

JORNADA PRRS TÉCNICA AVPA



Secuenciación a la práctica

Equipo GSP Lleida

Zaragoza, 11 de diciembre de 2024



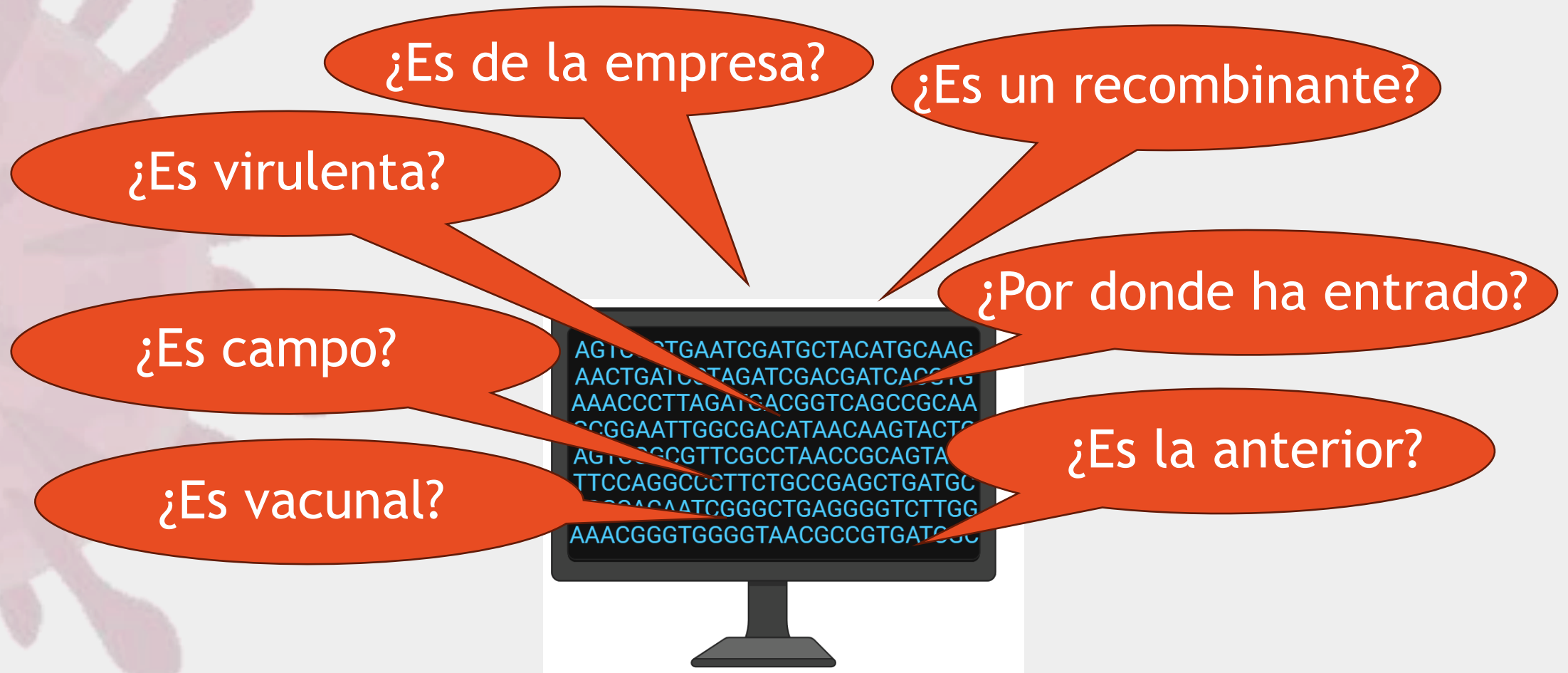
Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



MESA REDONDA: *Uso de la secuenciación como herramienta de control epidemiológico y bioseguridad colectiva.*



Preguntas que le hacemos a la secuenciación



Preguntas que le hacemos a la secuenciación



```
AGTCCCTGAATCGATGCTACATGCAAG  
AACTGATCCTAGATCGACGATCACGTG  
AAACCCTTAGATGACGGTCAGCCGCAA  
GCGGAATTGGCGACATAACAAGTACTG  
AGTCGGCGTTCGCCTAACCGCAGTATT  
TTCCAGGCCCTTCTGCCGAGCTGATGC  
AGCCACAATCGGGCTGAGGGGTCTTGG  
AAACGGGTGGGGTAACGCCGTGATCGC
```

Abordaje multifactorial en la interpretación



Fuente: chat gpt

Abordaje multifactorial en la interpretación

Resultados RT PCR PRRS – Lenguas NM por lote de parto

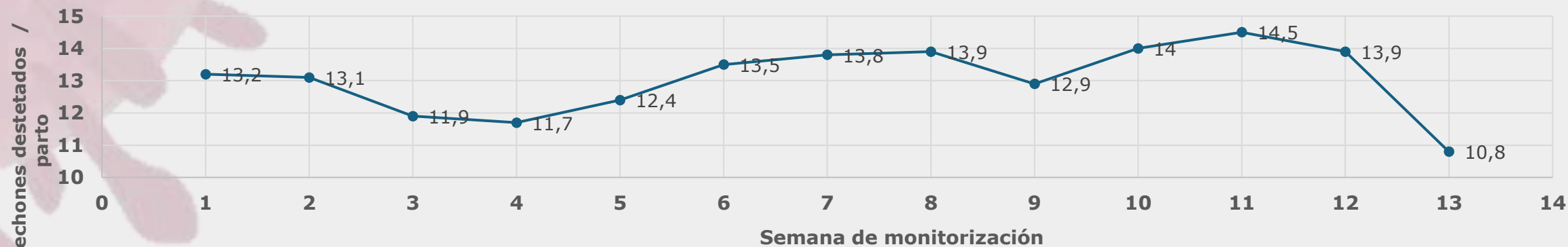


Abordaje multifactorial en la interpretación

Abortos



Lechones destetados



Abordaje multifactorial en la interpretación

Secuencia ORF5 de PCR de 28/11/2024

Similitud >97% a granjas de la misma empresa:

No constatadas.

Similitud >98% a otras granjas:

% de similitud	Zona	Fecha
99,67	Albalatillo	29/11/2023
98,84	Albalatillo	06/04/2023
98,68	Alcampell	07/11/2022

% Similitud ORF5 con histórico de la granja	15/03/2023	08/05/2023	13/07/2023	11/01/2024	28/11/2024
15/03/2023		99,7	99,7	98,2	96,5
08/05/2023	99,7		99,5	98,2	96,4
13/07/2023	99,7	99,5		98,0	96,4
11/01/2024	98,2	98,2	98,0		94,9
28/11/2024	96,5	96,4	96,4	94,9	

Abordaje multifactorial en la interpretación

Resultados RT PCR PRRS – Lenguas NM por lote de parto



Abortos



Lechones destetados



```
AGTCCCTGAATCGATGCTACATGCAAG
AACTGATCCTAGATCGACGATCACGTG
AAACCCTTAGATGACGGTCAGCCGCAA
GCGGAATTGGCGACATAACAAGTACTG
AGTCGGCGTTTCGCCTAACCGCAGTATT
TTCCAGGCCCTTCTGCCGAGCTGATGC
AGCCACAATCGGGCTGAGGGGTCTTGG
AAACGGGTGGGGTAACGCCGTGATCGC
```

Secuencia ORF5 de PCR de 28/11/2024

Similitud >97% a granjas de la misma empresa:

