

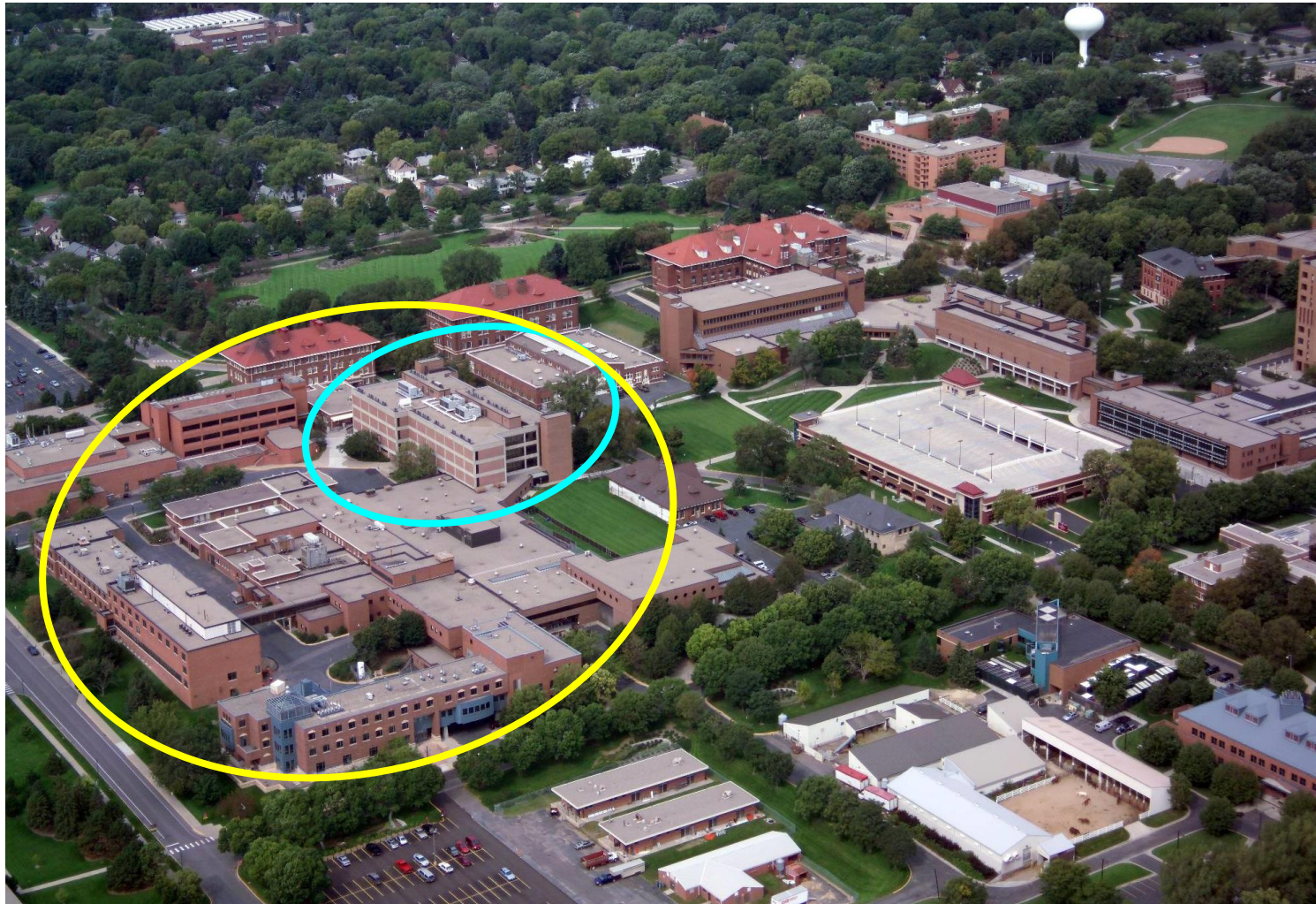
Desafíos y soluciones prácticas en el diagnóstico y vigilancia del PRRSV

Jorge Garrido Mantilla
Guayaquil, Septiembre 2018



UNIVERSITY OF MINNESOTA
Driven to DiscoverSM

UNIVERSITY OF MINNESOTA



OUTLINE

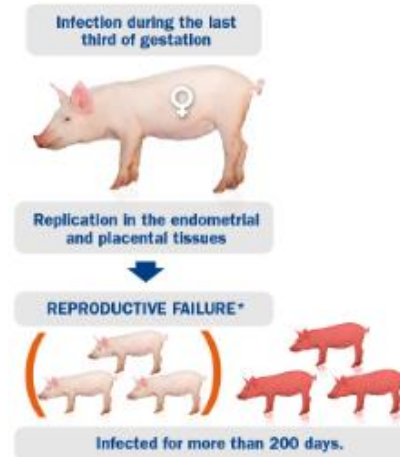
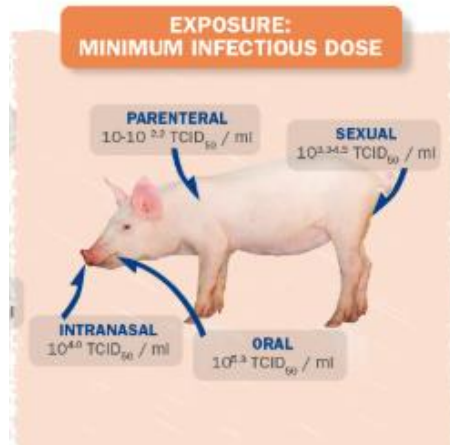
- Introducción
- Diagnóstico
- Desafíos
 - Soluciones
- Conclusiones
- Acknowledgments



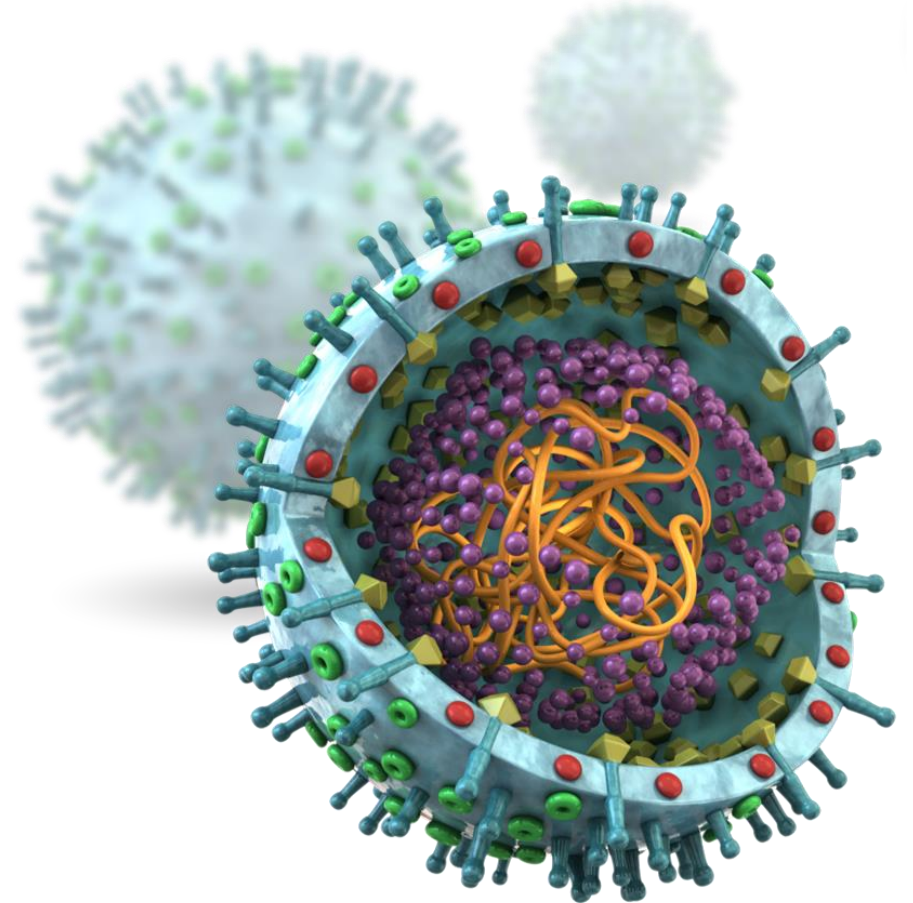
UNIVERSITY OF MINNESOTA
Driven to DiscoverSM

