



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Identificación y caracterización serológica de variantes  
antigénicas de Virus Influenza A pH1N109 en planteles de  
producción intensiva de cerdos.**

**Cynthia Andrea Rojas Antipi**

Proyecto de Memoria para optar al  
Título Profesional de Médico  
Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: Víctor Manuel Neira Ramírez, MV, PhD.  
Universidad de Chile

Financiamiento Proyecto FIV 2017 and Fondecyt Iniciación 11170877

SANTIAGO, CHILE  
2019



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Identificación y caracterización serológica de variantes antigénicas de Virus Influenza A pH1N109 en plantales de producción intensiva de cerdos.**

**Cynthia Andrea Rojas Antipi**

Proyecto de Memoria para optar al  
Título Profesional de Médico  
Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: Víctor Manuel Neira Ramírez, MV, PhD  
Universidad de Chile

Financiamiento Proyecto FIV 2017 and Fondecyt Iniciación 11170877

Nota Final: .....

PROFESOR GUÍA	:DR. VÍCTOR NEIRA R.....
PROFESOR CORRECTOR	:DR. PEDRO ÁBALOS P.....
PROFESOR CORRECTOR	:DR. SERGIO BUCAREY V.....

SANTIAGO, CHILE  
2019

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	
Etiología .....	5
Variabilidad Antigénica .....	6
Diversidad Antigénica virus influenza chilenos .....	8
Diagnóstico .....	9
Relevancia de la investigación.....	10
<b>HIPÓTESIS</b> .....	11
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	11
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	11
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
Bioseguridad .....	12
Planteles y ubicación.....	12
Muestreo .....	13
Pruebas de diagnóstico.....	13
Análisis de datos.....	15
<b>RESULTADOS</b> .....	16
<b>DISCUSIÓN</b> .....	36
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	40
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	41
<b>ANEXOS</b> .....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Virus Influenza A. Muestra las diferentes características del virus influenza, incluyendo las proteínas de superficie Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA) (obtenido de CDC, 2017) .....	5
<b>Figura 2.</b> Estructura trimérica de proteína HA en 3D de H1pdm09 obtenidas en Chile, usando la estructura cristalizada de H1 de referencia. El color azul representa la subunidad HA1 y celeste HA2. Tapia, 2018 .....	8
<b>Figura 3.</b> Mapa antigénico 3D construido con los títulos de IH entre cepas de los clusters H1 chileno A, H1 chileno B y H1 pandémico. Tapia, 2018 .....	9
<b>Figura 4.</b> Ubicación geográfica de los planteles muestreados. Foto tomada con Google Maps. ....	12
<b>Figura 5.</b> Lectura de una placa de prueba de Hemaglutinación (obtenida de Szretter, <i>et al.</i> , 2006 pp22). ....	14
<b>Figura 6.</b> Lectura de una placa, en este caso el virus tiene un título de 1280, en este nivel de dilución, los anticuerpos todavía eran capaces de reconocer y unirse a los antígenos en el virus (obtenida de CDC, 2017). ....	15
<b>Figura 7.</b> Resultados del test ELISA aplicado al plantel A, agrupados por semana.....	16
<b>Figura 8.</b> Resultados HI para el virus 559 plantel A, agrupados por semana de edad.....	17
<b>Figura 9.</b> Resultados HI para el virus 1107 plantel A, agrupados por semana de edad.....	17
<b>Figura 10.</b> Resultados HI 1107 comparado con 559, plantel A.....	18
<b>Figura 11.</b> Resultados del test ELISA aplicado al plantel B, agrupados por semana.....	19
<b>Figura 12.</b> Resultados HI para el virus 559 plantel B, agrupados por semana de edad.....	19
<b>Figura 13.</b> Resultados HI para el virus 1107 plantel B, agrupados por semana de edad....	20
<b>Figura 14.</b> Resultados HI 1107 comparado con 559, plantel B.....	21
<b>Figura 15.</b> Resultados del test ELISA aplicado al plantel C, agrupados por semana.....	22

<b>Figura 16.</b> Resultados HI para el virus 559 plantel C, agrupados por semana de edad.....	22
<b>Figura 17.</b> Resultados HI para el virus 1107 plantel C, agrupados por semana de edad....	23
<b>Figura 18.</b> Resultados HI 1107 comparado con 559, plantel C.....	23
<b>Figura 19.</b> Resultados del test ELISA aplicado al plantel D, agrupados por semana.....	24
<b>Figura 20.</b> Resultados HI para el virus 559 plantel D, agrupados por semana de edad.....	25
<b>Figura 21.</b> Resultados HI para el virus 1107 plantel D, agrupados por semana de edad....	25
<b>Figura 22.</b> Resultados HI 1107 comparado con 559, plantel D.....	26
<b>Figura 23.</b> Resultados del test ELISA aplicado al plantel E, agrupados por semana.....	27
<b>Figura 24.</b> Resultados HI para el virus 559 plantel E, agrupados por semana de edad.....	27
<b>Figura 25.</b> Resultados HI para el virus 1107 plantel E, agrupados por semana de edad....	28
<b>Figura 26.</b> Resultados HI 1107 comparado con 559, plantel E.....	28
<b>Figura 27.</b> Resultados del test ELISA aplicado al plantel F, agrupados por semana.....	29
<b>Figura 28.</b> Resultados HI para el virus 559 plantel F, agrupados por semana de edad.....	30
<b>Figura 29.</b> Resultados HI para el virus 1107 plantel F, agrupados por semana de edad....	30
<b>Figura 30.</b> Resultados HI 1107 comparado con 559, plantel F.....	31
<b>Figura 31.</b> Resultados del test ELISA aplicado al plantel G, agrupados por semana.....	32
<b>Figura 32.</b> Resultados HI para el virus 559 plantel G, agrupados por semana de edad.....	32
<b>Figura 33.</b> Resultados HI para el virus 1107 plantel G, agrupados por semana de edad....	33
<b>Figura 34.</b> Resultados HI 1107 comparado con 559, plantel G.....	33
<b>Figura 35.</b> Resultados general HI, para ambas variantes virales, comparado.....	34

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Agrícolas que formaron parte del muestreo, cantidad de muestras de suero obtenidas y grupos etarios muestreados.....	13
--	----

## **RESUMEN**

El virus de influenza A, es un virus ampliamente distribuido alrededor del mundo y es una de las causas principales de aparición de brotes respiratorios en cerdos. Este virus posee, una gran variabilidad antigénica, que es conferida por distintos procesos como el reordenamiento genético, la deriva antigénica y la glicosilación de la hemaglutinina. Y es este último proceso, el cual dio origen a las variantes pandémicas H1N1 chilenas de influenza, que pueden evadir la respuesta inmune de cerdos.

El objetivo de este estudio fue determinar la infección por 2 variantes antigénicas chilenas de pH1N1 en planteles porcinos, una variante de referencia (559) y una variante mutante (1107). Además, se diferenció serológicamente entre etapas productivas.

Se tomaron un total 442 muestras, provenientes de 7 granjas ubicadas a lo largo del país, de las cuales 4 realizaban vacunación contra la influenza, en cerdas gestantes. Las muestras se analizaron usando test ELISA y prueba de inhibición de la hemaglutinación, para poder corroborar la presencia de las variantes del virus, en diferentes etapas productivas. Una vez obtenidos y graficados los resultados, se aplicó prueba de Chi cuadrado, para poder determinar la significancia entre los resultados para una u otra variante analizada.

Todos los planteles presentaron muestras positivas al test ELISA, hallándose un total de 58,1% (257/442) de sueros positivos. En el test de inhibición de la hemaglutinación, la mayoría de los planteles mostró evidencia serológica para las variantes estudiadas. Al comparar los resultados de ambas pruebas, se aprecia la probable existencia de una tercera variante viral.

Los resultados para ambas variantes virales tuvieron diferencias significativas en todos los planteles con un valor  $p > 0.05$  en la prueba estadística de Chi-cuadrado, siendo levemente mayor la reacción inmunitaria para la variante mutante.

Palabras clave: Virus influenza, cerdos, variabilidad antigénica, mutantes de escape, serología, variante viral.

## **ABSTRACT**

Influenza virus A is a worldwide virus and is the one of the main causes of respiratory disease in swines. This virus have a great antigenic variability as the result of three process: antigenic shift, antigenic drift and glycosylation of hemagglutinin, and is this last process wich the one originated a mutant chilean variant of influenza H1N1, which can evade the swine immune response.

In the present study was determinated the infection for two chilean antigenic variants of pH1N1 in swine farms, a reference (559) and a mutant variant (1107). Also, serologically differentiated between productive stages.

A total of 442 sera were sampled, from 7 farms located throughout the country. A total of 4 of this farms were vaccinated against influenza in pregnant sows.

The samples were analyzed using ELISA test and hemagglutination inhibition test, for to corroborate the presence of the variants of the virus, in different productive stages. The results were box-plot graphed and analyzed through Chi-sqar test to determine the significance between the results for one or another variant analyzed.

All the farms have positive samples to the ELISA test, finding a total of 58.1% (257/442) of positive sera. In the haemagglutination inhibition test, most of the farms develop serological evidence for the variants studied. The results of both tests compared, is evidence the probable existence of a third viral variant.

The results for both viral variants had significant differences in all the farms with a p value  $> 0.05$  in the Chi-square statistical test, being slightly higher the immune reaction for the mutant variant.

Key words: Influenza virus, swine, antigenic variability, escape mutants, serology, viral variant.

## INTRODUCCIÓN

El virus de influenza A (IAV), fue aislado por primera vez en cerdos en el año 1930, sin embargo, sus orígenes se pueden seguir hasta el año 1918, año en el que ocurrió la gripe española causada por el subtipo H1N1 ya que, el virus causante era genéticamente idéntico entre humanos y porcinos (Canals, 2010). Este virus se mantuvo antigénica y genéticamente muy conservado en la población porcina hasta la década de 1980. Sin embargo, durante el año 1992 se aisló una nueva cepa que no reaccionó a los ensayos de inhibición de la hemaglutinación (HI) y genéticamente, poseía 18 mutaciones de aminoácidos en el segmento inmunodominante de la proteína de membrana hemaglutinina (HA1) en comparación con un virus previamente aislado (Olsen, 2002). Estos resultados confirmaron la primera gran variación antigénica dentro del virus IAV, lo cual ha seguido ocurriendo innumerables veces hasta la actualidad. Es así como los IAVs norteamericanos actualmente se clasifican en linajes de acuerdo con la variabilidad genética y antigénica. Los linajes alpha, beta y gamma son variantes de la cepa de 1930 aislada en cerdo, mientras que el linaje delta es una variante transmitida posteriormente desde el humano (Lorusso, *et al.*, 2011).

En el año 2009, una cepa del clúster gamma sufrió el reordenamiento de sus segmentos virales con un virus de origen porcino-aviar euroasiático, esto generó una nueva variante que fue transmitida al humano, causando la última pandemia de la humanidad. Este virus hoy es conocido como el virus pandémico H1N1 2009 (pH1N12009) que luego de transmitirse entre humanos a través de todo el mundo, volvió a la población porcina a través del proceso de zoonosis reversa (Lorusso, *et al.*, 2011; Rudneva, *et al.*, 2012).

En Chile, los IAVs son comunes en la población porcina, y entre las variantes más frecuentemente encontradas está el virus pH1N12009. Este virus ha sido estudiado a nivel genético, antigénico e infectivo a nivel de laboratorio con animales de experimentación. En uno de esos estudios, se logró identificar variantes antigénicas del virus pH1N12009, que podrían evadir la respuesta inmune tanto de los cerdos como de los humanos infectados durante el periodo de pandemia (Tapia, *et al.*, 2018).

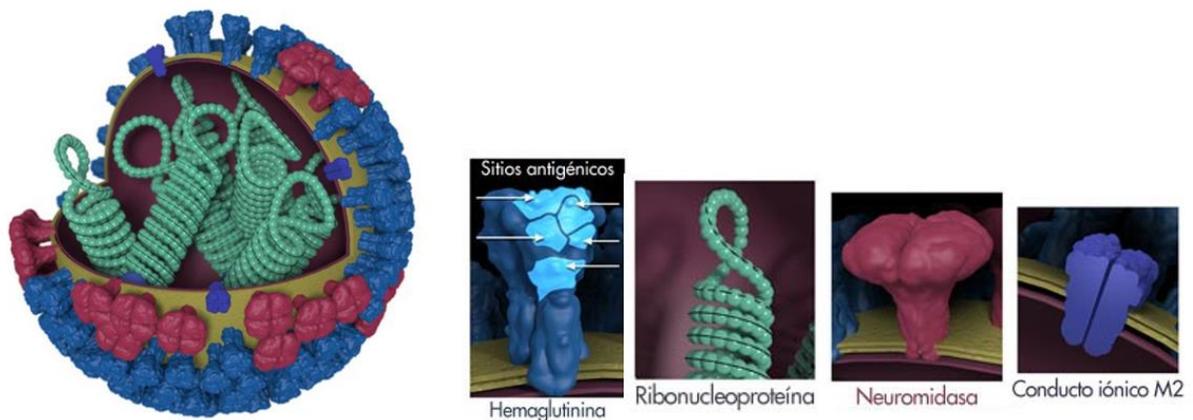
La presente memoria de título se centrará en identificar variantes antigénicas específicas de H1N1 pandémicas en la población de cerdos mediante un estudio transversal en granjas de producción intensiva.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### ETIOLOGIA

Influenza virus A (IAV, por sus siglas en inglés), pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, la cual es una familia de virus ARN envueltos con genoma monocatenario de sentido negativo, compuestos por 8 segmentos de ARN (Sharma, *et al*, 2010). En la actualidad se compone de cinco géneros: Influenza virus A, Influenza virus B, Influenza virus C, Thogotovirus e Isavirus (Alexander, 2008). Los virus de Influenza son una de las principales causas de brotes de enfermedades respiratorias en cerdos, aunque éstos suelen ser subclínicas. Se describe que uno de los primeros reportes de brotes de enfermedades similares a la influenza en cerdos, ocurrieron en 1918, en Estados Unidos y Europa. Aunque Influenza virus A es el único con importancia clínica en porcinos (Van Reeth, *et al.*, 2012).

IAV se clasifica en subtipos, los cuales se determinan considerando las diferencias genéticas y antigénicas de 2 glicoproteínas de superficie: Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA) (Figura 1).



**Figura 1.** Virus Influenza A. Muestra las diferentes características del virus influenza, incluyendo las proteínas de superficie Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA) (obtenido de CDC, 2017).

Actualmente, se han descubierto 18 subtipos HA y 11 subtipos NA (Urbaniak, *et al.*, 2014). Los subtipos de IAV que se han identificado más frecuentemente en cerdos son H1N1,

huH1N1, huH1N2, rH3N2 y rH1N2 (Swenson, *et al.*, 2016). Este virus también puede infectar a humanos, aves, cerdos, equinos, caninos, felinos, mamíferos marinos, y otras especies de animales domésticos y salvajes. El cerdo es reconocido como un importante hospedero del IAV, ya que, pueden ser fuente tanto de potenciales infecciones zoonóticas, como de nuevos virus gracias al reordenamiento (Corzo, *et al.*, 2014).

Los aislados de IAV se nombran utilizando los siguientes criterios: A/especie de origen/ubicación de aislamiento/número de aislamiento/año de aislamiento, por ejemplo, A/swine/Wisconsin/125/98 (Van Reeth, *et al.*, 2012).

## VARIABILIDAD ANTIGÉNICA

Este virus posee una gran variabilidad antigénica, la cual es conferida principalmente por el resultado de dos procesos: mutaciones o reordenamiento genético. Las mutaciones son aquellas que causan cambios graduales mediante un proceso que se le conoce como deriva antigénica o en inglés “*Antigenic drift*”, mientras que el reordenamiento puede causar cambios más rápidos y a estos cambios se les llama “*Antigenic shifts*” (Spickler, 2016). Ambos procesos propician la evolución del virus, la cual, puede influir en la especificidad del hospedero y la patogenicidad del virus (Shao, *et al.*, 2017).

