



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

EVALUACIÓN SEROLÓGICA DE CUATRO ESQUEMAS DE VACUNACIÓN
PARA NEWCASTLE EN POLLOS DE ENGORDE POR UN PERÍODO DE
SEIS SEMANAS EN LA GRANJA EXPERIMENTAL NONO UDLA

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos para
optar por el título de Médico Veterinario y Zootecnista

Profesor Guía

MVZ. David F. Andrade O. Mg.Sc.

Autor

Álvaro Patricio Merino Latorre

Año

2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.”

MVZ. David Francisco Andrade Ojeda Mg.Sc.
CI 1712693165

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.”

MVZ. Olga Alexandra Angulo Cruz
CI 1714976295

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Alvaro Patricio Merino Latorre

CI 180429085-4

AGRADECIMIENTOS

A Dios, que gracias a Él todo fue posible, a mis padres y abuelos que me apoyaron incondicionalmente en mi formación profesional y personal; un agradecimiento especial para Diana, Diego y Álvaro que sin compromiso alguno ayudaron en la ejecución de este proyecto y a mi profesor guía, el Mg.Sc. David Andrade, que supo encaminarme por el mejor rumbo y me enseñó a enfrentar con sabiduría cada obstáculo.

DEDICATORIA

A mi familia, que ha estado a lo largo de mi vida, ayudándome a llegar con esfuerzo y dedicación a conseguir las metas que me he propuesto; a mi abuelo Walther, que todos sus consejos me han servido y ha sido un ejemplo de vida; a mi abuela Martha, mi madre Silvia y mi tía Tatiana, que me han demostrado que la dedicación y sacrificio da las mejores satisfacciones; a mi padre Alvaro y abuelo Eriberto, que desde pequeño me inculcaron el amor al campo y a los animales.

RESUMEN

La industria avícola al estar sometida a un crecimiento constante se ve desafiada por la presentación de enfermedades que afectan de manera drástica a la producción y a la economía del productor. Para controlar el apareamiento de enfermedades se aplica un plan preventivo de inmunización o vacunación a las aves, para que de esta manera las mismas puedan desarrollar un sistema inmune competente. La enfermedad de Newcastle es altamente contagiosa y de reporte obligatorio ante la OIE y tiene varias cepas que se diferencian por su agresividad. La de mayor importancia es la cepa neurotrópica, causando hasta el 100% de mortalidad.

Para la detección de la enfermedad se realizan pruebas de serología; la prueba de tamizaje es ELISA y la prueba de oro es la Inhibición de la Hemaglutinación (HI), en las que se ocupan kits específicos más la muestra (suero) problema.

Para la realización del presente estudio se conformaron cuatro grupos experimentales, cada uno con 50 aves de engorde de raza Cobb500, utilizando un plan de vacunación distinto en cada uno. Para el análisis de las muestras sanguíneas se utilizaron las instalaciones y equipos de AGROCALIDAD; los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA y Tukey.

En los resultados finales, se observó que las aves poseen inmunidad específica gracias a los anticuerpos maternos. Las aves mostraron inmunidad hasta los 11 días de edad y en adelante no se detectaron respuestas inmunes. De igual manera, se evidenció que no existe variación significativa entre los planes de vacunación de los grupos experimentales.

Como conclusión, las aves ya presentan una inmunidad específica desde el nacimiento gracias a los anticuerpos de la madre y no existe variación entre los esquemas vacunales evaluados, lo que se relaciona con la condición general de salud de las aves demostrable en que no existe variación de la ganancia de peso entre los grupos experimentales.

Palabras clave:

Newcastle, vacunación, aves de engorde, anticuerpos maternos, anticuerpos vacunales.

ABSTRACT

The poultry industry undergoing constant growth has been challenged by the presentation of diseases that drastically affect the production and economy. To control the appearance of diseases, a preventive immunization or vaccination plan is applied to the birds, in order to develop a competent immune system. Newcastle is highly contagious and a mandatory report disease to the OIE. It has several strains that are differentiated by their aggressiveness; the most important is the neurotropic strain, causing up to 100% mortality. To diagnose the disease, the screening test is ELISA and Hemagglutination Inhibition (HAI) is used as a gold standard test, which uses specific kits and the sample to be analyzed.

For the accomplishment of the present study, four experimental groups were conformed, each with 50 Cobb500 breed chickens, using a different vaccination plan for each one. For the analysis of the blood samples, AGROCALIDAD facilities and equipment were used. The statistical analysis was performed using ANOVA and Tukey tests.