PRRSV

- Arterivirus, RNA, envuelto
- Altamente infeccioso



- Altamente diverso

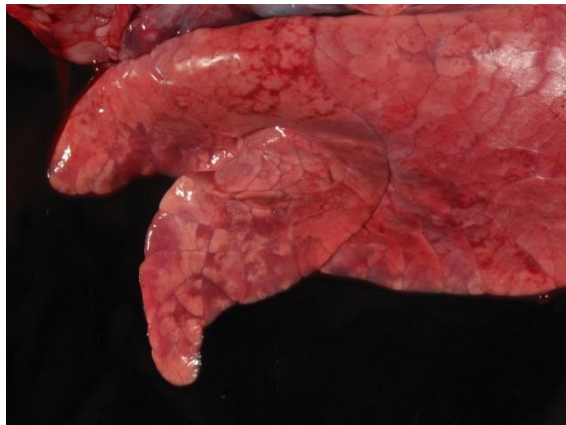


PRRS

- Reproductiva

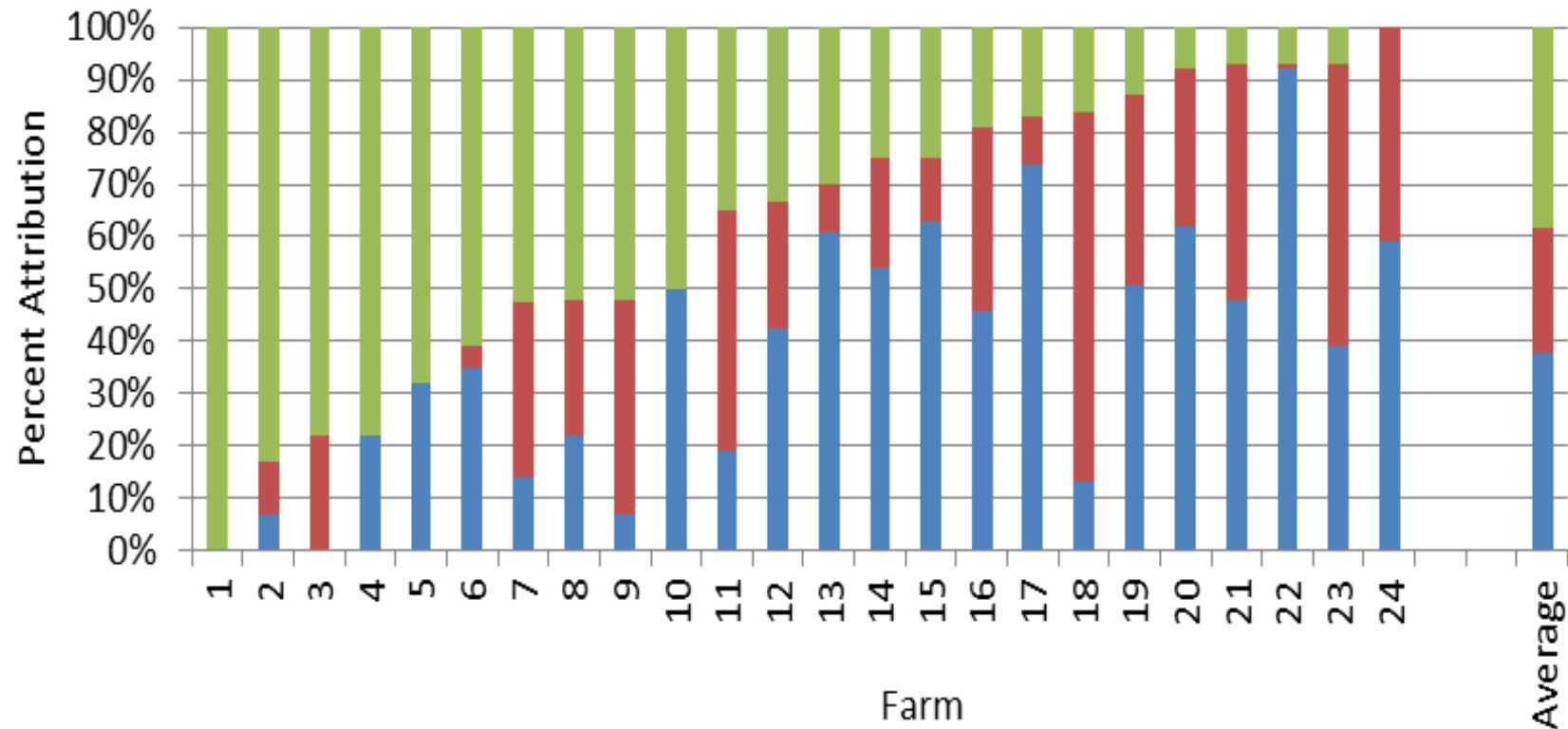


- Respiratoria



Como impacta PRRS en production?

Homan et al. Leman conference 2016



Mortalidad
parideras



Reducción
nacidos vivo



Reducción del
numero de partos
(abortos/fertilidad)

PRRS es una enfermedad costosa

- US\$664 millones anuales (Holtkamp 2013)
- Holck and Polson, 2003: US\$ 250 por cerda en brotes agudos
- Holck and Polson, 2003: US\$ 6.25–15.25 por cerdo en granjas endémicas
- Impacto económico de PRRSV es mayor en co-infecciones - SIV, *Mycoplasma hyopneumoniae* (Haden 2012)



PRRS POSITIVO, y ahora que?

¿CONTROL

O

ELIMINACION?



UNIVERSITY OF MINNESOTA

Driven to DiscoverSM

Load Close Expose (LCE) Load Close Homogenize (LCH)



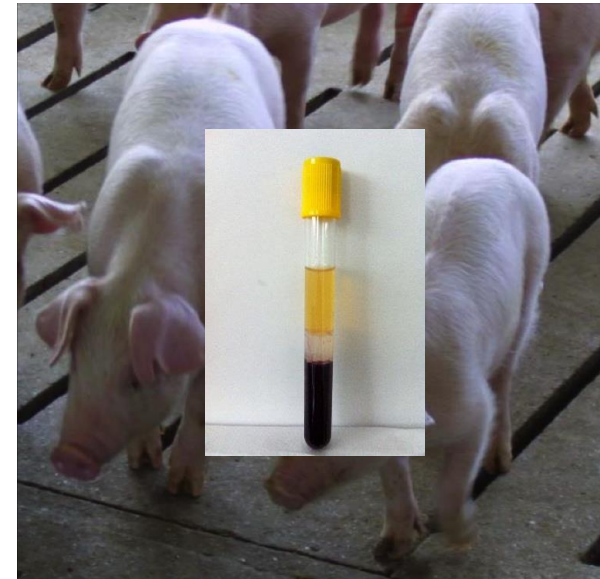
LCE - LCH

- **Time to Stability (TTS):** Tiempo a estable. Granjas PCR negativas en lechones (4 muestreos mensuales negativos)
- **Time to Baseline Production (TTBP):** Tiempo para la recuperación de la producción base (ultimas 20 semanas).

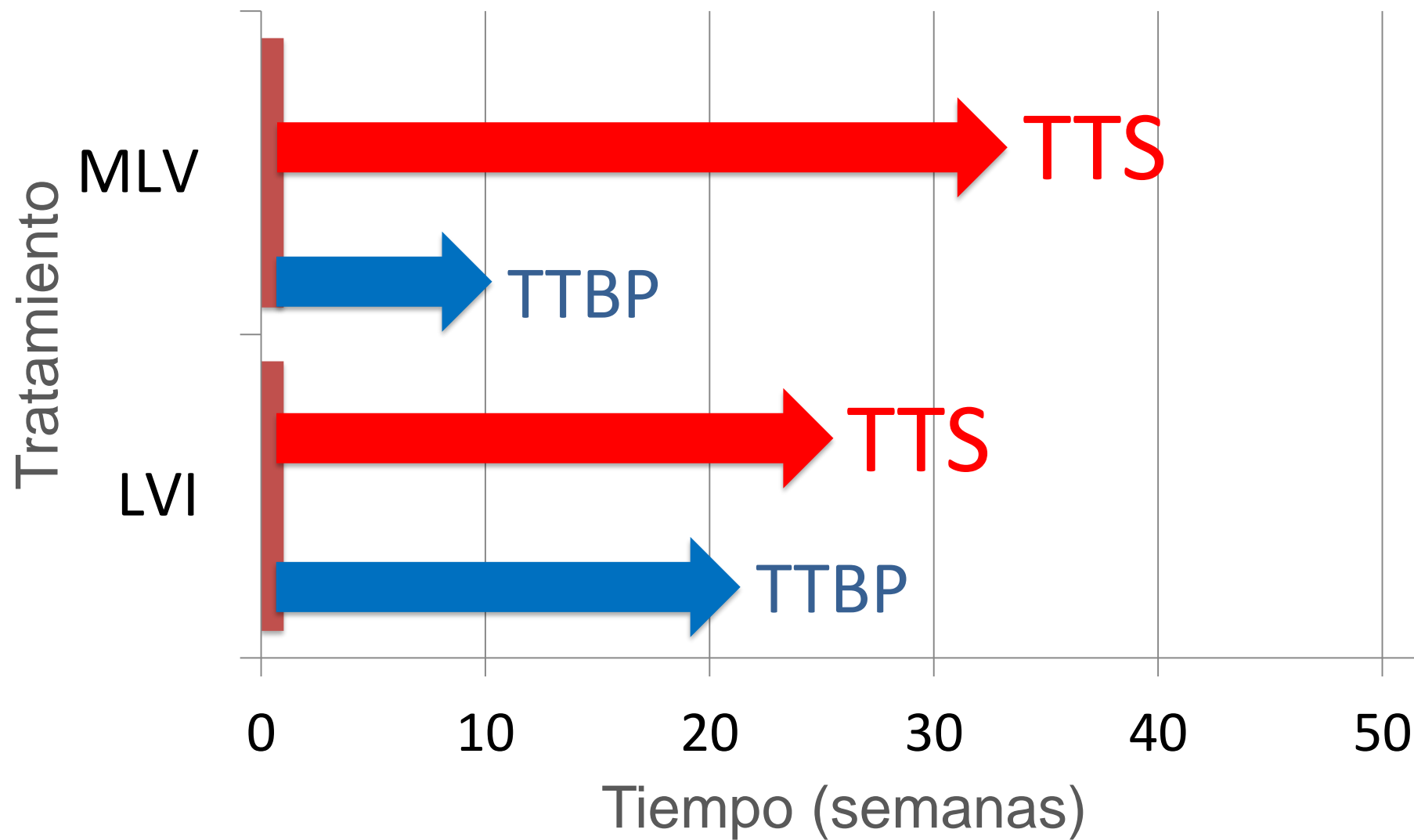
MLV



LVI



LCE - LCH



Tiempo a estabilidad (TTS)

Tiempo a línea base de
produccion (TTBP)



Programa de eliminación



UNIVERSITY OF MINNESOTA
Driven to DiscoverSM

Programa de eliminación

Estatus ?



UNIVERSITY OF MINNESOTA
Driven to DiscoverSM

Estatus

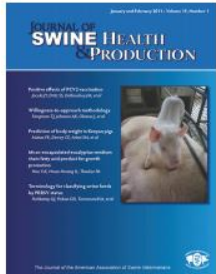


UNIVERSITY OF MINNESOTA
Driven to DiscoverSM

CLASIFICACION DE ESTATUS (AASV)

Holtkamp et al., 2011

JOURNAL OF
**SWINE HEALTH
& PRODUCTION**



This article was published in the *Journal of Swine Health and Production*. The attached copy is provided to the author for research and educational use and not for commercial purposes.

Reprinted with permission from the *Journal of Swine Health and Production*. Copyright © 2011. American Association of Swine Veterinarians.

AASV Resources online
at www.aasv.org

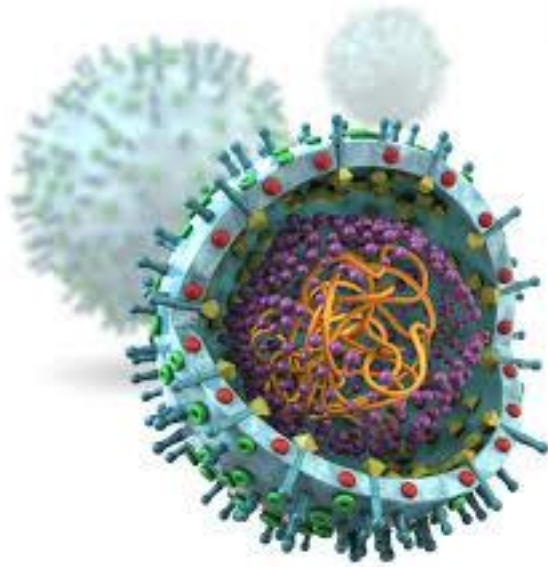
AMERICAN ASSOCIATION
OF SWINE VETERINARIANS
The Journal of the
American Association
of Swine Veterinarians

Categoría de granja		Excreción de virus	Exposición
	Positiva Inestable (I)	Positiva	Positiva
	Positiva estable (II-A)	Incierta	Positiva
	Positiva Estable (II-B) Persigue eliminación	Incierta	Positiva
	Provisional Negativa (III)	Negativa	Positiva
	Negativa (IV)	Negativa	Negativa

PCR

ELISA

Evidencia directa del virus



UNIVERSITY OF MINNESOTA
Driven to DiscoverSM

Diagnóstico, como y cuando lo aplico?

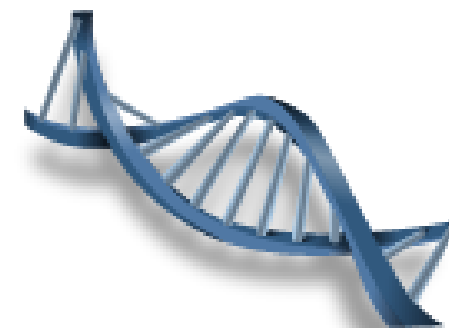
- Investigación de la enfermedad: cerdos enfermos, estatus desconocido
- Monitoreo de la enfermedad: Granjas con estatus PRRS positivo
- Vigilancia de la enfermedad: Granjas con estatus PRRS negativo



UNIVERSITY OF MINNESOTA
Driven to DiscoverSM

Diagnóstico

Disease Investigation	Disease Monitoring	Disease Surveillance
Clinical Signs	PCR	ELISA
Molecular	Sequencing	PCR
Growth	Oral	
Histology	Procedures	
Immunohistochemistry	Sequencing	
Virus isolation	ORF5	
PCR		



Que queremos en diagnóstico de PRRS ?