### Reordenamiento

El reordenamiento genético se ha documentado repetidamente en las últimas décadas, y esto ha alterado la epidemiología de la gripe o influenza, en muchas partes del mundo (Van Reeth, *et al.*, 2012). Este suceso puede ocurrir cuando una célula hospedera es coinfectada con 2 o más cepas de IAV, en este momento, es posible que exista intercambios de segmentos de ARN, por ejemplo, si la célula es infectada por 2 cepas de IAV, tomando en cuenta que cada cepa tiene 8 segmentos de ARN, tendríamos 256 combinaciones probables (Urbaniak, *et al.*, 2014).

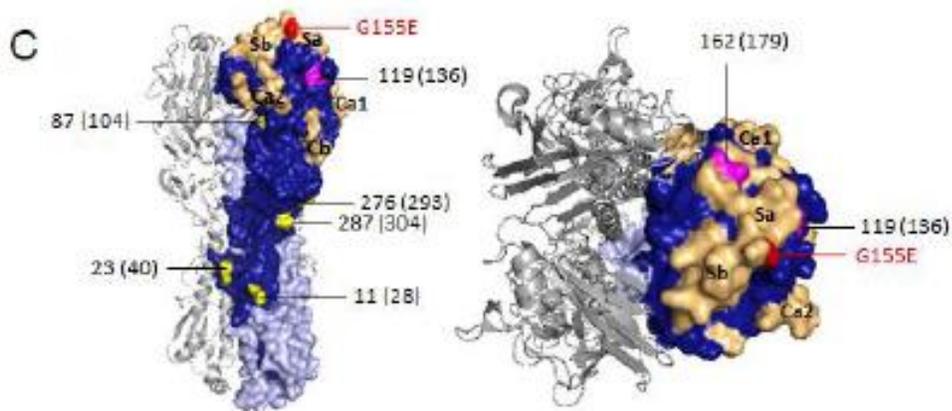
Este proceso produce cambios abruptos, y puede dar como resultado virus que contengan NA nuevo, HA nuevo o ambos. A estos cambios abruptos se les llama “*Antigenic shifts*” y pueden ser suficientes para que los nuevos virus eludan la inmunidad existente en una especie hospedera.

## Deriva antigénica

Corresponde a la forma más común de variación de este virus, y se da mediante cambios de nucleótidos individuales en los genes que codifican a los sitios antigénicos de HA y NA. Este proceso va ocasionando cambios graduales que traen como consecuencia, la creación de nuevas variantes antigénicas de IAV, y se ve favorecido debido a que el ARN-polimerasa de este virus carece de función correctora, por lo que, a menudo se remplazan nucleótidos durante la replicación viral. Además, se ha confirmado, que las mutaciones también están asociadas a la presión de selección impuesta por los anticuerpos (Shao, *et al.*, 2017).

## Glicosilación en Hemaglutinina

La Hemaglutinina constituye la mayor parte de la proteína de superficie del virus y es la más importante para la respuesta de anticuerpos del hospedero, por lo tanto, un cambio en su secuencia, como la ganancia de sitios de glicosilación, pueden cambiar las propiedades antigénicas del virus y con esto, escapar a la respuesta inmunitaria del hospedero. También se habla de que la pérdida de un sitio de glicosilación puede llegar a ser una novedad antigénica útil, aunque finalmente el efecto neto de la ganancia o pérdida de un sitio de glicosilación dependerá del estado inmune de la población hospedera (Cherry, *et al.*, 2009; Kovayaski y Suzuki, 2012). Este proceso es el que ha dado origen a las variantes chilenas de H1 pandémicas, las cuales muestran sitios adicionales de glicosilación (Tapia, 2018) (Figura 2).



**Figura 2.** Estructura trimérica de proteína HA en 3D de H1pdm09 obtenidas en Chile, usando la estructura cristalizada de H1 de referencia. El color azul representa la subunidad HA1 y

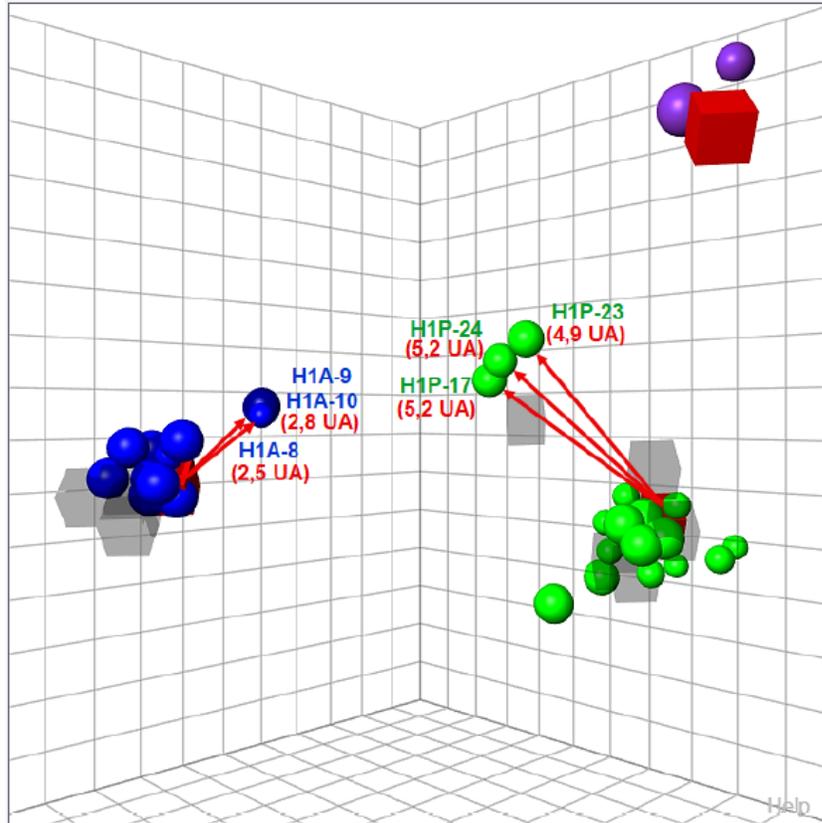
celeste HA2. En amarillo se destacan los sitios de glicosilación conservados presentes en las cepas vacunales de referencia. En naranja se destacan los sitios de antigénicos. En rojo se destacan las sustituciones aminoacídicas únicas en los sitios antigénicos de los mutantes de escape. En magenta se destacan los sitios de glicosilación únicos que dan lugar a mutantes de escape. Fuente: Tapia, 2018.

### Mutantes de escape

Son aquellos virus mutantes en los cuales uno o más aminoácidos de la Hemaglutinina son reemplazados, provocando así, que estos puedan evadir la respuesta neutralizante de los Anticuerpos Monoclonales del hospedero. Esta sustitución, también puede llevar a un cambio en la virulencia del virus (Rudneva, *et al.*, 2012).

### DIVERSIDAD ANTIGÉNICA DE VIRUS INFLUENZA CHILENOS

Las cepas de Virus Influenza A H1 chilenas, pueden ser agrupadas en 3 grupos o clusters antigénicos: H1 chileno A, H1 chileno B y H1 pandémico. A pesar de esta agrupación, algunas cepas de los clusters H1 chileno A y H1 pandémico son antigénicamente distintos de sus respectivos clusters. La cepa de interés de la presente memoria de título, A/swine/Chile/H1P-17/2015(H1N1) fue en promedio 5,9 UA distante de las otras cepas del cluster H1 pandémico (Figura 3) (Tapia, 2018).



**Figura 3.** Mapa antigénico 3D construido con los títulos de IH entre cepas de los clusters H1 chileno A, H1 chileno B y H1 pandémico. El espacio entre las líneas de cuadrícula corresponde a 1 unidad de distancia antigénica (unidad antigénica o UA). Los círculos corresponden a los virus y los cuadrados corresponden a los antisueros. Los colores representan los clusters antigénicos: H1 chileno A (azul), H1 chileno B (morado) y H1 pandémico (verde). Valores en UA y flechas rojas muestran la distancia entre estos antisueros y los mutantes de escape. Fuente: Tapia, 2018.

## DIAGNÓSTICO

El diagnóstico clínico de influenza sólo es presuntivo, porque no hay signos patognómicos, un diagnóstico definitivo solo es posible por el aislamiento del virus, detección de proteínas virales o ácido nucleico o demostración de anticuerpos específicos del virus (Van Reeth, *et al.*, 2012). Los diagnósticos serológicos de laboratorio más utilizados en laboratorios veterinarios son:

### Prueba ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

Este test está diseñado para detectar las cepas H1N1, H1N2 y H3N2, pero no diferencia entre subtipos, funciona detectando los anticuerpos contra la nucleoproteína (NP) del virus de influenza porcina, presente en suero porcino. Algunos estudios experimentales realizados en cerdos inoculados con IAV, han demostrado que éste es sólo un poco menos sensible que el aislamiento viral (Janke, 2000), por lo tanto, su utilización en el diagnóstico rápido de influenza es de gran ayuda en los laboratorios veterinarios.

### Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación

Es la prueba serológica clásica que se utiliza para detectar anticuerpos contra el virus influenza, está diseñada para detectar anticuerpos específicos para los distintos subtipos y variantes de hemaglutinina presentes en el IAV (Yoon, *et al*, 2004), dichos anticuerpos se unen a la proteína HA en la superficie del virus, evitando así, que las partículas del virus se adhieran a la superficie de los eritrocitos; es una prueba simple, que se puede completar en pocas horas (Janke, 2000).

### RELEVANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

En esta memoria de título, se hizo un seguimiento recabado de la presencia de las variantes antigénicas de pH1N109, lo cual contribuyó a tener una visión clara de la presencia de estas variantes mutantes en plantales porcinos, dentro del territorio nacional. Contribuyendo al conocimiento de virus potencialmente zoonóticos.

## **HIPÓTESIS**

Existe evidencia serológica de la variante mutante 1107 del virus pH1N109, en la mayoría de los planteles muestreados.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la infección por variantes antigénicas de pH1N1 en planteles porcinos de producción intensiva y diferencias serológicas entre etapas productivas.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificar virus pH1N1 de planteles porcinos y caracterizarlos antigénicamente.
2. Evidenciar serológicamente la presencia de estos virus en diferentes etapas productivas mediante Inhibición de la Hemaglutinación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### BIOSEGURIDAD

Debido a que el IAV porcino es un virus con un alto potencial zoonótico, cuando se trabajó con muestras posiblemente infectadas, se usaron cámaras de bioseguridad de tipo II (Swenson, *et al.*, 2016).

### OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

#### PLANTELES Y UBICACIÓN

Se muestrearon un total de 7 planteles de producción intensiva de cerdos. Los planteles ubicados más al norte son el plantel A y el B, ambos ubicados dentro de la Región Metropolitana, en el sector de Las Pircas y Paine, respectivamente.

Por su parte, tanto el plantel C como el D, se encuentran en la Región de O'Higgins. El plantel C, localizado en la localidad de Rengo y el plantel D en San Fernando. El plantel F se encuentra ubicado más al sur, en la comuna de San Javier, Región del Maule.

Finalmente, se encuentran los planteles F y G, ubicados ambos en la comuna de Chillán, Región de Ñuble (Figura 2).



## MUESTREO

<b>PLANTEL</b>	<b>N° MUESTRAS</b>	<b>MUESTREO (semanas)</b>
A	84	3.6.10
B	60	3.6.10.14.18.22
C	70	4.7.8.10.12.16.20.24.28
D	50	3.8.12.16.22
E	60	3.6.10.14.18.22
F	58	3.8.12.16.20.22
G	60	3.6.10.14.18.24

**Tabla 1.** Planteles que formaron parte del muestreo, cantidad de muestras de suero obtenidas y grupos etarios muestreados.

## PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO

El procesamiento de las muestras inició con un test Elisa, al cual se realizó con todos los sueros, posterior a esto, los positivos a Influenza virus A, fueron inactivados. Una vez inactivados los sueros, se les hizo el test de inhibición de la hemaglutinación (HI), y en paralelo a este test, se realizó la comprobación de la inactivación, para verificar que dicho proceso se haya realizado de la forma correcta y no afectase en el posterior resultado del test HI.

Para el test HI, se ocupó además el virus problema, el cual fue pdmH1N1 559/1107, todos fueron titulados antes de cada HI.

## TEST ELISA

Se usó un kit comercial, IDEXX Swine Influenza Virus Ab Test. Brevemente, de estar presentes los anticuerpos contra el virus de influenza, se bloquea el conjugado anti-NP para que no se una al antígeno NP presente en la placa. El desarrollo de color es inversamente proporcional al título de anticuerpos de influenza porcina en la muestra, por lo cual, al ser

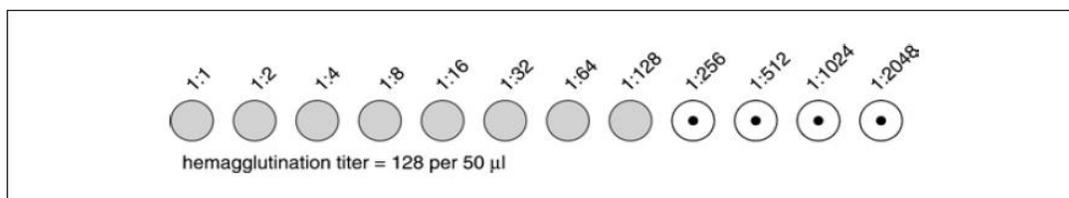
positiva el color fue más claro (celeste) y de ser negativa, el color fue más intenso (azul) (Idexx Laboratories Inc, Westbrook. Maine).

## PRUEBA DE HEMAGLUTINACIÓN

Esta prueba se basa en la capacidad la proteína Hemaglutinina (HA) de unirse y aglutinar los glóbulos rojos (RBC), y nos permitió titular el aislado viral (Eisfeld, *et al.*, 2014). Este ensayo depende de la cantidad de hemaglutinina presente en la superficie del virus y no de la capacidad del virus para replicar, por lo que, cuantifica las partículas virales independiente de infectividad. Se utilizó: *Phosphate-buffer saline* (PBS), glóbulos rojos de pavo (RBC), placas de 96 pocillos en fondo V y el virus problema (Szretter, *et al.*, 2006).

Brevemente, se pipetea 50µL de PBS en las dos primeras columnas, desde la fila 1 a la 12, y luego se hacen de diluciones del virus, las cuales, son mezcladas con RBC al 0,5%. Esto se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente y luego se analiza para titular el virus.

Los glóbulos rojos en las muestras negativas se depositarán en el fondo del pocillo, provocando que se vean claras, con un punto rojo en el fondo, mientras que, en las muestras positivas, se observará un color rosa. El título del virus será el recíproco de la última dilución donde se observa dilución completa (Figura 3) (Szretter, *et al.*, 2006).



