



PORK - UN -
MEJOR
FUTURO



Estrategias para el manejo de PRRSV: **Actualización sobre muestreo y pruebas para vigilancia**

Berenice Munguía-Ramírez, MVZ, MSc

Veterinary Diagnostic & Production Animal Medicine
Iowa State University





El campo
es de todos

Minagricultura

IDEXX



(Dirección de Cadenas Pecuarias, Pesqueras y Acuícolas, 2021)

Producción Nacional de Carne de Cerdo

Toneladas/Año – Periodo 2011 – 2020



¿Cómo seguir creciendo?
**Cerdos sanos, producción
sostenible**

¿Cuál es tu situación de PRRSV?

Tabla 2. Características de predios según su clasificación frente a PRRS.

Categoría	Excreción (PCR)	Exposición (ELISA)	Signos Clínicos	Observaciones
Positiva inestable (I)	Positivo	Positivo	Presentes	Incluye granjas con estatus desconocido
Positiva Estable (II-A)	Desconocido	Positivo	Ausentes	Sin proceso de eliminación
Positiva Estable (II-B)	Desconocido	Positivo	Ausentes	Con proceso de eliminación
Negativo Provisional	Negativo	Positivo	Ausentes	Reemplazos ELISA negativos
Negativo	Negativo	Negativo	Ausentes	Libre frente a PRRS

Holtkamp et al., 2011

¿Cuál es tu objetivo?

- ¿Detección?
- "Sincronizar" el uso de vacuna?
- ¿Eliminar PRRSV?

Granja (+)

Objetivo

Granja (-)

¿Cómo circula PRRSV a nivel poblacional?

¿Estoy seguro actualmente que mi granja es negativa?

¿Cómo lo hago?

Vigilancia epidemiológica

Diagnóstico



Plan de acción para lograr el objetivo

Guía para un plan de vigilancia sostenible:

1. Guía para la toma de muestras.

- a) Tipo de muestra, cuántas, y con cuánta frecuencia.
- b) ¿Qué prueba diagnóstica utilizar?

2. ¿Cómo obtener mejores resultados en la PCR?

- c) Importancia del manejo adecuado de la muestra
- d) Uso de controles endógenos



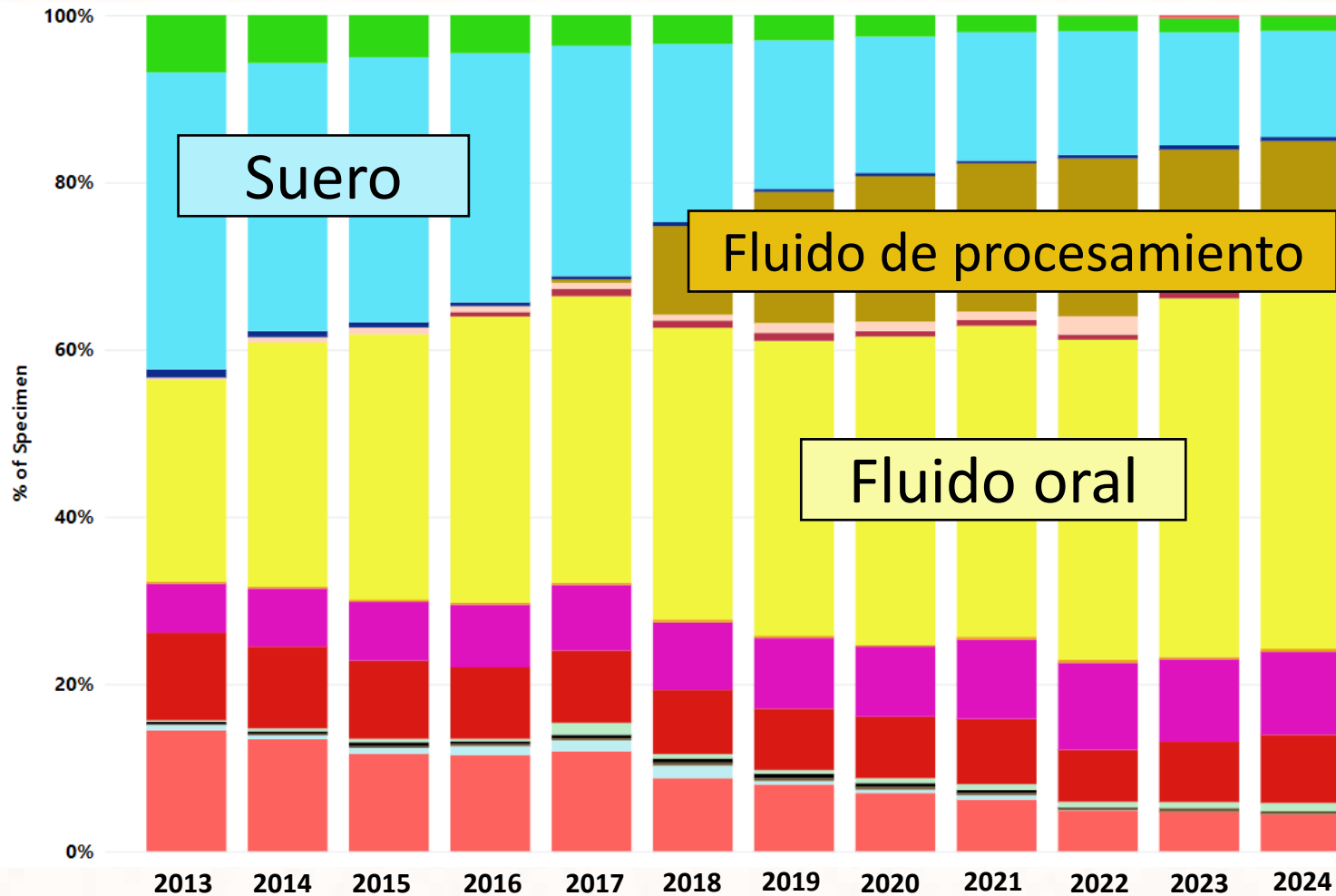
1. Guía para la toma de muestras:

- a) Tipo de muestra, cuántas, y con cuánta frecuencia

1. Guía para la toma de muestras:

- a) Tipo de muestra, cuántas, y con cuánta frecuencia

Muestras utilizadas rutinariamente para el diagnóstico de PRRSV por PCR



- Oral Fluid ● Oropharyngeal Swab
- Serum ● Tissue ● Fluid ● Lung
- Processing Fluid ● Semen
- Multiple ● Nasal Swab
- Blood/Blood Swab ● Environmental
- Feces ● Fetal tissue ● Other



(SDRS, 2024)

MUESTRAS DISCRETAS

IDEXX



porkaméricas / 2024

Colectadas en un punto en el tiempo, de una fuente y locación específica.

INDIVIDUALES

- Suero
- Hisopado de sangre
- Hisopado oral/orofaríngeo
- Hisopado nasal
- Semen
- Tejido



AGREGADAS

- Fluidos orales
- Fluidos de procesamiento
- Muestras ambientales



MUESTRAS INDIVIDUALES

IDEXX



porkaméricas / 2024

Común para el muestreo de distribución binomial y muestreo dirigido.

- Información a nivel individual
- Demanda tiempo, labor, y costo.



MUESTRAS INDIVIDUALES: El problema?

IDEXX



La estructura actual de las poblaciones porcinas compromete el uso de muestras individuales!



MUESTRAS AGREGADAS

IDEXX



- Información a nivel poblacional – Muestra representativa!
- Facilidad y rapidez de recolección + reducción en costo.
- Permite monitoreo continuo (facilidad de colección).

- Variación en sensibilidad diagnóstica.
 - % cerdos positivos.
 - Etapa de infección.



MUESTRAS AGREGADAS

IDEXX



- Variación en sensibilidad diagnóstica.
 - % cerdos positivos.
 - Etapa de infección.

Detección en función de la etapa de infección

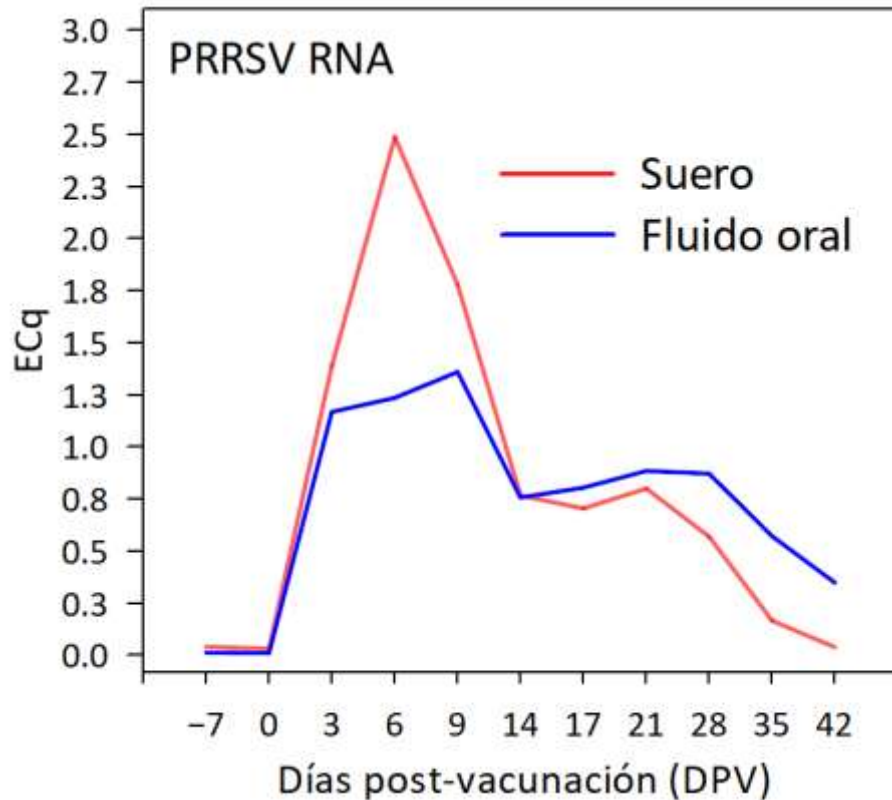
Tasa de detección de positividad a PRRSV a través del tiempo

Método diagnóstico	Día post-exposición a PRRSV								
	n	3	7	14	28	42	77	98	175
• PRRSV RNA en suero	973	94%	92%	87%	72%	48%	7%	2%	0%
• PRRSV infeccioso (bioensayo)	168	ND	77%	74%	68%	61%	41%	30%	7%
• Anticuerpos en suero	1866	ND	ND	92%	92%	92%	91%	91%	90%

(Henao-Díaz et al., 2020)

Detección en función de la etapa de infección

Tasa de detección de positividad a PRRSV a través del tiempo



Día post-exposición a PRRSV							
3	7	14	28	42	77	98	175
94%	92%	87%	72%	48%	7%	2%	0%
ND	77%	74%	68%	61%	41%	30%	7%
ND	ND	92%	92%	92%	91%	91%	90%

(Henao-Díaz et al., 2020)

(Munguía-Ramírez et al., 2023)

Muestras **INDIVIDUALES** vs **AGREGADAS**



Probabilidad de detectar PRRSV en un corral usando 1 muestra de fluidos orales:

% Prevalencia en corral	Muestra de <u>1 fluido oral (FO)</u> (95% CI)		# de sueros necesarios para igualar la probabilidad de detección. (95% CI)	
	PRRSV RNA	PRRSV Ab	PRRSV RNA	PRRSV Ab
5	0.31 (0.09, 0.67)	0.17 (0.06, 0.38)	8 (3, 17)	5 (2, 10)
10	0.79 (0.48, 0.94)	0.59 (0.37, 0.77)	11 (5, 16)	7 (4, 10)
15	0.94 (0.76, 0.99)	0.85 (0.67, 0.94)	12 (8, 16)	9 (6, 12)
20	0.98 (0.88, 1.00)	0.94 (0.82, 0.98)	13 (8, 16)	10 (7, 13)
25	0.99 (0.93, 1.00)	0.97 (0.90, 0.99)	13 (9, 16)	11 (8, 13)

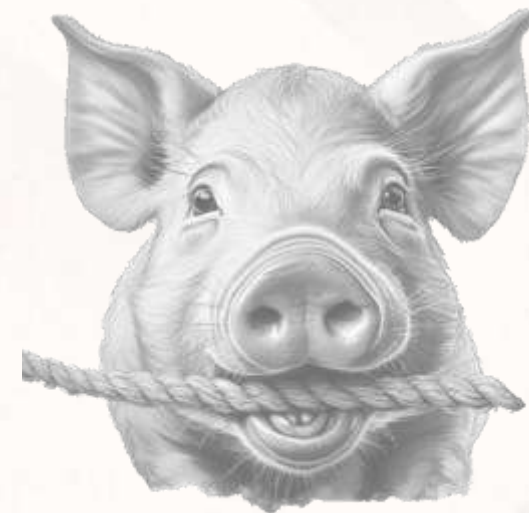
Nuevas recomendaciones para la toma de fluidos orales:

Una sola cuerda por corral!

- Corrales ≤ 25 cerdos \rightarrow 30 min es suficiente.
- Corrales > 25 cerdos \rightarrow 60 – 90 min incrementa participación.

Tiempo de cuerda acorde a prevalencia

- Alta prevalencia \rightarrow 30 min es suficiente.
- Prevalencia desconocida o granja negativa \rightarrow ≥ 60 min.



(Tarasiuk, G., comunicación personal)

1. Guía para la toma de muestras:

- a) Tipo de muestra, cuántas, y con cuánta frecuencia

Tipos de muestreo

1. Poblacional – **Todos los animales**
2. Dirigido – **Cerdos con signos clínicos**
3. Representativo/binomial – **Muestreo al azar**
4. Fijo espacial – **Muestreo equidistante**

Tipos de muestreo

1. Poblacional – Todos los animales
2. Dirigido – Cerdos con signos clínicos
3. Representativo/binomial – Muestreo al azar
4. Fijo espacial – Muestreo equidistante

Para detección

Para estimar
prevalencia

Tipos de muestreo

1. Poblacional – **Todos los animales**
2. Dirigido – Cerdos con signos clínicos
3. Representativo/binomial – Muestreo al azar
4. Fijo espacial – Muestreo equidistante

Programa de erradicación de la PPC en Estados Unidos (1978).



Para detección



Tipos de muestreo

1. Poblacional – Todos los animales
2. Dirigido – **Cerdos con signos clínicos**

3. Representativo/binomial – Muestreo al azar



Para detección

Selección de subpoblaciones con características indicativas de enfermedad.

- Signología clínica
- Mortalidad???

Útil para enfermedades de baja prevalencia!

