



IMPLEMENTACIÓN DE UNA PRUEBA qRT-PCR PARA LA DIFERENCIACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DEL PRRS DE CAMPO Y CEPAS VACUNALES UTILIZADAS EN MÉXICO.

Galindo-Barboza A.J.¹, Rivera-Benítez J.F.^{2*} y De La Luz-Armendáriz J.³

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, UNAM. ²Laboratorio de Virología, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, INIFAP. ³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. * José Francisco Rivera Benítez; rivera.francisco@inifap.gob.mx

Introducción.

El virus del PRRS (vPRRS) es uno de los principales agentes infecciosos en la porcicultura y su principal método de control es mediante el uso de la vacunación. Actualmente, para realizar la caracterización genética de las cepas circulantes en granja es necesario el uso de técnicas de secuenciación, las cuales normalmente están basadas en la clasificación filogenética del ORF5 [1, 2]. El identificar si la cepa vacunal que se está utilizando en granja se encuentra circulando y con ello evaluar el proceso, permite la toma de decisiones basada en información. La aplicación de tecnologías como la RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) nos permite conocer esta información con rapidez. La prueba implementada para cepas vacunales amplifica una región variable del gen NSP2 para cada cepa vacunal, lo que permite la diferenciación de las cepas vacunales, comparado con cepas de campo [3]. El objetivo del presente estudio fue implementar y evaluar una qRT-PCR para la diferenciación de cepas del vPRRS de granja, con respecto a cepas vacunales empleadas en México.

Materiales y métodos.

En el presente estudio se incluyeron siete granjas derivadas del programa “Sanidad Jalisco” de la URPJ, mismas que han sido previamente estudiadas [4], estas granjas contaban con al menos una muestra de vPRRS secuenciada y caracterizada de acuerdo con las herramientas bioinformáticas [1, 2], de estas granjas se seleccionaron todas las muestras positivas a la prueba ORF7 qRT-PCR (n=39), incluidas las muestras secuenciadas y caracterizadas. Con estas muestras se realizaron cuatro diferentes pruebas de qRT-PCR para diferenciar las cepas detectadas en la granja con respecto a las cepas vacunales disponibles en México (en adelante vacPRRS qRT-PCR). Se implementó un protocolo establecido previamente [3], el cual permite detectar cuatro de las cepas virales vacunales PRRSV-2 (Ingelvac MLV, Foster, Prime Pac, y Prevacent), adicionalmente se probó una vacuna nacional comercial (Innovac). Las condiciones de la reacción y el protocolo de amplificación fueron similares para el ORF7 y la prueba vacPRRS, empleando el kit QuantiTect® Probe RT-PCR Kit (QIAGEN, Cat. No. 204445) y el termociclador CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE. UU.) bajo las recomendaciones del fabricante. El valor de Ct se determinó aplicando la corrección por deriva de fluorescencia, utilizando un control positivo para garantizar valor consistente en todos los experimentos. Los testigos positivos para cada vacuna evaluada se obtuvieron de las extracciones de ARN de cada una, mediante columnas de sílica.

Resultados.

En la implementación, los valores de Ct obtenidos para cada testigo en la prueba vacPRRS qRT-PCR fueron: Prevacent 14.77, Prime Pac 19.8 Ingelvac MLV 20.64 y Foster 17.97; para el ORF7 21.31, 17.27, 18.41, 16.93 respectivamente; y para la nacional, Innovac 18.97. Las

39 muestras positivas a la prueba ORF7 qRT-PCR se sometieron a la prueba vacPRRS qRT-PCR (n=156). En la detección de cepas vacunales se registró solo una muestra positiva idéntica a la cepa vacunal Ingelvac MLV. El resto de las cepas vacunales no fueron detectadas en las muestras positivas (Cuadro 1).

Cuadro 7. Resultados obtenidos de la aplicación de la qRT-PCR (vacPRRS y ORF7) a muestras positivas y secuenciadas de campo obtenidas en granjas de Jalisco.