**Figura 5.** Lectura de una placa de prueba de Hemaglutinación (obtenida de Szretter, *et al.*, 2006).

## INACTIVACIÓN DE SUERO

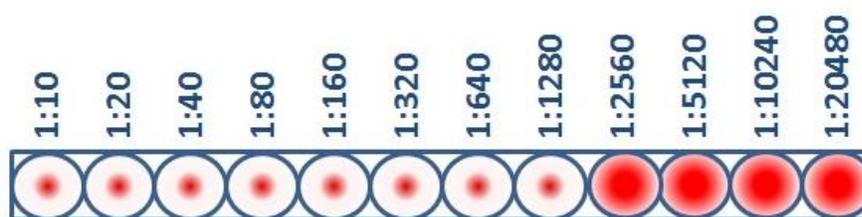
Se realizó bajo el protocolo de Direksin, *et al.*, 2002. Inicia tomado 100µL. de cada suero a analizar, colocándolos en tubos de ensayos por separado, los cuales se llevan a incubación por 30 minutos a 56°C. Luego se agregan 600µL de caolín (solución salina de borato) al 25% a cada tubo, y se lleva nuevamente a incubación por 30 minutos esta vez a temperatura ambiente. Posterior a esto, se llevan a centrifugar por 20 minutos a 3.000g y el sobrenadante

resultante de esta centrifugación se mezcla con 600 $\mu$ L de RBC al 25%. Nuevamente se debe dejar en incubación a temperatura ambiente por 2 horas, finalizado este tiempo se centrifugan los sueros a 3.000g por 20 minutos. El sobrenadante es apartado y depositado en tubos de 1,5 ml. rotulados.

### TEST DE INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN

Brevemente, se realizan diluciones en base 2 de los sueros inactivados, utilizando placas de 96 pocillos con fondo V, posterior a esto se añaden 25 $\mu$ L. del virus en cada pocillo. Esto se debe dejar incubando durante 30 minutos a 4°C. Finalmente, añadir 25 $\mu$ L. de RBC al 0,5% y dejar incubando 30 minutos a temperatura ambiente o hasta que las células de RBC se hayan asentado por completo en los pocillos control (Zacour, *et al*, 2016). Para la lectura de las placas, se examinan visualmente y se considera que el título de cada muestra será el recíproco de mayor dilución en el que no se presentó hemaglutinación (Figura 4) (Yoong, *et al*, 2004).

Este test se basa en la interacción entre RBC, IVA y anticuerpos. De presentarse inhibición de la hemaglutinación, los anticuerpos del suero antigénicamente similares al virus lo reconocerán y se unirán a este, evitando que el virus se una al RBC, y se observará un punto rojo en los pocillos. En caso de no presentarse dicha inhibición se formará una estructura reticulada y el pocillo quedará completamente rojo (CDC, 2017).



**Figura 6.** Lectura de una placa, en este caso el virus tiene un título de 1280, en este nivel de dilución, los anticuerpos todavía eran capaces de reconocer y unirse a los antígenos en el virus (obtenida de CDC, 2017).

### ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados obtenidos, fueron agrupados por grupo etario y luego analizados mediante análisis de varianza, ANOVA, y también con prueba de hipótesis, Chi cuadrado.

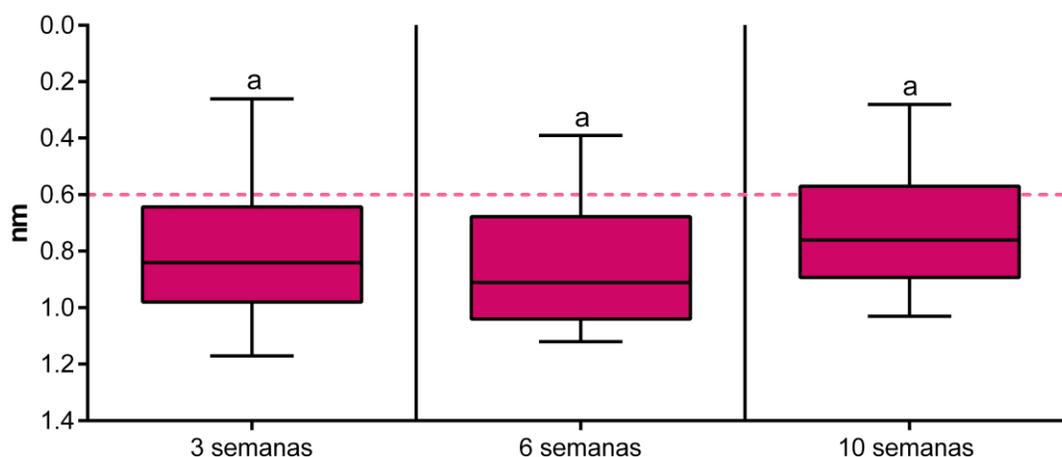
## RESULTADOS

Fueron analizadas 442 muestras provenientes de 7 granjas distintas, distribuidas a lo largo del país. De estas, un 58,1% resultaron positivas al test ELISA. Las 257 muestras positivas fueron testeadas mediante HI. Los resultados fueron visualizados por plantel en gráficos independientes para ELISA y para virus pandémico de referencia (559) que fue representado con color azul y mutante (1107) que fue representado con color verde. En todos los gráficos, aquellas muestras por sobre la línea punteada, son aquellas que se consideraron positivas.

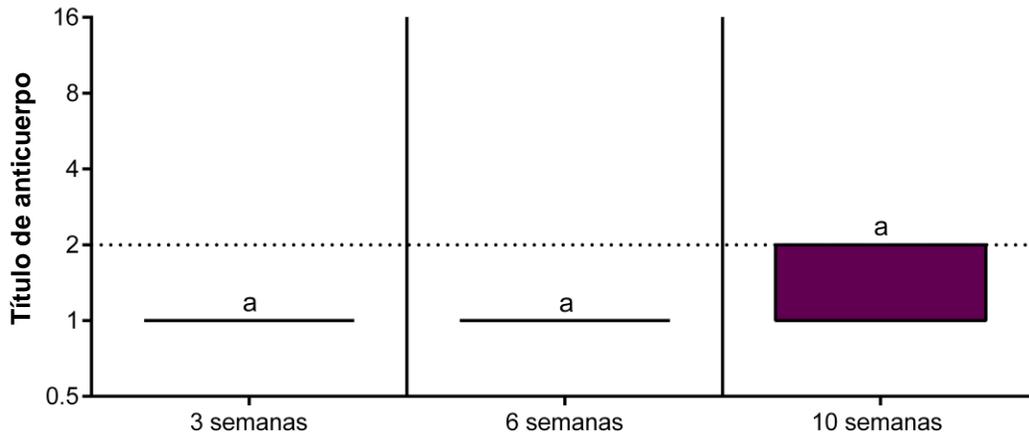
### PLANTEL A

En el plantel A se muestrearon un total de 84 muestras, de las cuales, 32 correspondían a las 3 semanas de edad, 20 a las 6 semanas de edad y 32 a las 10 semanas. Al ser sometidas al test ELISA, sólo 21 (25%) de ellas fueron positivas el virus de Influenza A; esto fue analizado por semanas de edad, el resultado es que, a las 3 semanas, 7 muestras (21,9%) resultaron ser positivas, a las 6 semanas sólo 3 (15%) fueron positivas y a las 10 semanas, 11 muestras (34,4%).

Al análisis ANOVA, ninguno de los grupos de edad, presentaba diferencias estadísticas. (Figura 7) y fueron agrupados dentro de mismo grupo, A.

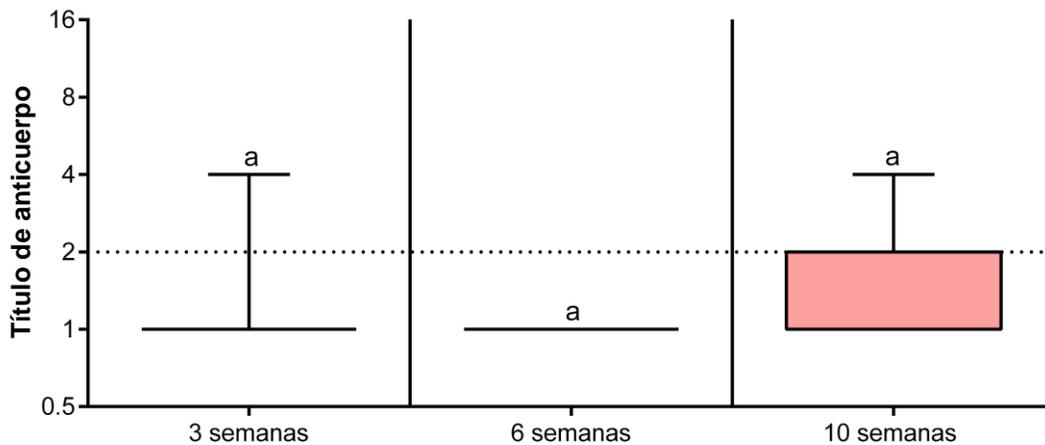


**Figura 7.** Resultados del test ELISA aplicado al plantel A, agrupados por semana. El valor nm corresponde a la relación del negativo con la muestra ( $a = p < 0,05$ ).



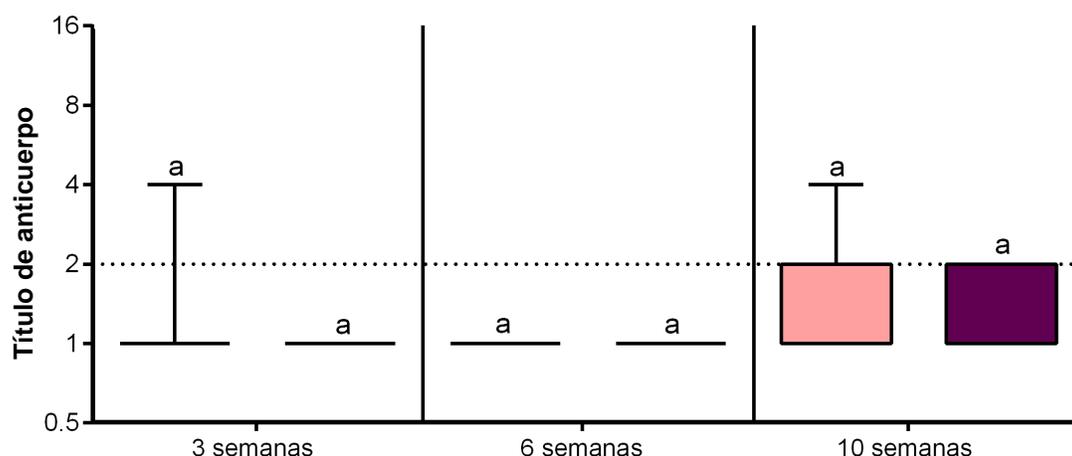
**Figura 8.** Resultados HI para el virus 559 plantel A, agrupados por semana de edad. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI ( $a = p < 0,05$ ).

A las 21 muestras positivas a ELISA, se les realizó HI, para 2 virus, de referencia y mutante, los resultados fueron los que se aprecian en la Figura 8 y Figura 9, respectivamente. En donde no se obtuvieron muestras positivas para el virus de referencia, y sólo 2 para la variante mutante, en la semana 3 y 10. Cabe destacar que este plantel corresponde a un plantel sin vacunación.



**Figura 9.** Resultados HI para el virus 1107 plantel A, agrupados por semana de edad. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI ( $a = p < 0,05$ ).

No hubo diferencias significativas en cuanto a carga viral de la variante de referencia y mutante, tal como se observa en la Figura 10, donde se ve que ambos virus se comportan de manera muy similar, dentro y entre semanas.



**Figura 10.** Resultados HI 1107 comparado con 559, plantel A. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI ( $a = p < 0,05$ ).

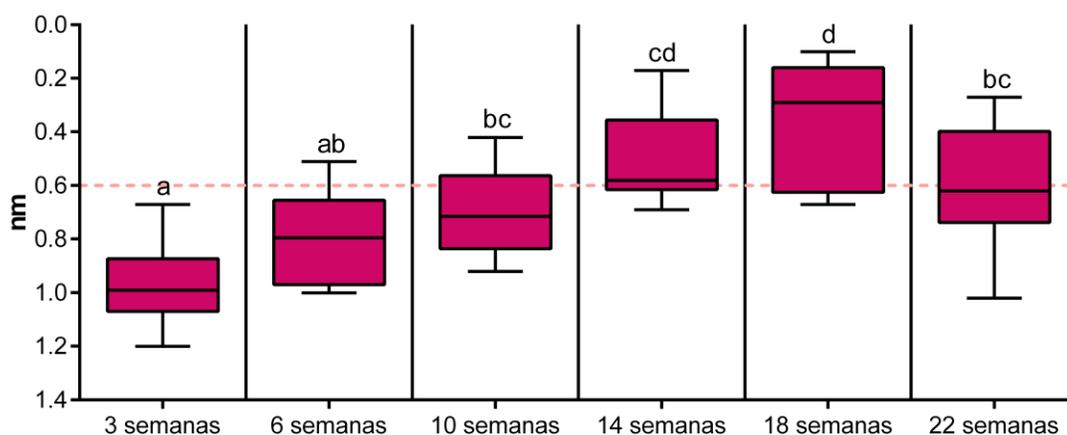
Los resultados de HI, de la semana 10 en adelante, esta incluida, fueron sometidos a la prueba de chi cuadrado, para analizar la significancia de los resultados a ambas variantes. Se determinó que, si existía una diferencia significativa, con un valor p de 0,0064.

#### PLANTEL B

De las 60 muestras que se recibieron, un 40% (24) de ellas fueron positivas al test ELISA, las cuales corresponden a todos los puntos por sobre la línea punteada. Si esto se desglosa por semana, entonces los resultados son los siguientes: sin muestras positivas en la semana 3, 2 muestras (20%) positivas en la semana 6, 3 muestras (30%) positivas en la semana 10, 7 muestras (70%) positivas en la semana 14 y en la 18 y finalmente, 5 muestras (50%) positivas en la semana 22. Tal como se observa en la Figura 11, donde además es claro que hubo un aumento paulatino de las muestras positivas, a medida que iban avanzando las semanas.

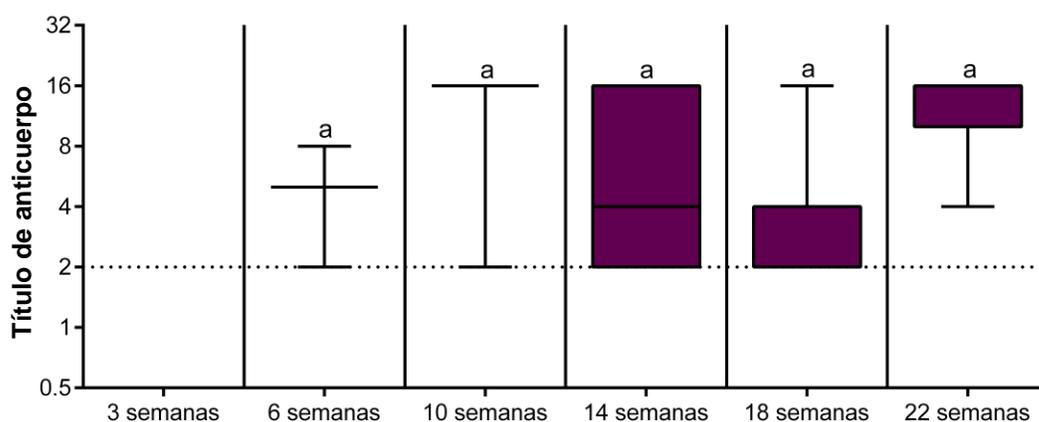
Frente al análisis ANOVA, la presencia de anticuerpos contra Influenza A, si tuvo una variación significativa entre las distintas semanas, siendo la semana 10 y la 22 las más

similares entre ellas. En el caso de la semana 3 comparte similitudes con la semana 6, y esta última, a su vez, es similar a la semana 10 y 22. La semana 18, sólo es similar con la semana 14, la cual también comparte parecido con la 10 y 22.