The final results showed that the birds presented specific immunity due to maternal antibodies; the birds showed immunity up to 11 days of age and thereafter there was no detectable immune response. Also no significant variation between the vaccination plans on experimental groups was evidenced. In conclusion, the birds were already immune since birth thanks to maternal antibodies, and there was no variation between the evaluated vaccine schemes, this related to the fact that there was no variation of the weight gain among the experimental groups, which demonstrates the adequate general health condition.

Key words:

Newcastle disease, vaccination, broilers, maternal antibodies, vaccine antibodies.

ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Problema	2
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1. Objetivo general.....	3
1.3.2. Objetivos específicos	3
1.4 Hipótesis	4
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	1
2.1. La producción avícola	1
2.2. El sistema inmune aviar y sus características.....	2
2.2.1. El timo	3
2.2.2. Glándula de harder	3
2.2.3. El bazo	3
2.3. Los linfocitos en la inmunología aviar y sus aportes a la misma.....	3
2.4. La inmunología del ave y su sistema digestivo.....	4
2.4.1. Bolsa de Fabricio	5
2.4.2. Divertículo de Meckel.....	5
2.4.3. Placas de Peyer	6
2.4.4. Tonsilas cecales.....	7
2.4.5. Tejido linfoide asociado a mucosa	7
2.5. Las inmunoglobulinas en el sistema inmune del ave	8
2.5.1. Los tipos de inmunoglobulinas en aves	8
2.5.1.1. Inmunoglobulina aviar M (IgM).....	8
2.5.1.2. Inmunoglobulina aviar G (IgY)	9
2.5.1.3. Inmunoglobulina aviar a (IgA)	9
2.5.1.4. La vida media de las inmunoglobulinas	9
2.6. La inmunidad en el pollo.....	10
2.6.1. La inmunidad pasiva	10
2.6.2. La inmunidad activa	11
2.7. Enfermedades de la avicultura.....	11
2.7.1. La enfermedad de Newcastle.....	12

2.7.2. Taxonomía y descripción del virus de Newcastle	14
2.8. Pruebas de laboratorio.....	14
2.8.1. Elisa	14
2.8.1.1. Elisa competitivo	15
2.8.1.2. Elisa no competitivo	15
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Unidad de estudio de la investigación.....	17
3.2. Población y muestra.....	17
3.3. Materiales.....	18
3.3.1. Material utilizado en campo:	18
3.3.2. Material de laboratorio:	18
3.3.2.1. Elisa:	19
3.3.2.2. Inhibición de hemaglutinación (HI):	19
3.4. Diseño de la investigación.	19
3.4.1. Obtención de muestras de sangre	21
3.4.2. Criterios para la muestra.....	21
3.5. Procedimiento de toma de muestras sangre-suero sanguíneo	21
3.6. Métodos de análisis de laboratorio	22
3.7 Variables.....	25
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1 Resultados	27
4.1.1. Anticuerpos maternos en aves de un día.....	27
4.1.2. Evaluación de los cuatro esquemas de vacunación.	28
4.1.3. Comparación de los cuatro esquemas de Vacunación en base a la respuesta inmune.	31
4.1.4. Comparación de pesos entre cada esquema de vacunación.....	31
4.1.5. Mortalidad y enfermedades.....	33
4.2. Discusión.....	33
4.3. Limitaciones.....	36
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	37
5.1. Conclusiones.....	37

5.2. Recomendaciones	38
REFERENCIAS	39
ANEXOS.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización anatómica de los órganos linfoides de una gallina doméstica (Schat, Kaspers y Kaiser, 2014).	2
Figura 2. Bolsa de Fabricio afectada por el virus de NC. Universidad de Cornell, Colegio de Medicina Veterinaria, (2012).	5
Figura 3. Divertículo de Meckel y sus partes (Gómez, López, Maldonado y Ávila, 2010).	6
Figura 4. Localización de las Tonsilas Cecales (Schat, Kaspers y Kaiser, 2014).	7
Figura 5. Ubicación del galpón en la Granja Experimental Nono. (Google Earth).....	17
Figura 6. Medición de Inmunidad por ELISA (%)	30
Figura 7. Medición de Inmunidad por HI	30
Figura 8. Comparación de los pesos en cada esquema de vacunación	32
Figura 9. Comparación de Ganancia Media Diaria (GMD) en cada esquema de vacunación	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía del Virus de Newcastle.	14
Tabla 2. Estructura de los grupos de investigación.	20
Tabla 3. Variables de Estudio.....	26
Tabla 4. Resultados serológicos para anticuerpos maternos.....	28
Tabla 5. Resultados obtenidos en ELISA y HI.....	28
Tabla 6. Matriz para valoración de sensibilidad y especificidad	29
Tabla 7. Matriz para valoración de sensibilidad y especificidad de Newcastle.	29
Tabla 8. Análisis ANOVA de los 4 esquemas de vacunación de Newcastle	31
Tabla 9. Análisis ANOVA de los pesos de los 4 esquemas de vacunación	33