Granja	Linaje*	Uso de vacuna	Ct (vacPRRS)	Ct (ORF7)
1 (n=8)	8D	Si	n/a	28.81±3.69
2 (n=9)	8D	Si	n/a	31.87±3.40
3 (n=7)	1A	No	n/a	26.6±5.38
4 (n=4)	5A ~ Ingelvac MLV	Si	n=1, 25.86	32.02±5.95
5 (n=6)	1C	Si	n/a	26.22±3.73
6 (n=2)	1A	No	n/a	28.96±4.08
7 (n=3)	8D	Si	n/a	30.54±1.19

*Identificado por secuenciación. n/a: sin amplificación.

Discusión.

La prueba vacPRRS qRT-PCR permitió diferenciar eficazmente cepas vacunales y de campo del virus PRRS, como ha sido reportado previamente [3]. Solo se detectó la cepa Ingelvac MLV en una muestra, mientras que las demás resultaron negativas a las vacunas evaluadas, lo que indica una circulación predominante de cepas de campo. Este hallazgo es notable considerando que el 80 % de las muestras provenían de granjas vacunadas, lo cual sugiere posible discontinuidad o esquemas incompletos de vacunación [4]. Esta herramienta ofrece una alternativa rápida y accesible a la secuenciación para el monitoreo de cepas vacunales, contribuyendo al seguimiento sanitario en tiempo real.

Conclusiones.

La prueba vacPRRS qRT-PCR demostró ser una herramienta útil para la detección diferencial entre cepas vacunales y variantes circulantes no vacunales, fortaleciendo el monitoreo molecular en unidades de producción porcina.

Agradecimientos

A la Asociación IPVS México 2014 A.C. por los fondos otorgados para esta investigación. No. SIGI: 1520226989.

Referencias bibliográficas.

[1]. Zeller et al., (2024). *Front. Vet. Sci.* 11:1419340. [2]. Yim-Im et al., (2023). *Microbiology spectrum*, 11(6), e0291623. [3]. Rawal, G. et al., (2023). *Viruses*, 15(11), 2240. [4]. Galindo-Barboza, A.J. et al., (*en preparación*). Molecular and Phylogenetic Characterization of PRRSV 2 in Jalisco, Mexico.

Palabras claves. PRRS, Vacunas, Jalisco.





IMPLEMENTACIÓN DE UNA PRUEBA qRT-PCR PARA LA DIFERENCIACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DEL PRRS DE CAMPO Y CEPAS VACUNALES UTILIZADAS EN MÉXICO.

Galindo-Barboza A.J.¹, Rivera-Benítez J.F.^{2*} y De La Luz-Armendáriz J.³

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, UNAM. ²Laboratorio de Virología, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, INIFAP. ³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

*Alberto Jorge Galindo Barboza; allogaba@gmail.com * José Francisco Rivera Benítez; rivera.francisco@inifap.gob.mx

OBJETIVO

Implementar y evaluar una qRT-PCR para la diferenciación de cepas del virus del PRRS de granja, con respecto a cepas vacunales empleadas en México.

INTRODUCCIÓN

El virus del PRRS (vPRRS) es uno de los principales agentes infecciosos en la porcicultura y su principal método de control es mediante el uso de la vacunación. Actualmente, para realizar la caracterización genética de las cepas circulantes en granja es necesario el uso de técnicas de secuenciación, las cuales normalmente están basadas en la clasificación filogenética del ORF5 [1, 2].

El identificar si la cepa vacunal que se está utilizando en granja se encuentra circulando y con ello evaluar el proceso, permite la toma de decisiones basada en información. La aplicación de tecnologías como la RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) nos permite conocer esta información con rapidez. La prueba implementada para cepas vacunales amplifica una región variable del gen NSP2 para cada cepa vacunal, lo que permite la diferenciación de las cepas vacunales, comparado con cepas de campo [3].

MÉTODOS

En el presente estudio se incluyeron siete granjas derivadas del programa "Sanidad Jalisco" de la URPI, mismas que han sido previamente estudiadas [4], estas granjas contaban con al menos una muestra de vPRRS secuenciada y caracterizada de acuerdo con las herramientas bioinformáticas [1, 2], de estas granjas se seleccionaron todas las muestras positivas a la prueba ORF7 qRT-PCR (n=39), incluidas las muestras secuenciadas y caracterizadas. Con estas muestras se realizaron cuatro diferentes pruebas de qRT-PCR para diferenciar las cepas detectadas en la granja con respecto a las cepas vacunales disponibles en México (en adelante, vacPRRS qRT-PCR).