- **1995** – Campaña Nacional contra la fiebre porcina clásica (NOM-037-ZOO-1995)
- **2021** – Recomendado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) para PPC y FPA

Tipos de muestreo

1. Poblacional – Todos los animales
2. Dirigido – **Cerdos con signos clínicos**
3. Representativo/binomial – Muestreo al azar
4. Fijo espacial – Muestreo equidistant



porkaméricas / 2024



Para detección

Nota: No se puede excluir la presencia de enfermedad en estadios tempranos (sin signos/sin mortalidad)

Tipos de muestreo

1. Poblacional – Todos los animales
2. Dirigido – Cerdos con signos clínicos
- 3. Representativo/binomial – Muestreo al azar**
4. Fijo espacial – Muestreo equidistante

Para detección

Para estimar
prevalencia

IDEXX

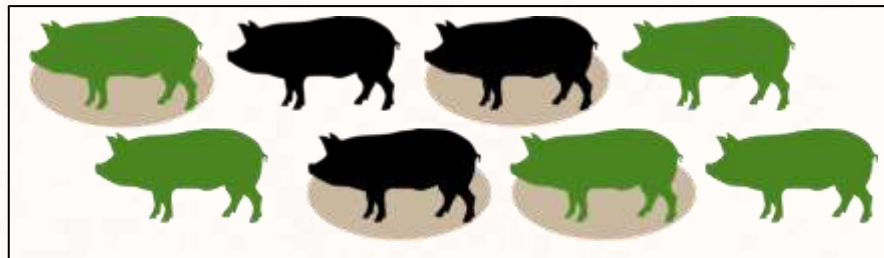


Tipos de muestreo

1. Poblacional – Todos los animales
2. Dirigido – Cerdos con signos clínicos
- 3. Representativo/binomial – Muestreo al azar**
4. Fijo espacial – Muestreo equidistante

Para detección

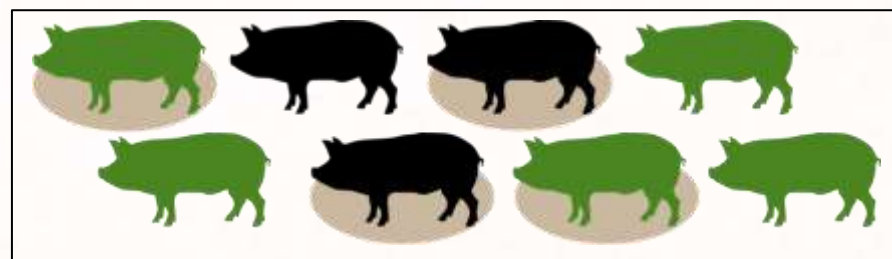
Para estimar
prevalencia



Selección **aleatoria** de cerdos

Tipos de muestreo

3. Representativo/binomial



Selección **aleatoria** de cerdos

< 100 cerdos - pruebe 25
 ≥ 1,000 - pruebe 29

Tabla de tamaños muestrales basada en un muestreo aleatorio

population size (N)	50%	40%	30%	25%	20%	15%	10%	5%	2%	1%	0.5%	0.1%
10	4	5	6	7	8	10	10	10	10	10	10	10
20	4	6	7	9	10	12	16	19	20	20	20	20
30	4	6	8	9	11	14	19	26	30	30	30	30
40	5	6	8	10	12	15	21	31	40	40	40	40
50	5	6	8	10	12	16	22	35	48	50	50	50
60	5	6	8	10	12	16	23	38	55	60	60	60
70	5	6	8	10	13	17	24	40	62	70	70	70
80	5	6	8	10	13	17	24	42	68	79	80	80
90	5	6	8	10	13	17	25	43	73	87	90	90
100	5	6	9	10	13	17	25	45	78	96	100	100
120	5	6	9	10	13	18	26	47	86	111	120	120
140	5	6	9	11	13	18	26	48	92	124	139	140
160	5	6	9	11	13	18	27	49	97	136	157	160
180	5	6	9	11	13	18	27	50	101	146	174	180
200	5	6	9	11	13	18	27	51	105	155	190	200
250	5	6	9	11	14	18	27	53	112	175	228	250
300	5	6	9	11	14	18	28	54	117	189	260	300
350	5	6	9	11	14	18	28	54	121	201	287	350
400	5	6	9	11	14	19	28	55	124	211	311	400
450	5	6	9	11	14	19	28	55	127	218	331	450
500	5	6	9	11	14	19	28	56	129	225	349	500
600	5	6	9	11	14	19	28	56	132	235	379	597
700	5	6	9	11	14	19	28	57	134	243	402	691
800	5	6	9	11	14	19	26	57	136	249	421	782
900	5	6	9	11	14	19	28	57	137	254	437	868
1000	5	6	9	11	14	19	29	57	138	258	450	950

Tipos de muestreo

3. Representativo/binomial



Selección aleatoria

El problema?!

< 100 cerdos - pruebe 25
≥ 1,000 - pruebe 29

Tabla de tamaños muestrales basada en un muestreo aleatorio

population size (N)	50%	40%	30%	25%	20%	15%	10%	5%	2%	1%	0.5%	0.1%
10	4	5	6	7	8	10	10	10	10	10	10	10
20	4	6	7	9	10	12	16	19	20	20	20	20
30	5	6	8	9	11	14	19	26	30	30	30	30
40	5	7	9	11	12	16	22	31	40	40	40	40
50	5	7	10	12	14	18	25	35	48	50	50	50
60	5	8	11	13	15	20	28	38	55	60	60	60
70	5	8	12	14	17	22	31	40	62	70	70	70
80	5	9	13	15	19	24	34	42	68	79	80	80
90	5	9	14	16	21	27	37	43	73	87	90	90
100	5	10	15	17	23	29	40	45	78	96	100	100
120	5	11	17	19	26	33	45	47	86	111	120	120
140	5	12	19	21	29	37	50	48	92	124	139	140
160	5	13	21	23	32	41	53	49	97	136	157	160
180	5	14	23	25	35	45	56	50	101	146	174	180
200	5	15	25	27	38	50	60	51	105	155	190	200
250	5	17	29	32	45	60	70	53	112	175	228	250
300	5	19	33	37	52	70	80	54	117	189	260	300
350	5	21	37	42	60	80	90	54	121	201	287	350
400	5	23	41	47	68	90	100	55	124	211	311	400
450	5	25	45	52	77	100	110	55	127	218	331	450
500	5	27	49	57	86	110	120	56	129	225	349	500
600	5	31	57	66	100	130	140	56	132	235	379	597
700	5	35	65	75	115	150	160	57	134	243	402	691
800	5	39	73	84	130	170	180	57	136	249	421	782
900	5	43	81	93	145	190	200	57	137	254	437	868
1000	5	47	89	102	160	210	220	57	138	258	450	950

(Cannon y Roe, 1982)

Tipos de muestreo

3. Representativo/binomial

El problema:

Los números de la tabla provienen de la fórmula de distribución binomial:

$$P(x) = \frac{n!}{(n-x)!x!} p^x q^{n-x}$$

n = the number of trials (or the number being sampled)

x = the number of successes desired

p = probability of getting a success in one trial

$q = 1 - p$ = the probability of getting a failure in one trial

Tipos de muestreo

3. Representativo/binomial

Asume

a) Población homogénea y finita.

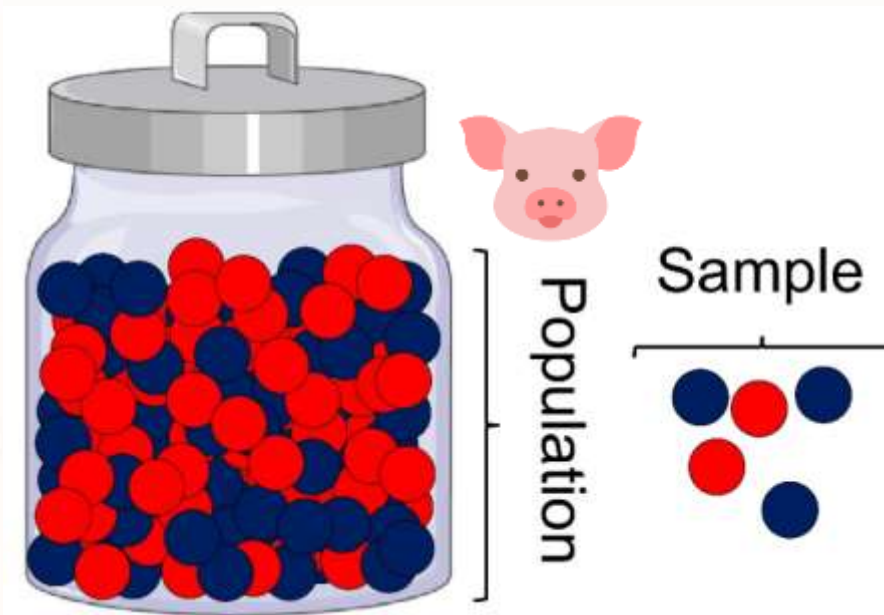
- Cerdos al azar tienen la misma probabilidad de ser positivos

b) Independencia.

- El estado infeccioso de un cerdo no es predictivo del otro.

c) Resultado binario.

- **Positivo/negativo** 🍷



Tipos de muestreo

3. Representativo/binomial

Asume

- a) Población homogénea y finita.
- b) Independencia.
- c) Resultado binario.

Respuesta =

Cuántas canicas debo tomar para incluir ≥ 1 roja?

- $n = 100$.
- Prevalencia = 10% rojas.

Tabla de tamaños muestrales basada en un muestreo aleatorio

Población (N)	Prevalencia (%)											
	50%	40%	30%	25%	20%	15%	10%	5%	2%	1%	0.5%	0.1%
10	4	5	6	7	8	10	10	10	10	10	10	10
20	4	6	7	9	10	12	16	19	20	20	20	20
30	4	6	8	9	11	14	19	26	30	30	30	30
40	5	6	8	10	12	15	21	31	40	40	40	40
50	5	6	8	10	12	16	22	35	48	50	50	50
60	5	6	8	10	12	16	23	38	55	60	60	60
70	5	6	8	10	13	17	24	40	62	70	70	70
80	5	6	8	10	13	17	24	42	68	79	80	80
90	5	6	8	10	13	17	25	43	73	87	90	90
100	5	6	9	10	13	17	25	45	78	96	100	100
120	5	6	9	10	13	18	26	47	86	111	120	120
140	5	6	9	11	13	18	26	48	92	124	139	140
160	5	6	9	11	13	18	27	49	97	136	157	160
180	5	6	9	11	13	18	27	50	101	146	174	180
200	5	6	9	11	13	18	27	51	105	155	190	200
250	5	6	9	11	14	18	27	53	112	175	228	250
300	5	6	9	11	14	18	28	54	117	189	260	300
350	5	6	9	11	14	18	28	54	121	201	287	350
400	5	6	9	11	14	19	28	55	124	211	311	400
450	5	6	9	11	14	19	28	55	127	218	331	450
500	5	6	9	11	14	19	28	56	129	225	349	500
600	5	6	9	11	14	19	28	56	132	235	379	597
700	5	6	9	11	14	19	28	57	134	243	402	691
800	5	6	9	11	14	19	28	57	136	249	421	782
900	5	6	9	11	14	19	28	57	137	254	437	868
1000	5	6	9	11	14	19	29	57	138	258	450	950



3. Muestreo representativo/binomial

Tabla de tamaños muestrales basada en un muestreo aleatorio

Población (N)	Prevalencia (%)											
	50%	40%	30%	25%	20%	15%	10%	5%	2%	1%	0.5%	0.1%
10	4	5	6	7	8	10	10	10	10	10	10	10
20	4	6	7	9	10	12	16	19	20	20	20	20
30	4	6	8	9	11	14	19	26	30	30	30	30
40	5	6	8	10	12	15	21	31	40	40	40	40
50	5	6	8	10	12	16	22	35	48	50	50	50
60	5	6	8	10	12	16	23	38	55	60	60	60
70	5	6	8	10	13	17	24	40	62	70	70	70
80	5	6	8	10	13	17	24	42	68	79	80	80
90	5	6	8	10	13	17	25	43	73	87	90	90
100	5	6	9	10	13	17	25	45	78	96	100	100
120	5	6	9	10	13	18	26	47	86	111	120	120
140	5	6	9	11	13	18	26	48	92	124	139	140
160	5	6	9	11	13	18	27	49	97	136	157	160
180	5	6	9	11	13	18	27	50	101	146	174	180
200	5	6	9	11	13	18	27	51	105	155	190	200
250	5	6	9	11	14	18	27	53	112	175	228	250
300	5	6	9	11	14	18	28	54	117	189	260	300
350	5	6	9	11	14	18	28	54	121	201	287	350
400	5	6	9	11	14	19	28	55	124	211	311	400
450	5	6	9	11	14	19	28	55	127	218	331	450
500	5	6	9	11	14	19	28	56	129	225	349	500
600	5	6	9	11	14	19	28	56	132	235	379	597
700	5	6	9	11	14	19	28	57	134	243	402	691
800	5	6	9	11	14	19	28	57	136	249	421	782
900	5	6	9	11	14	19	28	57	137	254	437	868
1000	5	6	9	11	14	19	29	57	138	258	450	950

- a) Población homogénea y finita.
- b) Independencia.
- c) Resultado binario.

Aplicable?



Poblaciones pequeñas o de estructura simple.

3. Muestreo representativo/binomial

Tabla de tamaños muestrales basada en un muestreo aleatorio

Población (N)	Prevalencia (%)											
	50%	40%	30%	25%	20%	15%	10%	5%	2%	1%	0.5%	0.1%
10	4	5	6	7	8	10	10	10	10	10	10	10
20	4	6	7	9	10	12	16	19	20	20	20	20
30	4	6	8	9	11	14	19	26	30	30	30	30
40	5	6	8	10	12	15	21	31	40	40	40	40
50	5	6	8	10	12	16	22	35	48	50	50	50
60	5	6	8	10	12	16	23	38	55	60	60	60
70	5	6	8	10	13	17	24	40	62	70	70	70
80	5	6	8	10	13	17	24	42	68	79	80	80
90	5	6	8	10	13	17	25	43	73	87	90	90
100	5	6	9	10	13	17	25	45	78	96	100	100
120	5	6	9	10	13	18	26	47	86	111	120	120
140	5	6	9	11	13	18	26	48	92	124	139	140
160	5	6	9	11	13	18	27	49	97	136	157	160
180	5	6	9	11	13	18	27	50	101	146	174	180
200	5	6	9	11	13	18	27	51	105	155	190	200
250	5	6	9	11	14	18	27	53	112	175	228	250
300	5	6	9	11	14	18	28	54	117	189	260	300
350	5	6	9	11	14	18	28	54	121	201	287	350
400	5	6	9	11	14	19	28	55	124	211	311	400
450	5	6	9	11	14	19	28	55	127	218	331	450
500	5	6	9	11	14	19	28	56	129	225	349	500
600	5	6	9	11	14	19	28	56	132	235	379	597
700	5	6	9	11	14	19	28	57	134	243	402	691
800	5	6	9	11	14	19	26	57	136	249	421	782
900	5	6	9	11	14	19	28	57	137	254	437	868
1000	5	6	9	11	14	19	29	57	138	258	450	950

- a) Población homogénea y finita.
- b) Independencia.
- c) Resultado binario.

Aplicable?



¿Granjas modernas?