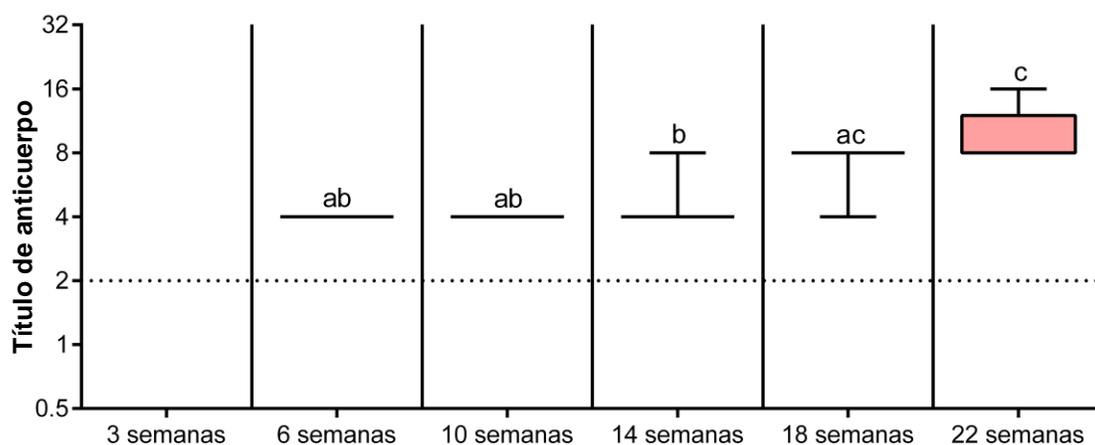
**Figura 11.** Resultados del test ELISA aplicado al plantel B, agrupados por semana. El valor nm corresponde a la relación del negativo con la muestra (a, ab, bc, cd, d =  $p < 0,05$ ).

A estas muestras positivas a ELISA, se les realizó HI, con ambas variantes. Los resultados para la variante de referencia se grafican en la Figura 12, donde se aprecia que en todas las semanas hubo muestras con títulos por sobre 2, lo cual, se deja en evidencia frente al análisis ANOVA, donde ninguna semana tuvo diferencias significativas con el resto.



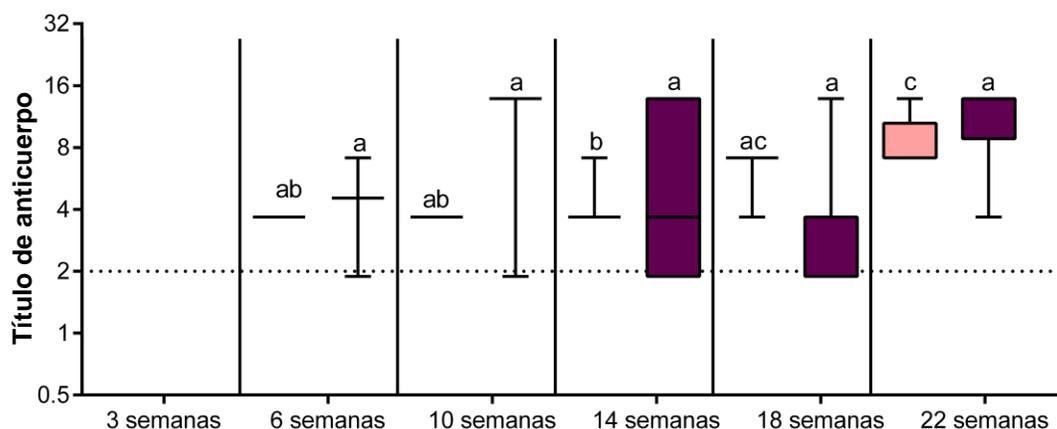
**Figura 12.** Resultados HI para el virus 559 plantel B, agrupados por semana de edad. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI (a =  $p < 0,05$ ).

Con respecto a la variante mutante, se encuentra que en la Figura 13, todos los títulos, están por sobre el mínimo aceptado para considerarse positivos a la presencia de anticuerpos contra esta variante en específico. Aunque, al analizarlo mediante ANOVA, nos encontramos con que, entre semanas, si hay diferencias, siendo la semana 6 y 10, las más similares, y la semana 14 presenta cierta similitud con ambas, la semana 22 es similar con la 18, y esta última se asemeja con la 6 y la 10.



**Figura 13.** Resultados HI para el virus 1107 plantel B, agrupados por semana de edad. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI (ab, b, ac, c =  $p < 0,05$ ).

Al momento de comparar los resultados para ambas variantes, de referencia y mutante, los títulos de la variante de referencia fueron más altos que para la mutante, sin embargo, la dispersión en los valores, entre mínimos y máximos, fue mayor. Esta situación queda en evidencia en la Figura 14.



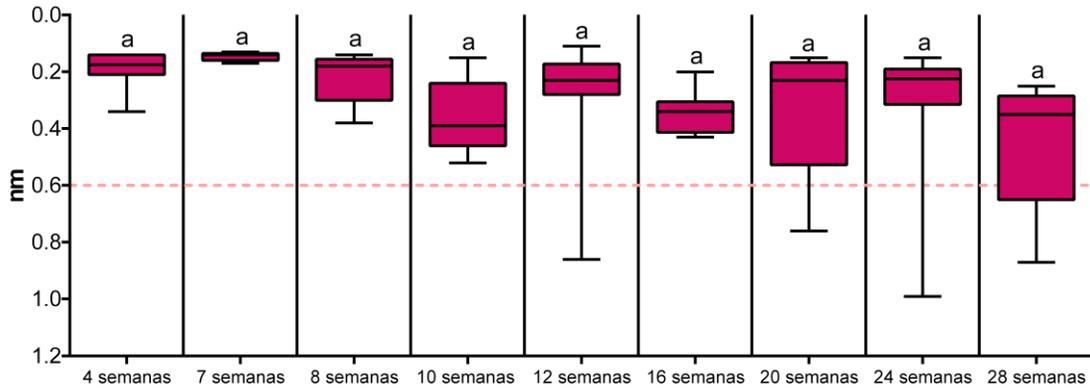
**Figura 14.** Resultados HI 1107 comparado con 559, plantel B. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI (a, ab, b, ac, c =  $p < 0,05$ ).

Los resultados de HI, de la semana 10 en adelante, esta incluida, fueron sometidos a la prueba de chi cuadrado, para analizar la significancia de los resultados a ambas variantes. Se determinó que, si existía una diferencia significativa, con un valor p de 0,0494.

#### PLANTEL C

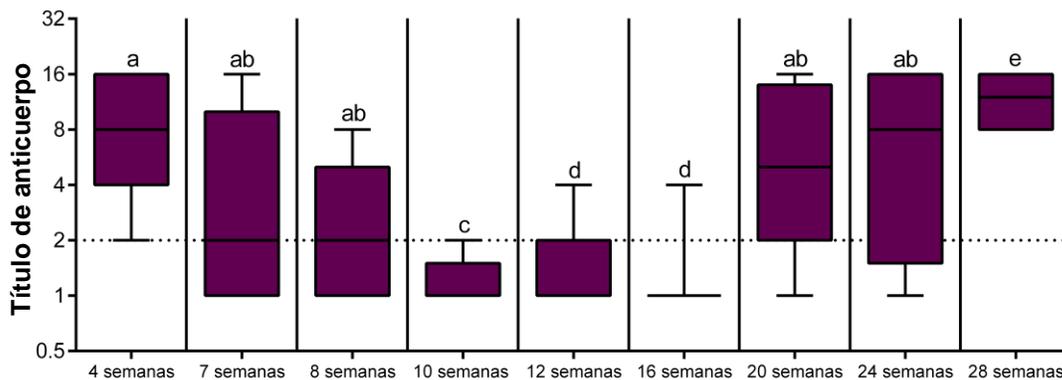
Se analizaron un total de 70 muestras, de las cuales 65 fueron positivas al test ELISA, lo que corresponde a un 92.9% del total. Al analizarlo por semana, encontramos que las semanas 4, 7, 8, 10 y 16 tienen un 100% de muestras positivas; las semanas 12 y 24 tienen 9 (90%) muestras positivas, cada una; y finalmente, las semanas 20 y 28, tienen 8 y 4 muestras positivas, respectivamente, lo que corresponde a un 80% en ambos casos. Esto es lo que se encuentra graficado en la Figura 15, donde se ve con claridad, la gran cantidad de muestras positivas al test.

Cuando fue analizado con ANOVA, se constató que entre semanas no hay diferencias significativas, y todas se comportan de una manera similar.



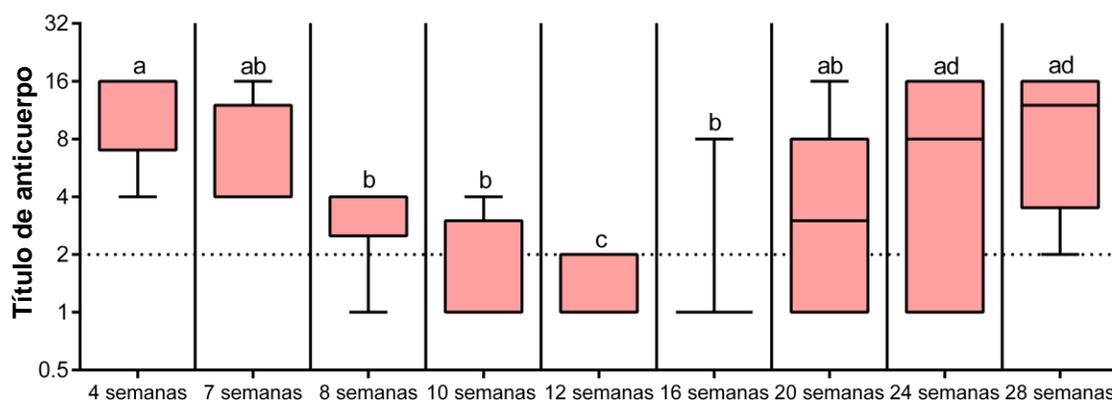
**Figura 15.** Resultados del test ELISA aplicado al plantel C, agrupados por semana. El valor nm corresponde a la relación del negativo con la muestra (a =  $p < 0,05$ ).

A las muestras positivas a ELISA, se les realizó HI, para la variante de referencia y mutante, para la variante de referencia, se obtuvieron los resultados graficados en la Figura 16. Las semanas 4, 7, 8, 20, 24 y 28, son aquellas donde los títulos de anticuerpos fueron más altos y hubo una menor cantidad de muestras por bajo el mínimo establecido; en cambio, en las semanas 10, 12 y 16, se encontraron la mayor cantidad de muestras con títulos por bajo 20. Al análisis ANOVA, se obtuvo que la semana 4, no tuvo diferencias significativas con las semanas 7, 8, 20 y 24; las semanas 12 y 16 no tuvieron diferencias significativas entre ellas, y, por último, las semanas 10 y 28, se comportaron distinto entre ellas y con el resto de las semanas muestreadas.



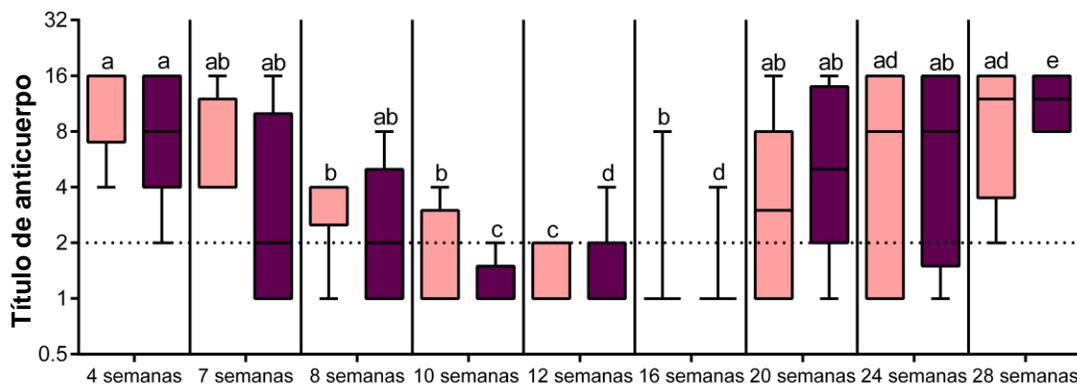
**Figura 16.** Resultados HI para el virus 559 plantel C, agrupados por semana de edad. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI (a, ab, c, d, e =  $p < 0,05$ ).

Los resultados obtenidos para la variante mutante se grafican en la Figura 17, donde se registraron los títulos más altos, en las semanas 4, 7, 10, 20, 24 y 28, y los títulos más bajos, se obtuvieron en las semanas, 10, 12 y 16. Al análisis ANOVA, las semanas 7, 8, 10, 16 y 20, tuvieron un comportamiento muy similar entre ellas; las semanas 24 y 28, no tuvieron diferencias entre ellas y con la semana 4, la cual además, se pareció a las semanas 7 y 20; a diferencia de la semana 12 que tuvo diferencias significativas con todas las demás.



**Figura 17.** Resultados HI para el virus 1107 plantel C, agrupados por semana de edad. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI (a, ab, b, c, ad =  $p < 0,05$ ).

Cuando se comparan los resultados obtenidos en ambos planteles, como se observa en la Figura 18, se observa que los títulos de anticuerpos para ambas variantes del virus fluctúan de manera similar en todas las semanas.

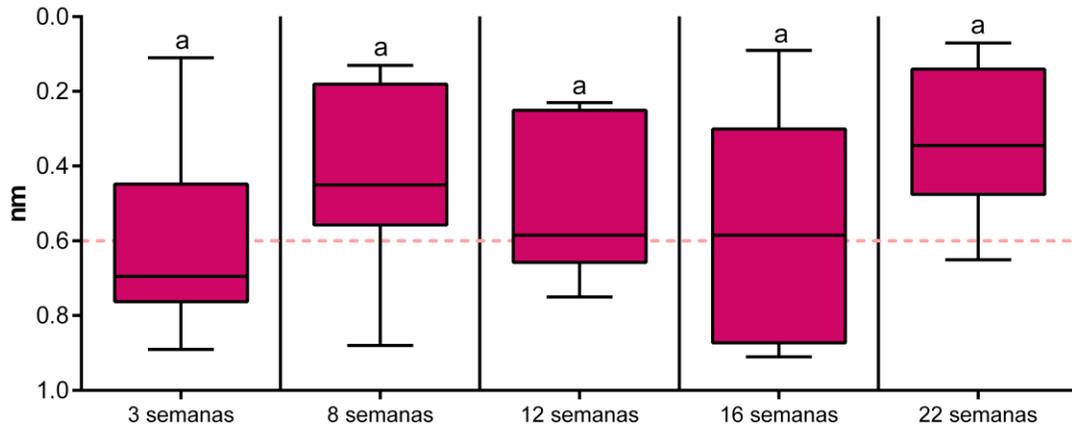


**Figura 18.** Resultados HI 1107 comparado con 559, plantel C. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI (a, ab, b, c, d, ad, e =  $p < 0,05$ ).

Los resultados de HI, de la semana 10 en adelante, esta incluida, fueron sometidos a la prueba de chi cuadrado, para analizar la significancia de los resultados a ambas variantes. Se determinó que, si existía una diferencia significativa, con un valor p de 0,00049.