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Según el Censo Nacional Agropecuario (2011), se identifica que en la región Sierra se presenta el 49% de la producción de pollo de engorde, en la Costa el 40% y el Oriente junto a Galápagos el 11%, esto sumado al crecimiento de las producciones avícolas y la necesidad de volverse intensivas, por tener poblaciones de aves que van desde 50 hasta 15.000 aves en un galpón, se ha vuelto fácil que se presenten un sinnúmero de enfermedades que afectan la producción economía del avicultor. Por esta razón una condición clave es contar con un calendario de vacunación particularmente en las aves de engorde, donde se requiere que su inmunidad sea efectiva en el poco tiempo que están en el proceso de crianza y ceba, que es de 6 semanas o 42 días. El médico veterinario se ve en la obligación de realizar un calendario de vacunas adecuado para el sector, que sea eficiente contra los agentes patógenos que se presenten en el medio.

En el estudio realizado por Díaz, Ríos y Moreno (2005), con el fin de obtener una determinación serológica de anticuerpos de la enfermedad de Newcastle y Bronquitis Infecciosa en aves de combate, las pruebas de laboratorio ocupadas fueron Elisa Indirecto e Inhibición de la Hemoaglutinación (HI), ocupando suero sanguíneo de aves tanto vacunadas como no vacunadas. En uno de sus resultados se observa que en el 43.3% de los predios analizados no conocían cuándo realizar la revacunación de las aves y el 40% de los predios no realizaban vacunación.

Guevara y Salazar (2013), observaron que las aves de combate tienen mayor cantidad de anticuerpos séricos al estar más cercanas a una producción de aves ponedoras; a una distancia de 2 km aproximadamente el promedio de anticuerpos fue mayor al de las aves que se encontraban a unos 5 km de distancia. De igual manera se estudiaron las instalaciones en las que vivían las

aves, teniendo mayor cantidad de anticuerpos en las aves que viven en piso de tierra en relación a las que están en cemento, lo que demostraría que dependiendo de las instalaciones puede existir mayor riesgo a presentación del virus.

Bernal y González (2015), llegan a la conclusión en su estudio sobre vacunación para la enfermedad de Newcastle que la vacuna emulsificada más la cepa La Sota al día 8 de manera ocular es la que mayor titulación de anticuerpos presenta en los animales, al probar 5 esquemas distintos de vacunación en pollos de engorde.

1.2 Problema

Al ser la avicultura una de las producciones con demanda creciente, día a día las amenazas crecen a la par, tales como el virus de Newcastle para el cual los productores avícolas utilizan la medicina preventiva con la intención de no sufrir los estragos de dicho virus. Por conocimientos empíricos de los productores o sugerencias de las casas comerciales, se aplican diferentes protocolos de vacunación que se asume estimulan el sistema inmune del ave, protegiéndola durante todo el proceso de engorde, por lo que no se sabe qué esquema es el indicado al momento de establecer un plan de vacunas. Kapczynski y King, (2005), en su estudio realizado en USA mencionan: “Una sola dosis de la cepa B1 a virus vivo o inactivado es suficiente en condiciones experimentales...”, pero en el Ecuador, hay la probabilidad de que todo esto cambie ya que la situación es distinta por factores climáticos, la densidad de las producciones, las condiciones de manejo y bioseguridad varían entre todas las producciones, por lo que no se puede generalizar.

Según el Censo Nacional Agropecuario (2011), se identifica que la región de la Sierra tiene el 49% de la producción de pollo de engorde, la Costa el 40% y el Oriente y Galápagos 11%; siendo la carne de pollo una de las carnes con más demanda y aceptación en el mercado.

Analizando los datos de censos en la industria avícola, los cuales hacen evidente la existencia de un número elevado de producciones de pollos de engorde ubicadas en distintas áreas, muchas de ellas corren más riesgo de contaminarse con algún virus ya que existen producciones muy cercanas a otras y también el manejo de la bioseguridad no es el adecuado, es notoria la falta de un estudio que ayude establecer un esquema de vacunación para proteger a las aves contra el virus de Newcastle, favoreciendo a los pequeños productores avícolas que no cuentan con un correcto y efectivo esquema de vacunación para evitar esta enfermedad que ataca de manera violenta a las aves de engorde. Por tal razón se plantea una investigación que basada en análisis de laboratorio (ELISA y HI) de distintos esquemas de vacunación brinde información sobre la efectividad de la vacunación de las aves de engorde.