3. Muestreo representativo/binomial

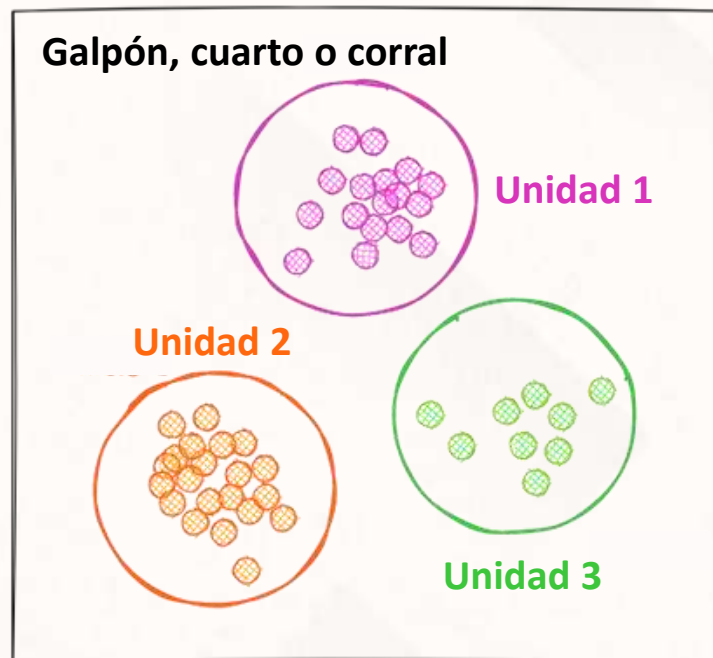


Hay separación en sitios dependiendo de la etapa y/o función productiva:

- Por galpón
- Por cuarto
- Por corrales

¡No aplicable en granjas actuales!

Poca interacción entre grupos!



3. Muestreo representativo/binomial



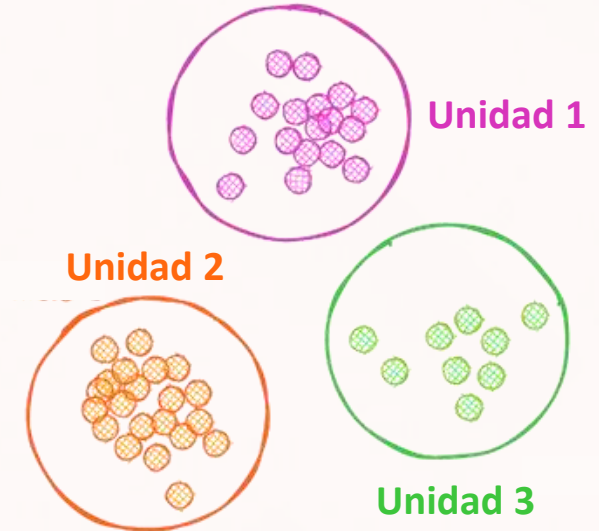
Hay separación en sitios dependiendo de la etapa y/o función productiva:

- Por galpón
- Por cuarto
- Por corrales

UNIDADES EPIDEMIOLÓGICAS

“Grupo de animales en un sitio que comparten un riesgo comparable de exposición.”

Galpón, cuarto o corral



Tipos de muestreo

1. Poblacional – Todos los animales
2. Dirigido – Cerdos con signos clínicos
3. Representativo/binomial – Muestreo al azar
4. Fijo espacial – **Muestreo equidistante**

Para detección

Para estimar
prevalencia

IDEXX



Tipos de muestreo

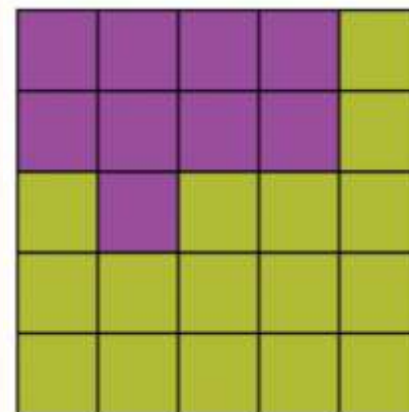
4. Fijo espacial – Muestreo equidistante

Las enfermedades infecciosas en granja tienden a **aglomerarse...**

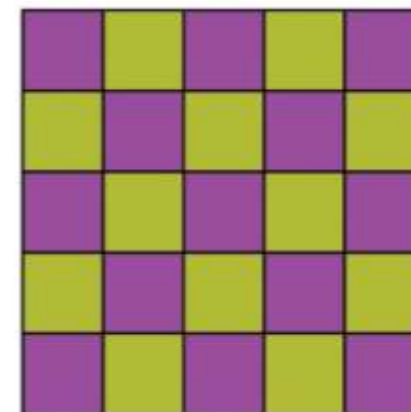
- Es más probable encontrar un **estatus infeccioso similar** en **cerdos físicamente cercanos** a otros.

Autocorrelación espacial

Tendencia de puntos geográficamente cercanos a tener valores similares en una variable dada.

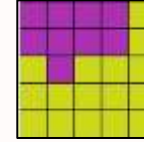


Correlación espacial positiva

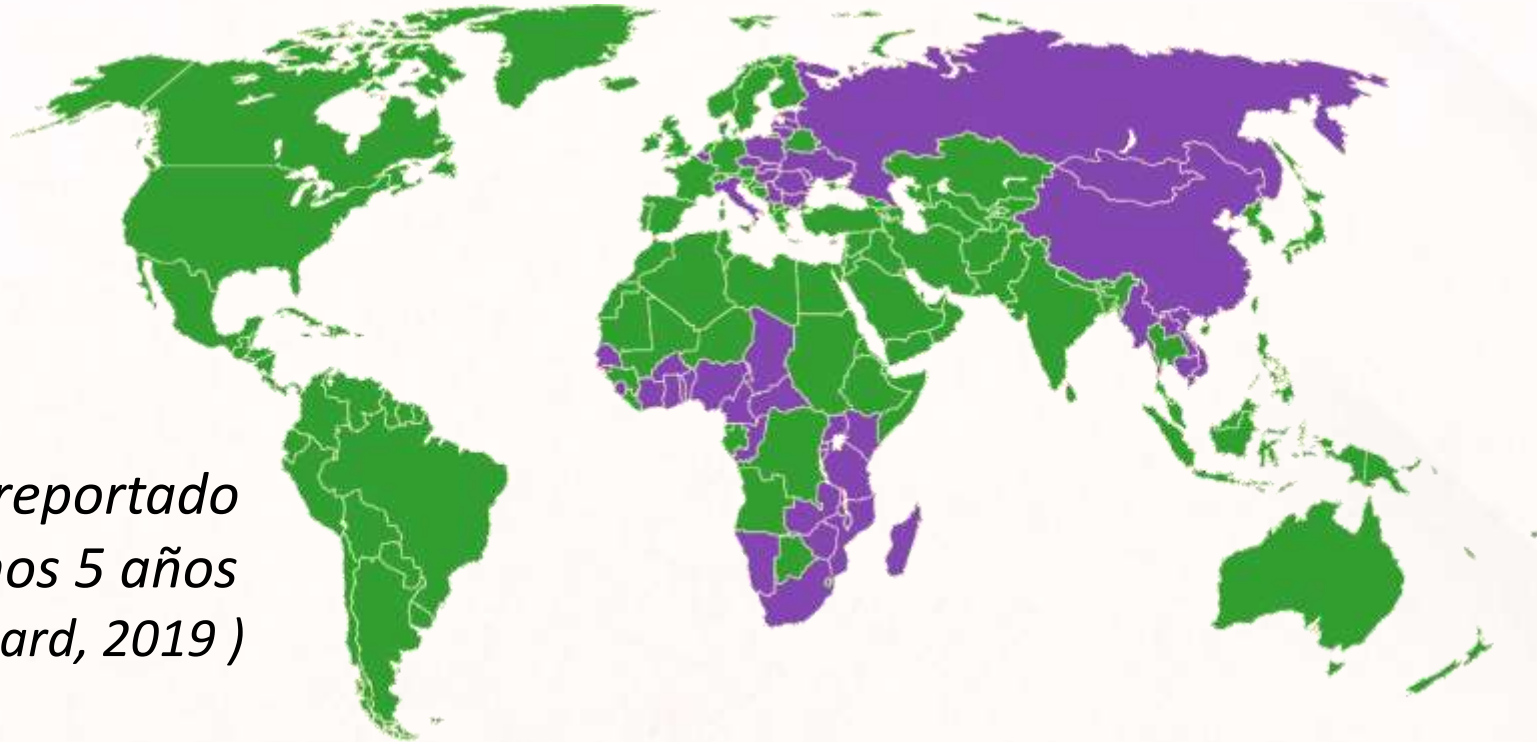


Correlación espacial negativa

Autocorrelación espacial



- *Pasíes que han reportado PPC en los últimos 5 años (National Pork Board, 2019)*



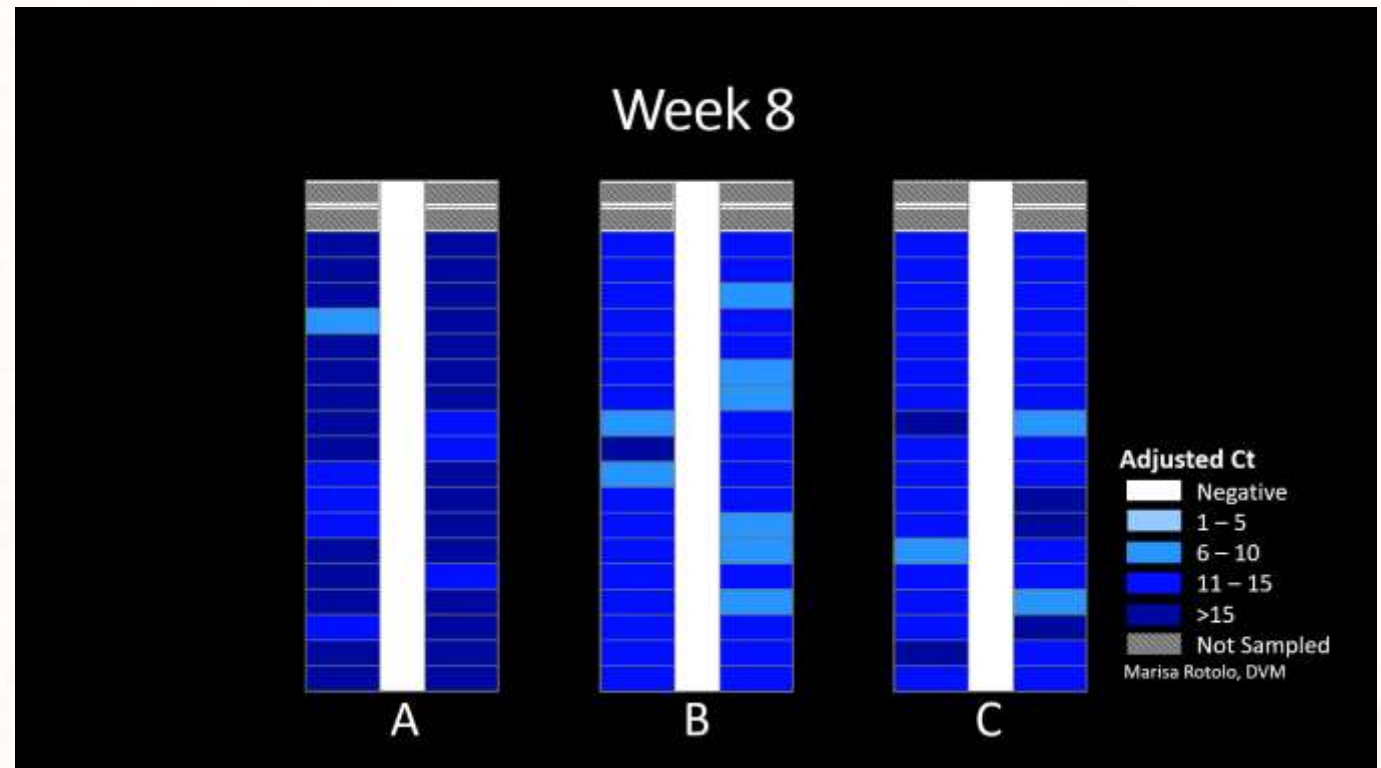
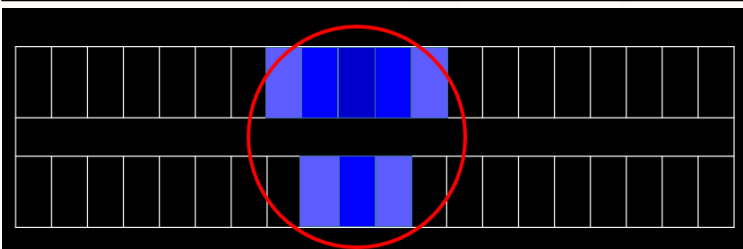
“Todo está relacionado con todo, pero las cosas cercanas están más relacionadas que las cosas distantes.”

W. Tobler's first law of geography (1970).

Autocorrelación espacial

Las enfermedades infecciosas en granja tienden a **aglomerarse**...

Estatus infeccioso similar en cerdos que están físicamente cercanos a otros.