- Buen sistema de muestreo
 - Alta sensibilidad
 - Método fácil de colectar
 - Bajo costo
- Muestra ideal
 - Ct value
 - Secuenciar
- Secuenciación
 - Como ?
 - Que ?
- Diagnóstico de campo
 - Portable, tiempo real



DESAFIOS EN DIAGNOSTICO DE PRRS

- Muestreo y vigilancia
 - Sensibilidad de la prueba
- Secuenciación
 - Variabilidad de la cepa
- Nuevas opciones de diagnóstico
- Compartir conocimiento



UNIVERSITY OF MINNESOTA
Driven to DiscoverSM

DESAFIOS EN DIAGNOSTICO DE PRRS

- Muestreo y vigilancia
 - Sensibilidad de la piara
- Secuenciación
 - Variabilidad de la cepa
- Nuevas opciones de diagnóstico
- Compartir conocimiento



UNIVERSITY OF MINNESOTA
Driven to DiscoverSM

Estrategias de muestreo novedosas para vigilancia y diagnóstico de PRRS

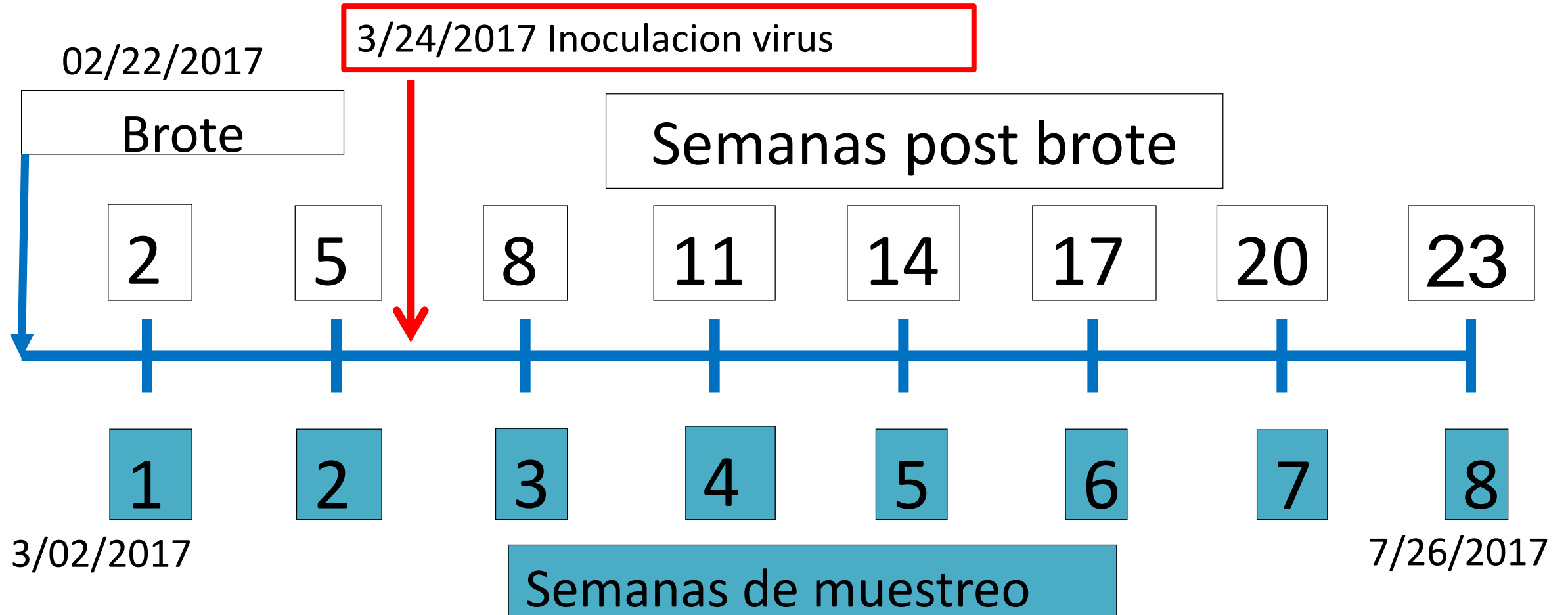


Dr. Carles Vilalta Post-Doctoral Associate,
College of Veterinary Medicine, Veterinary Population Medicine

Objetivos

- **Parte 1.** Evaluar el uso de fluidos de proceso para diagnóstico y vigilancia de PRRSV
- **Parte 2.** Evaluar el uso de muestras ambientales y de Cerda para detectar PRRSV

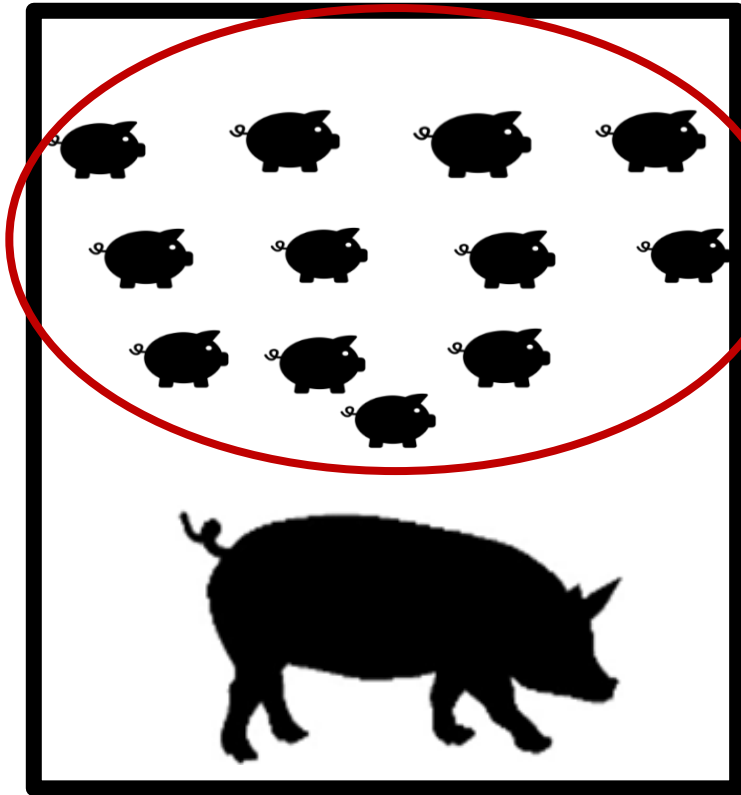
Diseño del estudio - 1



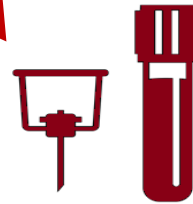
Previous outbreak: 4/8/2015; Status 3: 11/1/2017

Diseño del estudio - 1

10 camadas/semana



Fluidos de
Proceso
(por camada)

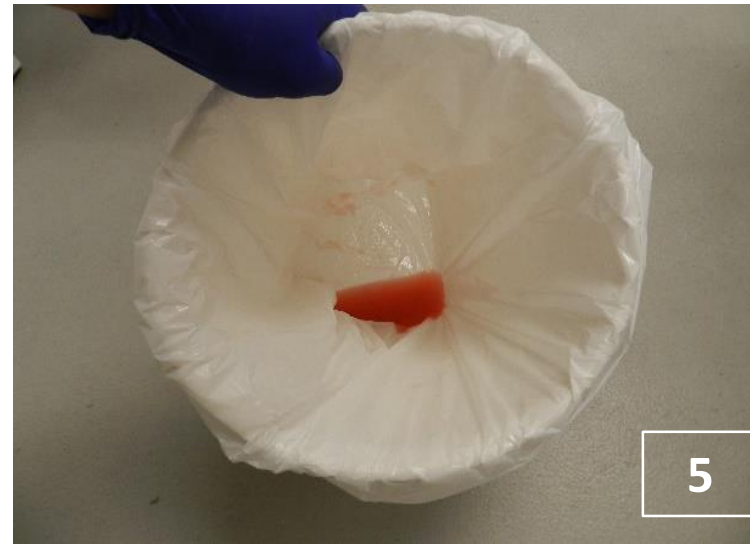


Gold Standard





Fluidos de proceso (nuts & tails) pasos de colección, Lopez et al



Sensibilidad y especificidad de los fluidos de proceso

		Estatus fluidos de proceso	
		Positivo	Negativo
Estatus camada	Positivo	20	4
	Negativo	4	49

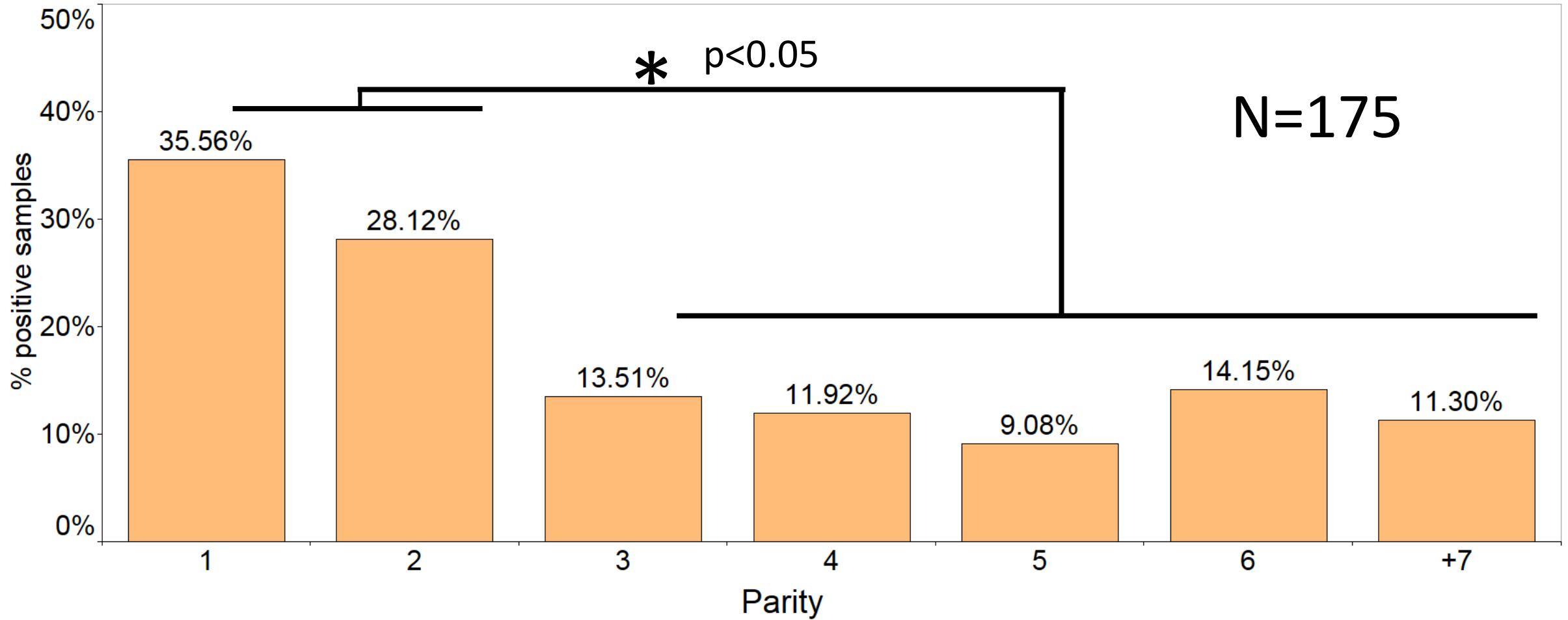
Ct cut off value: 37.5

Se: 83%
(63-95%)