1.3 Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Evaluar cuatro sistemas de vacunación para Newcastle en pollos de engorde, por un período de seis semanas mediante variaciones del protocolo general de vacunación para Newcastle, con el uso de pruebas serológicas (Elisa y HI) para medir la producción de anticuerpos.

1.3.2. Objetivos específicos

- Verificar la presencia de anticuerpos maternos en pollos de engorde de un día de nacidos, mediante la prueba de Elisa Indirecto para evaluar la transferencia de inmunidad pasiva.
- Evaluar cuatro sistemas de vacunación contra Newcastle en cuatro grupos de pollos de engorde para determinar la respuesta inmunológica, mediante pruebas de Elisa y HI.

- Identificar el esquema de vacunación en el que se logre mayor cantidad de anticuerpos (respuesta inmune) en aves durante el engorde, mediante análisis estadísticos de Anova y Tukey HSD.

1.4 Hipótesis

Existe diferencia en al menos un esquema de vacunación en base a la respuesta inmune de las aves.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. La producción avícola

En lo que respecta a las producciones de carácter animal, la producción avícola ha sido una de las que más crecimiento ha tenido en los últimos años, ya que es una fuente de alimento y de economía. Existen varios tipos de producciones, desde aquellas de traspatio, ocupadas para el abastecimiento familiar, semi-intensivas, con un fin de comercio en mercados pequeños, y las producciones intensivas, que tienen como propósito llegar a abarcar el mercado nacional e internacional (Houriet, 2007).

En el Ecuador se producen aproximadamente 200 millones de pollos anualmente, lo que nos da un resultado entre 400 mil y 450 mil toneladas anuales de carne de pollo y un consumo total de 35 kilogramos por habitante. Estos valores son iguales a los de nuestros países vecinos Colombia y Perú, y nos estamos acercando a las cifras de producción de Brasil. Estas cifras nos demuestran que el país es autosustentable en producción de carne de pollo y en un futuro se espera poder abarcar mercados internacionales (El Telégrafo, 2013).

Dentro de las producciones avícolas se manejan distintos sistemas de crianza, dependiendo del país, clima, infraestructura, entre otros; lastimosamente no siempre se las maneja de la mejor manera y eso puede desencadenar la presentación de varias enfermedades y es obligación tanto de propietarios y colaboradores de la granja de reconocer y actuar de manera temprana ante la presentación de una enfermedad. La capacitación periódica al personal es deber de toda producción, por más pequeña que sea, ya que está produciendo alimento para consumo humano (Houriet, 2007).

2.2. El sistema inmune aviar y sus características

El sistema inmune de las aves es un modelo para el estudio de la inmunología básica; tanto mamíferos como aves evolucionaron de un reptil en común del cual heredaron algunos comportamientos de su sistema inmune (Schat, Kaspers y Kaiser, 2014). Al ser la industria avícola de una gran importancia económica, la mayoría de estudios de inmunología están dirigidas a la gallina doméstica, gracias a esto el entendimiento de la inmunología se ha visto contribuido en sus conceptos como por ejemplo el desarrollo por separado de la Bolsa de Fabricio y del Timo dependiendo del tipo de linfocitos (Schat, Kaspers y Kaiser, 2014).

El entendimiento de la fisiología e inmunología del sistema linfoide es categorizado como desconocido o sin estudiar desde sus partes básicas, como el desarrollo de los tejidos linfoides, los cuales pueden ser de origen epitelial en el caso del Timo y la Bolsa de Fabricio (Figura N°1), siendo estos, órganos linfoides centrales, aquí maduran las células hematopoyéticas para convertirse en células inmunocompetentes T en el caso de pertenecer al Timo, o B, en el caso de pertenecer a la Bolsa de Fabricio (Schat, Kaspers y Kaiser, 2014).

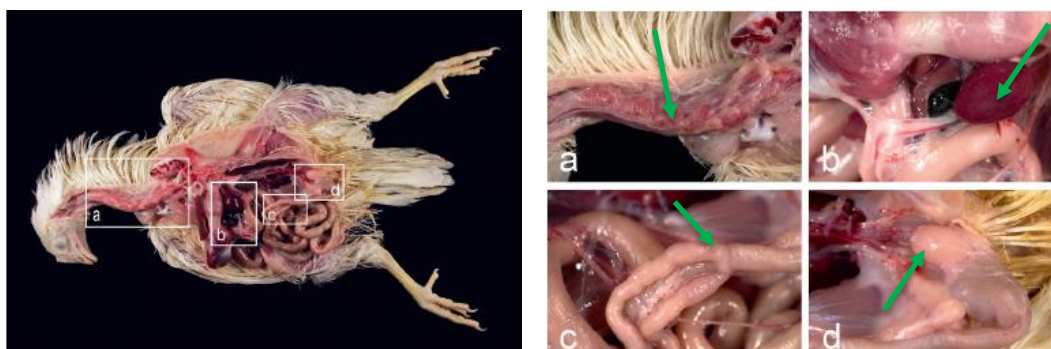


Figura 1. Localización anatómica de los órganos linfoides de una gallina doméstica tomado de (Schat, Kaspers y Kaiser, 2014).