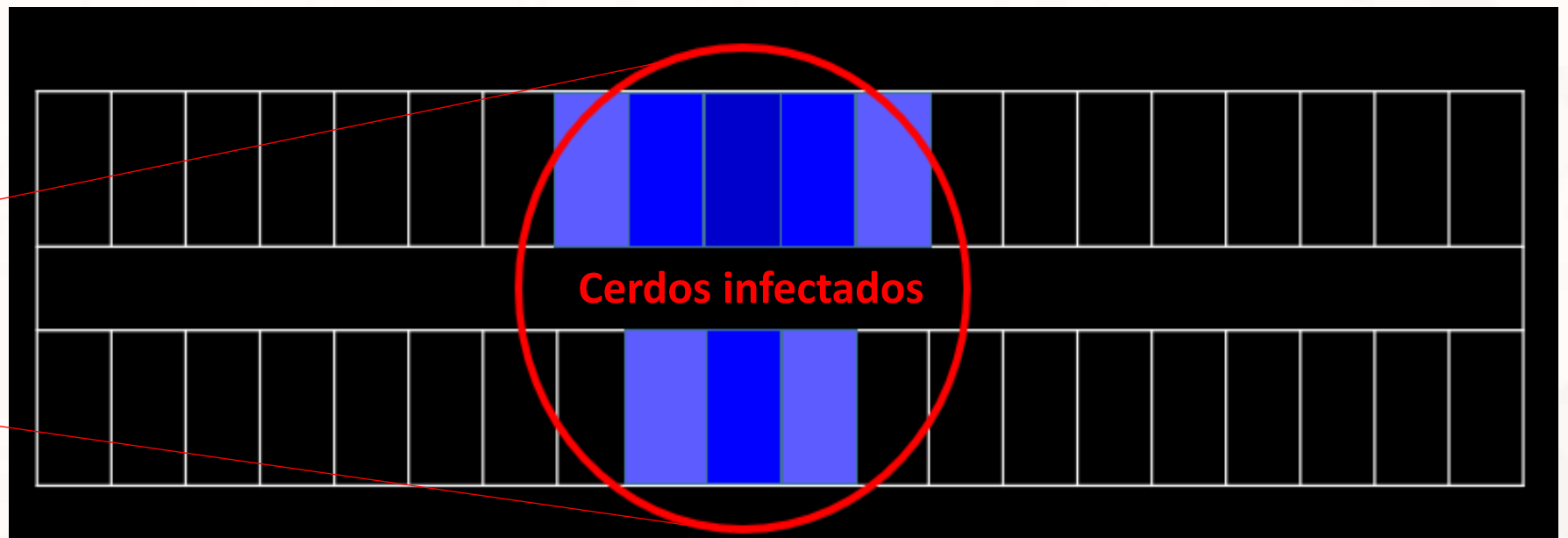
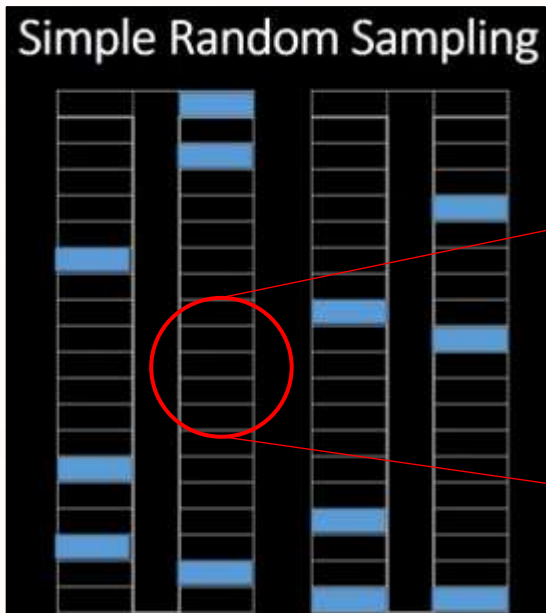


(Rotolo et al., 2017)

Autocorrelación espacial

Consecuencias de seleccionar cerdos “al azar” (muestreo binomial)

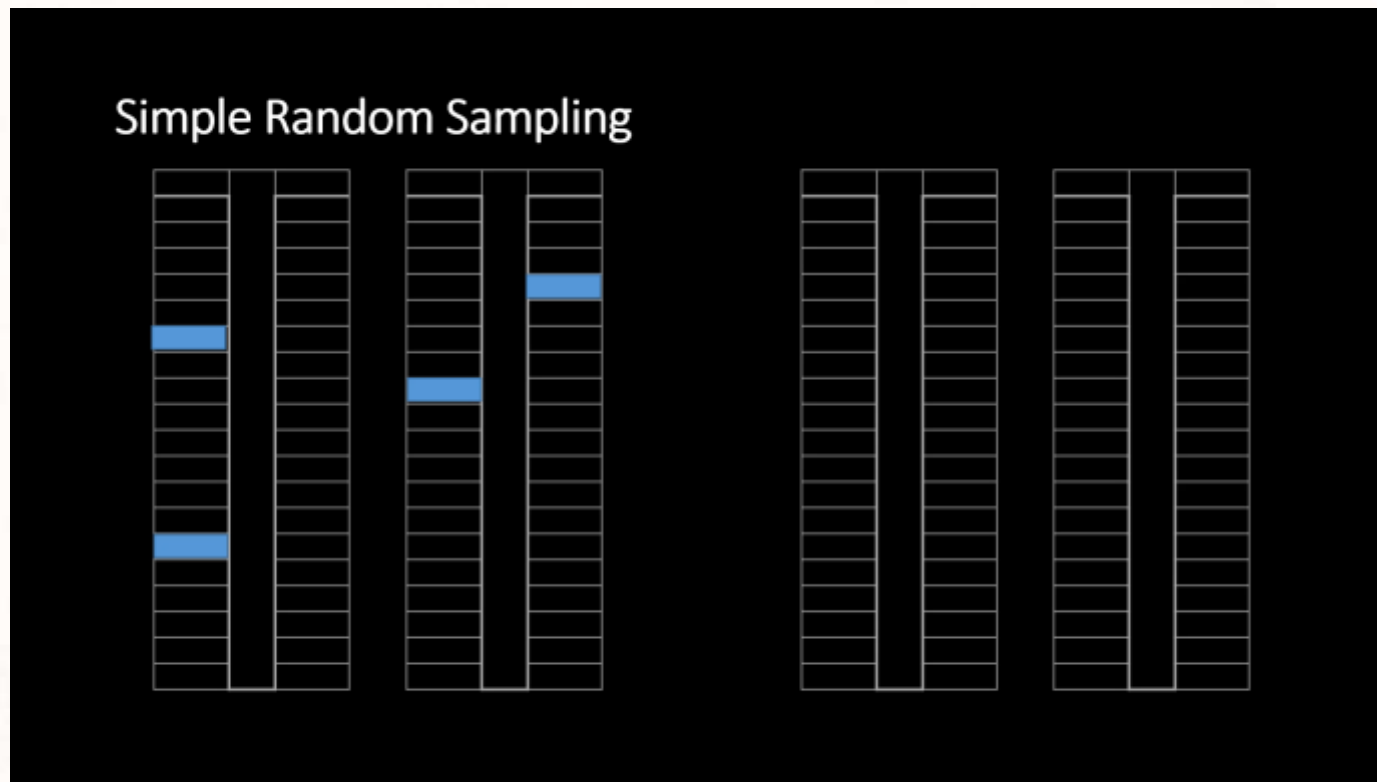
- ⚠ **Saltarse el aglomerado** de cerdos infectados involuntariamente.
- ⚠ Muestrear multiples veces el mismo aglomerado (**¡costo innecesario!**)



4. Muestreo fijo espacial

Mejor que el *muestreo binomial (al azar)* cuando hay correlación...

Asignación espacial uniforme de manera que el muestreo se distribuya en forma equidistante.



1. Guía para la toma de muestras:

- a) Tipo de muestra, cuántas, y con cuánta frecuencia

Muestreo fijo espacial – Fluidos orales (Ej.)



No existe una formula universal para determinar el tamaño de muestras...

Recomendaciones

1) ¿Cuántas muestras puedo coleccionar y analizar rutinariamente?

- \$\$\$\$

2) Muestree los mismos corrales!

3) La consistencia es clave y lo revela todo!

4 muestras		2 muestras		1 muestra	
3	23	3	23	3	23
4	24	4	24	4	24
5	25	5	25	5	25
6	26	6	26	6	26
7	27	7	27	7	27
8	28	8	28	8	28
9	29	9	29	9	29
10	30	10	30	10	30
11	31	11	31	11	31
12	32	12	32	12	32
13	33	13	33	13	33
14	34	14	34	14	34
15	35	15	35	15	35
16	36	16	36	16	36
17	37	17	37	17	37
18	38	18	38	18	38
19	39	19	39	19	39
20	40	20	40	20	40

Frecuencia vs Tamaño de muestra

Es mejor **pocas muestras colectadas frecuentemente** que **muchas muestras colectadas en un solo punto de tiempo...**

Calendario						
Dom	Lun	Mar	Mie	Jue	Vie	Sáb
1	2	3	4	5	6	7
8	9	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28
29	30	31				

Calendario						
Dom	Lun	Mar	Mie	Jue	Vie	Sáb
1	2	3	4	5	6	7
8	9	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28
29	30	31				



Ej: Granja de destete a finalización ($n = 1,100$)



10 sitios x 6 corrales en cada caseta

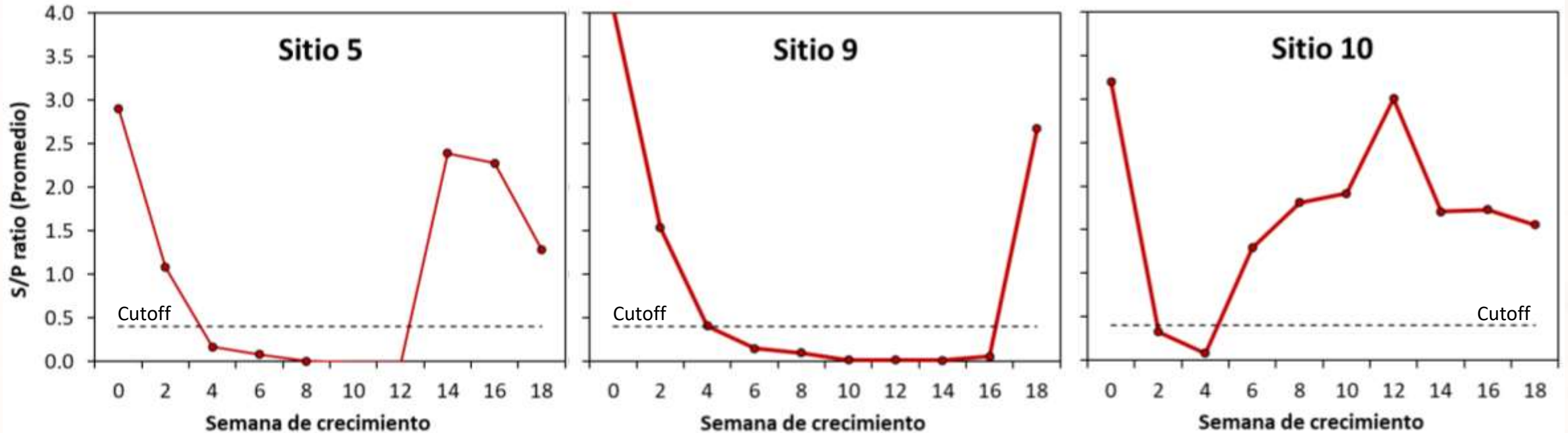
- Muestree los mismos corrales, use pocas muestras



Muestreo bi-semanal (la consistencia es la clave!)



Resultados: Anticuerpos contra PRRSV



Resultados **lógicos y fáciles de entender** porque reflejan la respuesta de los cerdos a la infección a través del tiempo.

1. Guía para la toma de muestras:

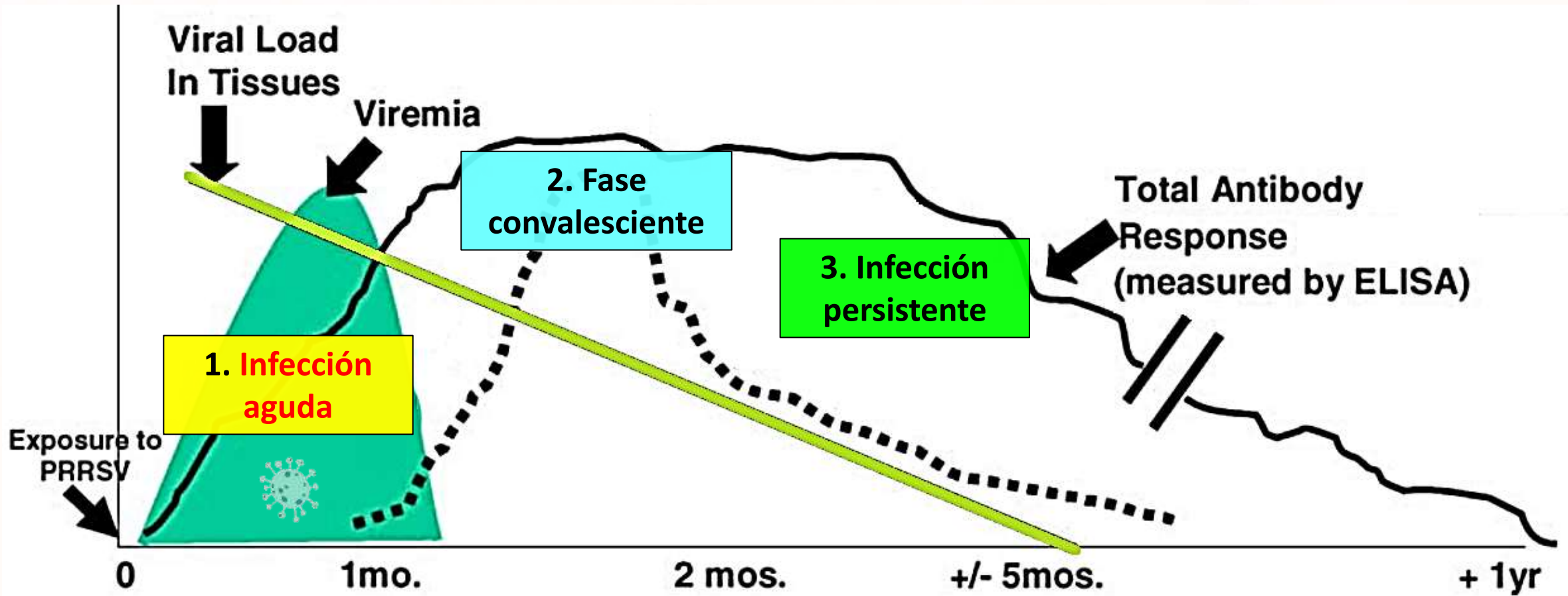
b) ¿Qué prueba diagnóstica utilizar?

b) ¿Qué prueba diagnóstica utilizar?



PCR vs ELISA/anticuerpo?

Etapas de transición de PRRSV



(Lopez and Osorio, 2004; Henao-Diaz et al., 2020)

PCR vs ELISA



IDEXX



porkaméricas 2024



PCR

Detecta **ARN** de **PRRSV** en la muestra.

- Estimación de carga viral en la muestra.

- Resultados en cuestión de horas.
- Disponible para gran variedad de muestras.

- **Costo:** \$25.00 – 35.00 USD/muestra.
- ARN sensible a altas temperaturas.



ELISA

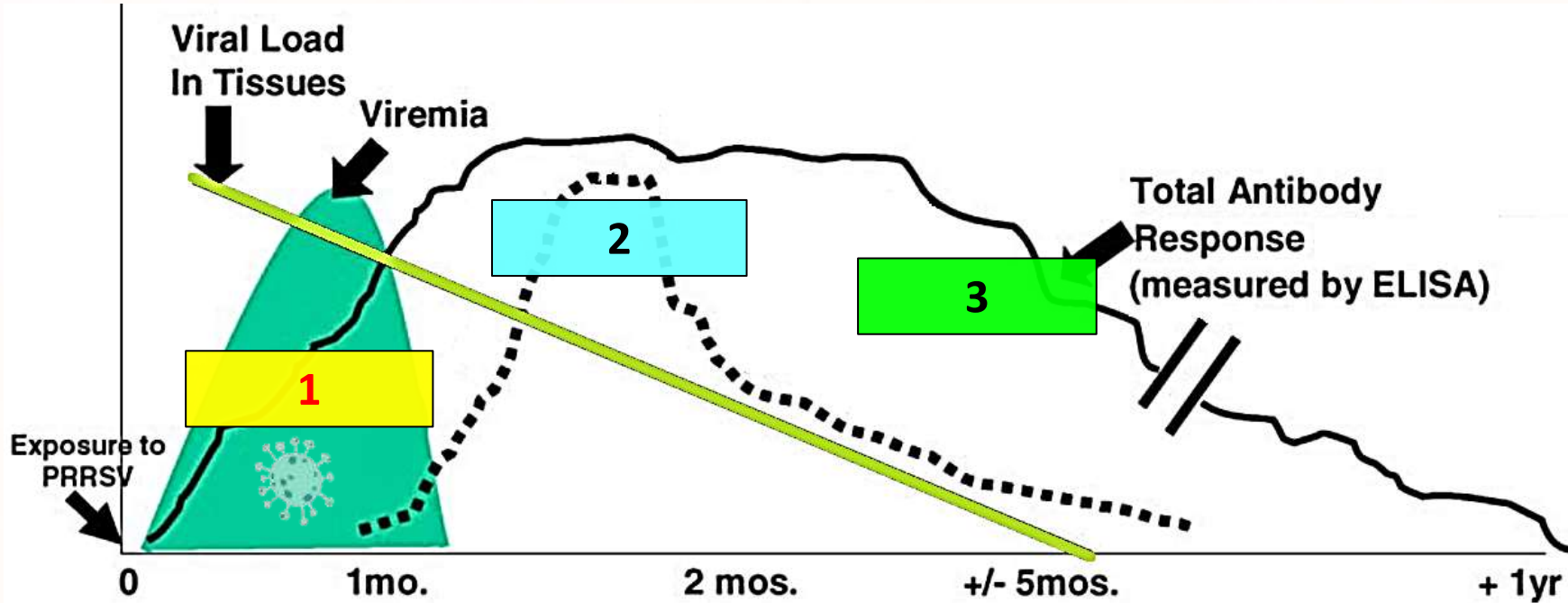
Detecta **anticuerpos** contra PRRSV.