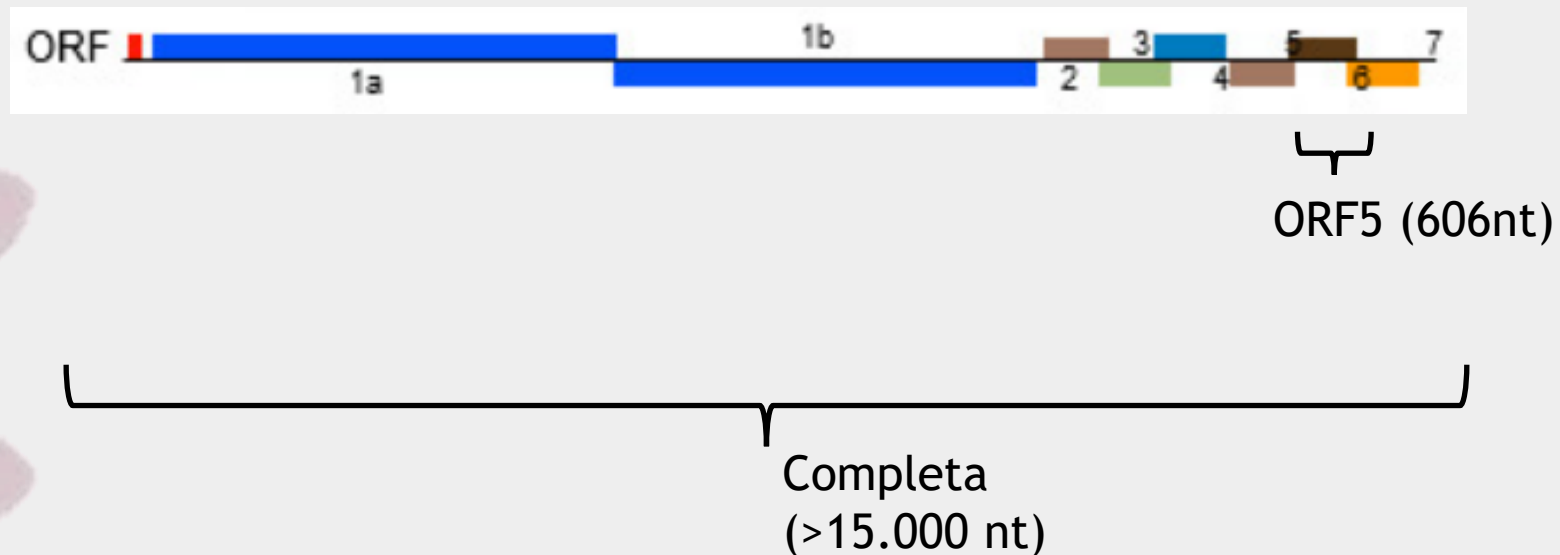
No constatadas.

Similitud >98% a otras granjas:

% de similitud	Zona	Fecha
99,67	Albalatillo	29/11/2023
98,84	Albalatillo	06/04/2023
98,68	Alcampell	07/11/2022

% Similitud ORF5 con histórico de la granja	15/03/2023	08/05/2023	13/07/2023	11/01/2024	28/11/2024
15/03/2023		99,7	99,7	98,2	96,5
08/05/2023	99,7		99,5	98,2	96,4
13/07/2023	99,7	99,5		98,0	96,4
11/01/2024	98,2	98,2	98,0		94,9
28/11/2024	96,5	96,4	96,4	94,9	

Secuenciación ORF5 vs Completa



Secuenciación ORF5 vs Completa

Sanger - ORF5

Menos tiempo promedio
desde muestreo hasta
obtención de la secuencia

Más económica

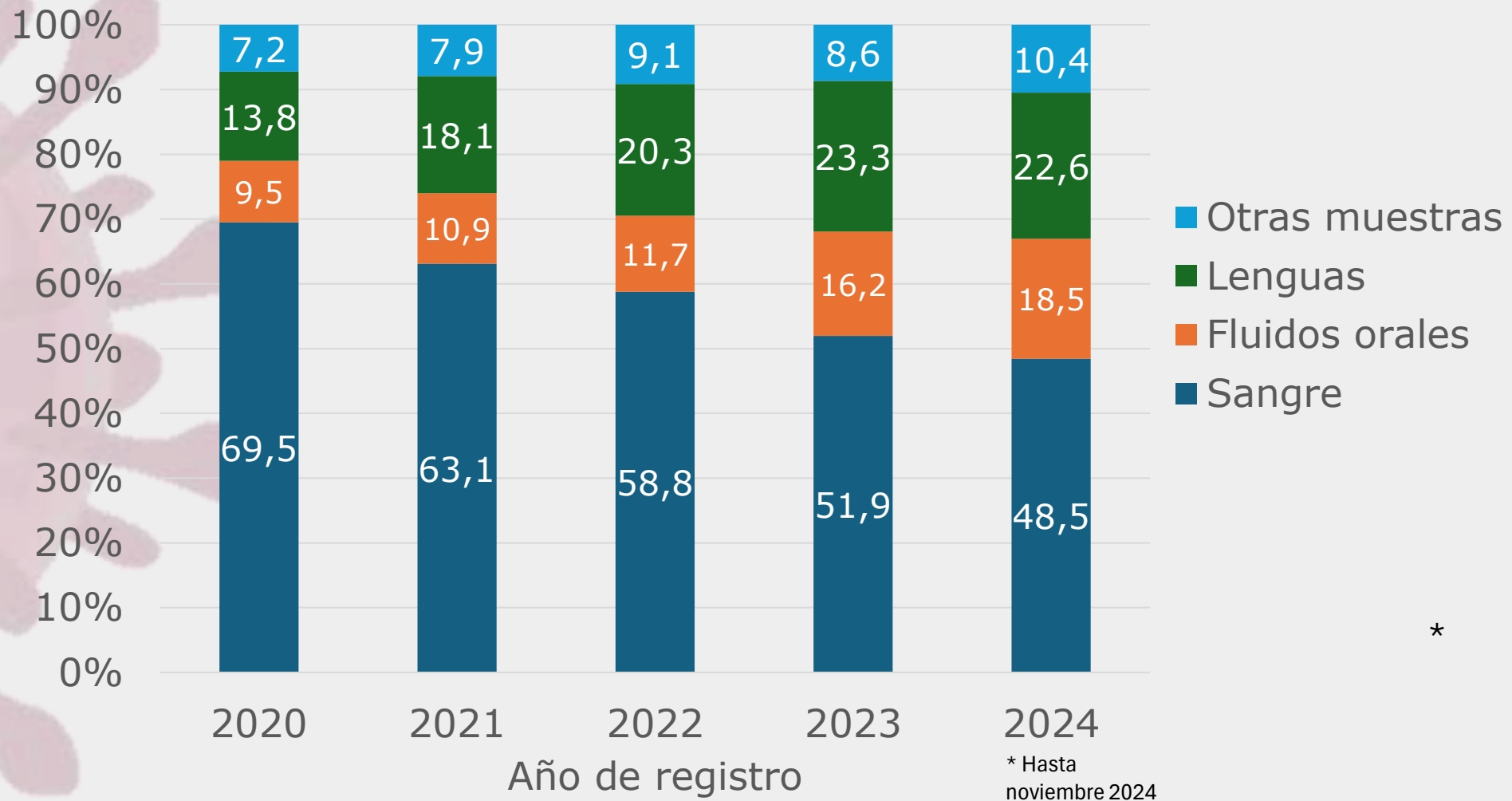
Más fácil de realizar e
interpretar para muestras
distintas a sueros y cT altos

Completa

Más información

Indispensable para
detectar recombinantes

% de registros con PCR PRRS según el tipo de muestra enviado al GSP



Presencia de distintas cepas/variantes en una granja durante un periodo de tiempo