Sp: 92%
(82-98%)

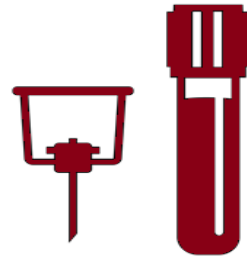
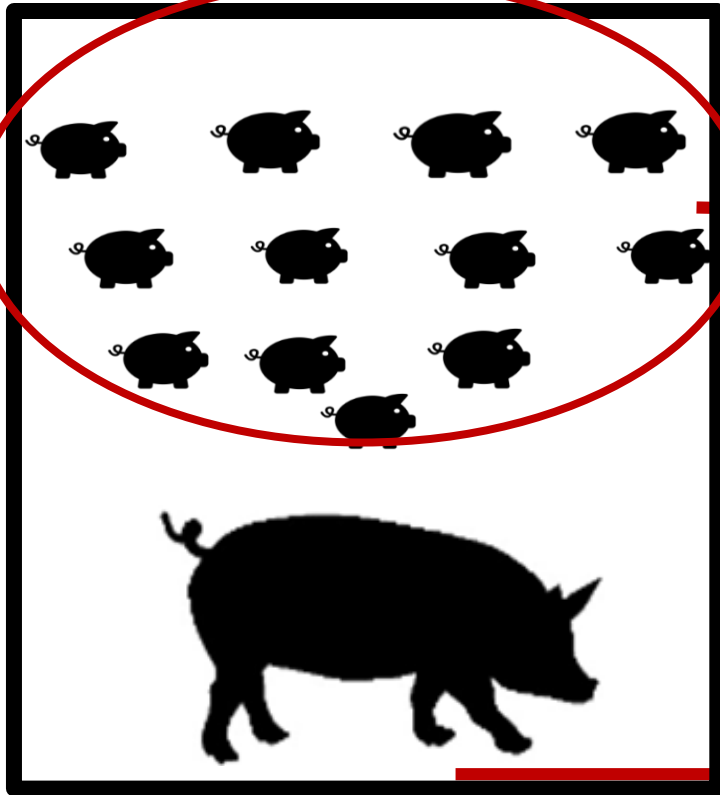
Kappa:
0.76 (0.53-0.98)
Buen agreement

Positividad de fluidos de proceso por paridad



Diseño del estudio - 2

10 camadas / semana



Gold Standard

Sangre de todos los cerdos / camada

Superficies



Deposición
de partículas
ambientales

Ubre



Comparación muestras ambientales y de cerda

	Kappa (95%CI)	Se (95%CI)	Sp (95%CI)	Secuenciación
Fluidos Procesado	0.76 (0.53-0.98)	83% (63-95%)	92% (82-98%)	Si
	Bueno			
Superficie	0.47 (0.25-0.68)	50% (29-71%)	92% (89-98%)	Si
	Moderado			
Ubre	0.47 (0.22-0.66)	42% (22-63%)	98% (90-100%)	Si
	Moderado			

Detección de PRRSV en bajas prevalencias en cerdos al destete usando fluidos orales familiares



IOWA STATE UNIVERSITY
College of Veterinary Medicine

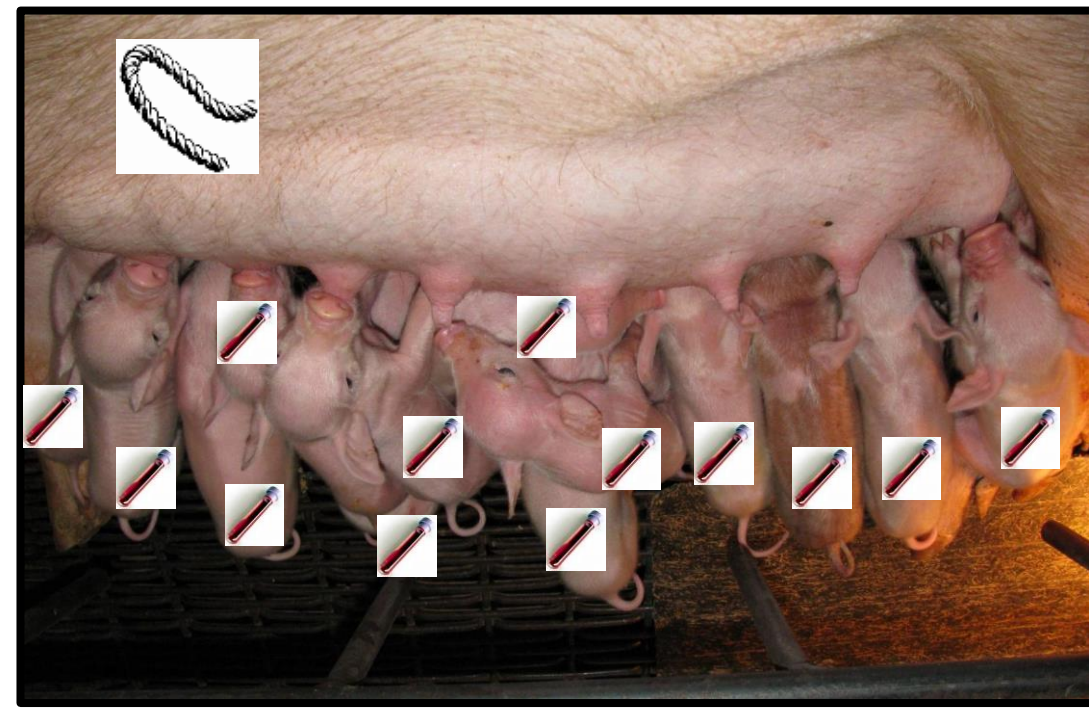
Dr. Marcelo Almeida Graduate student
Iowa State University

Family Oral Fluids > Litter Oral Fluids

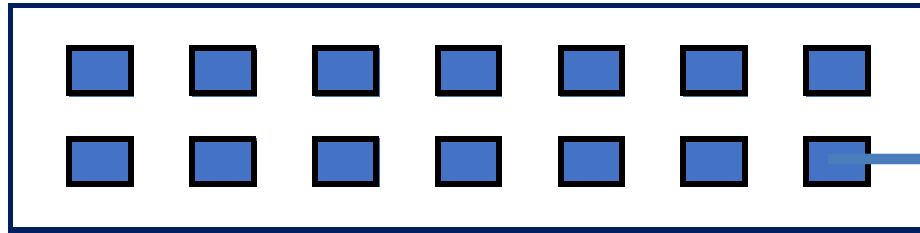


Diseño del estudio - 1

- Comparación y detección de PRRSV en FOF vs suero
 - 72 camadas pareadas
 - 7 salas
 - Test para PRRSV por rRT-PCR

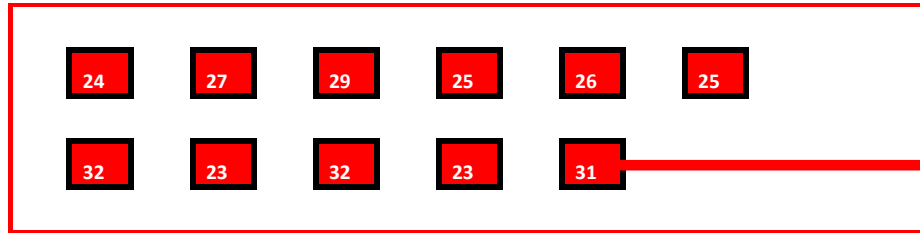


Resultados



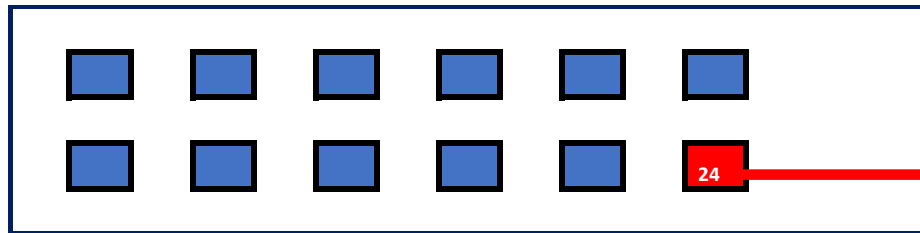
Contorno azul= Fluido oral familiar PRRSV Negativo

