVO GW, MW Luckenbach, SK Allen Jr. y EM Burreson. 2001. A comparative field study of *Crassostrea ariakensis* (Fujita 1913) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. *Journal of Shellfish Research* 20: 221-229.
- CAMERON AR. 2002. *Survey Toolbox for Aquatic Animal Diseases – A practical manual and software package*. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR). Monograph No. 94, 375p.
- CARRASCO N, I López-Flores, MD Alcaráz, FCJ Berthe e I Arzul. 2007a. First record of a *Marteilia* parasite (Paramyxea) in zooplankton populations from a natural estuarine environment. *Aquaculture* 269: 63-70.
- CARRASCO N, I López-Flores, MD Alcaráz, FCJ Berthe e I Arzul. 2007b. Dynamics of the parasite *Marteilia refringens* (Paramyxea) in *Mytilus galloprovincialis* and zooplankton populations in Alfacs Bay (Catalonia, Spain). *Parasitology* 134: 1541-1550.
- CHENG T. 1986. *General parasitology*. Second edition. Academic Press Collage Division. San Diego. 386p.
- CLAYDON K, C Bradford y O Leigh. 2004. OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in *Cherax quadricarinatus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 62(3): 265-268.
- ENRÍQUEZ-ESPINOZA TL, JM Grijalva-Chon, R Castro-Longoria y J Ramos-Paredes. 2010. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Diseases of Aquatic Organisms* 89: 269-273.
- FAO. 2010. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010*. Departamento de Pesca y Acuicultura. Roma. 219p.
- GULLIAN K. 2008. Caracterización de factores intrínsecos y extrínsecos asociados a la presencia de *Perkinsus marinus* en *Crassostrea virginica* (ostión americano) de Laguna de Términos. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Mérida, Yuc., México. 134p.
- HINEY M. 2001. Validation of non-culture-based pathogen detection systems: theoretical problems and practical considerations. En: CJ Rodgers (ed.). *Risk analysis in aquatic animal health*. World Organization for Animal Health (OIE), París, Francia, pp: 259-264.
- JORY DE. 1999. Shrimp white spot virus in the western hemisphere. *Aquaculture Magazine* 25: 83-91.
- LEYVA CV, E Cisneros, E Valdés, V Vallejo, B Pérez y O Pérez. 1996. Determinación de *Vibrio cholerae* en ostión fresco. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición* 10(1). http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol10_1_96/ali02196.htm
- LIGHTNER R. 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology* 106: 110-130.
- LOFISH H, A Berk, SL Zipursky, P Matsudaira, D Baltimore y J Darnell. 1999. *Molecular cell biology*. Fourth Edition. W.H. Freeman and Company. USA. 1084p.
- MEYERS J, E Burreson, B Barber y R Mann. 1991. Susceptibility of diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), to *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research* 10: 433-437.
- MURRAY A, L Munro, WI Stuart, B Berx, D Pendrey, D Frasser y R Raynard. 2010. Epidemiological investigation into the re-emergence and control of an outbreak of infectious salmon anaemia in the Shetland Islands, Scotland. *Diseases of Aquatic Organisms* 91(3): 189-200.
- NÉRETTE P, I Dohoo, L Hammell, N Gagné, P Barbash, S Maclean y C Yason. 2005. Estimation of the repeatability and reproducibility of three diagnostic tests for

- infectious salmon anaemia virus. *Journal of Fish Diseases* 28(2): 101-110.
- OIE. 2009a. *Manual of diagnostic test for aquatic animals*. World Organisation for Animal Health. París, Francia, pp: 121-131.
- OIE. 2009b. Infection with *Perkinsus marinus*. En: *Manual of diagnostic test for aquatic animals*. World Organisation for Animal Health, París, Francia, pp: 342-353.
- OIE. 2009c. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. En: *Manual of diagnostic test for aquatic animals*. World Organisation for Animal Health, París, Francia, pp: 10-23.
- RENAULT T, LM Le Deuff, B Chollet, N Cochenec y A Gérard. 2000. Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 42: 173-183.
- ROBLEDO JAF, AC Wright, AG Marsh y GR. Vasta. 1999. Nucleotide sequence variability in the nontranscribed spacer of the rRNA locus in the oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Journal of Parasitology* 85: 650-656.
- ROMESTAND B, F Corbier y P Roch. 2002. Protease inhibitors and haemagglutinins associated with resistance to the protozoan parasite, *Perkinsus marinus*, in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Parasitology* 125: 323-329.
- SEGARRA A, JF Pépin, I Arzul, B Morga, N Faury y T Renault. 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research* 153: 92-99.
- ULRICH PN, CM Colton, CA Hoover, PM Gaffney y AG Marsh. 2007. *Haplosporidium nelson* (MSX) rDNA detected in oysters from the Gulf of Mexico and the Caribbean Sea. *Journal of Shellfish Research* 26(1): 195-199.
- VÁSQUEZ-YEOMANS R, AM García-Ortega y J Cáceres-Martínez. 2010. Gill erosion and herpesvirus in *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, México. *Diseases of Aquatic Organisms* 89: 137-144.
- VÁSQUEZ-BOUCARD C, C Escobedo-Fregoso, Ma. De J Durán-Avelar, L Mercier, R Llera-Herrera, C Escobedo-Bonilla y N Vibanco-Pérez. 2012. *Crassostrea gigas* oysters as a shrimp farm bioindicator of white spot syndrome virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 98: 201-207.

Recibido: 13 de junio de 2012

Aceptado: 10 de octubre de 2012