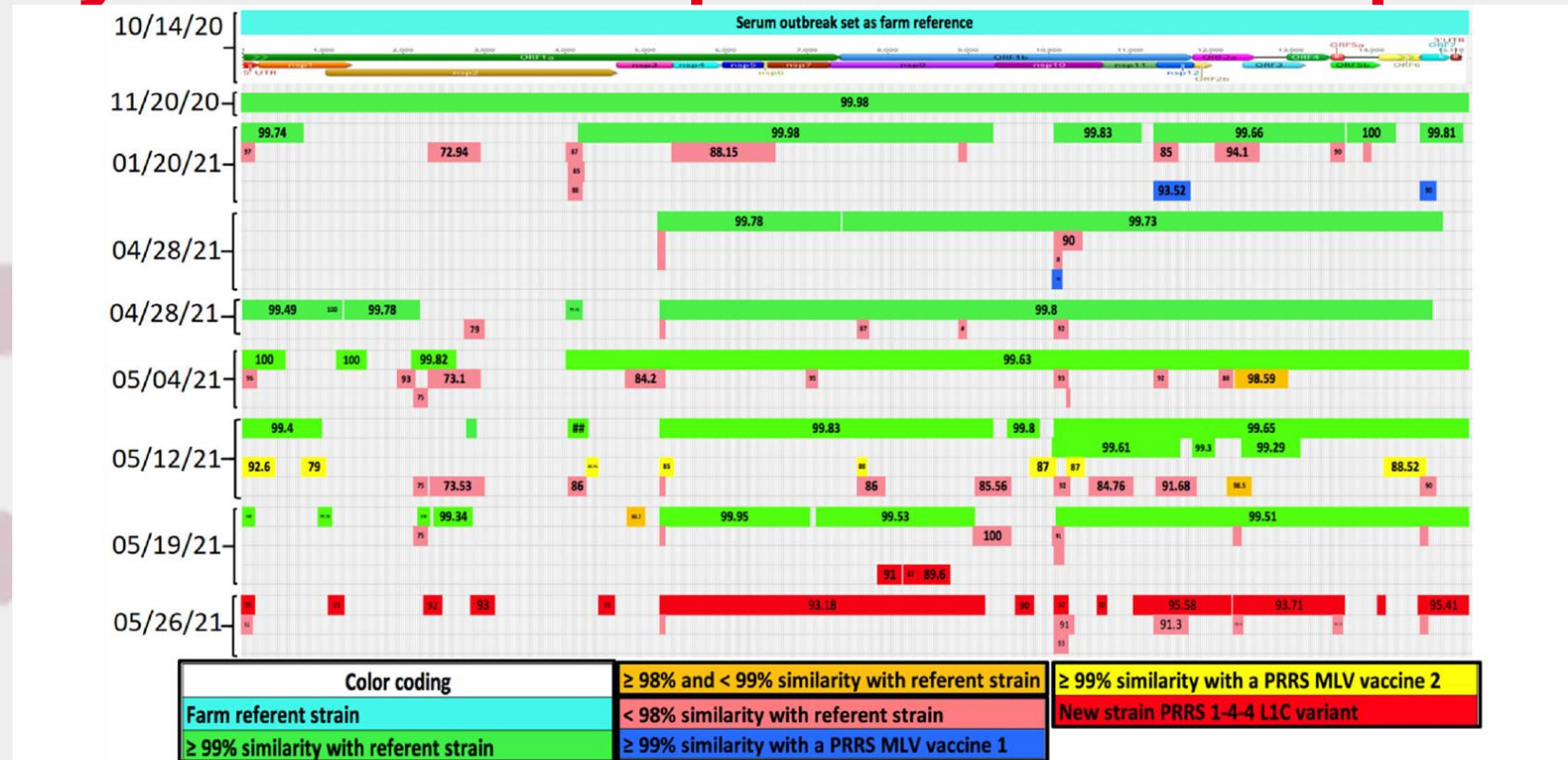
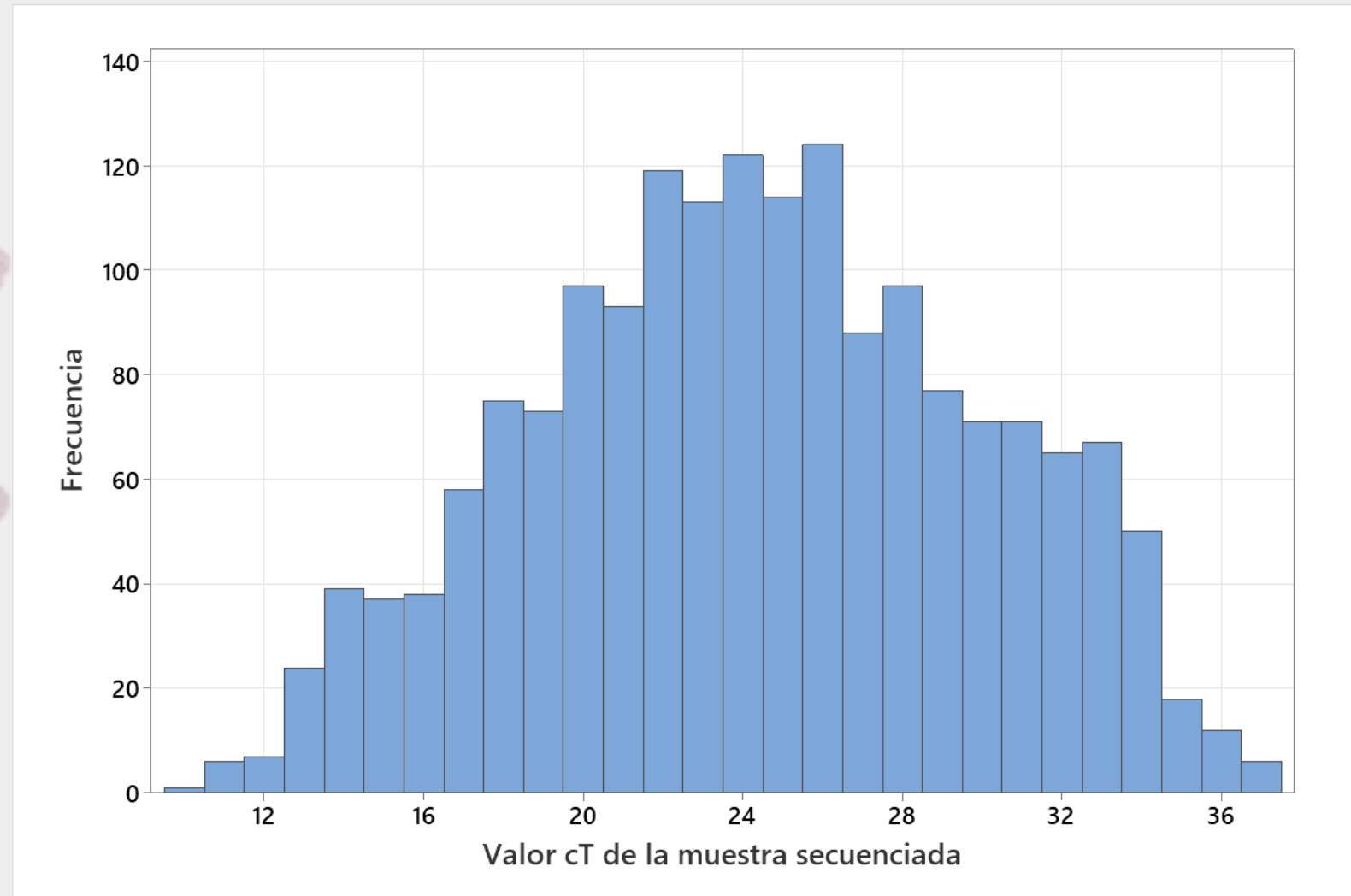