Relleno azul= Suero de lechon PRRSV Negativo



Contorno rojo= Fluido oral familiar PRRSV Positivo

Relleno rojo= Suero de lechon PRRSV Positivo



Contorno azul= Fluido oral familiar PRRSV Negativo

Relleno rojo= Suero de lechon PRRSV Positivo

Comparación y detección de PRRSV en FOF vs suero

SALA A

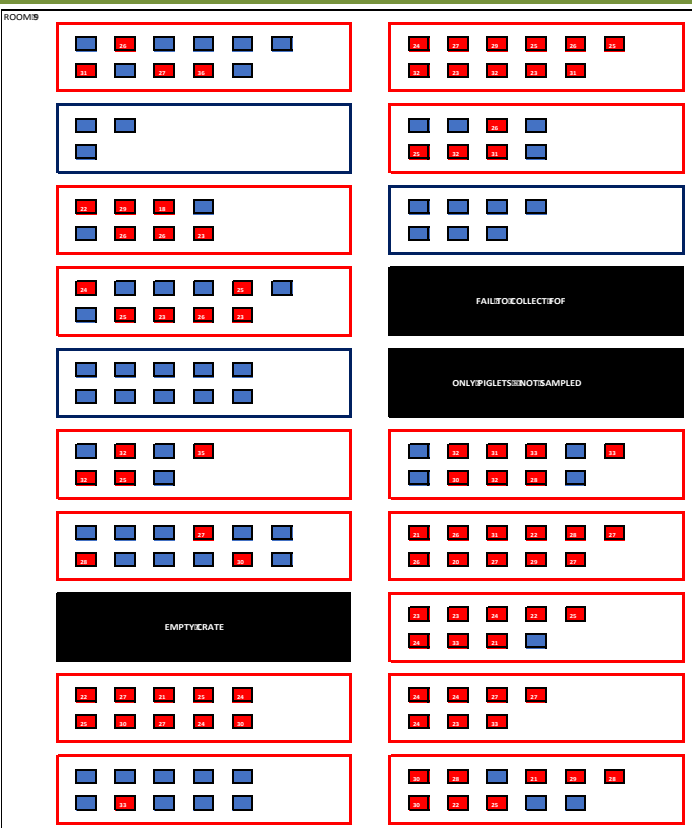
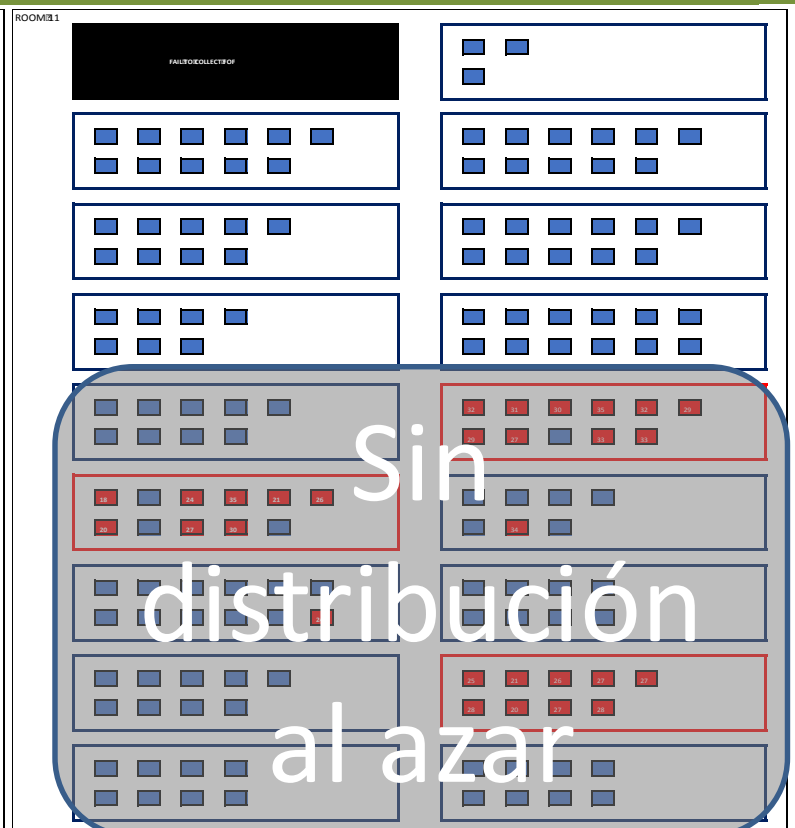
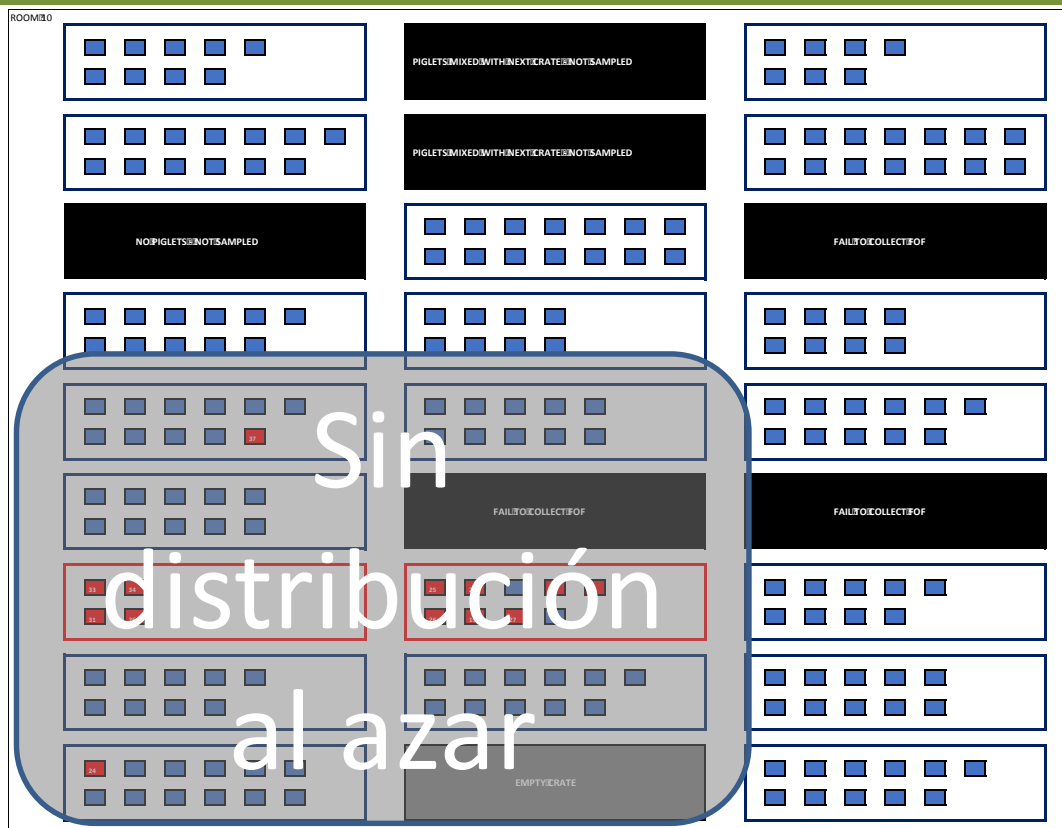
Prevalencia lechón= 6.5%
Prevalencia camada= 20.0%
Camadas positivas FOF = 10.0%

SALA B

Prev lechón: 19.0%
Prev camada: 29.4%
FOF +: 17.6%

SALA C

Prev lechón: 57.3%
Prev camada: 82.4%
FOF +: 82.4%



Comparación y detección de PRRSV en FOF vs suero

- La especificidad parece estar cerca al 100%
- La sensibilidad depende de la prevalencia: ~ 87.5% a nivel de camada
- Camadas de paridad 1 - OR 5.5 PRRSV+
- Todas las camadas ≥ 3 lechones viremicos fueron + FOF PCR

DESAFIOS EN DIAGNOSTICO DE PRRS

- Muestreo y vigilancia
 - Sensibilidad de la prueba
- Secuenciación
 - Variabilidad de la cepa
- Nuevas opciones de diagnóstico
- Compartir conocimiento



UNIVERSITY OF MINNESOTA
Driven to DiscoverSM

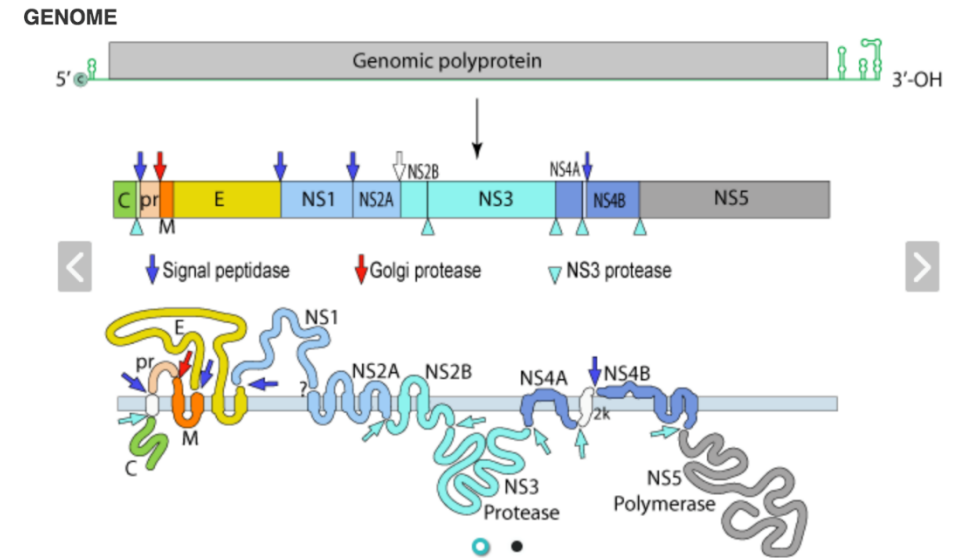
Secuenciación masiva y metagenómica



Dr. Douglas Marthaler Veterinary Diagnostic Laboratory
Kansas State University

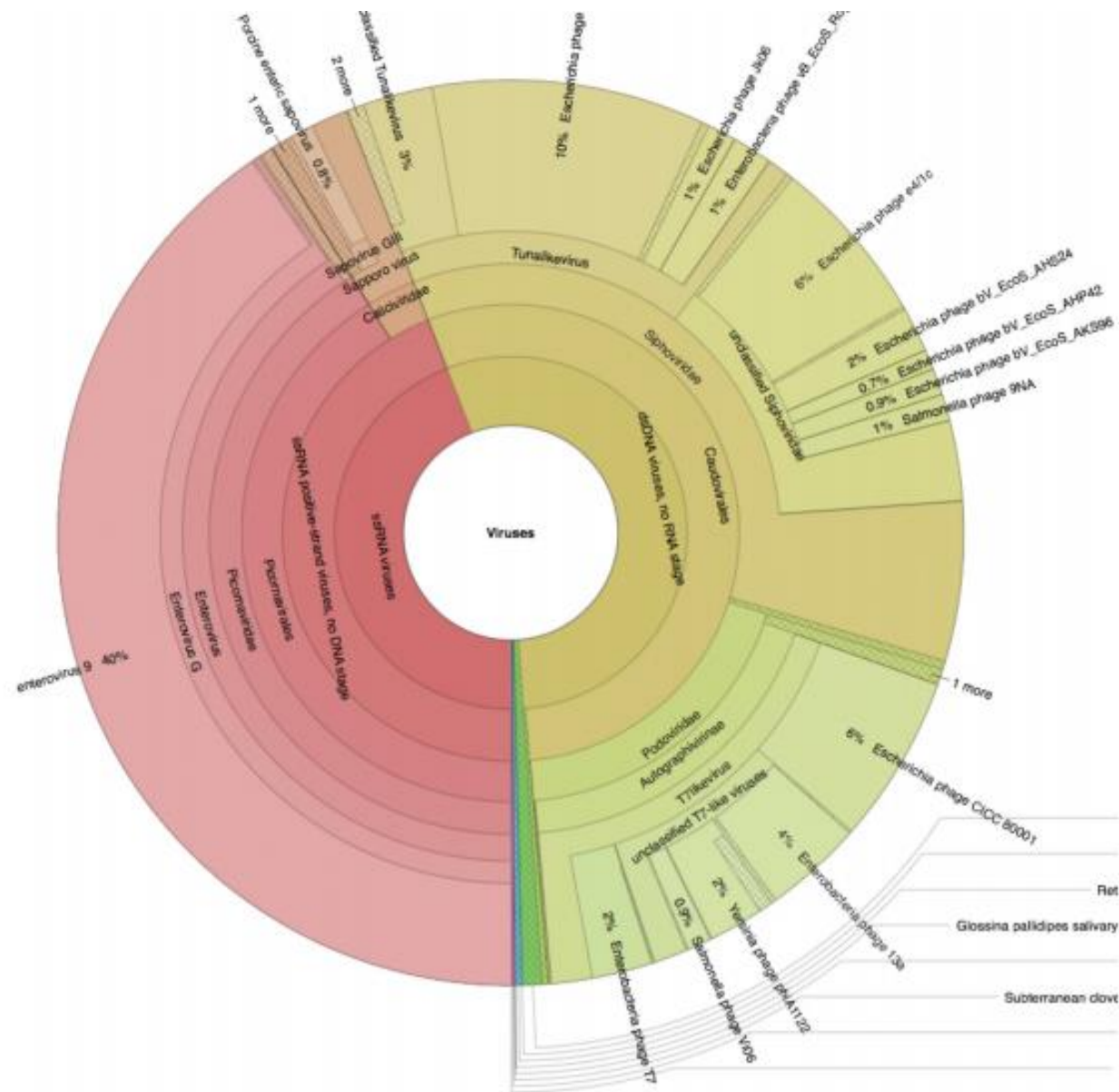
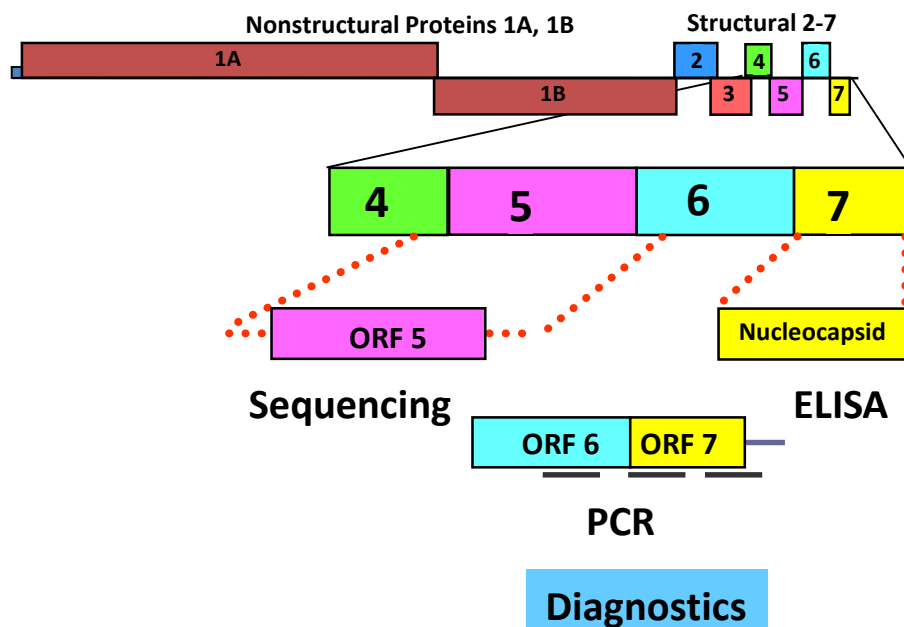
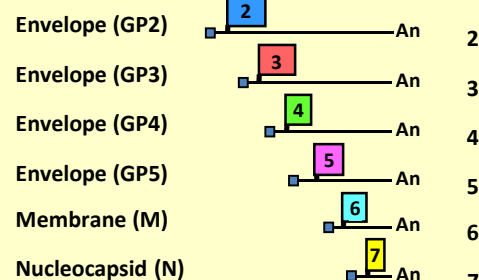
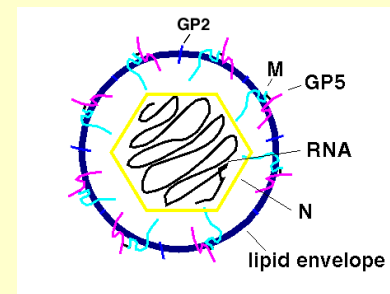
Por que secuenciar?