Nota: A) Se observa los 7 lóbulos que forman el Timo. B) Se observa el Bazo de color oscuro. C) Se observa las Tonsilas Cecales que están al inicio de los ciegos. D) Se observa la Bolsa de Fabricio con una forma ovalada.

2.2.1. El timo

El Tímo se ubica paralelo al nervio vago y a las venas yugulares, tiene entre 7 y 8 lóbulos a cada lado, los cuales están desde la tercera vértebra cervical hasta antes de llegar al segmento torácico, los lóbulos se encuentran encapsulados en tejido conectivo y adiposo, el tamaño aproximado es los lóbulos es de 6 a 12 mm al alcanzar las 12 o 16 semanas de vida, ya que en este punto empieza una involución (Schat, Kaspers y Kaiser, 2014).

2.2.2. Glándula de Harder

La glándula de Harder es una membrana nictitante, de tamaño superior a la glándula lagrimal en aves y es la glándula orbital de mayor importancia para el estudio en la inmunología aviar (Osorio, 1984).

La glándula de Harder es un tejido linfoide el cual posee una gran cantidad de linfocitos B y células plasmáticas (Fariñas, 2015).

2.2.3. El bazo

El Bazo se observa a las 48 horas de vida embrionaria como un cúmulo de células mesenquimatosas. En mamíferos el bazo es conocido como un lugar de reservorio de eritrocitos para una liberación rápida al torrente sanguíneo y como lugar de diferenciación de linfocitos, pero en aves, este no es el caso, el bazo cumple un rol de linfopoyesis embrionaria, por lo que aquí es donde van las células B, para después, colonizar la Bolsa de Fabricio y madurar (Schat, Kaspers y Kaiser, 2014).

2.3. Los linfocitos en la inmunología aviar y sus aportes a la misma.

El estudio del papel que desempeñan los linfocitos data de los años 50 y 60, donde, en estudios utilizando transferencia de células en mamíferos de laboratorio, demostraron que los linfocitos son parte esencial de la respuesta

inmune y de conservar la memoria celular en el caso de que exista algún tipo de exposición a un antígeno (Schat, Kaspers y Kaiser, 2014).

En los años de 1912 a 1921, el Patólogo James Murphy, el cual se encontraba trabajando en el Instituto de Investigación Médica de Rockefeller en la ciudad de New York, realizó distintos estudios en pollos y embriones de los mismos para saber cuál es la reacción que existe ante injertos de tumores, encontrando como resultados que los linfocitos es el componente activo en el rechazo de los injertos de tumores, la respuesta ante una infección y también que jugaban un rol importante en la respuesta inmune tanto adquirida como innata (Schat, Kaspers y Kaiser, 2014).

2.4. La inmunología del ave y su sistema digestivo.

El sistema digestivo del ave, aparte de cumplir funciones de absorción y metabolismo de alimentos, cumple funciones inmunológicas, ya que está relacionado con estructuras que desempeñan papeles fundamentales en la inmunidad. Al ser el sistema digestivo una puerta que comunica el medio exterior con el organismo del ave, puede servir como puerta de entrada para ciertos agentes patógenos que van a tener un impacto negativo en la producción (Gómez, López, Maldonado y Ávila, 2010).

Como se dijo anteriormente, existen estructuras donde se han hallado una cantidad elevada de células del sistema inmune digestivo de las aves, dichas estructuras son: bolsa de Fabricio, divertículo de Meckel, tonsilas cecales, placas de Peyer, tejido linfoide asociado a intestino y tonsila esofágica (Gómez, López, Maldonado y Ávila, 2010). El estudio minucioso de todas estas estructuras ha sido una gran ayuda para las granjas comerciales, ya que así se puede brindar un manejo sanitario de las aves teniendo control en almacenamiento de alimentos, desinfección de galpones, control de plagas, aves silvestres, cumplimiento de reglas de bioseguridad y planes de vacunación (Gómez, López, Maldonado y Ávila, 2010).