FIGURE 7 Comparison between a farm-specific wild-type PRRSV strain and genome fragments, that is, contigs, recovered from processing fluid samples characterizing the presence of at least five PRRSV strains. The structure at the top of the chart represents the farm referent strain position of open reading frames (ORFs) and non-structural proteins (nsp). The percentage of nucleotide identity between contig and farm referent strain is labelled at the center of each contig. Colours represent the level of similarity with farm referent strain or with a commercially available PRRSV MLV vaccine. Contigs in green: >99%; in orange: ≥98 and <99%; in light red: <99% similarity with farm referent strain; in blue: >99% similarity Foster; in yellow: >99% similarity with Ingelvac MLV; and in dark red: new PRRSV introduction

Fuente: Trevisan et al. (2022)

% de registros con PCR PRRS según el tipo de muestra enviado al GSP



Secuenciación completa según el tipo de muestra y valor cT

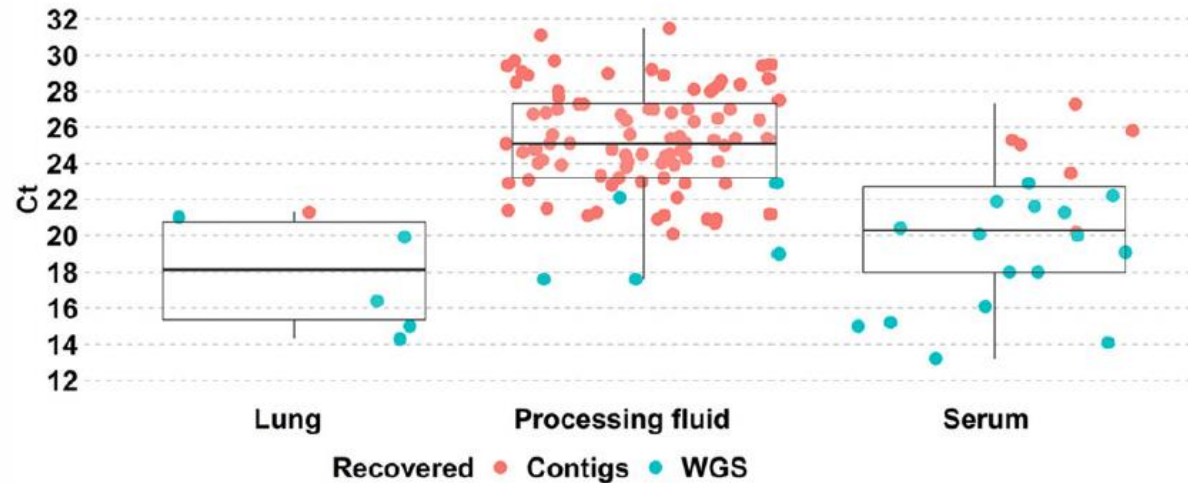


FIGURE 2 Success of recovering whole-PRRSV genome sequences (WGS) or contigs (genome fragments) based on viral load. Ct values: (a) lung: median 18.2, 25th percentile 15.4, and 75th percentile 20.7; (b) processing fluids: median 25.1, 25th percentile 23.2, and 75th percentile 27.4; (c) serum: median 20.3, 25th percentile 18, and 75th percentile 22.7

Puntos críticos en la secuenciación - Interpretación

Punto clave en cualquier tipo de secuenciación es la interpretación

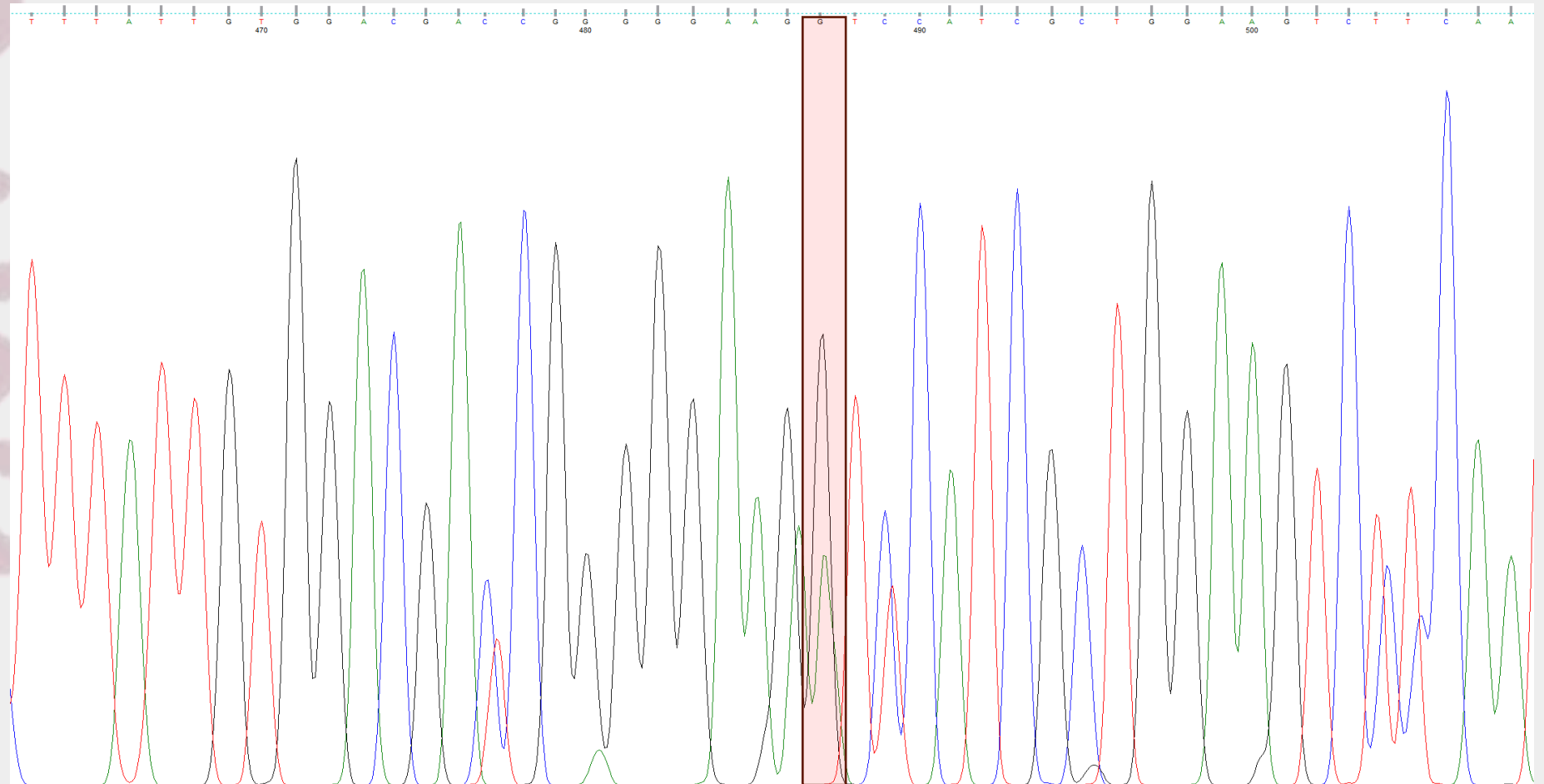
Conceptos

Cuasiespecies: evolución de un virus inicial que refleja la diversidad dentro de una misma población de virus en un cerdo o grupo de cerdos, normalmente generada por la alta tasa de mutación.

Variantes: evolución de un virus con cambios específicos en el genoma en comparación con el virus original. Cepa con cambios menores de probable acumulación de mutaciones.