- Provee información mas precisa para diferenciar cepas de PRRSV
- Identifica el virus, determina el origen del brote e identifica si hay mas de una cepa circulando
- Secuenciación demuestra variabilidad genética a lo largo del virus



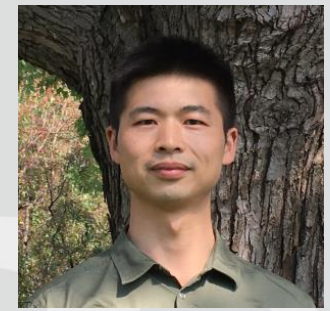
The diagram illustrates the structure and genome organization of the Marburg virus. The top part shows the genome map with segments 1A, 1B, 2, 3, 4, 5, 6, and 7. The bottom part shows a cross-section of the virus particle with labels for GP2, GP5, M, RNA, N, and lipid envelope. To the right, a table lists the proteins encoded by each segment: Envelope (GP2), Envelope (GP3), Envelope (GP4), Envelope (GP5), Membrane (M), and Nucleocapsid (N).

Segment	Protein	Approx. Size (kb)
1A	GP1 (large)	~8.5
1B	GP1 (small)	~3.5
2	Envelope (GP2)	~1.5
3	Envelope (GP3)	~1.0
4	Envelope (GP4)	~1.0
5	Envelope (GP5)	~1.0
6	Membrane (M)	~1.0
7	Nucleocapsid (N)	~0.5



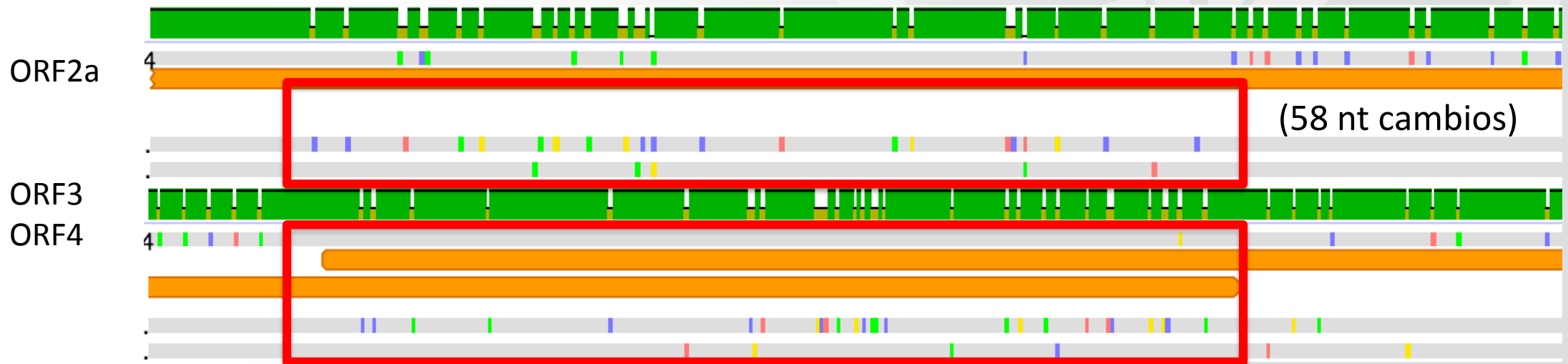
PRRS Investigations: Caso clínico de campo

PRRS strains mezclados en una granja



Fangzhou Chen, PhD

- Caso en Minnesota
 - ORF5 = 100% de identidad genética
 - Dos regiones variables (ORF2a, ORF3, ORF4)



DESAFIOS EN DIAGNOSTICO DE PRRS

- Muestreo y vigilancia
 - Sensibilidad de la piara
- Secuenciación
 - Variabilidad de la cepa
- Nuevas opciones de diagnóstico
- Compartir conocimiento



UNIVERSITY OF MINNESOTA
Driven to DiscoverSM

Tecnología Nanopore para secuenciación y diagnóstico

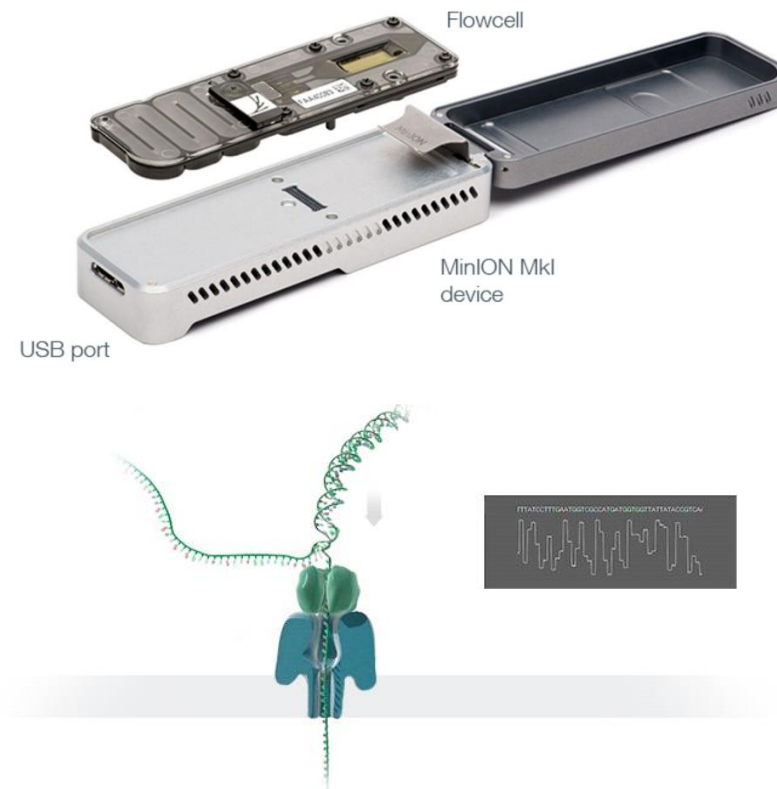


Dr. Shaoyuan Tan Graduate student
University of Minnesota

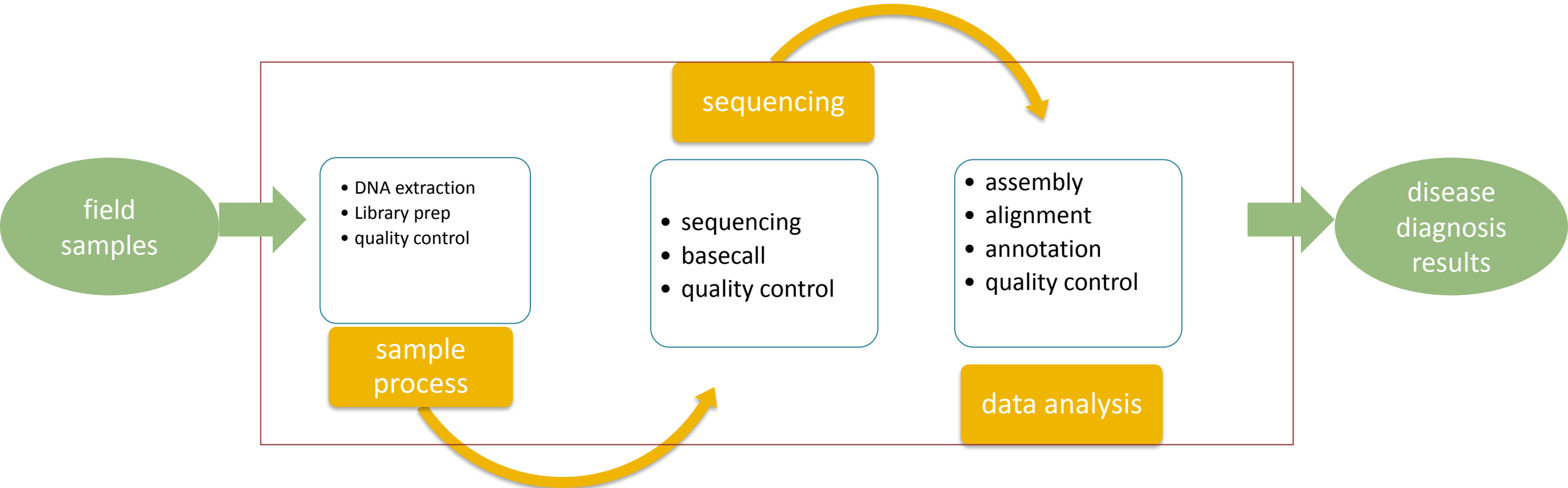
MinION (Oxford Nanopore Technologies)

El MinION es un equipo de PCR tiempo-real portable que puede leer largas secuencias

Su tecnología es desarrollada alrededor de la proteína “nanopore” que detecta ácidos nucleicos incluyendo DNA and RNA.