#### PLANTEL D

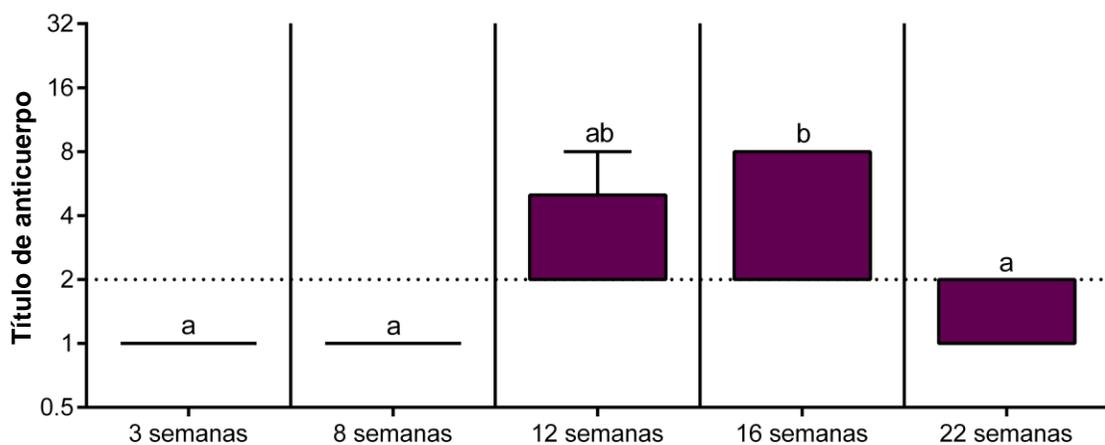
En el plantel, se obtuvo un total de 32 muestras positivas al test ELISA, lo cual corresponde a un 64% del total de 50 muestras analizadas. Al realizar el desglose por semana, se obtuvo en la semana 3, un total de 4 (40%) muestras positivas; en la semana 8, hubo 8 (80%) de muestras positivas; en la semana 12, se encontraron 6 (60%) de muestras positivas al test; y finalmente, en las semanas 16 y 22, se obtuvieron 5 (50%) y 9 (90%) de muestras positivas, respectivamente, tal como se grafica en la Figura 19. Al realizar el análisis estadístico, mediante ANOVA, resultó que, a pesar de estas varianzas en la cantidad de muestras positivas, no hubo diferencias significativas, entre las diferentes semanas muestreadas.



**Figura 19.** Resultados del test ELISA aplicado al plantel D, agrupados por semana. El valor nm corresponde a la relación del negativo con la muestra ( $a = p < 0,05$ ).

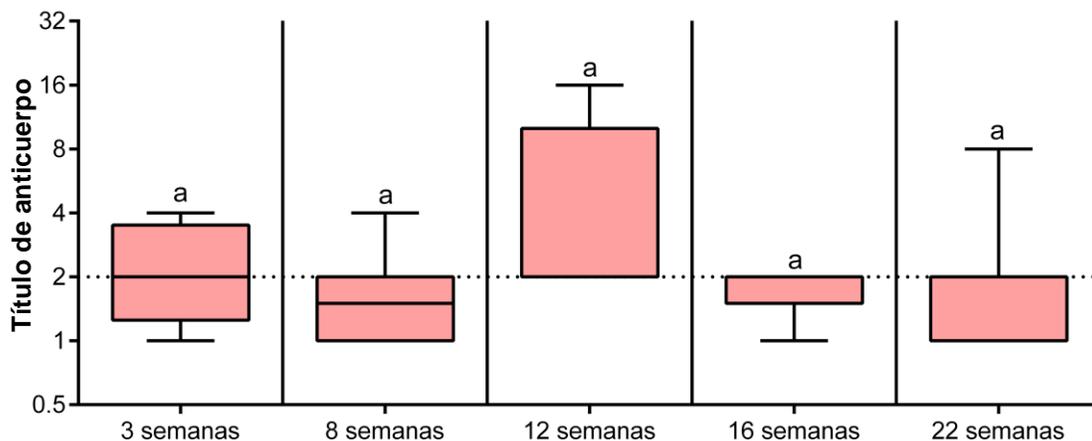
En cuanto al HI, se usaron las 2 mismas variantes que en los otros planteles, de referencia y mutante, y los resultados se pueden ver en las Figuras 20 y 21.

Los resultados para la variante de referencia fueron con títulos bajos, la mayoría bajo 20, que es el título mínimo que se consideró para poder tomar la carga de anticuerpos como algo significativo para el estudio. Al análisis ANOVA, las semanas presentaban diferencias entre ellas, siendo la 3, 12 y 22 muy similares entre si, y la semana 16 sólo similar con la semana 8, aunque esta última también se asemejaba con la 3, 12 y 22.



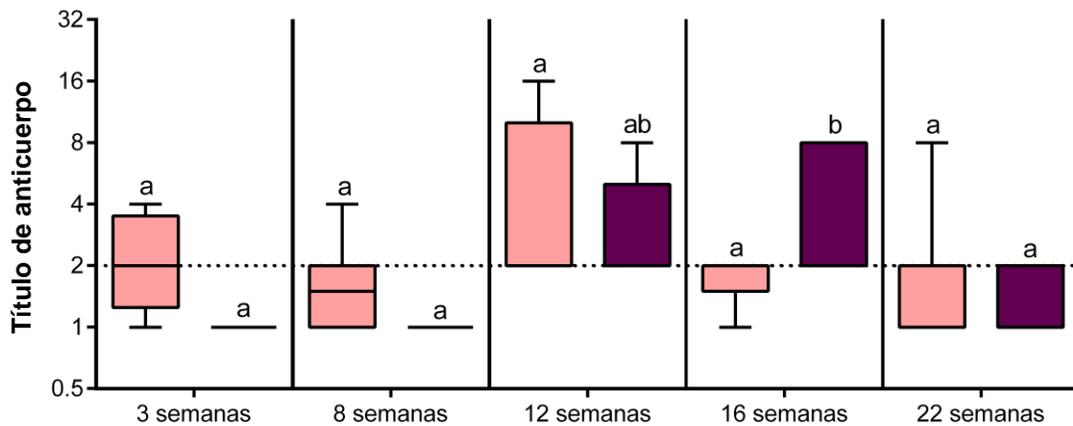
**Figura 20.** Resultados HI para el virus 559 plantel D, agrupados por semana de edad. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI ( $a, ab, b = p < 0,05$ ).

En cuanto a la variante mutante, en la mayoría de las semanas se registraron muestras con títulos por sobre 20, a excepción de la semana 16, donde ninguna muestra obtuvo títulos por sobre el mínimo establecido. Al análisis ANOVA, ninguna semana tuvo diferencias significativas entre ellas.



**Figura 21.** Resultados HI para el virus 1107 plantel D, agrupados por semana de edad. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI ( $a = p < 0,05$ ).

Al comparar los resultados obtenidos con ambas variantes del virus, de referencia y mutante, se aprecia en la Figura 22, que, para el virus mutante, los títulos de anticuerpo fueron más altos en las semanas 3, 8, 12 y 22, y en la semana 16 fue en la única en la cual los títulos fueron mayores para la variante de referencia.



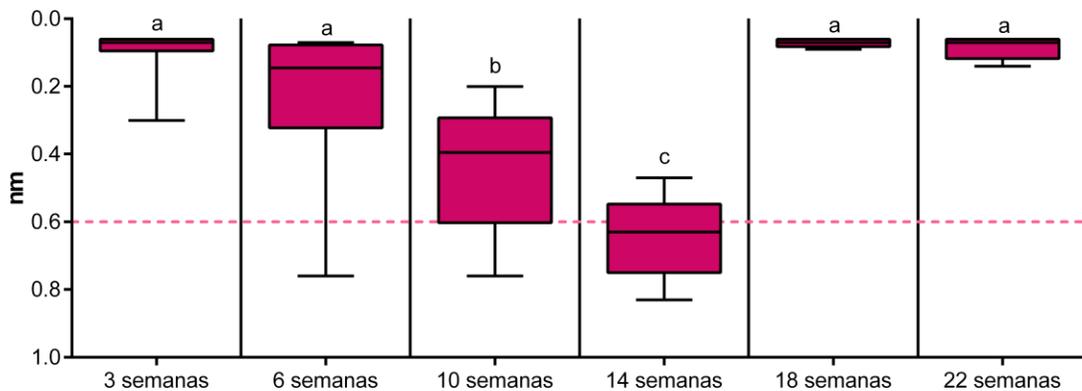
**Figura 22.** Resultados HI 1107 comparado con 559, plantel D. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI (a, ab, b =  $p < 0,05$ ).

Los resultados de HI, de la semana 10 en adelante, esta incluida, fueron sometidos a la prueba de chi cuadrado, para analizar la significancia de los resultados a ambas variantes. Se determinó que, si existía una diferencia significativa, con un valor p de 0,00199.

#### PLANTEL E

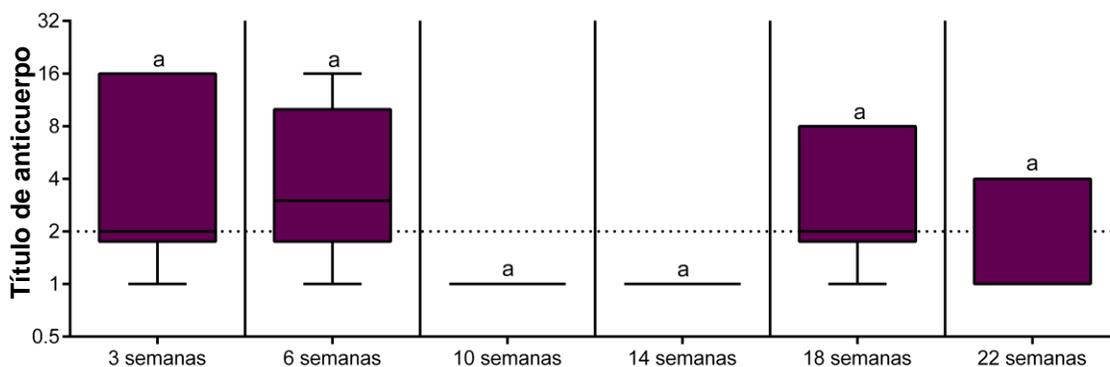
De las 60 muestras tomadas en el plantel E, 50 (83,3%) de ellas resultaron positivas al test ELISA. En el desglose por semana, se obtiene que la semana 3, 10 (100%) muestras fueron positivas, en las semanas 6, 10 y 14 se obtuvo una disminución constante de las muestras positivas, obteniendo 9 (90%), 7 (70%) y 4 (40%) de positivas, respectivamente, teniendo la semana 6, una variación menor con respecto a la 3, en comparación a las otras semanas; finalmente en las semanas 18 y 22, esto vuelve a aumentar teniendo un 100% en ambas semanas. Esto se refleja claramente en el gráfico de la Figura 23.

Al análisis ANOVA, se obtuvo que las semanas 3, 6, 18 y 22, no tienen diferencias significativas, a diferencia de las semanas 10 y 14, las cuales son diferentes entre ellas y, además, con el resto de las semanas.



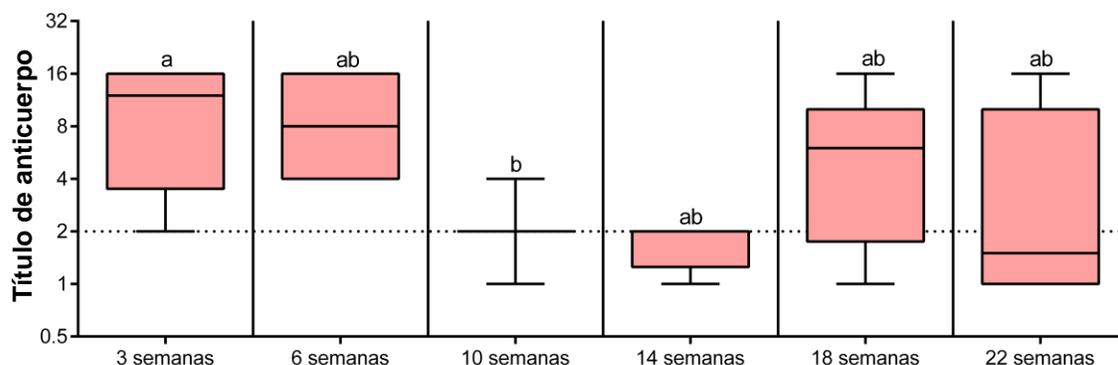
**Figura 23.** Resultados del test ELISA aplicado al plantel E, agrupados por semana. El valor nm corresponde a la relación del negativo con la muestra (a, b, c =  $p < 0,05$ ).

De las 50 muestras positivas, a todas se les hizo HI para la variante de referencia y mutante, en el caso de la primera, se obtuvieron resultados con títulos, por sobre el mínimo establecido, en las semanas 3, 6, 18 y 22; a diferencia de las semanas 10 y 14, donde todos los títulos estuvieron por debajo el mínimo establecido. Sin embargo, al análisis ANOVA, todas las semanas tuvieron un comportamiento sin diferencias significativas entre ellas, tal como se observa en el gráfico de la Figura 24.



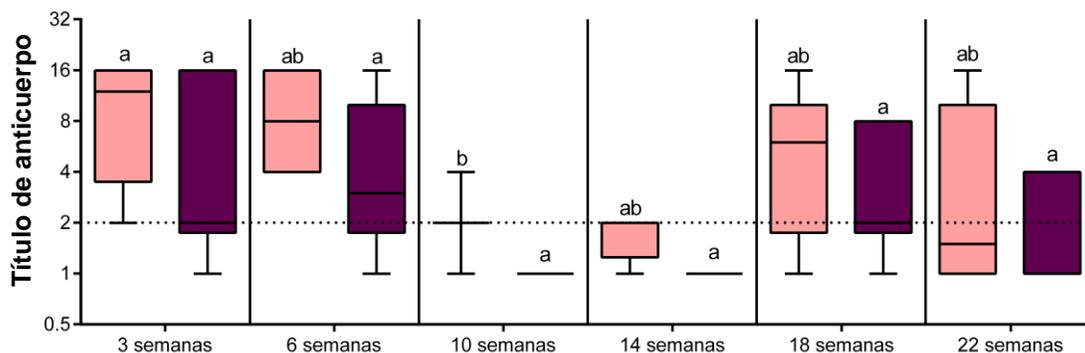
**Figura 24.** Resultados HI para el virus 559 plantel E, agrupados por semana de edad. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI (a =  $p < 0,05$ ).

En el caso de la variante mutante, se observa en la Figura 25, que se obtuvieron títulos por sobre el mínimo establecido, en las semanas 3, 6, 10, 18 y 22, siendo la semana 14 la que obtuvo los títulos más bajos en comparación a las otras semanas. Al análisis ANOVA, la semana 3, no tuvo diferencias significativas con la semana 6, 14, 18 y 22, las cuales tampoco tuvieron diferencias significativas con la semana 10, sin embargo, esta última, si tuvo un comportamiento distinto con la semana 3.



**Figura 25.** Resultados HI para el virus 1107 plantel E, agrupados por semana de edad. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI (a, ab, b =  $p < 0,05$ ).

Al comparar ambos resultados, tanto para la variante mutante como para la de referencia, se hace evidente que para la primera se obtuvieron títulos más altos. Tal como se puede ver en la Figura 26.



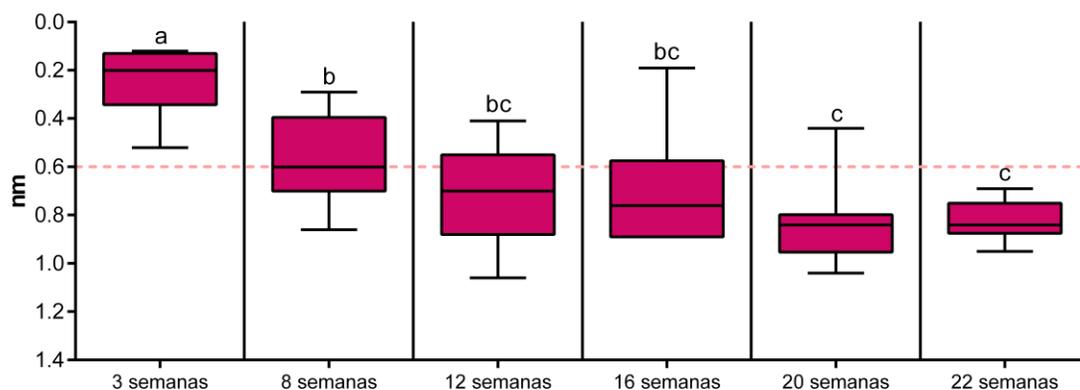
**Figura 26.** Resultados HI 1107 comparado con 559, plantel E. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI (a, ab, b =  $p < 0,05$ ).