- Indica infecciones pasadas o recientes.

- Resultados en cuestión de horas.
- **Costo:** ~\$5.00 – 7.00 USD/muestra

- Limitado a fluidos que contengan anticuerpos.
- Limitado a granjas libres de PRRSV.

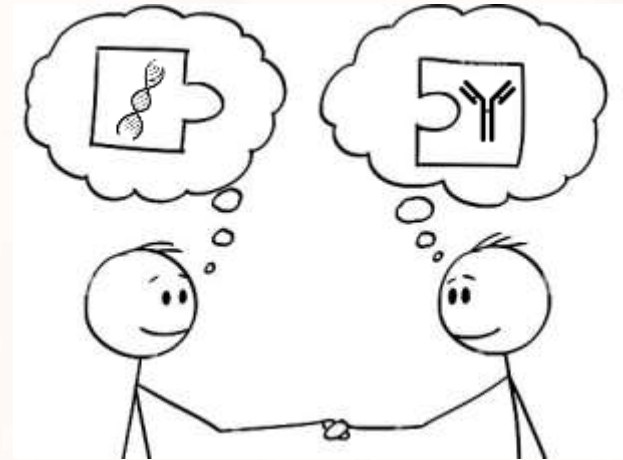
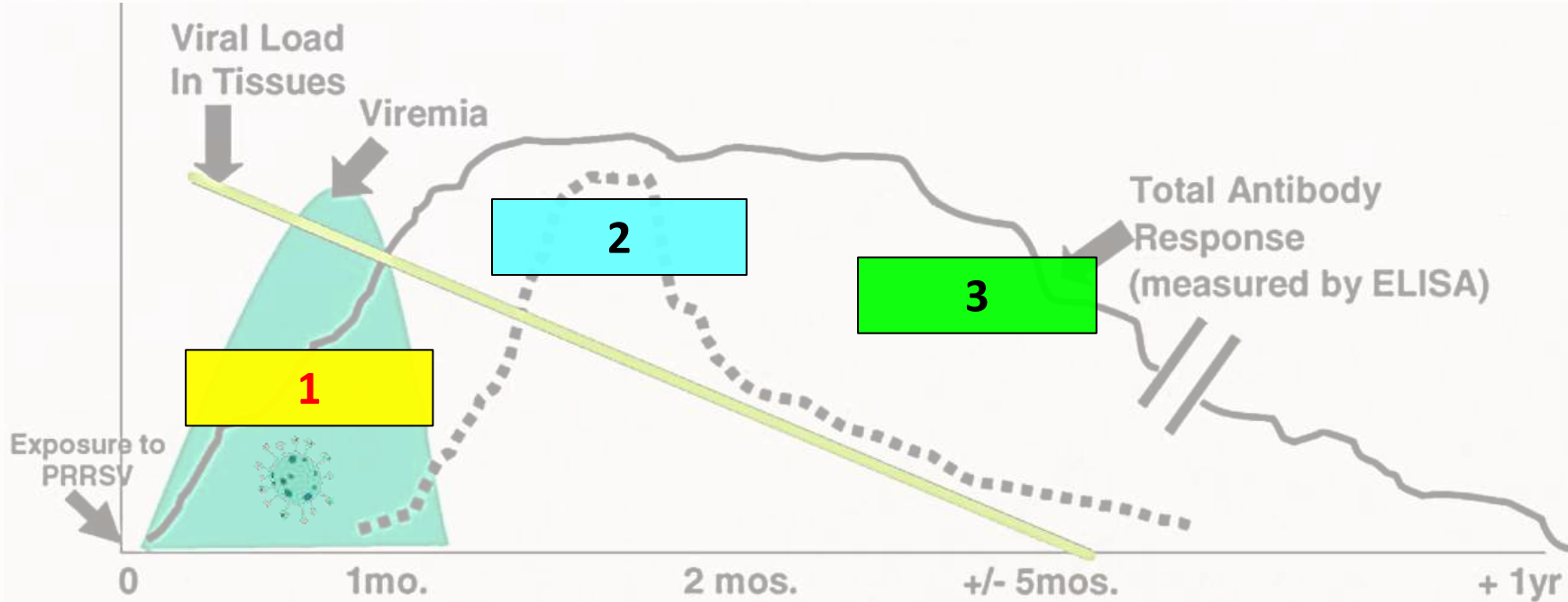
PCR vs ELISA?



- 1 RT-PCR ✓
- 2 RT-PCR (baja carga viral) ⚠️, ELISA ✓
- 3 ELISA ✓

PCR + ELISA!

IDEXX



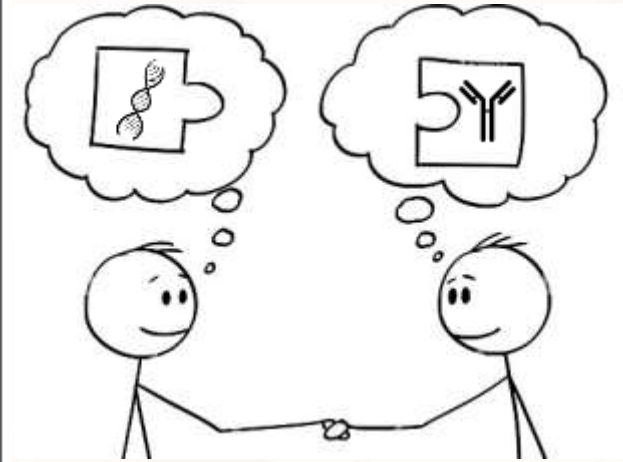
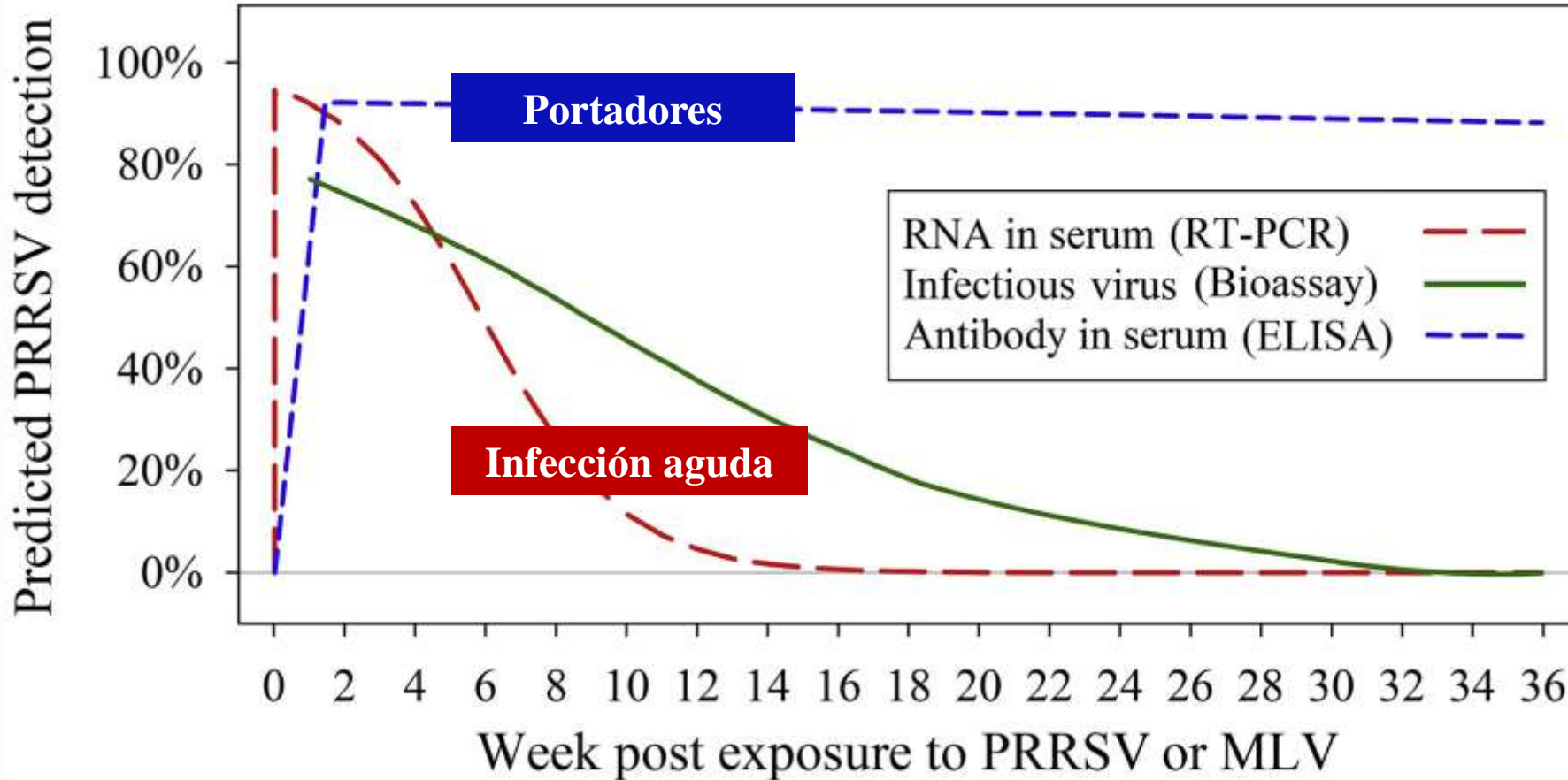
PCR + ELISA

1 RT-PCR ✓

2 RT-PCR (baja carga viral) ⚠, ELISA ✓

3 ELISA ✓

PCR + ELISA!



PCR + ELISA

(Henao-Diaz et al., 2020)

Guía para un plan de vigilancia sostenible:

1. Guía para la toma de muestras.

- a) Tipo de muestra, cuántas, y con cuánta frecuencia.
- b) ¿Qué prueba diagnóstica utilizar?

2. ¿Cómo obtener mejores resultados en la PCR?

- c) Importancia del manejo adecuado de la muestra
- d) Uso de controles endógenos

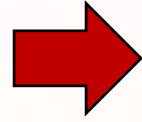


2. ¿Cómo asegurar los mejores resultados en PCR?

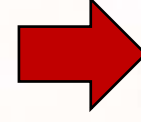
- c)** Importancia del manejo adecuado de la muestra.



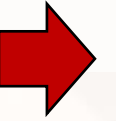
1. Colección de muestra



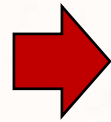
2. Almacenamiento en granja



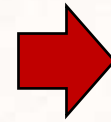
3. Envío al laboratorio



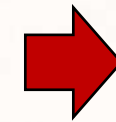
4. Recepción en laboratorio



5. Procesamiento de muestra



6. Almacenamiento antes de testear



7. Testeo por qPCR



1. Colección de muestra



! Refrigerada/congelada?

! Congelada-descongelada?



! Refrigerada?

! Altas temperaturas?



3. Envío al laboratorio

! Refrigerada?



4. Recepción en laboratorio



5. Procesamiento de muestra



! Refrigerada?



6. Almacenamiento antes de testear



7. Testeo por qPCR

Las muestras colectadas en granja están expuestas a una **variedad de condiciones desfavorables...**

¿Me debería preocupar...?





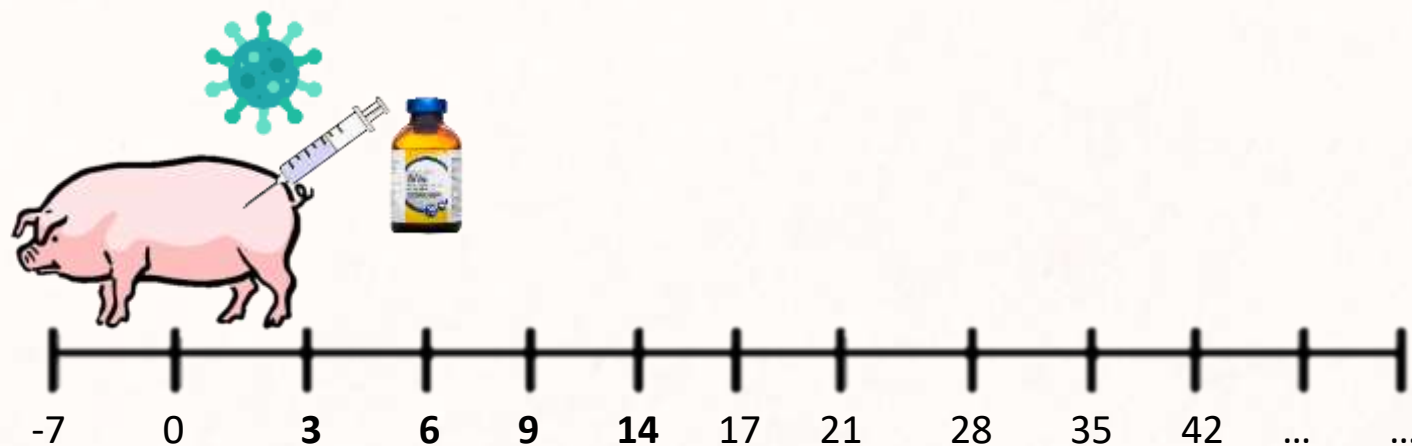
Efecto de la **temperatura de almacenamiento** en la detección de PRRSV RNA en suero y fluidos orales

Suero ($n = 5$)

Cerdos inoculados con PRRSV contemporáneo.

Fluido oral ($n = 5$)

Cerdos vacunados con Ingelvac[®] PRRS MLV.

