

EXPERIENCIAS EN EL ANALISIS DEL VALOR DEL CT POINT (PCR TIEMPO REAL) PARA LA CARACTERIZACION DEL VIRUS DE PRRS POR MEDIO DE RFLP

Alcántar, P^{1*}; Robles, F¹; Chevez, JC¹

¹ Boehringer Ingelheim Vetmedica México

Introducción.

La medicina veterinaria ha tenido una creciente necesidad de tener técnicas diagnósticas más eficientes y rápidas; actualmente la PCR tiempo real (qPCR) es la técnica más sensible, rápida y específica que existe para la identificación de microorganismos. Esta técnica está basada en la PCR convencional pero con la ventaja de poder monitorear la amplificación del ADN usando técnicas de fluorescencia; esto permite la cuantificación de ácidos nucleicos con gran exactitud y confiabilidad. El gráfico que muestra el equipo mientras se realiza la PCR permite identificar una línea horizontal llamada umbral, que al ser cruzado por la muestra indica la positividad de la misma (Cross threshold o Ct point). Entre más bajo sea el valor Ct de una muestra, mayor es la cantidad de copias genómicas presentes en la muestra.

Materiales y Métodos

Se recolectó la información a partir de los qPCR y RFLP realizados en el laboratorio de Boehringer Ingelheim Vetmedica, durante el 2008 hasta marzo del 2010. El RNA viral de las muestras fue obtenido a través del kit comercial QiampRNA (QIAGEN). La técnica de PCR tiempo real se realizó utilizando un Kit comercial de Tetracore siguiendo las indicaciones del fabricante, en un equipo Smart Cyclor (Cepheid). Para el RFLP; se obtuvo cDNA por medio de RT-PCR y posteriormente PCR anidado, utilizando una Taq Polimerasa Recombinante (Invitrogen); 15 Ul del producto amplificado fueron sometidos a digestión enzimática con 3 diferentes endonucleasas (MullI, HincII y SacII). Finalmente se realizó la electroforesis en un gel de agarosa al 2% para poder identificar el patrón de bandas. Para encontrar la relación entre la carga viral (Ct point) vs la posibilidad de caracterizar el virus por RFLP, se decidió organizar los resultados en rangos de 1 ciclo de diferencia entre ellos y colocar el porcentaje de muestras dentro de cada rango al cual se pudo realizar la caracterización por RFLP.

Resultados

A lo largo de éste periodo fueron evaluadas por qPCR PRRS 2,458 muestras de las cuales 1,240 fueron positivas a PRRSv. Sin embargo, únicamente en el 5% fue posible identificar el patrón de corte mediante la técnica de restricción enzimática (RFLP).

En el 2008 se analizaron 1,193 muestras a través de qPCR, donde el 44.51% fueron positivas a PRRSv pero únicamente al 1.32% fue posible realizarle la prueba de RFLP. En el 2009, se analizaron 875 muestras, el 59.09% fueron positivas a PRRSv, logrando obtener el RFLP al 8.51% de las muestras. Así mismo, en lo que va del 2010, se han analizado 390 muestras, el 49.2% fueron positivas, pudiéndose llevar a cabo la RFLP al

5.73%. (Tabla 1). Con estos datos, se realizó el análisis para identificar la distribución de los valores Ct-point con los cual se puede obtener suficiente amplificado para su caracterización con RFLP, ver Tabla 2.

Tabla 1. Número de muestras procesadas por qPCR.

Rango Ct Point	N° muestras 2008	N° muestras 2009	N° muestras 2010
<20	5	12	1
20.01 - 22	13	17	1
22.01 - 23	6	18	1
23.01 - 24	17	9	2
24.01 - 25	11	14	3
25.01 - 26	15	12	4
26.01 - 27	9	24	5
>27	455	411	175
NEG	662	358	198
Total	1,193	875	390

Tabla 2. Porcentaje de RFLP en relación al Ct-point

Rango Ct Point	% muestras caracterizadas 2008	% muestras caracterizadas 2009	% muestras caracterizadas 2010
<20	20.00%	25.00%	100.00%
20.01 - 22	38.46%	47.06%	100.00%
22.01 - 23	16.67%	50.00%	100.00%
23.01 - 24	0.00%	44.44%	100.00%
24.01 - 25	0.00%	71.43%	66.67%
25.01 - 26	0.00%	41.67%	50.00%
26.01 - 27	0.00%	20.83%	20.00%
>27	0.00%	0.00%	0.57%

Conclusiones

Al analizar los resultados del presente estudio se observa claramente que en resultados positivos con Ct-point máximos de 25 se tiene cerca del 70% de probabilidades de realizar y obtener el patrón de corte mediante la técnica de RFLP (Cargas virales/ml promedio mínimas de 1.55E+08), así mismo en muestras que presentan Ct point mayores a 26 se va perdiendo la capacidad de realizar la caracterización del virus mediante RFLP. Esta matriz y correlación es muy útil para ser más eficiente y obtener un diagnóstico certero y más económico ya que las muestras con Ct Point mayores a 26 no es factible realizarles RFLP y esto genera un ahorro en el costo del proceso de monitoreo. Por otra parte a las muestras que se logran caracterizar para RFLP se les puede realizar la secuenciación.

Referencias

1. M. Tevfik Dorak, MD, PhD - REAL-TIME PCR 2006
2. Logan Julie, Kirstin Edwards and Nick Saunders – Real-Time PCR: Current Technology and Applications 2009