Los resultados de HI, de la semana 10 en adelante, esta incluida, fueron sometidos a la prueba de chi cuadrado, para analizar la significancia de los resultados a ambas variantes. Se determinó que, si existía una diferencia significativa, con un valor p de 0,00049.

#### PLANTEL F

De las 58 muestras analizadas, 21 fueron positivas al test ELISA, lo que se traduce en un 36,2% del total de muestras. Si se evalúa esto por semanas, los resultados son que en la semana 3, de 10 muestras analizadas, las 10 fueron positivas (100%); en la semana 8, 4 (44,4%) muestras fueron positivas; mientras que en la semana 12 y 16, sólo 3 (30%) muestras fueron positivas en cada uno; finalmente en la semana 20 y 22 fue donde menos casos positivos se encontraron, obteniendo sólo 1 (10%) muestra positiva en la semana 10 y 0% en la semana 22. Esto se aprecia claramente en la Figura 27, donde se ve claramente que la cantidad de muestras positivas va disminuyendo progresivamente hasta llegar a 0 en la última semana muestreada.

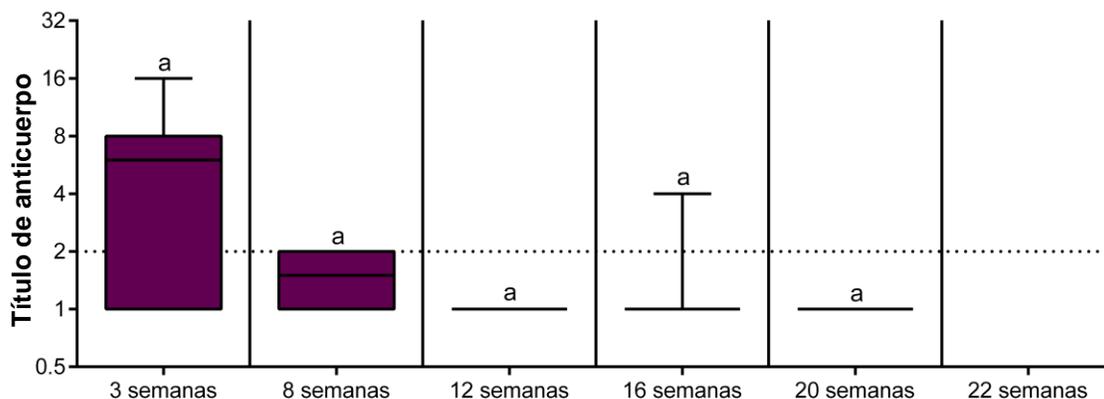
Frente al análisis ANOVA, las semanas con menos diferencias significativas, fueron las 20 y 22 y las semanas 12 y 16, éstas últimas teniendo un comportamiento parecido con la semana 8 también, y la semana 3, presentó diferencias con todas las demás.



**Figura 27.** Resultados del test ELISA aplicado al plantel F, agrupados por semana. El valor nm corresponde a la relación del negativo con la muestra (a, b, bc, c =  $p < 0,05$ ).

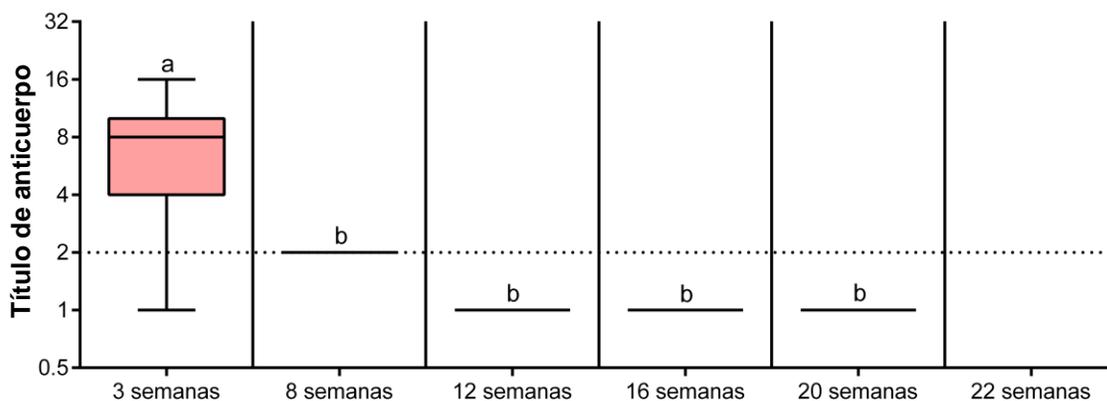
De estas muestras positivas, cuando se les realizó HI para la variante de referencia, se puede ver, en la Figura 28, que en la semana 3 se tienen títulos más altos, y las semanas 8, 12 y 20

no tuvieron ninguna muestra con títulos mayores al establecido para considerar las muestras con la suficiente cantidad de anticuerpos frente al virus de referencia. Sin embargo, al análisis ANOVA, no hubo diferencias significativas entre semanas.



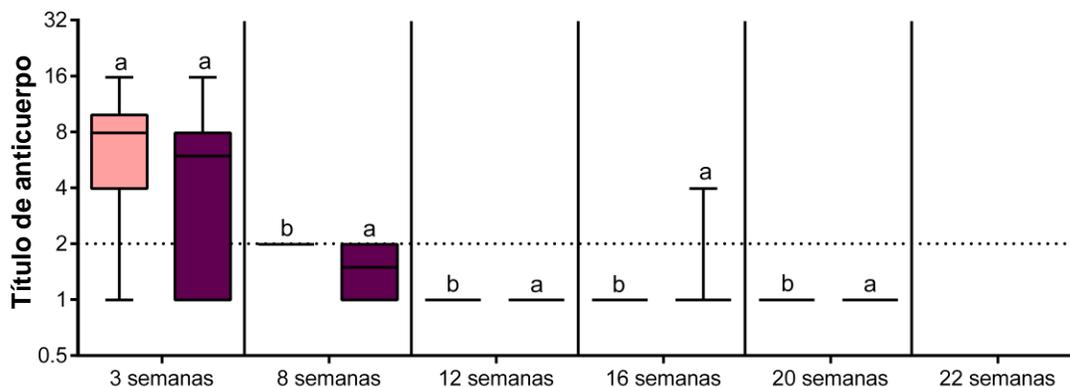
**Figura 28.** Resultados HI para el virus 559 plantel F, agrupados por semana de edad. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI ( $a = p < 0,05$ ).

En los resultados del HI para el virus mutante, graficados en la Figura 29, se obtuvo títulos más altos en la semana 3, siendo esta la única con muestras con títulos por sobre el mínimo establecido, esta situación se refleja en el análisis ANOVA, donde se obtuvo que la semana 3, tuvo diferencias significativas con la semana 8, 12, 16 y 20, y estas a su vez fueron muy similares entre ellas.



**Figura 29.** Resultados HI para el virus 1107 plantel F, agrupados por semana de edad. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI ( $a, b = p < 0,05$ ).

Al comparar los resultados obtenidos tanto para la variante de referencia como para la variante mutante, Figura 30, se aprecia que ambos tuvieron títulos similares en las distintas semanas muestreadas, presentando la semana 3 los títulos más altos en ambos casos.



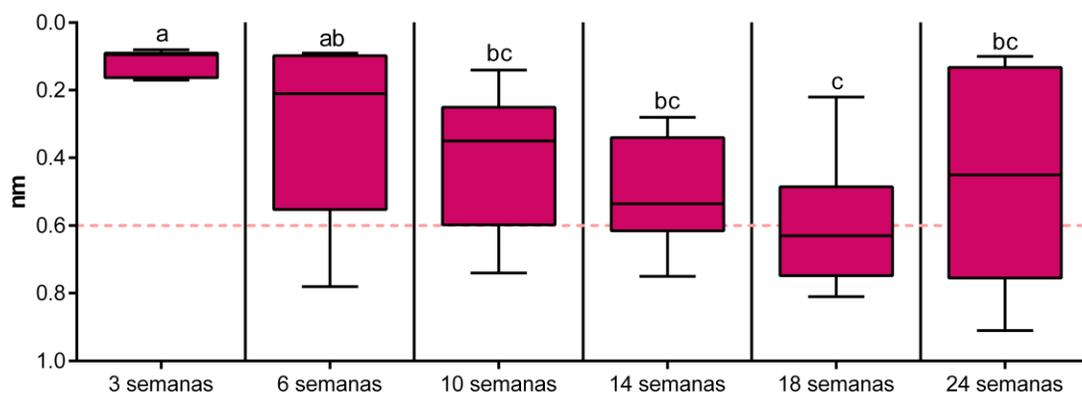
**Figura 30.** Resultados HI 1107 comparado con 559, plantel F. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI (a, b =  $p < 0,05$ ).

Los resultados de HI, de la semana 10 en adelante, esta incluida, fueron sometidos a la prueba de chi cuadrado, para analizar la significancia de los resultados a ambas variantes. Sin embargo, no pudieron ser analizados, debido a que el tamaño muestral era demasiado pequeño.

#### PLANTEL G

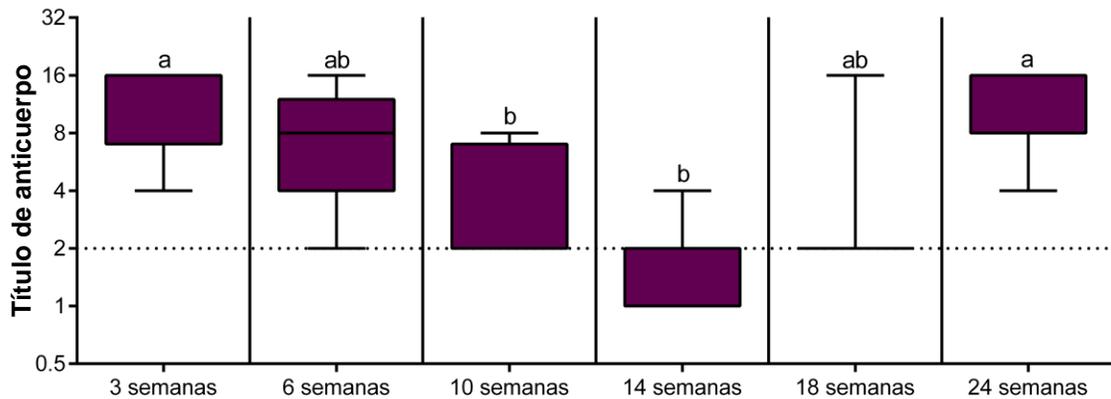
De las 60 muestras analizadas, 44 fueron positivas al test ELISA, lo que corresponde a un 73,3% del total. Al desglosar los resultados por semana, se obtiene que, en la semana 3, 10 (100%) de muestras fueron positivas; en la semana 6, 9 (90%) resultaron positivas; en la semana 10, 8 de 10 muestras (80%) fueron positivas; en la semana 14 y 24, 7 (70%) muestras fueron positivas en cada una; y finalmente, en la semana 18, sólo se obtuvieron 3 (30%) muestras positivas, siendo la semana con menos positividad al test. Todo esto se puede ver en la Figura 31, donde además se observa que la cantidad de muestras positivas en las diferentes semanas presenta un descenso marcado hasta la semana 18, para luego volver a aumentar en la semana 24.

Al análisis ANOVA, la semana 3, tiene un comportamiento similar con la semana 6, y esta a su vez, presenta similitud con las semanas 10, 14 y 24, las cuales, también comparten cierta semejanza con la semana 18.



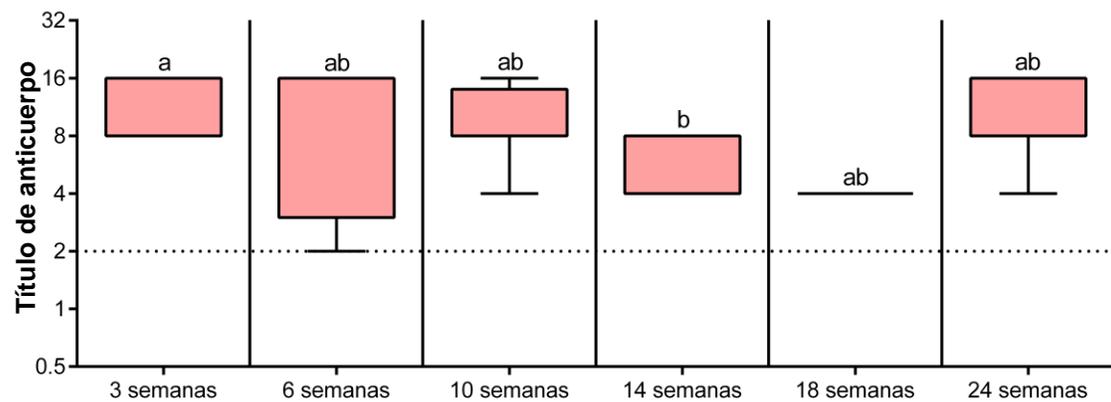
**Figura 31.** Resultados del test ELISA aplicado al plantel G, agrupados por semana. El valor nm corresponde a la relación del negativo con la muestra (a, ab, bc, c =  $p < 0,05$ ).

A las muestras positivas al test ELISA, se les realizó HI para las variantes de referencia y mutante, los resultados se aprecian en la Figura 32 y 33, respectivamente. Con respecto a los resultados para la variante de referencia, se aprecia que la semana 3 y 24 son aquellas con títulos más altos, y, las semanas 10 y 14 son las que presentaron títulos más abajo, esto frente al análisis ANOVA, se traduce en que las semanas 3 y 24 y las semanas 10 y 14, tienen menos diferencias significativas entre ellas, y que las semanas 6 y 18 tienen un comportamiento similar a todas las semanas anteriores.



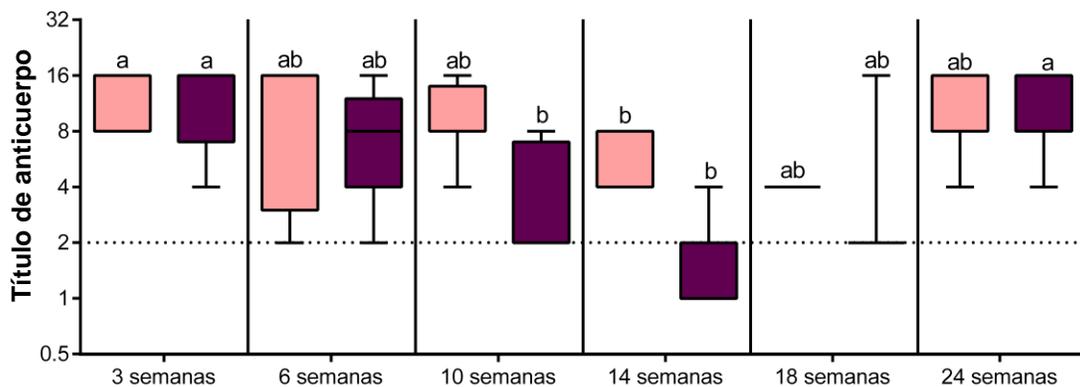
**Figura 32.** Resultados HI para el virus 559 plantel G, agrupados por semana de edad. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI (a, ab, b =  $p < 0,05$ ).

En el caso de los resultados obtenidos para la variante mutante, se aprecia que en todas las semanas se obtuvieron títulos similares, siendo las semanas 3 y 14, las únicas con diferencias más significativas, presentando la semana 3, títulos más altos que la semana 14. Al análisis ANOVA, esto se refleja al ser las semanas 6, 10, 18 y 24 parecidas a las semanas 3 y 14, pero entre estas si se presentan diferencias.