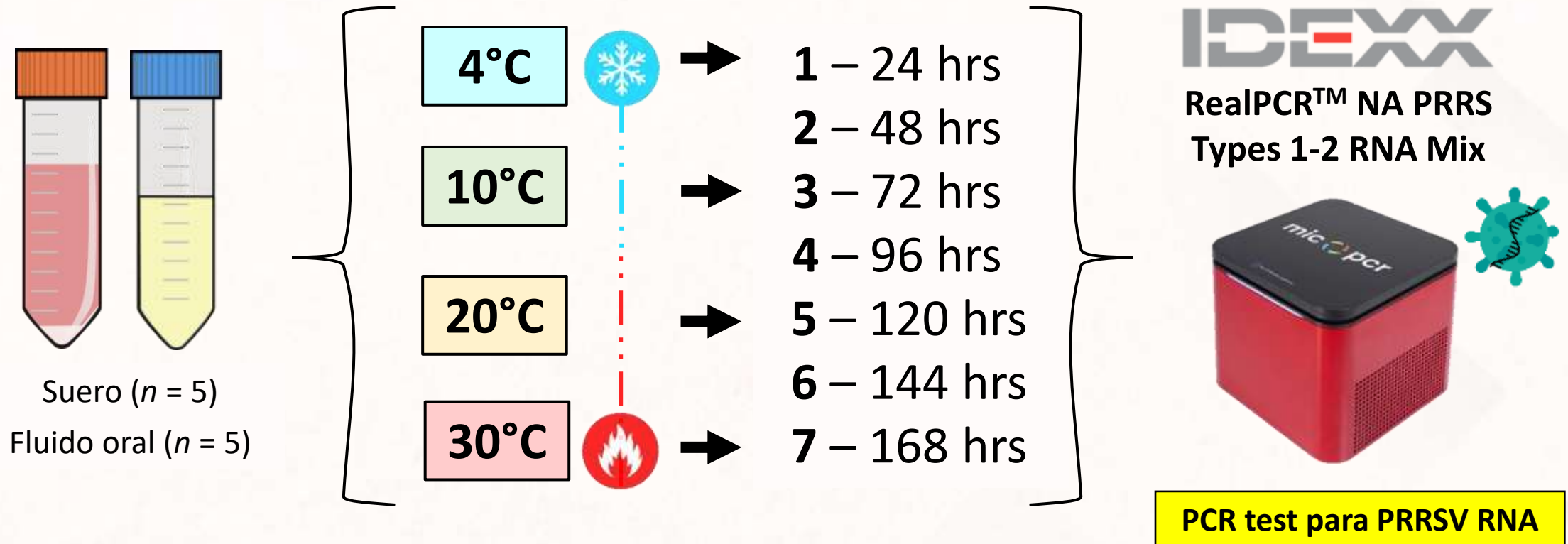


14 ml c/u

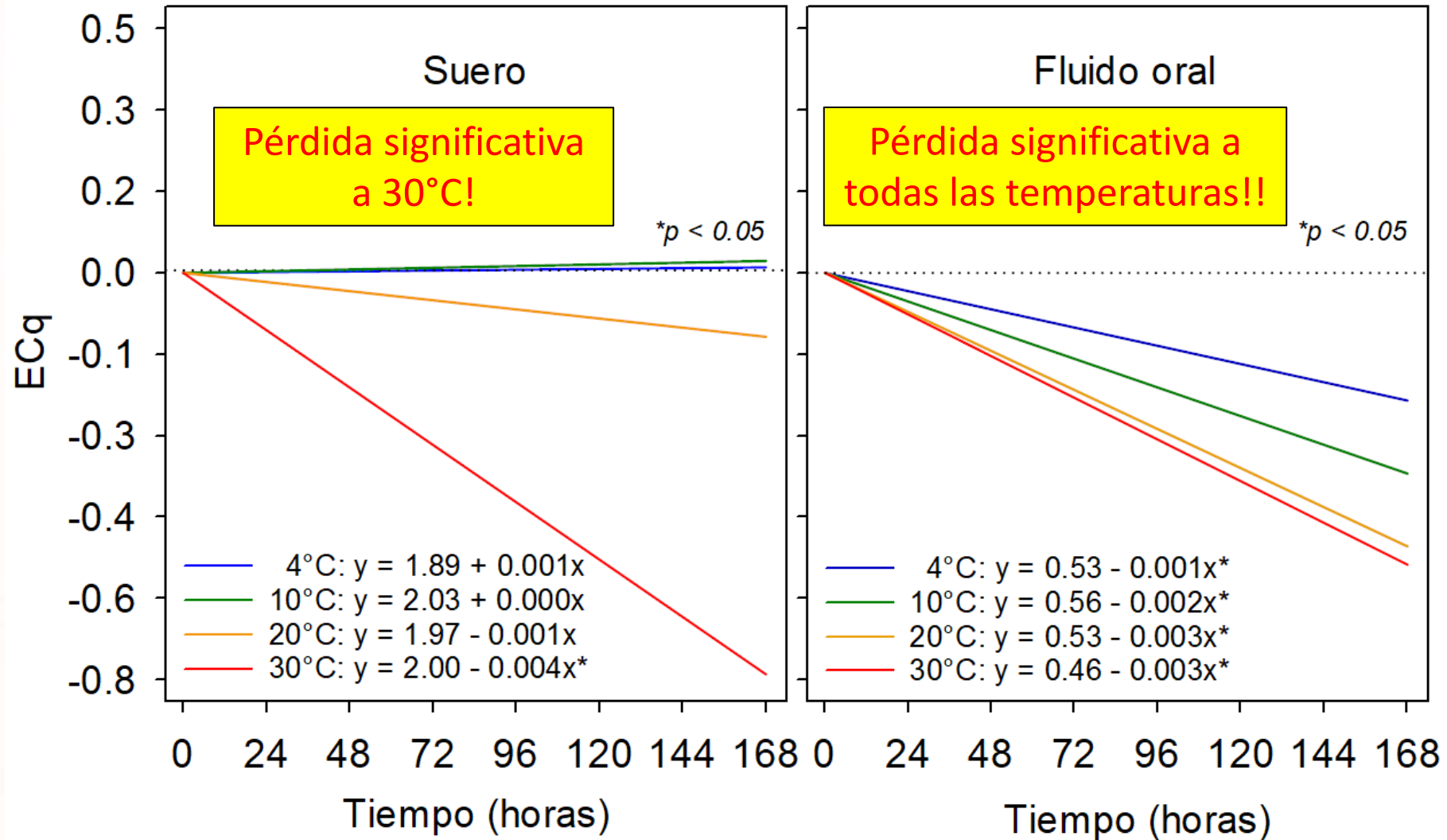
(Munguía-Ramírez et al., 2023)

Muestras divididas en 28 alícuotas de 500 uL

→ Sometidas a **28 tratamientos de temperatura:**





Pérdida de PRRSV RNA en función de la (temperatura*tiempo)



(Munguía-Ramírez et al., 2023)


% de PRRSV RNA detectable por PCR



	Suero			
	4°C	10°C	20°C	30°C
24 hrs	100	100	99	95
48 hrs	100	100	98	90
72 hrs	100	100	97	84
96 hrs	100	100	97	79
120 hrs	100	100	96	74
144 hrs	100	100	95	68
168 hrs	100	100	94	63

	Fluido oral			
	4°C	10°C	20°C	30°C
24 hrs	94	91	86	83
48 hrs	87	81	73	67
72 hrs	81	72	59	50
96 hrs	75	62	45	34
120 hrs	68	52	32	17
144 hrs	62	43	18	0
168 hrs	56	34	5	0

(Munguía-Ramírez et al., 2023)

% de PRRSV RNA detectable por PCR

	Suero			
	4°C	10°C	20°C	30°C
24 hrs	100	100	99	95
48 hrs	100	100	98	90
72 hrs	100	100	97	84
96 hrs	100	100	97	79
120 hrs	100	100	96	74
144 hrs	100	100	95	68
168 hrs	100	100	94	63

	Fluido oral			
	4°C	10°C	20°C	30°C
24 hrs	94	91	86	83
<p>Pérdida de PRRSV RNA a cualquier temperatura $\geq -80/-20^{\circ}\text{C}$!!! </p>				
144 hrs	62	43	18	0
168 hrs	56	34	5	0



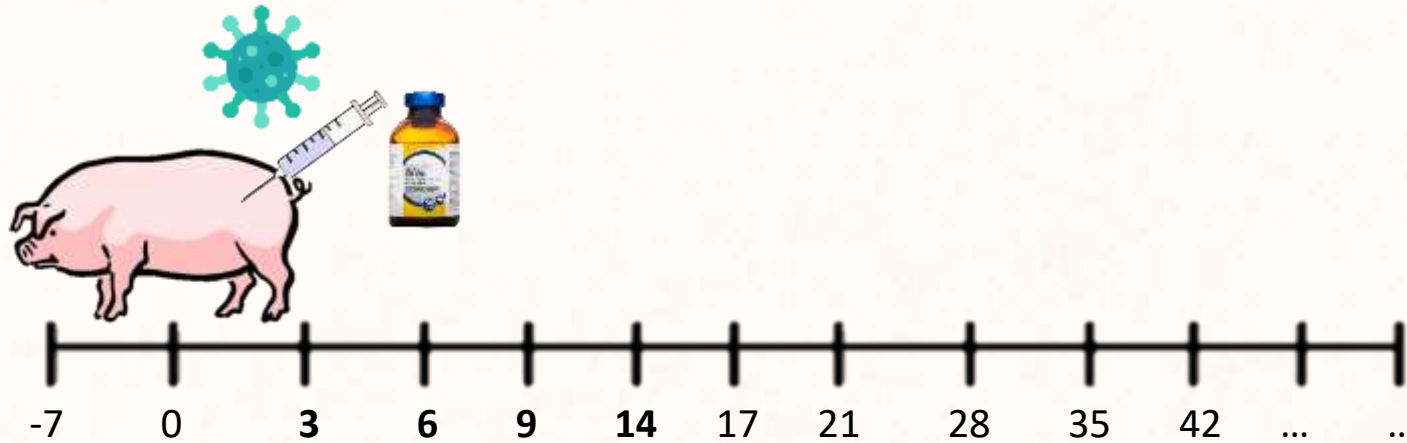
Efecto del **congelado-descogelado** en la detección de PRRSV RNA en suero y fluidos orales

Suero ($n = 5$)

Cerdos inoculados con PRRSV contemporáneo.

Fluido oral ($n = 6$)

Cerdos vacunados con Ingelvac[®] PRRS MLV.

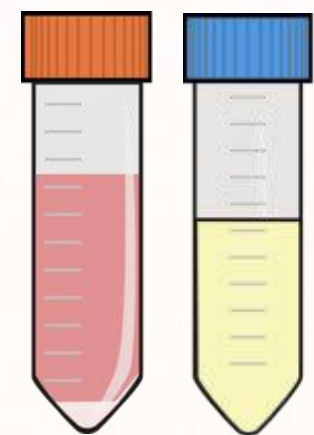


4 ml c/u

(Munguía-Ramírez et al., 2023)

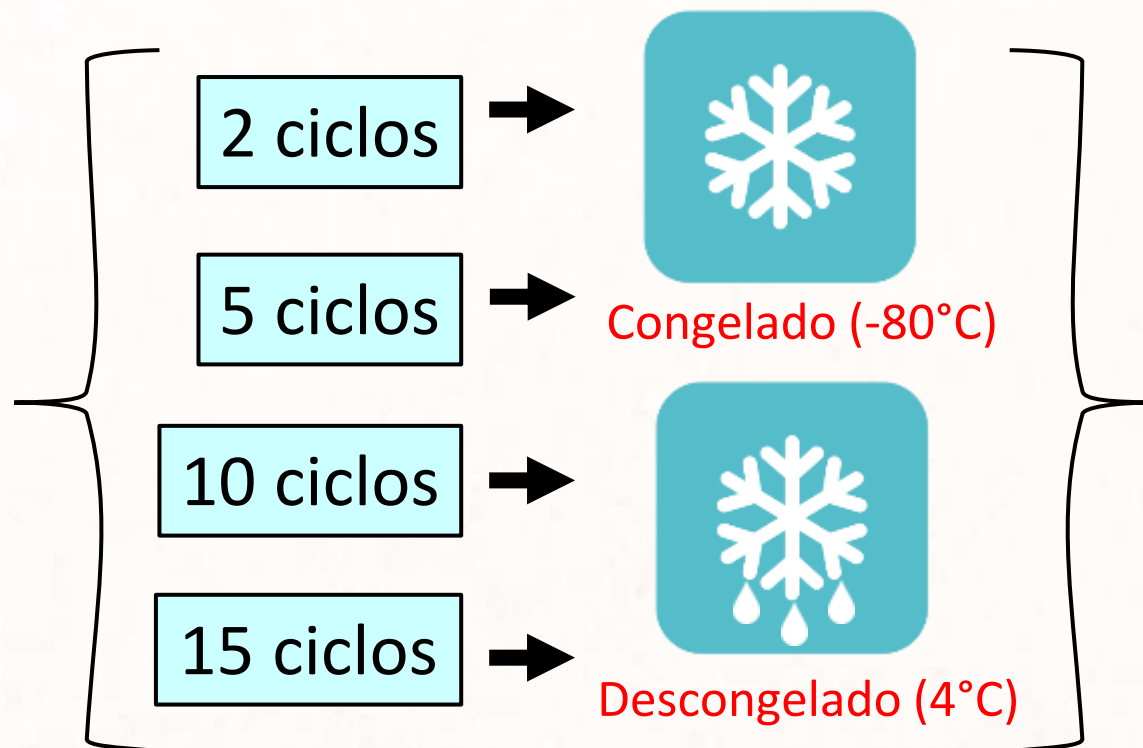
Muestras divididas en 4 alícuotas de 1 mL

→ Sometidas a **4 tratamientos de congelado-descongelado:**



Suero ($n = 5$)

Fluido oral ($n = 6$)