2.4.1. Bolsa de Fabricio

La bolsa de Fabricio (Figura N°2) se la aprecia como un saco, ubicado en la parte dorsal a la cloaca, aquí es donde se da la diferenciación de los linfocitos y su correspondiente maduración (Gómez, López, Maldonado y Ávila, 2010). Se la aprecia en el desarrollo embrionario a partir del día 4, y al nacimiento del ave el lumen de la Bolsa de Fabricio tiene comunicaciones con el lumen intestinal, al existir estas comunicaciones se hace posible que la bolsa de Fabricio identifique antígenos, por lo que se puede realizar la inoculación de antígenos en la cloaca para que estos sean identificados por la bolsa de Fabricio y de esta manera dar como resultado una buena respuesta inmune. Cuando el ave llega a su madurez sexual la Bolsa de Fabricio desaparece (Gómez, López, Maldonado y Ávila, 2010).



Figura 2. Bolsa de Fabricio afectada por el virus de NC, tomado de Universidad de Cornell, Colegio de Medicina Veterinaria, (2012).

2.4.2. Divertículo de Meckel

El Divertículo de Meckel (Figura N°3) es un saco que se lo localiza sobre el yeyuno, se lo observa con dos estructuras, que son el saco y el tallo. Este órgano forma parte del sistema inmune del ave ya que aquí se da el proceso de

mielopoyesis extramedular, que ocurre entre la segunda y la séptima semana de vida del pollo. Estudios han demostrado que el divertículo tiene conexión con el lumen del intestino pero hasta la segunda semana de edad. En esta estructura podemos encontrar granulocitos, IgM, monocitos, etc. (Gómez, López, Maldonado y Ávila, 2010).

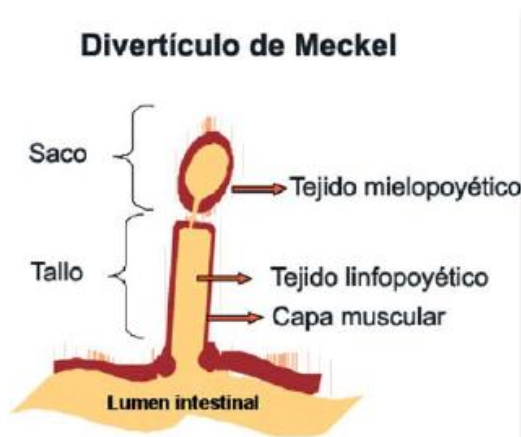


Figura 3. Divertículo de Meckel y sus partes tomado de Gómez, López, Maldonado y Ávila, 2010.

2.4.3. Placas de Peyer

Están ubicadas en la submucosa intestinal y, se ha descrito en mamíferos y aves. Debido a que no es un lugar de maduración o un órgano linfoide primario, aquí se realiza la inmunidad específica; estudios previos han demostrado que se pueden encontrar hasta 6 placas en aves de 12 semanas de edad, pero en las aves adultas se encuentra una sola placa en el íleon, en la unión a los sacos (Gómez, López, Maldonado y Ávila, 2010). El epitelio que está sobre las placas contiene vellosidades cortas y anchas para que los antígenos puedan ser detectados y formar una inmunidad específica (Gómez, López, Maldonado y Ávila, 2010).

2.4.4. Tonsilas cecales

Las tonsilas cecales (Figura N°4) son un órgano linfoide especializado que se lo ubica en la unión íleocecal. Tiene una zona subepitelial donde se encuentran células B y otra zona interna donde se encuentran células T (Gómez, López, Maldonado y Ávila, 2010).



Figura 4. Localización de las Tonsilas Cecales tomado de Schat, Kaspers y Kaiser, 2014.

2.4.5. Tejido linfoide asociado a mucosa

Se encuentra en la submucosa y mucosa de todo el intestino por lo cual es el órgano linfoide más grande, aquí se encuentran hasta el 80% de las células inmunes (Gómez, López, Maldonado y Ávila, 2010).

La funcionalidad de estos órganos puede verse afectados si el ave cursa una inmunosupresión y posteriormente el ave presentará distintas enfermedades. El personal a cargo debe estar pendiente de los animales ya que una pista que podemos ver es una baja en la producción y un cambio en el comportamiento. Algo clave que se debe realizar adicionalmente a estos cambios es el análisis serológicos, morfométricos y anatómo-patológicos para tener un panorama claro de la situación de la producción, realizando esto de manera precavida se podría realizar una medicina preventiva (Perozo, 2015, p. 23).