**Figura 33.** Resultados HI para el virus 1107 plantel G, agrupados por semana de edad. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI (a, ab, b =  $p < 0,05$ ).

Al comparar los resultados para ambas variantes, se aprecia claramente en la Figura 34, que en las semanas 10 y 14 es donde se presentan mayores diferencias, encontrando títulos más altos, para la variante mutante.

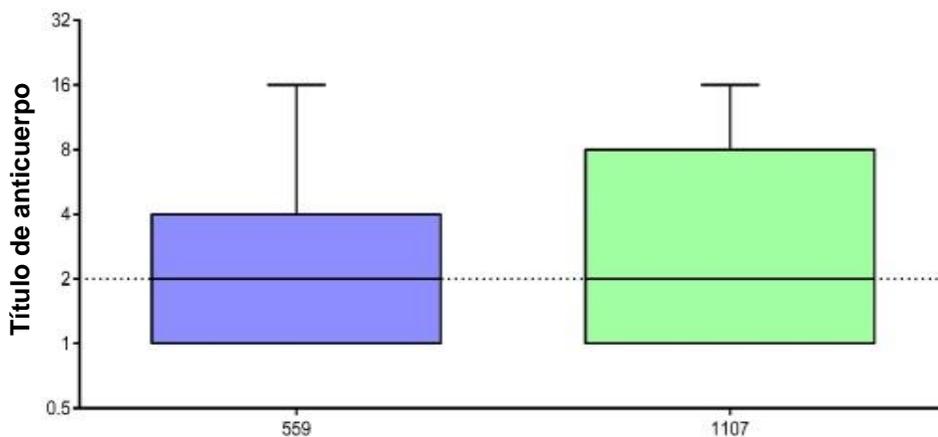


**Figura 34.** Resultados HI 1107 comparado con 559, plantel G. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI (a, ab, b =  $p < 0,05$ ).

Los resultados de HI, de la semana 10 en adelante, esta incluida, fueron sometidos a la prueba de chi cuadrado, para analizar la significancia de los resultados a ambas variantes. Se determinó que, si existía una diferencia significativa, con un valor p de 0,00049.

#### RESULTADOS GENERALES HI

Los resultados de HI de todos los planteles muestreados y de la semana 10 en adelante, esta incluida, fueron agrupados y sometidos a la prueba de chi cuadrado, para analizar la significancia de los resultados a ambas variantes. Se determinó que, si existía una diferencia significativa, con un valor p de 0,00049.



**Figura 35.** Resultados general HI, para ambas variantes virales, comparado. El título de anticuerpos es el valor recíproco del título del HI.

## DISCUSIÓN

En este estudio se buscó comprobar la presencia de 2 variantes antigénicas de H1N1 pandémico 2009, usando serología en granjas porcinas nacionales. Para poder demostrar la presencia de estas variantes, se utilizó como prueba genérica, el test ELISA, y como prueba específica, HI. Cabe destacar, que ambas pruebas detectan anticuerpos, los cuales pueden originarse, por infección natural o inmunidad materna.

De acuerdo a lo anterior, es necesario recalcar que no se detectó virus de manera directa, sin embargo, se extrapolaron los resultados serológicos obtenidos, que, al ser analizados, demuestran que en todos los planteles existe evidencia de la presencia del virus Influenza A. Esto concuerda con estudios previos que indican el virus es ubicuo en la producción porcina nacional y mundial (Tapia, 2018; Vincent *et al.*, 2013).

El virus de influenza A, fue detectado mediante ELISA en un 58,1% (257/442) de las muestras analizadas, observando un rango de 21% a 92,5% entre planteles. En plantel A donde se registró la menor cantidad de muestras positivas con un 21% (25/84) de positividad y el plantel con mayor número de positivos fue el plantel C, con un 92,9%, (65/70). Esto soporta la idea de que Influenza A, a pesar de ser ubicua en las explotaciones de cerdos tiene dinámicas infecciosas distintas en cada uno de ellos. El comportamiento serológico del virus a nivel predial puede estar condicionado por: tipo de virus, programa de vacunación (Markowska-Daniel *et al.*, 2011), tipo de vacuna (Vincent *et al.*, 2010), factores del plantel, como el ingreso no controlado de animales (Simon-Grifé *et al.*, 2011), uso de ciclo completo o sistema all in-all out (Corzo *et al.*, 2014) y/o cantidad de cerdos por metro cuadrado (Mastin *et al.*, 2011).

Por otra parte, los resultados al análisis de Inhibición de la Hemaglutinación o HI sugieren que en al menos 1 de los 7 planteles muestreados no se presenta virus pandémico. No se encontró evidencia suficiente para demostrar la presencia de las variantes pandémica en el plantel A. De la mano de esto, al extrapolar los resultados de HI con los de ELISA, se presencia la probable existencia de otro linaje de virus.

Ahora bien, considerando la inmunidad materna que se registró en algunos planteles, específicamente en 6 de 7, es importante destacar tres cosas; primero, que esta la obtienen los lechones a partir del calostro y la leche, ya que, las inmunoglobulinas, en el caso de los cerdos no pueden atravesar la placenta (Salmon, *et al.* 20008), en segundo lugar, que dicha inmunidad pasiva, perdura hasta las 10 semanas (Cador, *et al.* 2016), por lo tanto, se consideran hallazgos importantes todos los encontrados desde las 10 semanas. Por último, es que es recomendado la vacunación en cerdas gestantes, para que estas puedan transferir su inmunidad a los lechones (Quiles, *et al.* 2013). Sin embargo, no en todos los planteles estudiados se realizaba esta medida, y en algunos, la inmunidad materna, se dio por infección natural. Específicamente en 4 planteles se vacunó y en 2, la infección se dio de manera natural.

## RESULTADOS AGRUPADOS

Con el objetivo de poder analizar de mejor manera los resultados de los análisis, es que se agruparon los resultados, considerando 3 criterios: ELISA, Test de inhibición de la Hemaglutinación o HI, y vacunación de las cerdas.

### ELISA

Se pudieron identificar 4 perfiles serológicos diferentes. Uno de estos perfiles se identificó en 3 de los 7 planteles analizados, estos fueron los planteles A, C, D y G, los que tuvieron resultados similares, y se puede notar al comparar los gráficos respectivos, donde se observa en todas las semanas de muestreo la presencia de muestras positivas y negativas en igual cantidad. Esto se puede deber a que, a pesar de haber presencia de anticuerpos maternos, la protección no es completa, y los lechones se encuentran parcialmente protegidos (Loeffen, *et al.* 2003), lo que ocasiona que de igual manera se presente infección en las semanas posteriores. Con respecto a los demás planteles, todos tuvieron patrones diferentes perfiles serológicos.

### Plantel B

En este plantel las cerdas no son vacunadas, por lo tanto, no se observan anticuerpos de origen materno, sin embargo, estos se ven expuestos al virus de manera natural dentro del plantel y

presentan una respuesta serológica marcada, por el desarrollo de inmunidad activa (Cador, *et al.* 2016), llegando a un 70% de sueros positivos

#### Plantel E

Se observa una transferencia de inmunidad materna homogénea, en la primera semana muestreada, la cual tuvo un descenso gradual hasta la semana 10, y en la semana 14 ya se aprecia la aparición de inmunidad activa, teniendo en las últimas 2 semanas muestreadas, un 100% de muestras positiva; con esto, se puede concluir que los animales, se encuentran expuestos al virus dentro del plantel de manera natural, y, además, debería existir una alta circulación viral ya que todos los ejemplares desarrollaron inmunidad.

#### Plantel F

En este plantel las cerdas son vacunadas, sin embargo, se presenta una heterogeneidad en los perfiles serológicos individuales, en la semana 3, que si bien, todos son positivos, algunos tienen títulos más bajos que otros, esto se puede deber a un consumo desigual de calostro por los lechones, de todas formas, en las semanas siguientes, no se observó una respuesta serológica detectable. Esto se puede interpretar como una gran homología entre la cepa vacunal y la variante viral presente en el plantel, por lo que, la protección es más eficiente y logra los resultados esperados (Cador, *et al.* 2016).

#### TEST DE INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN (HI)

Al momento de comparar los resultados obtenidos, por plantel, en ambas pruebas diagnósticas, ELISA y HI, se evidencia que, en 4 de estos, los animales, se están infectando con una variante viral que no corresponde a las que normalmente se encuentran en los planteles chilenos (Tapia, 2018) y que no fue estudiada en este trabajo, siendo en 1 de ellos, la variante predominante. Los gráficos comparativos se pueden encontrar en los anexos, del 3 al 9.

Estos planteles son el A, C, D y E, en los cuales, al comparar los gráficos de los resultados obtenidos para ELISA y HI, se hace notorio que, en ciertas semanas, la cantidad de sueros positivos a influenza A, no es similar con los títulos obtenidos ni para la variante de referencia, ni para la mutante.

Con respecto a los planteles B, F y G, estos tuvieron resultados similares en ambas pruebas, y esta semejanza se puede interpretar como que sólo esas 2 variantes virales son las que se encuentran infectando a los individuos.

## VACUNACIÓN

De los planteles muestreados, no todos realizan vacunación de las cerdas. Los planteles que sí toman esta medida son el C, E, F y G, los cuales se identifican en el test ELISA por tener una presencia homogénea de anticuerpos en la primera semana muestreada.

Al comparar la reinfección de estos lechones, con los de las granjas donde no se realiza vacunación a las cerdas, se debería encontrar un porcentaje menor de sueros positivos, posterior a la semana 10, que es cuando la inmunidad pasiva ya comienza a disminuir sus niveles; esto debido a que, si bien algunos lechones se pueden infectar durante el periodo de transición, esta infección es inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpos calostrales recibidos de la cerda (Quiles, *et al.* 2013). Sin embargo, se puede ver que esto, en la práctica, no funciona así, ya que, por ejemplo, en el plantel C, durante todas las semanas muestreadas, el porcentaje de sueros positivos se mantuvo alto, sobre 90%. Esto se explica, probablemente, en que la vacuna que se utiliza en los planteles chilenos no es específica para la variante chilena (Tapia, 2018), porque en todos los planteles que sí vacunan, los anticuerpos para el virus mutante son significativamente mayores que para el de referencia y, en el otro plantel, se encuentra una tercera variante, desconocida.

La variación antigénica del virus influenza, supone un gran problema para el control de dicha enfermedad, se necesita una vacuna que proporcione una protección más amplia contra esta variación (Kitikoon, *et al.* 2008).

## **CONCLUSIÓN**

Existe evidencia serológica de la variante mutante 1107 del virus pH1N109, en la mayoría de los planteles muestreados, específicamente en 6 de 7.

La variabilidad antigénica fue más significativa 4 planteles C, D, E y G.

Exista una tercera variante en los planteles A, C, D y E. Y en algunos de estos, no había sido descrita anteriormente.

La vacunación no tiene el efecto protector deseado, porque no se consideran las variantes locales de virus pH1N109 y existe una tercera variante no estudiada en algunos planteles.

## BIBLIOGRAFÍA

**ALEXANDER, D.** 2008. *Orthomyxoviridae* – avian influenza. **In:** Pattison, M.; McMullin, P.; Bradbury, J.; Alexander, D. Poultry Diseases. 6° ed. Saunders, Elsevier. Inglaterra. pp. 317-332.

**CADOR, C.; HERVE, S.; ANDRAUD, M.; GORIN, S.; PABOEUF, F.; BARBIER, N.; QUEGUINER, S.; DEBLANC, C.; SIMON, G.; ROSE, N.** 2016. Maternally-derived antibodies do not prevent transmission of swine influenza A virus between pigs. *Vet Res.* 47:86.

**CANALS, M.** 2010. Análisis comparado de la dinámica epidemiológica de la Influenza A (H1N1) en Chile. *Rev Med Chile.* 138: 1186-1196.

**CDC. CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION.** 2017. Influenza (flu), Antigenic Characterization. [en línea] <<https://www.cdc.gov/flu/professionals/laboratory/antigenic.htm>> [consulta: 03-08-2018].

**CHERRY, J.; LIPMAN, D.; NIKOLSKAYA, A.; WOLF, Y.** 2009. Evolutionary Dynamics of N-Glycosylation Sites of Influenza Virus Hemagglutinin. *PLoS Curr.* 1: RRN1001.

**CORZO, C.; MORRISON, R.; FITZPATRICK, A.; CULHANE, M.** 2014. Risk factors for detecting influenza A virus in growing pigs. *J. Swine Health Prod.* 22(4): 176-184.

**DIREKSIN, K.; JOO, H.; GOYAL, S.** 2002. An inmunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibodies against swine influenza virus. *Journal of veterinary diagnostic investigation.* 14(2): 169-171.

**EISFELD, A.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y.** 2014. Influenza A virus isolation, culture and identification. *Natura Protocols.* 9(11): 2663-2681.

**IDEXX LABORATORIES INC.** Swine Influenza Virus (SIV) Testing Solutions. [en línea] <<https://www.idexx.com/en/livestock/livestock-tests/swine-tests/idexx-swine-influenza-virus-ab-test/>> [consulta:19-07-2018].

**JANKE, B.** 2000. Diagnosis of swine influenza. *Journal of Swine Health and Production*. 8(2): 79-84.

**KITIKOON, P.; STRAIT, E.; THACKER, E.** 2007. The antibody responses to swine influenza virus (SIV) recombinant matrix 1 (rM1), matrix 2 (M2), and hemagglutinin (HA) proteins in pigs with different SIV exposure. *Vet Mic*. 129: 51-62.

**KOBAYASHI, Y.; SUZUKI, Y.** 2012. Compensatory Evolution of Net-Charge in influenza A Virus Hemagglutinin. *Plos ONE*. 7(7): e40422.

**LOEFFEN, W.; HEINEN, P.; BIANCHI, A.; HUNNEMAN, W.; VERHEIJDEN, J.** 2002. Effect of maternally derived antibodies on the clinical signs and immune response in pigs after primary and secondary infection with and influenza H1N1 virus. *Vetimm*. 92: 23-35.

**LORUSSO, A.; VINCENT, A.; HARLAND, M.; ALT, D.; BAYLES, D.; SWENSON, S.; GRAMER, M.; RUSSELL, C.; SMITH, D.; LAGER, K.; LEWIS, L.** 2011. Genetic and antigenic characterization of H1 influenza viruses from Unites States swine from 2008. *J Gen Virol*. 92(4): 919-930.

**MARKOWSKA-DANIEL, I.; POMORSKA-MOL, M.; PEJSAK, Z.** 2011. The influence of age and maternal antibodies on the postvaccinal response against swine influenza viruses in pigs. *Vetimm*. 142: 81-86.

**MASTIN, A.; ALARCON, P.; PFEIFFER, D.; WOOD, J.; WILLIAMSON, S.; BROWN, I.; WIELAND, B.** 2011. Prevalence and risk factors for swine influenza virus infection in the English pig population. *PLoS currents*, 3, RRN1209.

**OLSEN, C.** 2002. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Res*. 85:199–210.

**QUILES, A.; OTAL, J.; CUBERO, M.** 2013. Profilaxis vacunal en ganado porcino. [en línea] <<https://www.produccionanimal.com/profilaxis-vacunal-en-ganado-porcino/>> [consulta: 21-05-2019].

**RUDNEVA, I.; IGNATIEVA, A.; TIMOFEEVA, T.; SHILOV, A.; KUSCH, A.; MASALOV, O.; KLIMOVA, R.; BOVIN, N.; MOCHALOVA, L.; KAVERIN, N.** 2012. Escape mutants of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus: Variations in antigenic specificity and receptor affinity of the hemagglutinin. *Vir Res.* 166(1-2): 61-67.

**SALMON, H.; BERRI, M.; GERDTS, V.; MEURENS, F.** 2008. Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. *Dci.* 33: 384-393.