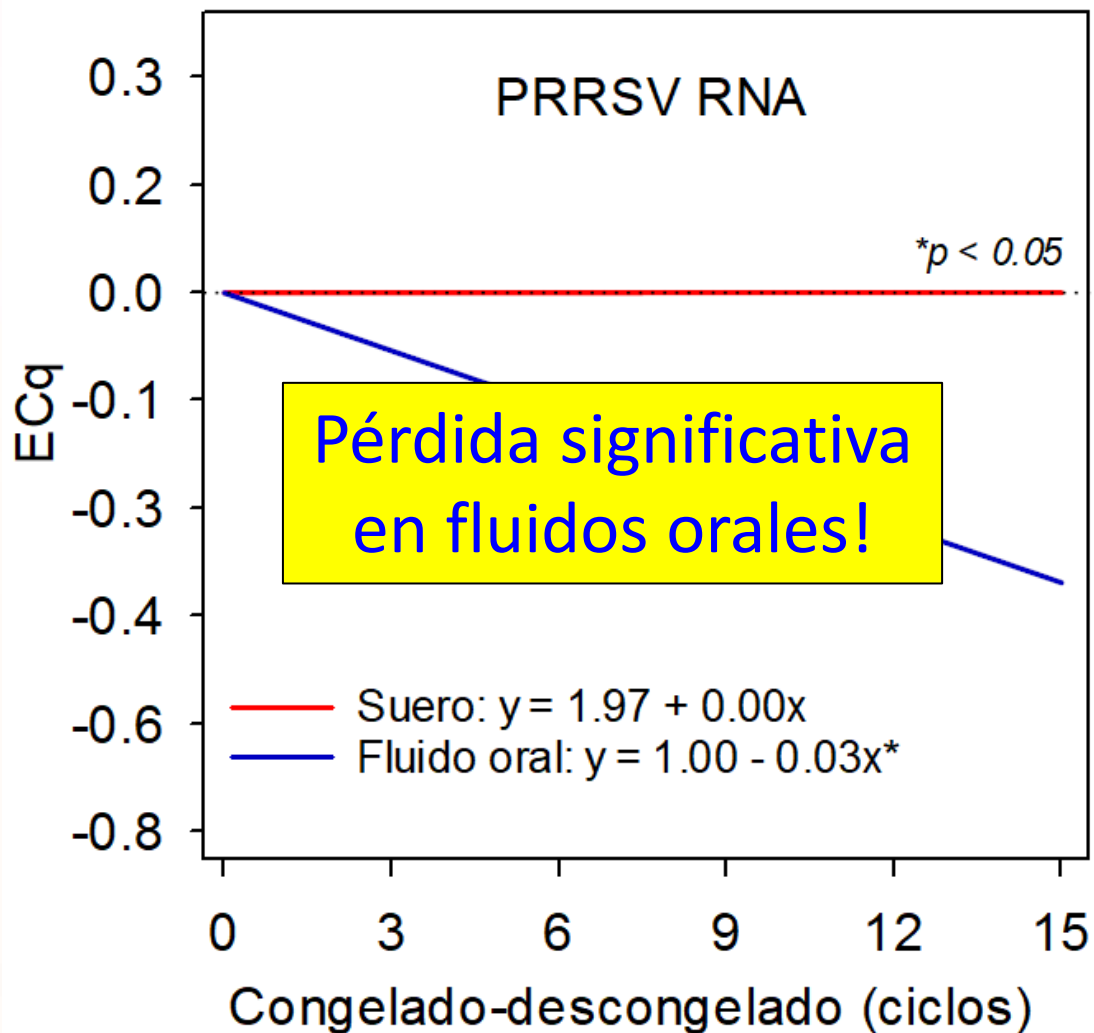


IDEXX
RealPCR™ NA PRRS
Types 1-2 RNA Mix



PCR test para PRRSV RNA

Pérdida de PRRSV RNA en función del (congelado-descongelado)



	% de PRRSV RNA detectable por PCR			
	2 ciclos	5 ciclos	10 ciclos	15 ciclos
Suero	100	100	100	100
Fluido oral	95	87	73	60

Pérdida de PRRSV RNA a > 2 ciclos de congelado-descongelado en fluido oral!

2. ¿Cómo asegurar los mejores resultados en PCR?

d) Uso de controles endógenos.

La prueba de PCR no es perfecta...



- Variaciones en el manejo de la muestra afectan los resultados.
- **NO TODAS LAS PRUEBAS DE PCR SE COMPORTAN IGUAL!**

Detección de *M. hyopneumoniae* en fluidos orales por PCR:

Procedure		Oral fluid results		
Extraction	PCR	Positive ¹	Negative	Total
1	1 ^a	109 ^c	213	322
2 diferentes extracciones	3 diferentes PCRs	148 ^{a,b}	174	322
1	2	173 ^a	149	322
2	2	134 ^{b,c}	188	322

(Poeta Silva et al., 2020)

La prueba de PCR no es perfecta...



- Variaciones en el manejo de la muestra afectan los resultados.
- **NO TODAS LAS PRUEBAS DE PCR SE COMPORTAN IGUAL!**

Detección de *M. hyopneumoniae* en fluidos orales por PCR:

Procedure		Oral fluid results	
Extraction	PCR	Positive ¹	
1	1 ^a	109 ^c	La tasa de positividad varía por los métodos de extracción y PCR!
2 diferentes extracciones	3 diferentes PCRs	148 ^{a,b}	
1	2	173 ^a	
2	2	134 ^{b,c}	

(Poeta Silva et al., 2020)

La prueba de PCR no es perfecta...

IDEXX



porkaméricas / 2024

¿Por qué?



- Pobre calidad la muestra
- Diferente personal realizando la prueba
- Contaminación
- Errores en pipeteo
- Eficiencia de las enzimas usadas para RT
- Diferente equipo de extracción o PCR
- Variaciones en el lote de los reactivos

... etc.

4. ¿Cómo asegurar resultados de PCR confiables?

Monitoreando la calidad del procedimiento!



La prueba de PCR no es perfecta...

IDEXX



¿Por qué?



- Pobre calidad la muestra
- Diferente personal realizando la prueba
- Contaminación
- Errores en pipeteo
- Eficiencia de las enzimas usadas para RT
- Diferente equipo de extracción o PCR
- Variaciones en el lote de los reactivos

... etc

La prueba de PCR no es perfecta...

IDEXX



¿Por qué?



- Pobre calidad la muestra
- ✓ Diferente personal realizando la prueba
- ✓ Contaminación
- ✓ Errores en pipeteo
- ✓ Eficiencia de las enzimas usadas para RT
- ✓ Diferente equipo de extracción o PCR
- ✓ Variaciones en el lote de los reactivos

...

La prueba de PCR no es perfecta...

IDEXX



¿Por qué?



✗ **No monitoreado!**

- ✓ Diferente personal realizando la prueba
- ✓ Contaminación
- ✓ Errores en pipeteo
- ✓ Eficiencia de las enzimas usadas para RT
- ✓ Diferente equipo de extracción o PCR
- ✓ Variaciones en el lote de los reactivos

...

4. ¿Cómo asegurar resultados de PCR confiables?

Monitoreando la calidad del procedimiento!



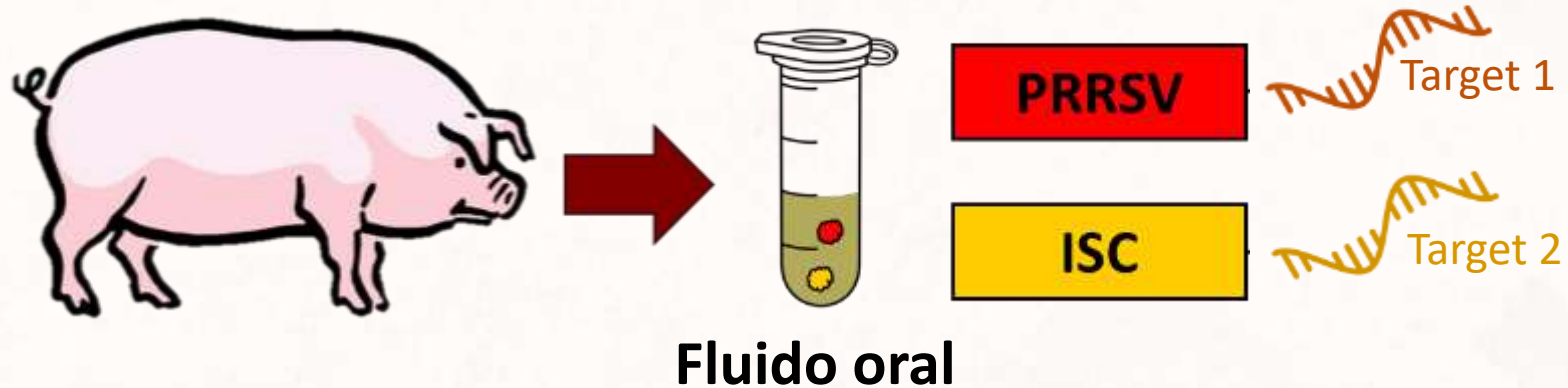
¿Cómo monitorear la calidad de la muestra?

Control endógeno (internal sample control, **ISC**)

Cuantificación de un **gen porcino inherente a la muestra** junto a la prueba de PCR para PRRSV.

En la muestra: El **gen porcino** se encuentra bajo las **mismas condiciones** de manejo que el **RNA de interés (PRRSV)**.

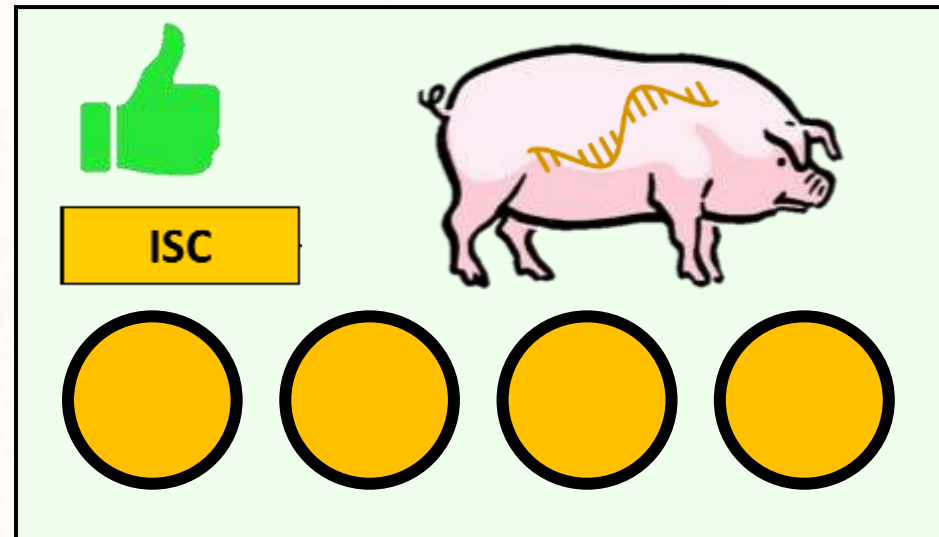
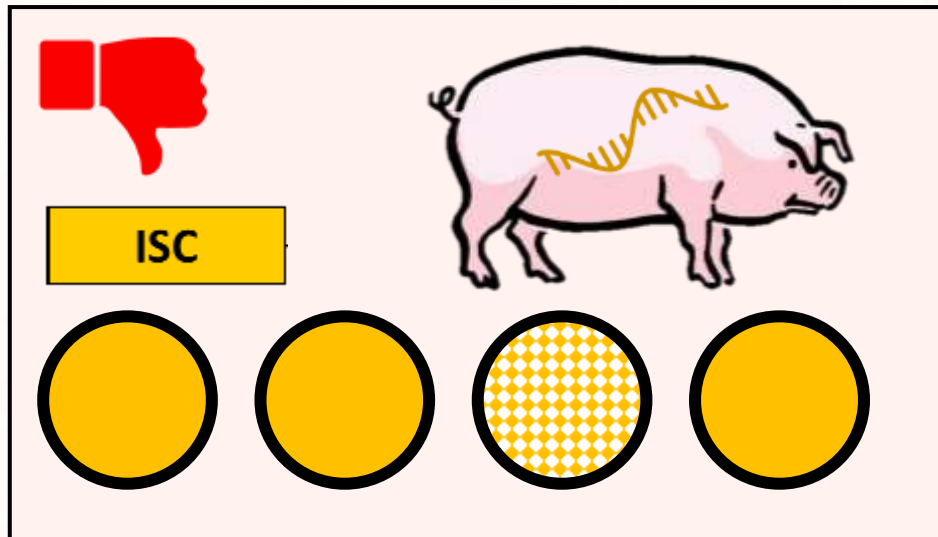
Verifican la integridad de la muestra desde su colección y transporte!



Control endógeno (ISC)

Deben ser **verificados** para su **expression constante** antes de usarse como controles.

- Validado bajo las **mismas condiciones** que el RNA viral de interés.



Validación de un control endógeno en una PCR para PRRSV

Muestras (n) = 927



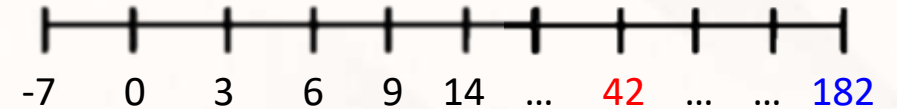
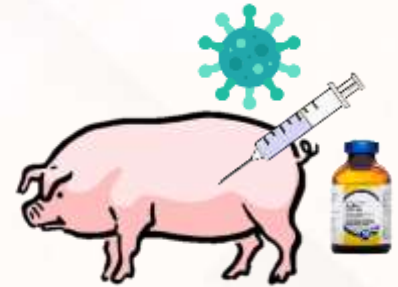
**RealPCR™ NA PRRS
Types 1-2 RNA Mix**

1. Validación en consistencia

Fluido oral ($n = 130$)

Suero ($n = 215$)

Heces ($n = 132$)



2. Establecer valores de referencia para diagnóstico de rutina.

Fluido oral ($n = 150$)

Hisopado fecal ($n = 75$)

Suero ($n = 150$)

Heces ($n = 75$)

Validación de un control endógeno en una PCR para PRRSV

Muestras (n) = 927



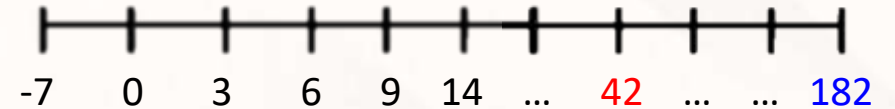
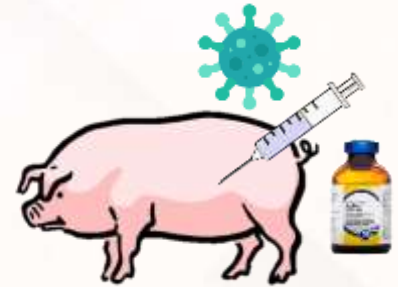
**RealPCR™ NA PRRS
Types 1-2 RNA Mix**

1. Validación en consistencia

Fluido oral ($n = 130$)

Suero ($n = 215$)

Heces ($n = 132$)



2. Establecer valores de referencia para diagnóstico de rutina.

Fluido oral ($n = 150$)