2.5. Las inmunoglobulinas en el sistema inmune del ave

Las inmunoglobulinas o Ig como se las nombra en la mayoría de literaturas, son glicoproteínas que tiene como actividad ejercer la función de anticuerpo. Las podemos encontrar en el torrente sanguíneo, sistema linfóide y tejidos que tengan vascularización. Las Ig constan de cuatro cadenas de polipéptidos, de las cuales dos son pesadas y las dos restantes son ligeras o livianas, lo que da forma a una unidad monomérica (Schat, Kaspers y Kaiser, 2014).

En anteriores investigaciones en mamíferos, se han encontrado cinco isotipos de Ig, las cuales tienen distintas letras para su identificación, las cuales son IgM, A, G, D y E, su distinción depende de sus cadenas pesadas (Schat, Kaspers y Kaiser, 2014).

2.5.1. Los tipos de inmunoglobulinas en aves

Se han identificado tres clases de inmunoglobulinas homólogas de los mamíferos en las aves, las cuales son, Inmunoglobulina M (IgM), Inmunoglobulina A (IgA) y la Inmunoglobulina G (IgG) (Schat, Kaspers y Kaiser, 2014).

2.5.1.1. Inmunoglobulina aviar M (IgM)

El funcionamiento y la estructura de la IgM es igual al de los mamíferos, es la inmunoglobulina (célula B) predominante y en la embriogénesis es la primera en ser creada, su peso molecular tiene entre 823 a 954 kDa, existiendo un promedio de 890 kDa y al existir algún tipo de exposición inicial con un antígeno son el isotipo de producción predominante (Schat, Kaspers y Kaiser, 2014).

2.5.1.2. Inmunoglobulina aviar G (IgY)

En aves la inmunoglobulina G se la denomina IgY, si es verdad que son homólogas, pero tienen una diferencia en sus funciones y su peso el cual es de 165 a 206 kDa es menor al de la IgG de los mamíferos y su cadena pesada o H por sus siglas en inglés es más larga que la de los mamíferos. Es el isotipo más predominante en el suero sanguíneo y en la respuesta inmune secundaria o de infecciones, se produce después de la IgM (Schat, Kaspers y Kaiser, 2014).

2.5.1.3. Inmunoglobulina aviar a (IgA)

Al tratarse de secreciones corporales, como la bilis, la IgA es encontrada en mayor concentración en aves que en mamíferos, su concentración media en suero es de 0.35-0.65 mg/ml. Esta Ig está unida a una cadena J, la cual se une al receptor que está en las células de la superficie epitelial, al unirse, tanto Ig como receptor, se forma un componente de secreción, dicha unión viaja hasta una célula epitelial para ser secretada en el lumen del órgano que la requiera (Schat, Kaspers y Kaiser, 2014).

2.5.1.4. La vida media de las inmunoglobulinas

Se han realizado varias investigaciones para determinar la vida media de las inmunoglobulinas, una herramienta muy usada son los denominados "marcadores" como el yodo (I). Biológicamente la vida media de las Ig es de 2 días en machos de 14 semanas y 1.55 días en hembras adultas, esos fueron los resultados de Ivanyi en el año 1964. Otro investigador, Paterson, realizó el mismo estudio en aves recién nacidas y el resultado fue de 3 días y en el caso de gallinas ponedoras fue de 1.48 días, tal vez se puede explicar ésta

diferencia ya que las IgY viajan a los folículos ováricos para ser pasados a la yema (Schat, Kaspers y Kaiser, 2014).

Se han realizado ensayos de Inhibición de la Hemaglutinación (HI) ocupando anticuerpos específicos para el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) y los resultados fueron que la vida media de las Ig era de 5.2 días después del nacimiento (Schat, Kaspers y Kaiser, 2014).

2.6. La inmunidad en el pollo

Como todo neonato, al momento que el pollito sale cascarón, pierde su ambiente estéril, y puede ser afectado por algún virus o microorganismo por lo que necesita tener protección inmunitaria, en el momento de la formación del huevo las inmunoglobulinas pasan a la yema, existe un aporte de IgM e IgA a la albúmina por medio de secreciones en el oviducto, a medida que la formación del embrión sigue su curso normal, el mismo absorbe IgG (IgY) de la yema o saco vitelino la cual después se podrá encontrar en el suero sanguíneo del pollito, las IgA e IgM que se encuentran en la albumina pasan al líquido amniótico, el cual es ingerido por el pollito, pero la absorción de las Ig no es completa si no después de 24 a 36 horas después de la eclosión y podremos encontrar IgG en el suero sanguíneo e IgM e IgA en el tracto gastrointestinal (Tizard, 2002).