Se implementó un protocolo establecido previamente [3], el cual permite detectar cuatro de las cepas virales vacunales PRRSV-2 (Ingelvac MLV, Fostera, Prime Pac, y Prevacent), adicionalmente se probó una vacuna nacional comercial (Innovac). Las condiciones de la reacción y el protocolo de amplificación fueron similares para el ORF7 y la prueba vacPRRS, empleando el kit QuantiTect® Probe RT-PCR Kit (QIAGEN, Cat. No. 204445) y el termociclador CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE. UU.) bajo las recomendaciones del fabricante.

El valor de Ct se determinó aplicando la corrección por deriva de fluorescencia, utilizando un control positivo para garantizar valor consistente en todos los experimentos. Los testigos positivos para cada vacuna evaluada se obtuvieron de las extracciones de ARN de cada una, mediante columnas de sílica.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la implementación, los valores de Ct obtenidos para cada testigo en la prueba vacPRRS qRT-PCR fueron: Prevacent 14.77, Prime Pac 19.8 Ingelvac MLV 20.64 y Fostera 17.97; para el ORF7 21.31, 17.27, 18.41, 16.93 respectivamente; y para la nacional, Innovac 18.97.

Las 39 muestras positivas a la prueba ORF7 qRT-PCR se sometieron a la prueba vacPRRS qRT-PCR (n=156). En la detección de cepas vacunales se registró solo una muestra positiva idéntica a la cepa vacunal Ingelvac MLV. El resto de las cepas vacunales no fueron detectadas en las muestras positivas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Resultados obtenidos de la aplicación de la qRT-PCR (vacPRRS y ORF7) a muestras positivas y secuenciadas de campo obtenidas en granjas de Jalisco.

Granja	Linaje*	Uso de vacuna	Ct (vacPRRS)	Ct (ORF7)
1 (n=8)	8D	Si	n/a	28.81±3.69
2 (n=9)	8D	Si	n/a	31.87±3.40
3 (n=7)	1A	No	n/a	26.6±5.38
4 (n=4)	5A ~ Ingelvac MLV	Si	n=1, 25.86	32.02±5.95
5 (n=6)	1C	Si	n/a	26.22±3.73
6 (n=2)	1A	No	n/a	28.96±4.08
7 (n=3)	8D	Si	n/a	30.54±1.19

*identificado por secuenciación. n/a: sin amplificación.

La prueba vacPRRS qRT-PCR permitió diferenciar eficazmente cepas vacunales y de campo del virus PRRS, como ha sido reportado previamente [3]. Solo se detectó la cepa Ingelvac MLV en una muestra, mientras que las demás resultaron negativas a las vacunas evaluadas, lo que indica una circulación predominante de cepas de campo.

Este hallazgo es notable considerando que el 80% de las muestras provenían de granjas vacunadas, lo cual sugiere posible discontinuidad o esquemas incompletos de vacunación [4]. Esta herramienta ofrece una alternativa rápida y accesible a la secuenciación para el monitoreo de cepas vacunales, contribuyendo al seguimiento sanitario en tiempo real.

CONCLUSIONES

La prueba vacPRRS qRT-PCR demostró ser una herramienta útil para la detección diferencial entre cepas vacunales y variantes circulantes no vacunales, fortaleciendo el monitoreo molecular en unidades de producción porcina.

PALABRAS CLAVE

PRRS, Vacunas, Jalisco.

AGRADECIMIENTOS



A la Asociación IPVS México 2014 A.C. por los fondos otorgados para esta investigación. No. INIFAP/SIGI: 1520226989. Y a la URPI por su apoyo.

REFERENCIAS

[1]. Zeller et al., (2024). Front. Vet. Sci. 11:1419340. [2]. Yim-Im et al., (2023). Microbiology spectrum, 11(6), e0291623. [3]. Rawal, G. et al., (2023). Viruses, 15(11), 2240. [4]. Galindo-Barboza, A.J. et al., (en preparación). Molecular and Phylogenetic Characterization of PRRSV 2 in Jalisco, Mexico.