Cepa: virus que sufre cambios significativos en su genoma con variación en aspectos como replicación, transmisibilidad y patogenicidad. Genotipo y Fenotipo distinto.

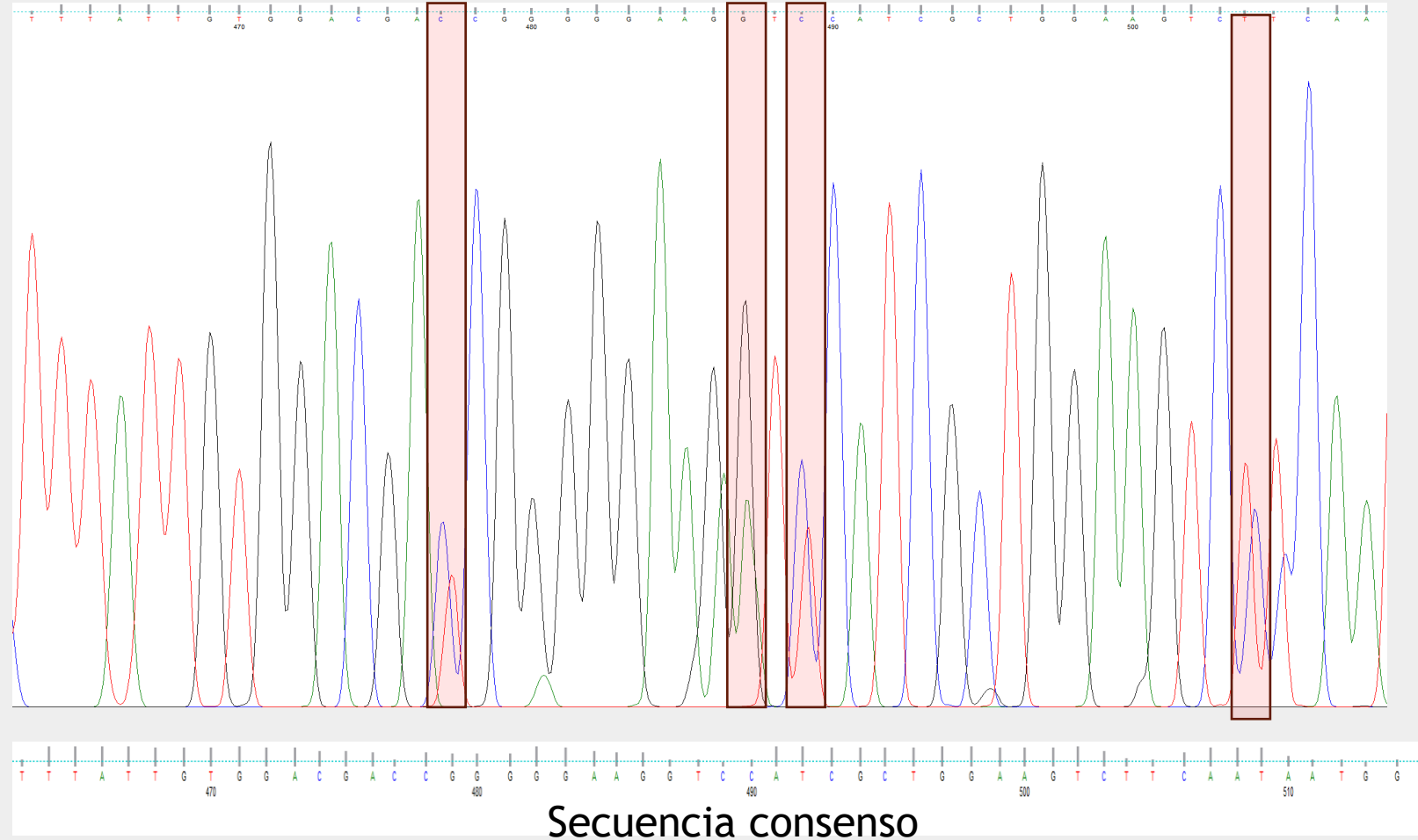
¿Secuencias consenso o con degenerados?



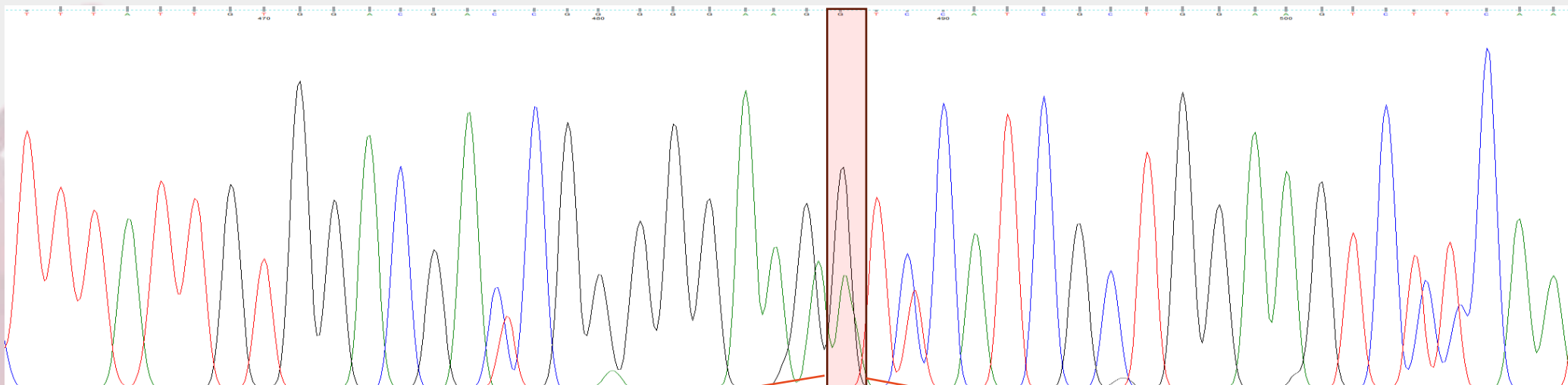
Consenso: G

Degenerado o no consenso: G o A

¿Secuencias consenso o con degenerados?



¿Secuencias consenso o con degenerados?



Consenso: G



Degenerado o no consenso: G o A

Degenerado o no consenso: R

IUPAC nucleotide code	Base
A	Adenine
C	Cytosine
G	Guanine
T (or U)	Thymine (or Uracil)
R	A or G
Y	C or T
S	G or C
W	A or T
K	G or T
M	A or C
B	C or G or T
D	A or G or T
H	A or C or T
V	A or C or G
N	any base
. or -	gap

ATGAGATGTTCTTACAAGTTGGGCGTTCCTTGACTCTCTATCCTGTTATTGGTGGCTTCTTTGCTGTGTATC
 GGCTCGTCTTGGTCTTTGCCGATGGCAACGGCGACAGCTCGACATACCAATACATATATAACTTGACGATATG
 CGAGCTGAATGGGACCGAATGGCTGGCCGGCCATTTCCATTGGACAGTCGAAACTTTTGTGCTTTATCCGGTC
 GTGACCATATTCTTTCATTGGGTTTTCTACAACAAGCCATTTCTTGATACACTCGGCCTCGGAACCGTGTCC
 GTCATGGGCTATTGTACAAGCGGTATGTGCTCAGCAGCGTATGGCGTTTGGCGTCTTTCTGCGCTCGTGTG
 CTTTGTCAATCGTGCCGCCAAAAATGCTGGCTTGCCGCTATGCTCGACCCGGTCACTAACTTTATTGTGG
 ACGACCGGGGAAAGATTATCATGATGGAATCTTCAATAGTGGTGAGAAATGGGCAAAGCTGACATCGGCA
 ATGACCTTGTACCGTCAAACATGTCGTCCTCGAAGGAGTCAAAGCTCAACCCCTAACGAGAATTCGGCTGA
 GCAATGGGAAGCCTAG