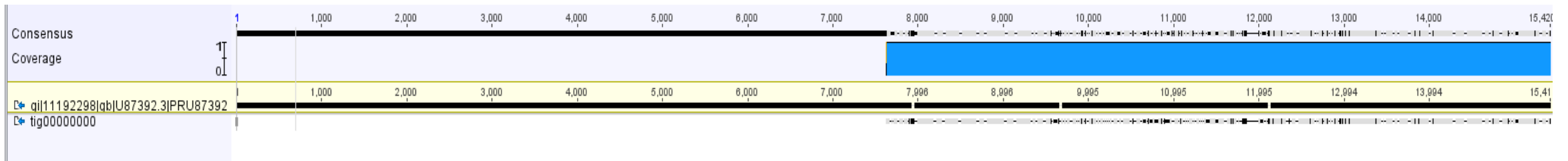
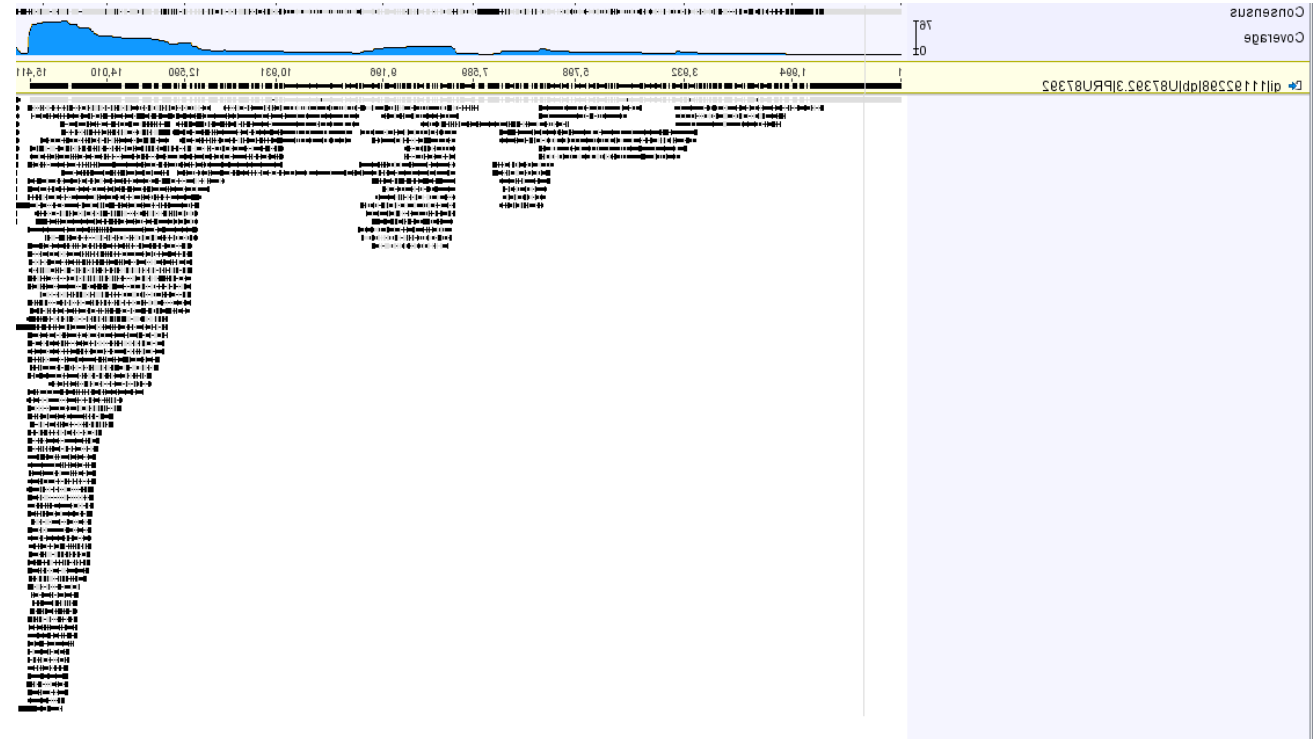


Flujo de diagnóstico (muestra)



Desarrollo MinION PRRSV

- ❖ Genoma complete PRRSV: 15,411 bp
- ❖ Total reads: 7446 - 9405 bp
- ❖ Exactitud: 92%
- ❖ Identidad de alineamineto: 94.2%





- Conforme continúe y mejore la calidad de secuenciación, se anticipa que MinION será un equipo de gran ayuda para el diagnóstico de enfermedades en el futuro

DESAFIOS EN DIAGNOSTICO DE PRRS

- Muestreo y vigilancia
 - Sensibilidad de la prueba
- Secuenciación
 - Variabilidad de la cepa
- Nuevas opciones de diagnóstico
- Compartir conocimiento



UNIVERSITY OF MINNESOTA
Driven to DiscoverSM

Dr. Morrison's Swine Health Monitoring Project (MSHMP)