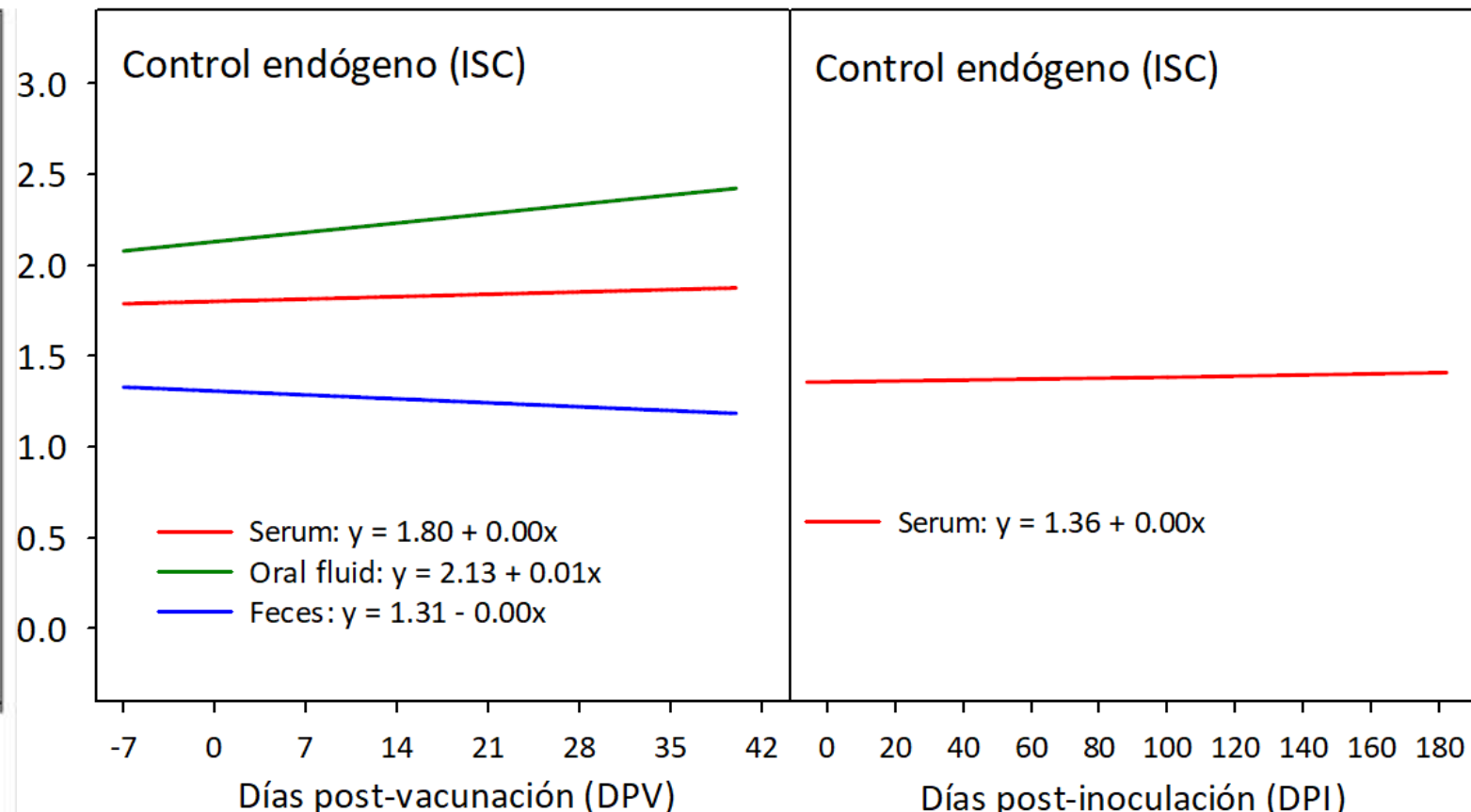
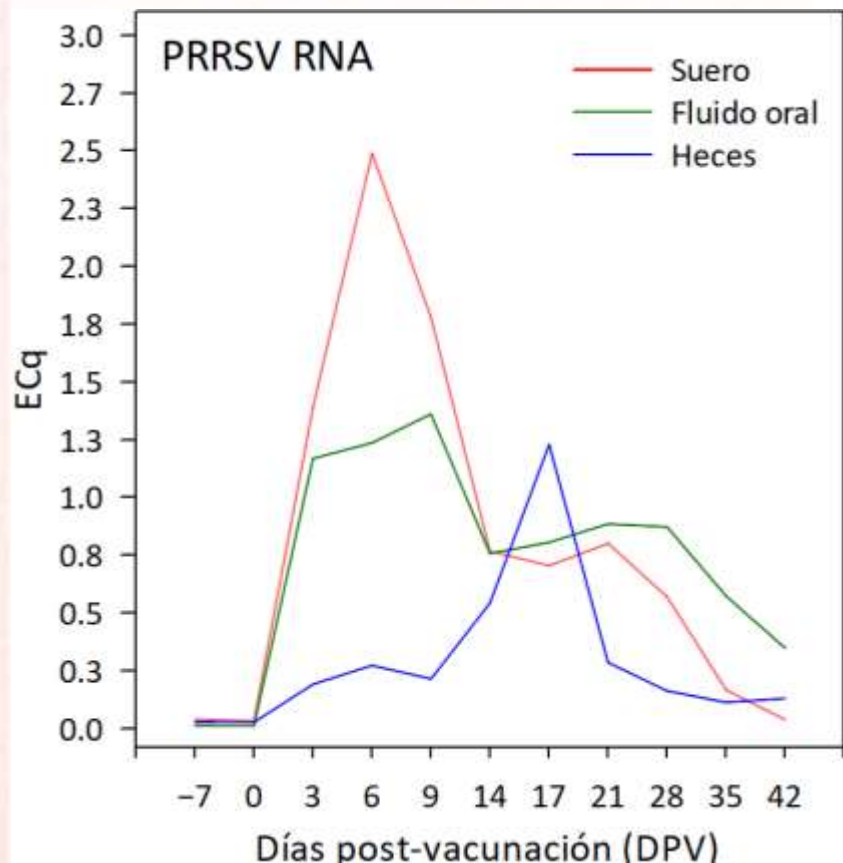
Hisopado fecal ($n = 75$)

Suero ($n = 150$)

Heces ($n = 75$)

1. Validación en consistencia

ISC consistente en todas las muestras



(Munguía-Ramírez et al., 2023)

Validación de un control endógeno en una PCR para PRRSV

Muestras (n) = 927



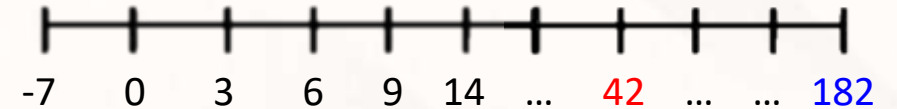
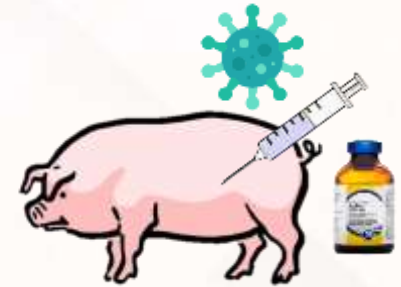
**RealPCR™ NA PRRS
Types 1-2 RNA Mix**

1. Validación en consistencia

Fluido oral ($n = 130$)

Suero ($n = 215$)

Heces ($n = 132$)



2. Establecer valores de referencia para diagnóstico de rutina.

Fluido oral ($n = 150$)

Hisopado fecal ($n = 75$)

Suero ($n = 150$)

Heces ($n = 75$)

Validación de un control endógeno en una PCR para PRRSV

Muestras (n) = 927



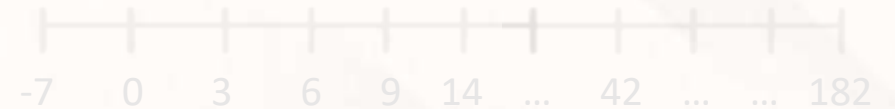
**RealPCR™ NA PRRS
Types 1-2 RNA Mix**

1. Validación en consistencia ✓

Fluido oral ($n = 130$)

Suero ($n = 215$)

Heces ($n = 132$)



2. Establecer valores de referencia para diagnóstico de rutina.

Fluido oral ($n = 150$)

Hisopado fecal ($n = 75$)

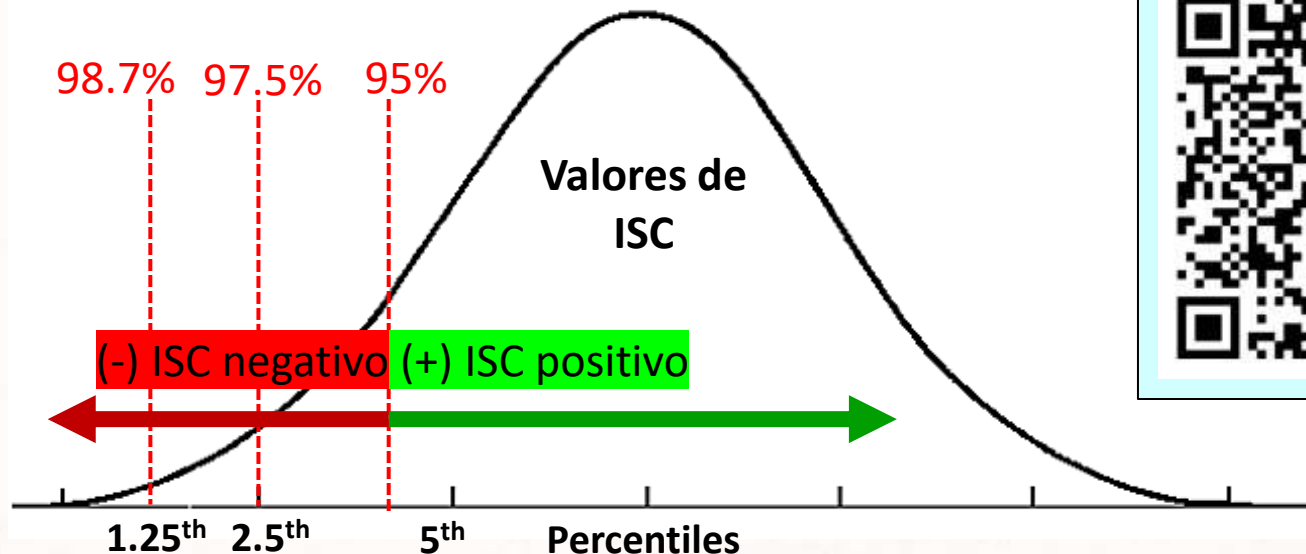
Suero ($n = 150$)

Heces ($n = 75$)

(Munguía-Ramírez et al., 2023)

2. Establecer valores de referencia para diagnóstico de rutina.

Valores límite de ECqs para ISC (95% CI)			
Muestra	98.7%	97.5%	95%
Suero	1.26 (1.12, 1.40)	1.16 (1.10, 1.27)	1.11 (0.56, 1.23)
Fluido oral	0.28 (0.22, 0.44)	0.25 (0.09, 0.36)	0.11 (0.03, 0.26)
Heces	0.49 (0.18, 0.60)	0.37 (0.17, 0.55)	0.18 (0.17, 0.52)
Hisopado fecal	0.27 (0.04, 0.44)	0.14 (0.03, 0.39)	0.04 (0.03, 0.34)



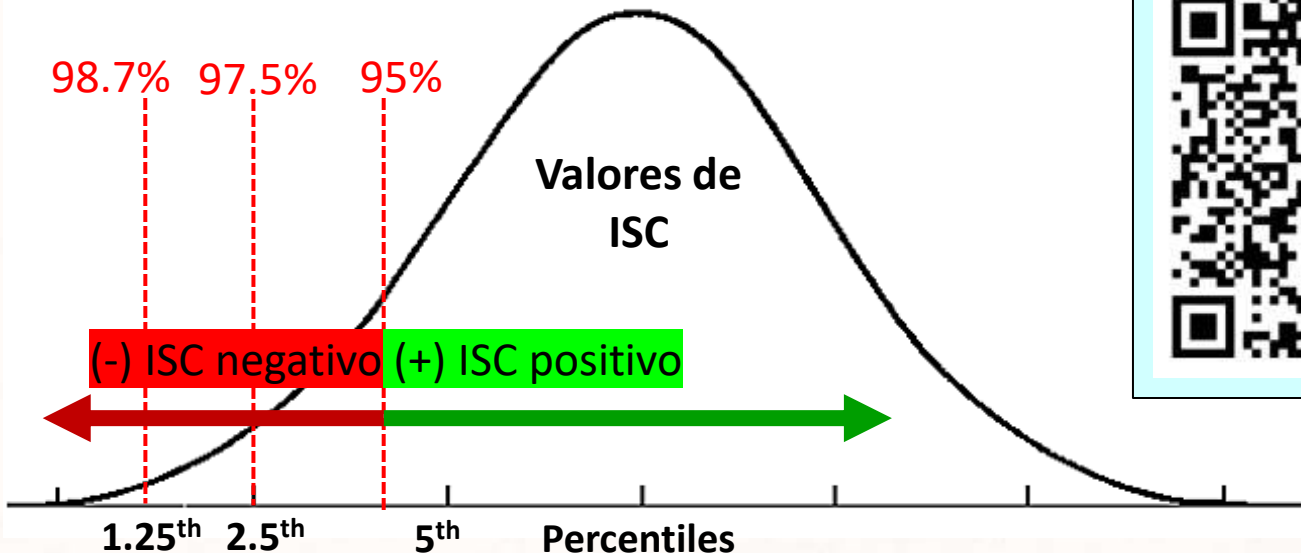
Cómo normalizar a ECq los resultados de la PCR?

(Armenta-Leyva et al., 2023)

2. Establecer valores de referencia para diagnóstico de rutina.

Valores límite de ECqs para ISC (95% CI)			
Muestra	98.7%	97.5%	95%
Suero	1.26 (1.12 - 1.40)	1.16 (1.10 - 1.27)	1.11 (0.56 - 1.23)
Fluido oral	0.28 (0.26 - 0.30)	0.27 (0.26 - 0.28)	0.26 (0.25 - 0.27)
Heces	0.49 (0.47 - 0.51)	0.48 (0.47 - 0.49)	0.52 (0.51 - 0.53)
Hisopado fecal	0.27 (0.26 - 0.28)	0.26 (0.25 - 0.27)	0.34 (0.33 - 0.35)

**Valores fuera de rango =
Re-testear, re-recolección!**



**Cómo normalizar a
ECq los resultados
de la PCR?**

(Armenta-Leyva et al., 2023)

Conclusiones

El manejo de PRRSV es trabajo en equipo

Las **decisiones tomadas en granja** para el manejo de PRRSV **dependen** de los resultados de las **pruebas diagnósticas...**

→ Sinergia granja + laboratorio para asegurar resultados precisos!



En granja:

- Toma y envío adecuado de muestra.
- Refrigeradores/congeladores funcionales.
- Recolectar suficiente muestra (ml) para la prueba diagnóstica.
- Enviar la muestra dentro de 24 horas.



En laboratorio:

- Manejo adecuado de muestra a la recepción.
- Uso de controles positivo y negativo en pruebas diagnósticas.
- Uso de controles endógenos en PCR.
- Congelar muestra después de testear.

Puntos clave

- La PCR y ELISA son **igual de valiosas para el monitoreo!**
- Muestras agregadas y muestreo fijo espacial **reducen costos.**
- **La consistencia es clave:** Pocas muestras + mismos corrales.
- **El manejo adecuado de muestras evitará falsos negativos...**
 - **Suero:** Evite temperaturas $\geq 20^{\circ}\text{C}$ para optimizar la detección por PCR.
 - **Fluidos orales:** Congelar a -80°C y evitar >2 ciclos de congelado-descongelado para prevenir falsos negativos.





PORK - UN -
MEJOR
FUTURO

¡GRACIAS!





Berenice Munguía Ramírez, MVZ, MSc.
Veterinary Diagnostic & Production Animal Medicine
Iowa State University, Ames, IA, USA.
bmunguia@iastate.edu



PORK - UN - MEJOR FUTURO



IOWA STATE UNIVERSITY
Veterinary Diagnostic Laboratory