ATGAGATGTTCTYACARGTTGGKGCCTTCTTGACWCTCYATYCTTGTRYTGKTGGCTTCTTTGYTGTGTAYC
 GGCTCGTCTYGGTCTTTGCCGATGGCAACGGCGACAGCTCGACATACCAATACATATATACTTGACGATATG
 YGAGCTGAAYGGGACCGAATGGCTGGCMRRYCATTTTCATTGGACAGTCGAAACTTTTGTCTTTATCCGGTY
 GTSACCCAYRTTMYTCAYTGGGTTTTCTACAACAAGCCAYTTCTTGAYACRCTCGGCCTCGGMRCCTGTG
 CRTCATSGGCTATRTSACRAGCGGTATGTGCTCAGCAGYGTCTATGGCGTTTGYGCWCTTCTGCGCTCRTRT
 GCTTGTCAATCGTGCCGYMAAAATGCMTGCGWTGCCGCTATGCTCGACCCGGTCACTAACTTTATTGT
 GGACGACCGGGGAAAGATTATMGATGGAATCTTCAATAGTGGTGAGAAATGGGCAAAGCTGACRTR
 GCRRYGACCTTGTACCRCTCAAACATGTCGTCCTCGAAGGAGTCAAAGCTCAACCCCTAACGAGAATTCGGC
 TGAGCAATGGGAAGCCTAG

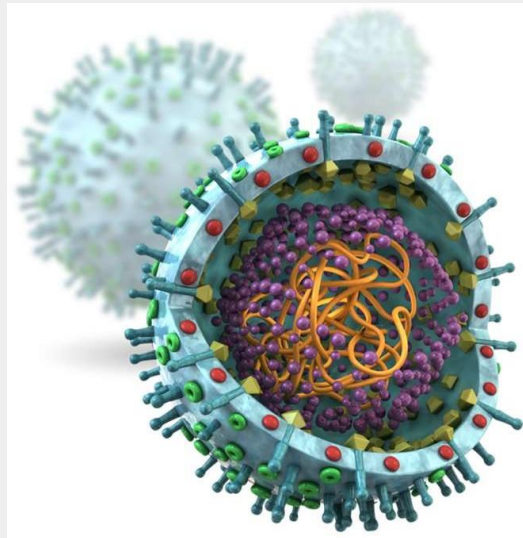


Puntos críticos en la secuenciación - ¿Con qué comparar?

Las bases de datos de secuencias por ORF son amplias, las secuencias completas son muy escasas en comparación hasta la fecha

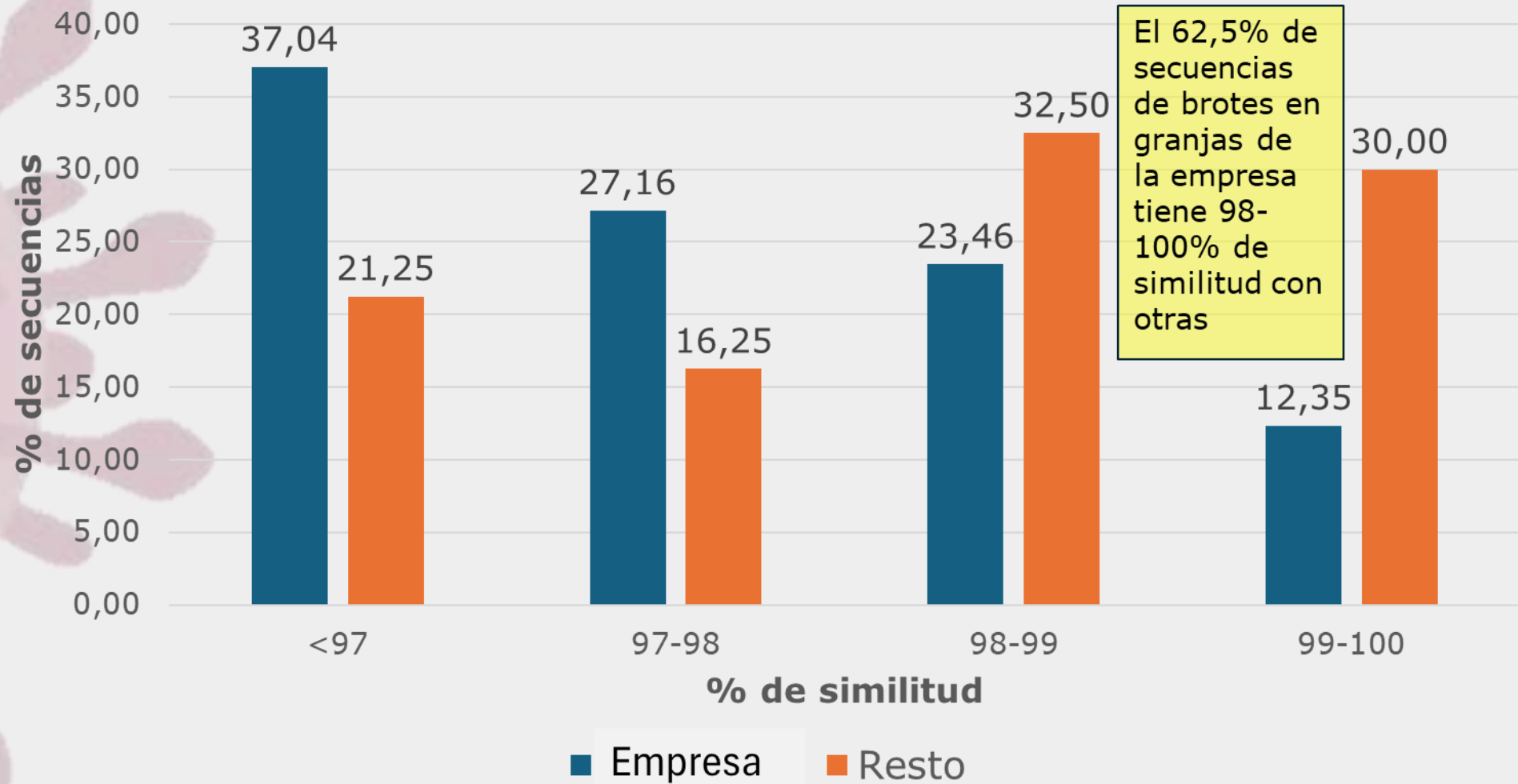
Puntos críticos en la secuenciación - ¿Con qué comparar?

Base de datos de GSP/INTERPORC



13338 ORF5 secuencias
130 secuencias completas
2594 granjas
329 empresas

Puntos críticos en la secuenciación - ¿Con qué comparar?



Secuencias similares entre granjas ¿Por dónde se ha introducido?