USDA

SHC
Swine Health Information Center

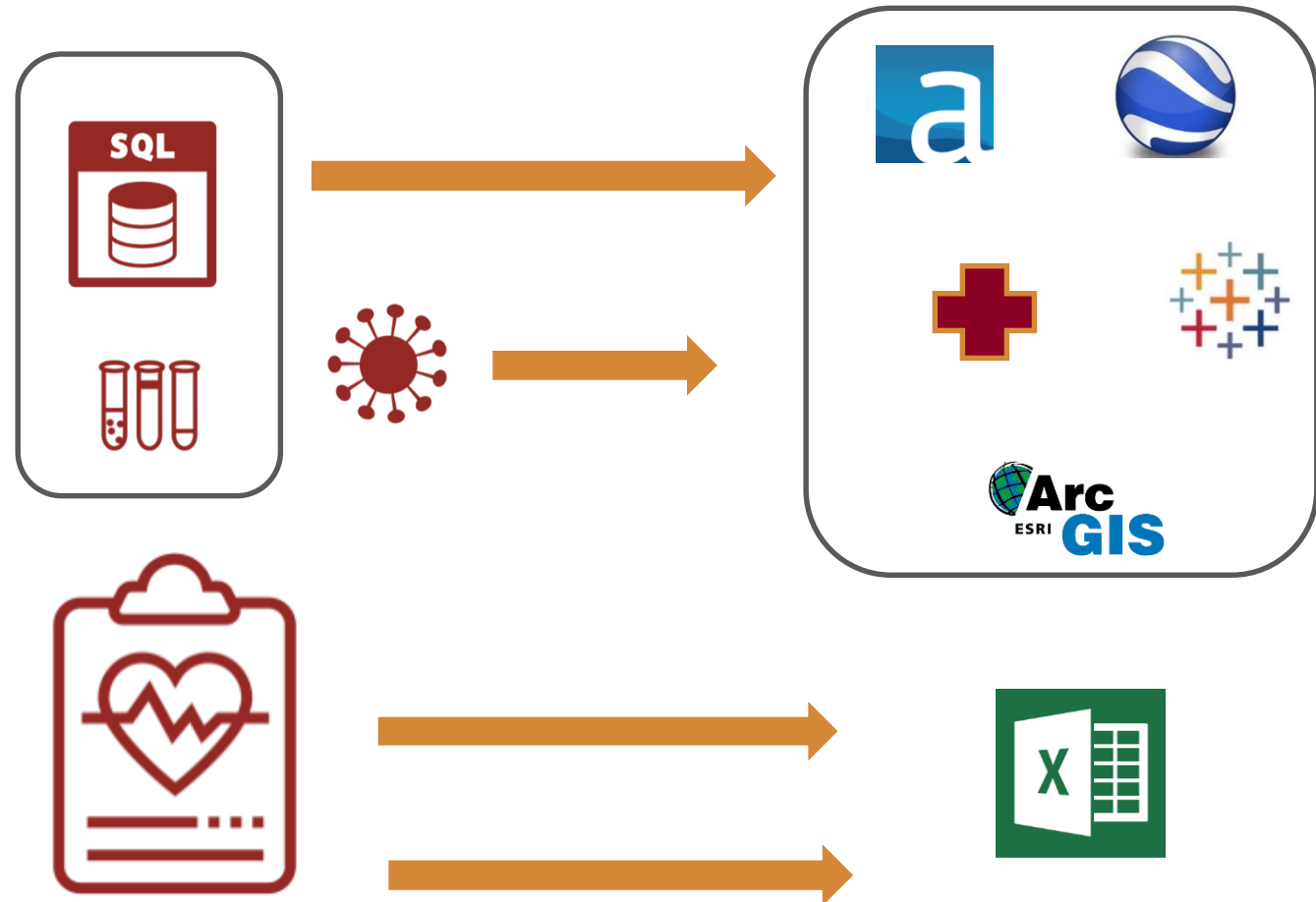
pork
checkoff

Dr. Bob Morrison's Swine Health Monitoring Project
SHMP@umn.edu
8/18/2017

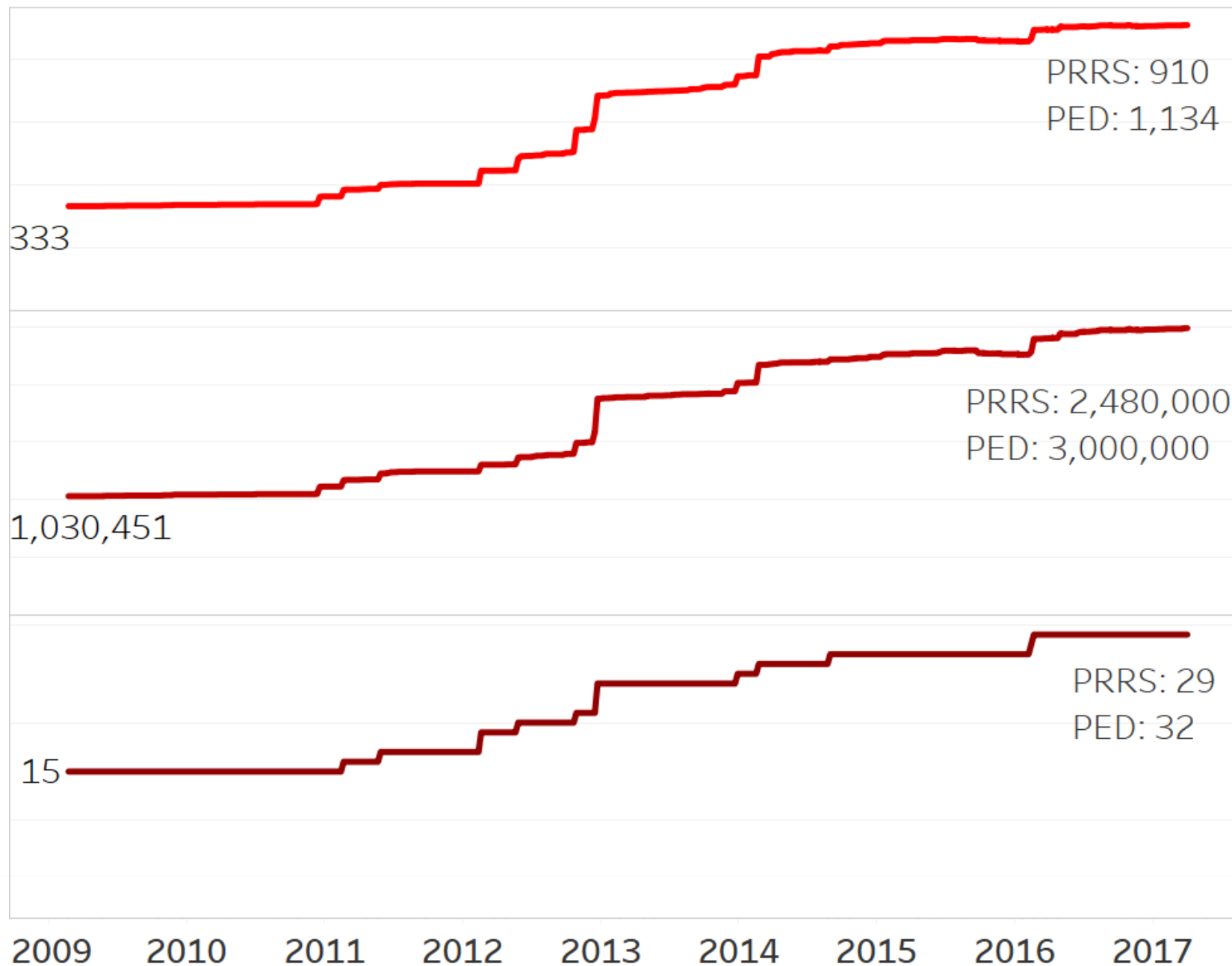
These producers are willing to share their premises IDs and pathogen status in the interests of national disease control.



Regional Projects:
N212 MN, PA, SE IA, and Lyon Co



GRANJAS

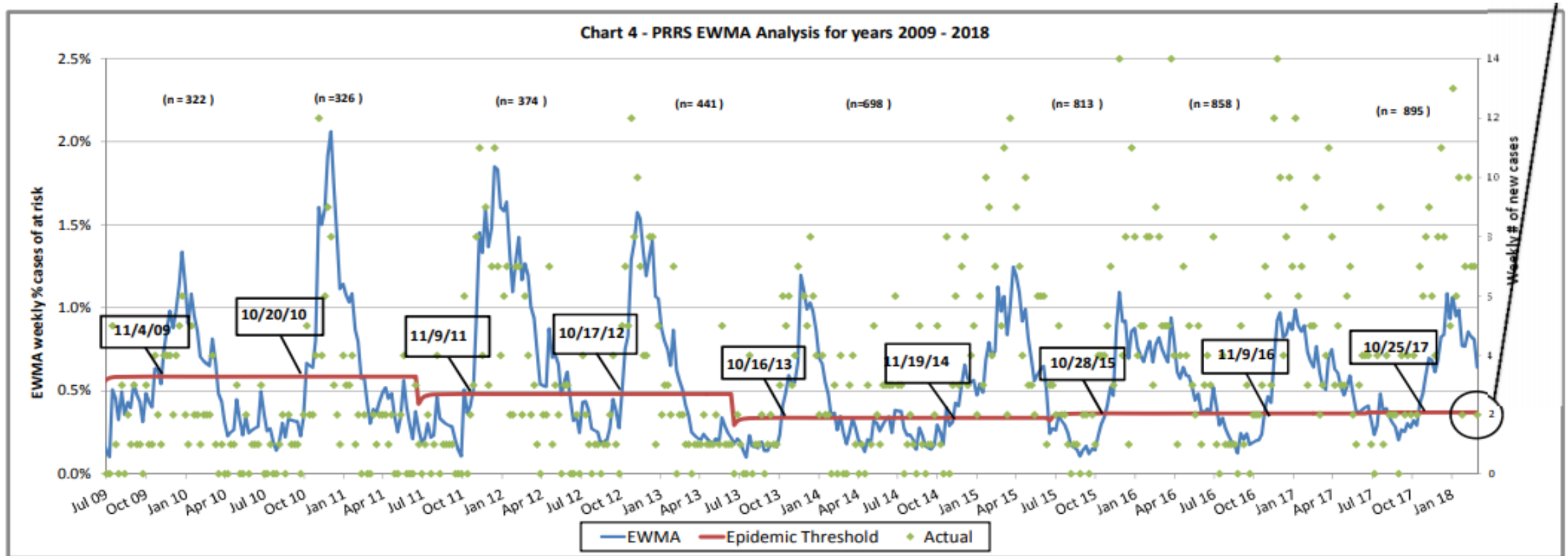


CERDAS

SISTEMAS

Estacionalidad PRRS

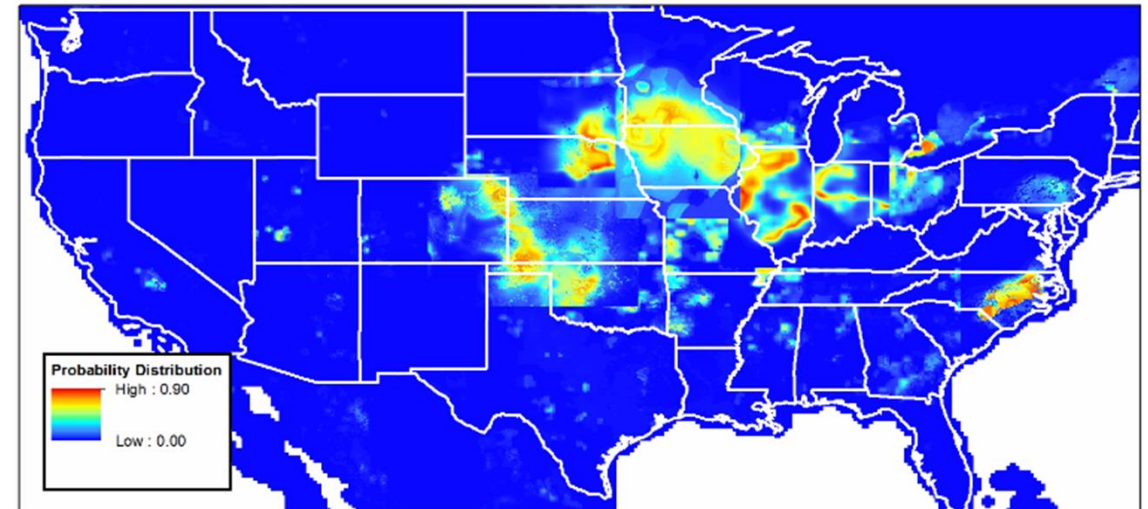
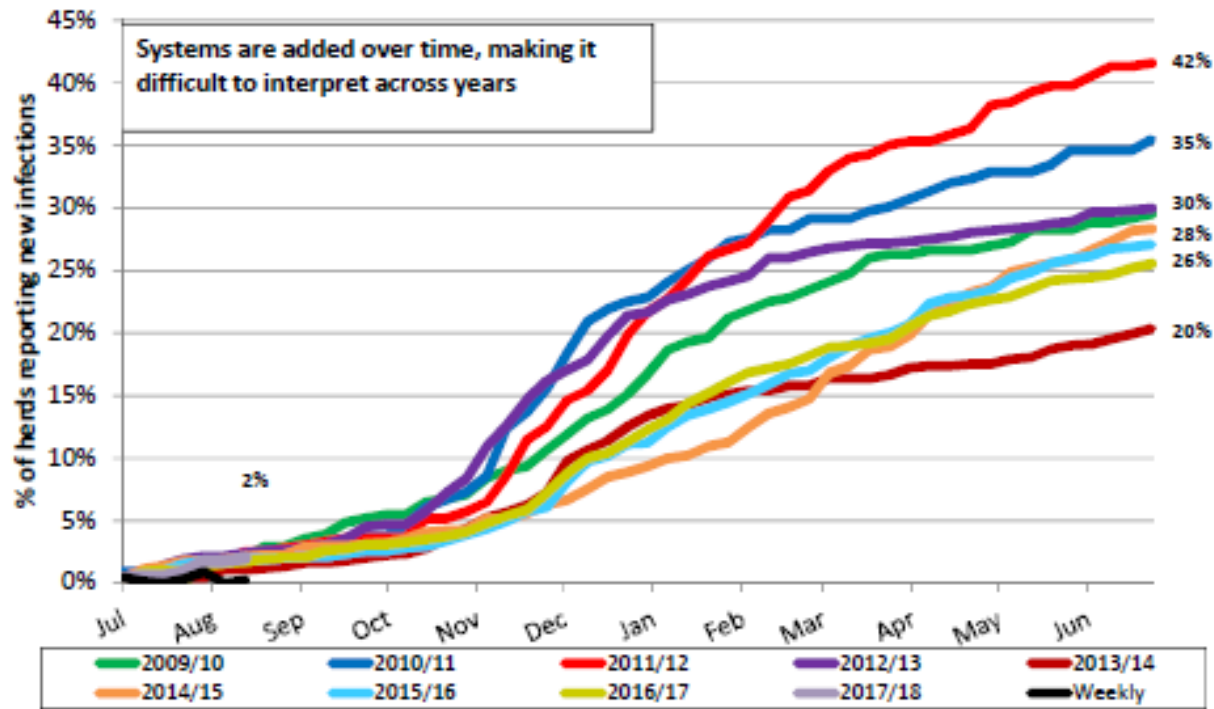
Tousignant et al., 2012



UNIVERSITY OF MINNESOTA
Driven to DiscoverSM

Epidemiología del PRRS

Chart 1 - PRRS cumulative Incidence / weekly and cumulative
Beginning July 1 for years 2009-2018



Alkhamis et al., 2017



UNIVERSITY OF MINNESOTA
Driven to DiscoverSM

DESAFIOS EN DIAGNOSTICO DE PRRS EN ECUADOR

- Hacer diagnóstico y definir estatus
 - Nuestros cerdos
 - Importaciones / reemplazo
- Serología no es suficiente
- Diagnóstico molecular
 - Necesaria
- Compartir conocimiento



UNIVERSITY OF MINNESOTA
Driven to DiscoverSM

CONCLUSIONES

- PRRS es una enfermedad costosa que debe ser controlada / eliminada
- Los fluidos de proceso son efectivos en el diagnóstico y vigilancia de PRRS
- Muestras ambientales y fluidos orales familiares son una alternativa pese a tener menor sensibilidad
- La secuenciación es importante en PRRS
- Hay nuevas opciones para diagnóstico
- La colaboración como gremio es necesaria



Acknowledgements



Montserrat Torremorel

Shaoyuan Tan

Carles Vilalta

Cesar Corzo

Will Lopez

Marcelo Almeida

Albert Rovira

Fabio Vanucci

Michael Murtaugh

Gracias

garri098@umn.edu



UNIVERSITY OF MINNESOTA

College of Veterinary Medicine

Driven to DiscoverSM



UNIVERSITY OF MINNESOTA

Driven to DiscoverSM