**SHAO, W.; LI, X.; GORAYA, M.; WANG, S.; CHEN, J.** 2017. Evolution of Influenza A virus by Mutation and Reassortment. *International Journal of Molecular Sciences.* 18(8): 1650.

**SHARMA, D.; RAWAT, A.; SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, R.; KUMAR, A.** 2010. Comparative sequence analysis on different strains of Swine Influenza Virus sub-type H1N1 for Neuraminidase and Hemagglutinin. *JPB.* 3(2): 55-60.

**SIMON-GRIFÉ, M.; MARTÍN-VALLS, G.; VILAR, M.; GARCIA-BOCANEGRA, I.; MORA, M.; MARTÍN, M.; MATEU, E.; CASAL, J.** 2011. Seroprevalence and risk factors of swine influenza in Spain. *Vet Microbol.* 149(1-2): 56-63.

**SPICKLER, A.** 2016. Influenza. *CFPSH.* pp. 1-68.

**SWENSON, S.; FONI, E.; SAITO, T.; BROWN, I.** 2016. Influenza A porcina. **In:** Manual Terrestre de la OIE.

**SZRETTER, K.; BALISH, A.; KATZ, J.** 2006. Influenza: propagation, quantification, and storage. *Current protocols in microbiology.* 3(1): 15G-1.

**TAPIA, R.** 2018. Desarrollo de una vacuna multivalente contra virus de Influenza A para uso en porcinos en Chile. Tesis Doctor en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 144 p.

**TAPIA, R.; GARCIA, V.; MENA, J.; BUCAREY, S.; MEDINA, R.; NEIRA, V.** 2018. Infection of novel reassortant H1N2 and H3N2 swine influenza A viruses in the guinea pig model. *Vet Res.* 49:73.

**URBANIAK, K.; MARKOWSKA-DANIEL, I.** 2014. *In vivo* reassortment of influenza viruses. *ACTABP*. 61(3): 427-431.

**VAN REETH, K.; BROWN, I.; OLSEN, C.** 2012. Influenza Virus. **In:** Zimmerman, J.; Karriker, L.; Ramírez, A.; Schwartz, K.; Stevenson, G. *Diseases of Swine*. 10<sup>o</sup> ed. Jhon Wiley & Sons, Inc. Iowa, USA. pp. 557-571.

**VINCENT, A.; AWADA, L.; BROWN, I.; CHEN, H.; CLAES, F.; DAUPHIN, G.; DONIS, R.; CULHANE, M.; HAMILTON, K.; LEWIS, N.; MUMFORD, E.; NGUYEN, T.; PARCHARIYANON, S.; PASICK, J.; PAVADE, G.; PEREDA, A.; PEIRIS, M.; SAITO, T.; SWENSON, S.; VAN REETH, K.; WEBBY, R.; WONG, F.; CIACCI-ZANELLA, J.** 2013. Review of Influenza A Virus in Swine worldwide: a call for increased surveillance and research. *Zph*. 61(1): 4-17.

**VINCENT, A.; CIACCI-ZANELLA, J.; LORUSSO, A.; GAUGER, P.; ZANELLA, E.; KEHRLI JR., M.; JANKE, B.; LAGER, K.** 2010. Efficacy of inactivated swine influenza virus vaccines against the 2009 A/H1N1 influenza virus in pigs. *Vaccine*. 28(15): 2782-2787.

**YOON, K.; JANKE, B.; SWALLA, R.; ERICKSON, G.** 2004. Comparison of a commercial H1N1 enzyme-linked immunosorbent assay and hemagglutination inhibition test in detecting serum antibody against swine influenza viruses. *J. Vet. Diagn. Invest*. 16: 197-201.

**ZACOUR, M.; WARD, B.; BREWER, A.; TANG, P.; BOIVIN, G.; LI, Y.; WARHUUS, M.; MCNEIL, S.; LEBLANC, J.; HATCHETTE, T.** 2016. Standardization of hemagglutination inhibition assay for influenza serology allows for high reproducibility between laboratories. *Clinical and Vaccine Immunology*, CVI-0061.

# ANEXOS

## Anexo 1

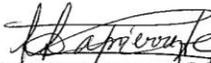


### CERTIFICADO N° 104

Santiago, 07, noviembre, 2017

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha revisado el proyecto titulado, "Emergence of novel Influenza A H1N1, H1N2 and H3N2 reassortant viruses in swine in Chile; Revealing its origin, distribution and antigenic diversity in intensive pig production" que fue adjudicado en el Concurso FONDECYT de Iniciación en la Investigación 2017 y cuyo Investigador Responsable es el Dr. Víctor Neira, académico de FAVET.

El proyecto cumple las normas de bioseguridad que se encuentran descritas en el mismo y en el formulario de solicitud de certificados de bioseguridad de FAVET, y que son las adecuadas según las especificaciones contenidas en el "Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, de la Organización Mundial de la Salud (versión 2005)" y en el "Manual de Bioseguridad de Conicyt" (versión 2008), que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.

  
DRA. LISETTE LAPIERRE  
Coordinadora  
Comité de Bioseguridad  
FAVET

A circular stamp with the text 'UNIVERSIDAD DE CHILE' at the top, 'COMITÉ BIOSEGURIDAD' in the center, and 'Fac. de Ciencias Veterinarias y Pecuarias' at the bottom. There are two small stars on either side of the center text.

## Anexo 2



Santiago, a 8 de noviembre de 2017

Certificado n°: **17077-VET-UCH**

### **CERTIFICADO**

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que el protocolo número 12-2017 VETUCH del proyecto de investigación titulado: **“Emergence of novel Influenza A H1N1, H1N2 and H3N2 reassortant viruses in swine in Chile: Revealing its origin, distribution and antigenic diversity in intensive pig production”**, cuyo Investigador Responsable es el **Dr. Víctor Neira Ramírez**, del Laboratorio de Virología Animal, Unidad de Sanidad Porcina y Unidad de Manejo Animal, Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, no plantea acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

El Investigador se ha comprometido a la ejecución de este proyecto de investigación dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de 100 Cobayos (*Cavia porcellus*), cepa Pirbright White y 260 cerdos (*Sus scrofa*) para la obtención de muestras de suero y fluido oral. Los cobayos serán obtenidos del Bioterio del Instituto de Salud Pública ISP y las muestras de cerdos desde plantales de producción intensiva de cerdos, desde noviembre 2017 a octubre de 2020, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por el **Proyecto Fondecyt de Iniciación Nro. 11170877**.

*El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 43 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales” después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.*

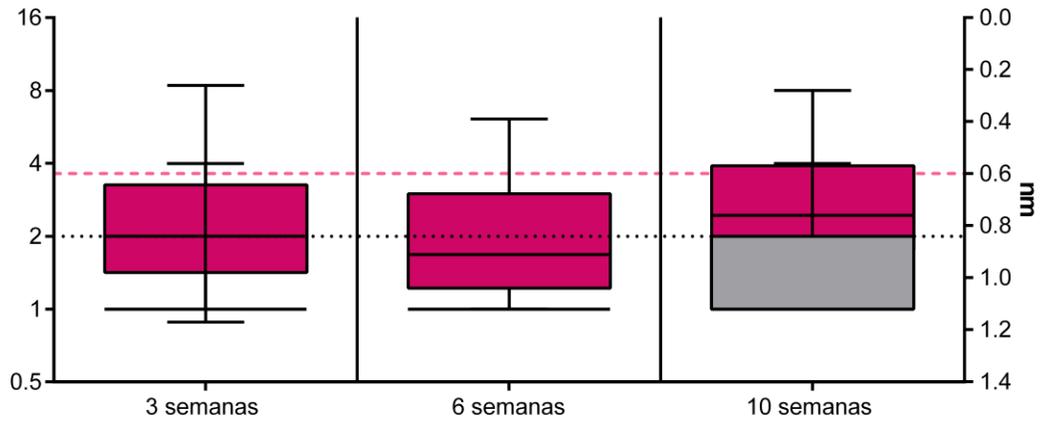
Dr. Cristián Ugaz Ruiz  
Coordinador  
CICUA - VID  
Universidad de Chile



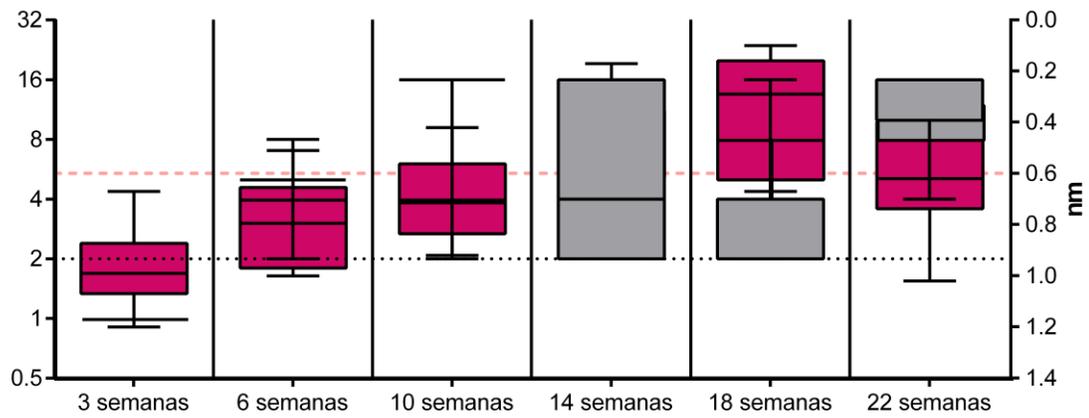
Dr. Emilio Herrera Videla  
Presidente  
CICUA - VID  
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)  
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile  
[www.uchile/cicua.cl](http://www.uchile/cicua.cl) email: [coordinador.cicua@uchile.cl](mailto:coordinador.cicua@uchile.cl)

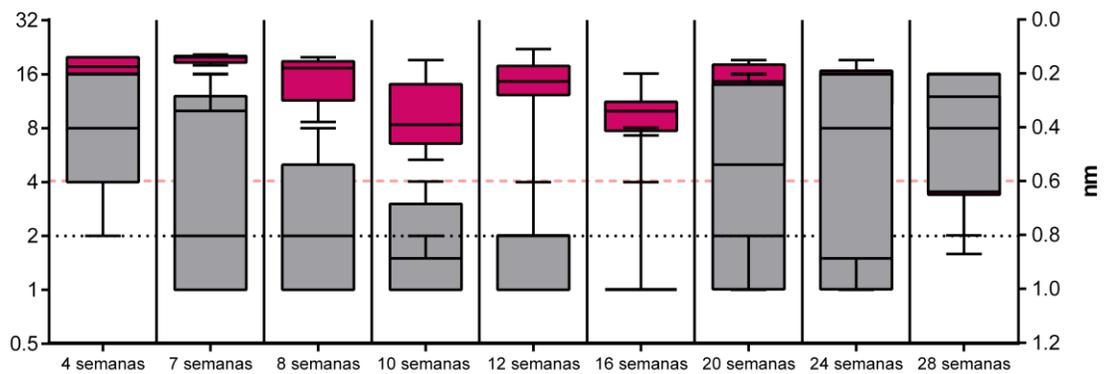
Anexo 3. Resultados test ELISA y HI comparados, plantel A.



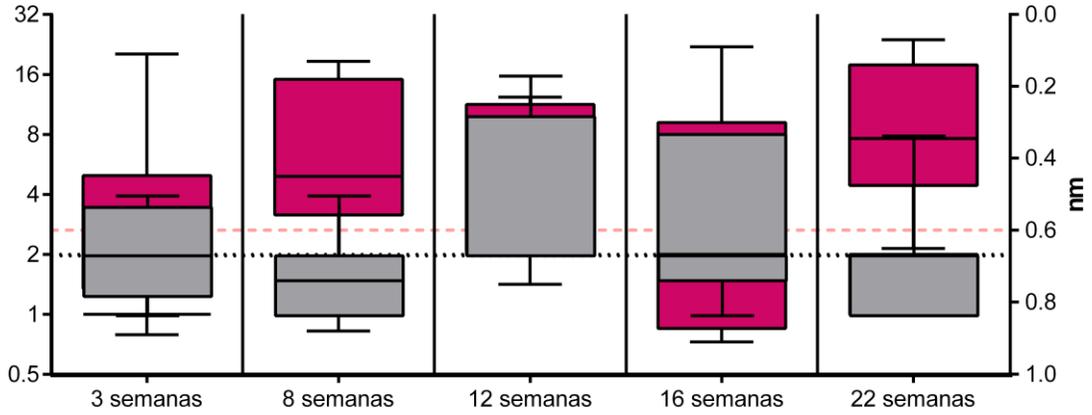
Anexo 4. Resultados test ELISA y HI comparados, plantel B.



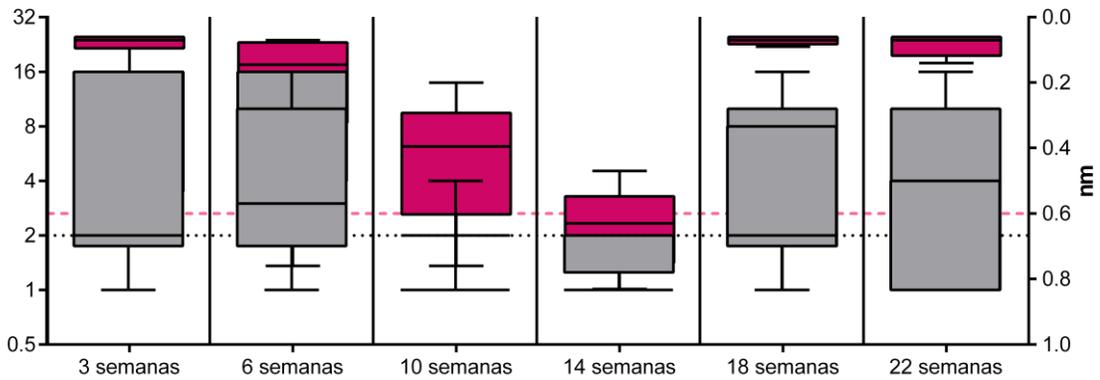
Anexo 5. Resultados test ELISA y HI comparados, plantel C.



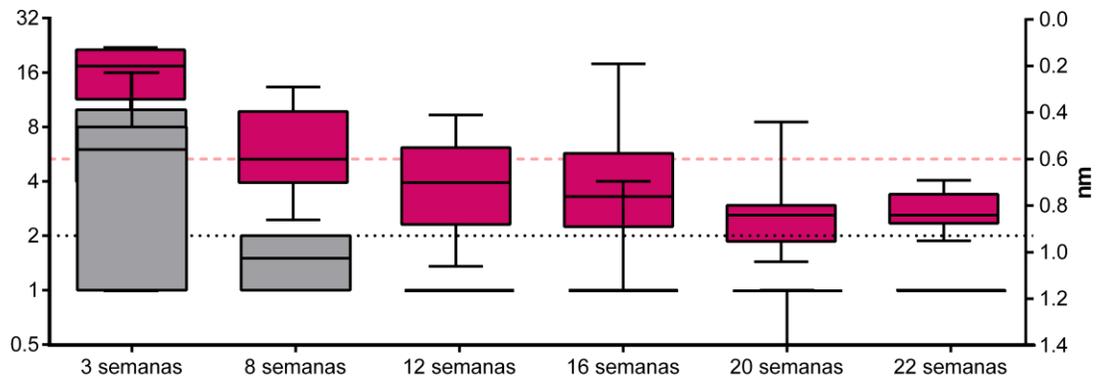
Anexo 6. Resultados test ELISA y HI comparados, plantel D.



Anexo 7. Resultados test ELISA y HI comparados, plantel E.



Anexo 8. Resultados test ELISA y HI comparados, plantel F.



Anexo 9. Resultados test ELISA y HI comparados, plantel G.