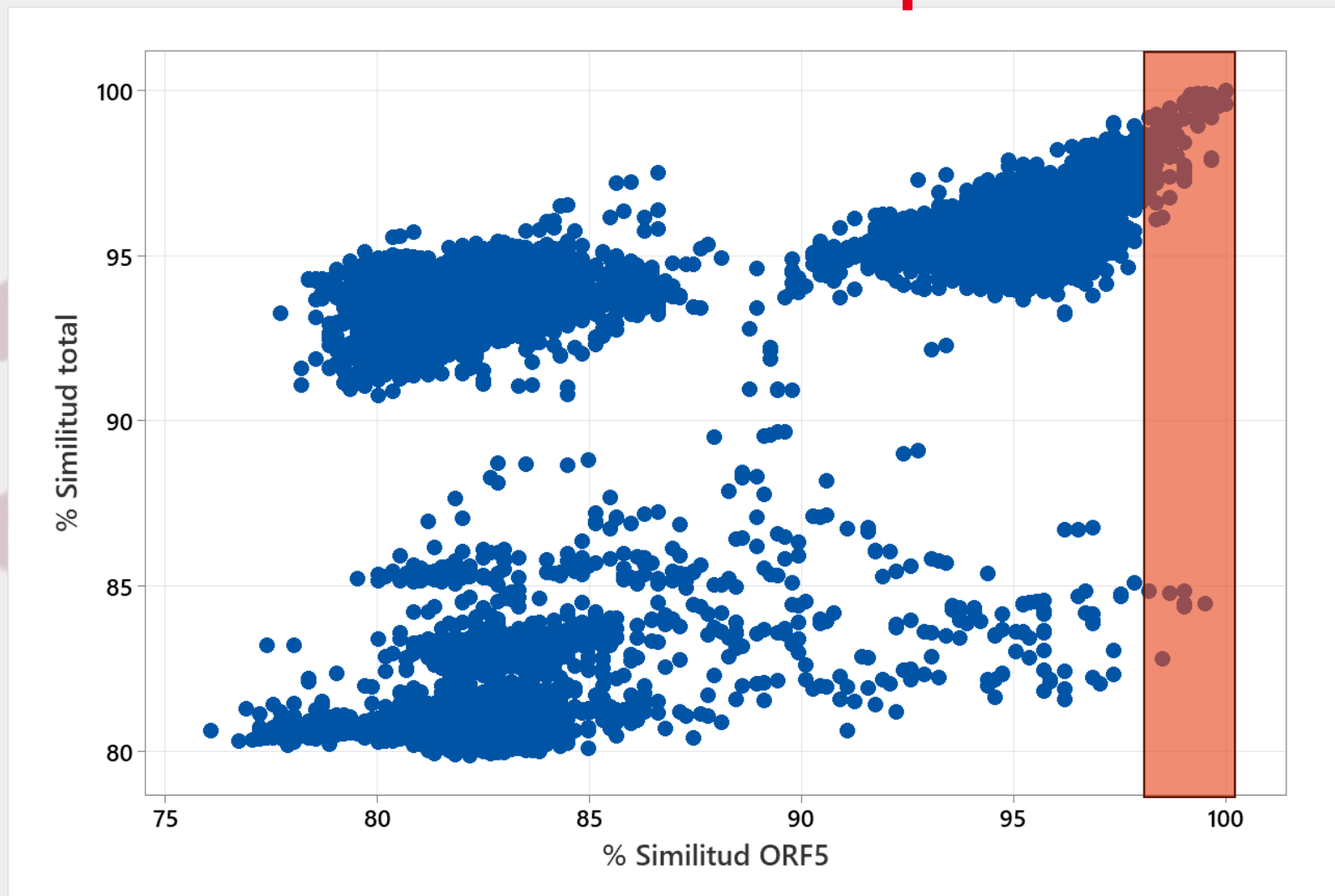
Directa



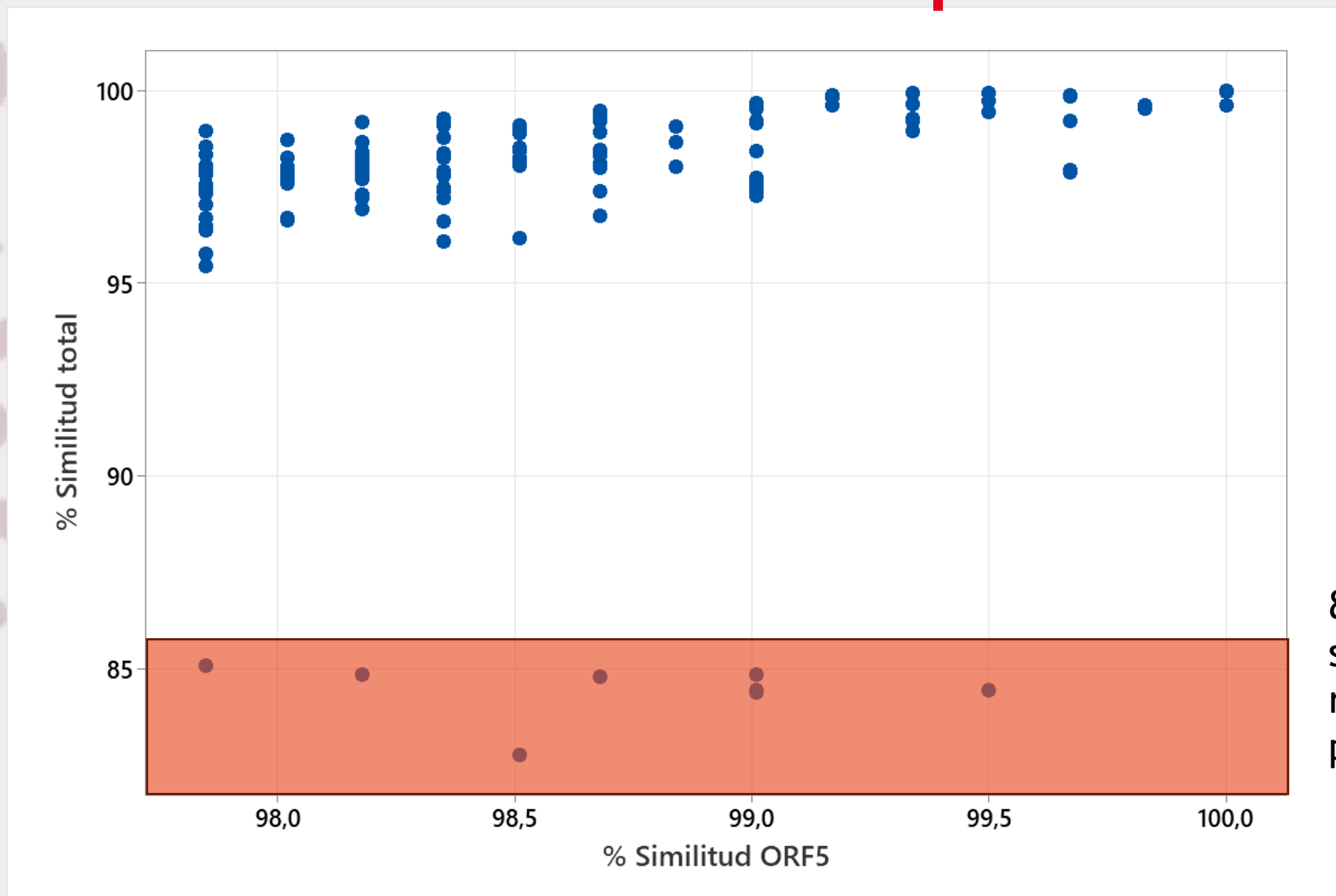
Indirecta



Comparativa 106 secuencias completas vs ORF5



Comparativa 106 secuencias completas vs ORF5

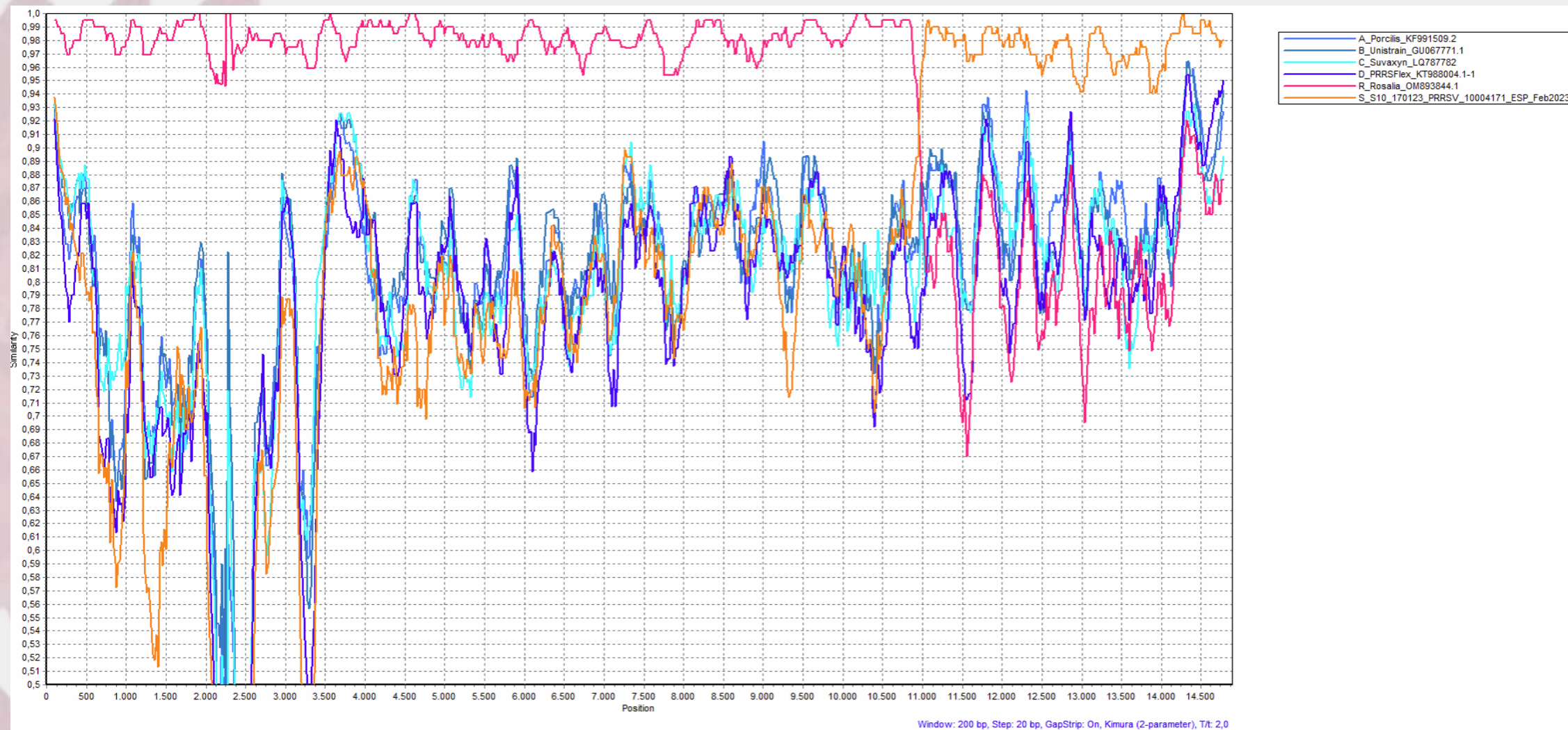


8 de 106
secuencias con
recombinantes
posibles

Comparativa 106 secuencias completas vs ORF5

Rosalía

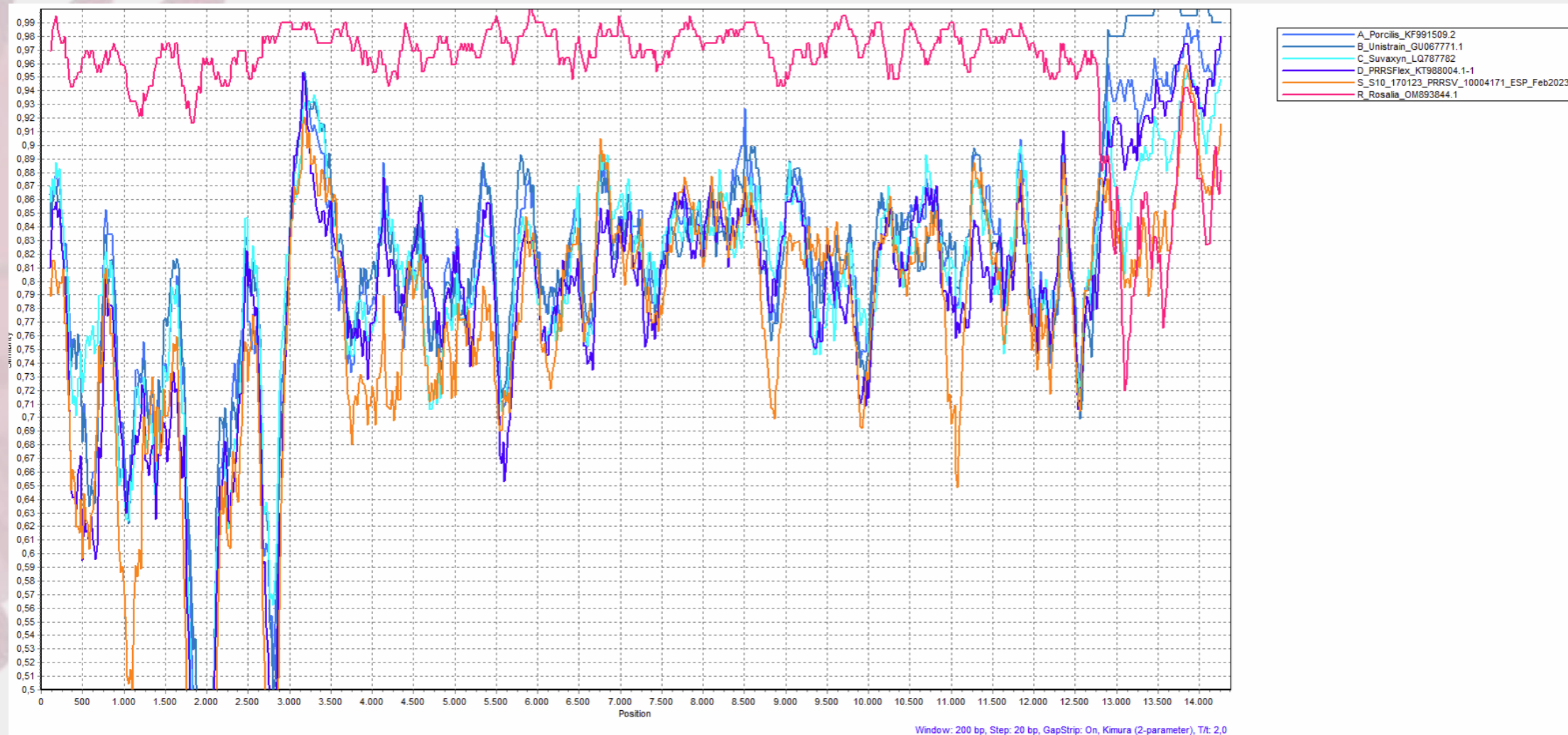
S10



Comparativa 106 secuencias completas vs ORF5

Rosalía

Vacunal



Limitaciones actuales prácticas

Basamos la interpretación en una sola o pocas secuencia/s en una población de muchos PCR positivos

Secuenciamos cuando hay un cambio clínico y no como monitorización

Estandarización / Harmonización en la secuenciación Sanger y completa entre distintos laboratorios

Conclusión general

Independientemente de la secuenciación por ORF, completa, etc, el programa de prevención y control es el mismo

- 1- Bioseguridad externa: evitar entrada de nuevas cepas, variantes, etc.
- 2- Estabilizar todas las fases de producción con: bioseguridad interna, inmunización, bandas, etc.
- 3- Buenas prácticas de uso y manejo de la inmunización



Muchas gracias!

jordi@gsplleida.net