2.6.1. La inmunidad pasiva

La inmunidad pasiva en las aves se da desde reproductoras inmunizadas o infectadas hacia la descendencia a través del huevo y sus estructuras, las inmunoglobulinas son las que hacen efectiva esta inmunidad, la inmunidad pasiva tiene una corta duración, como máximo pueden durar 3 semanas, pero por lo general tienen un período de dos semanas (Tizard, 2002).

El porcentaje de inmunoglobulinas que pasan de la reproductora a la progenie es de un 30% en la IgY ya que esta se empieza a transferir desde el día 7 de

formación embrionaria hasta el día 18 aproximadamente, pero en las IgA e IgM son de 1% solamente, pero estos dos isotipos son los primeros que el ave recién nacida empieza a fabricar por sí misma, en lo que respecta a los anticuerpos transferidos contra la enfermedad de Newcastle desde la reproductora al pollito son del 27% al 40%, y van a depender directamente de la cantidad de anticuerpos que la reproductora tenga (El Sitio Avícola, 2008).

2.6.2. La inmunidad activa

La inmunidad activa tiene como propósito la administración de un antígeno en específico a un ave para que se produzca una reacción inmunológica de protección, tiene sus ventajas sobre la inmunidad pasiva siempre y cuando es bien utilizada, ya que provee de un mayor tiempo de protección, no debe provocar efectos adversos o efectos de enfermedad sobre el ave, mediante la inmunidad activa se incrementará el número de células de memoria para que la respuesta inmune sea más rápida y también los antígenos que son introducidos deben quedarse en lugares linfoides específicos para que siga estimulando a las células productoras de anticuerpos (Tizard, 2002).

Hay que tomar en cuenta un aspecto sobre el paso y duración de los anticuerpos maternos, los anticuerpos maternos pueden interferir en la vacunación por lo que la vacunación debe efectuarse cuando los anticuerpos maternos sean bajos (Sharma, 2011).

2.7. Enfermedades de la avicultura

En la crianza de aves de corral hay varios factores que influyen para que el ciclo productivo sea óptimo y dé los mejores resultados, dichos factores son: manejo, bioseguridad, infraestructura, fin de la explotación (carne o huevos), entre otros. Al momento que hay una mala ejecución o error en uno de estos factores, se puede presentar una enfermedad, que pueden ser de distintos tipos y grados de agresividad. Se debe tener mucho cuidado al momento de

tomar una decisión en estos casos ya que se puede dar una mejora en la producción o una caída en la misma y muchas veces eso termina en el cierre de la producción (Houriet, 2007).

Dentro de las enfermedades que atacan a las aves de corral tenemos enfermedades bacterianas como: Salmonelosis, Colibacilosis, Mycoplasmosis, Cólera Aviar, Coriza infecciosa, Enteritis Necrótica, Infecciones por Streptococcus y Staphylococcus y Erisipela. En las enfermedades causadas por virus encontramos a: el virus de la enfermedad de Newcastle, Marek, Gumboro o Enfermedad de la Bursa, Bronquitis infecciosa, Laringotraqueitis Aviar y la Influenza Aviar. Hay enfermedades que se relacionan con la deficiencia de manejo, alimentación, bioseguridad e higiene y son causadas por hongos y son: Micotoxicosis, Aspergilosis y Moniliasis. En las enfermedades parasitarias tenemos las que atacan a la parte externa de las aves como las Pulgas, Chinchas y Garrapatas; y los parásitos que atacan a la parte interna del ave son: Capillaria, Tenias, Coccidias, Áscaris, Nematodos e Histomonas, entre las más importantes (Houriet, 2007).

2.7.1. La enfermedad de Newcastle

La enfermedad de Newcastle es de tipo viral y altamente contagiosa por lo que su reporte es obligatorio ante la OIE, al presentarse de varias maneras o cepas se brinda especial atención a su cepa velogénica ya que puede ser causante de infecciones de curso agudo y letales; y la cepa velogénica neurotrópica que es la causante de signos neurológicos como el opistótono (Angulo, 2016). Al ser muy contagiosa y mortal para las aves hasta en un 100% representa pérdidas económicas directas e indirectas para los productores por lo que debe ser muy bien identificada ya que tiene signos en distintos sistemas, como en el respiratorio ya que se encuentran congestionadas las vías aéreas por secreciones, la diarrea causante de la deshidratación es un signo digestivo muy evidente, en el aspecto reproductivo una pista fundamental es la caída de la

postura y la presencia de opistótono es un signo nervioso característico (Seuk-Choi, 2014, p.3).

Los primeros datos de la Enfermedad de Newcastle se dieron en Inglaterra, Indonesia y Corea en 1926 pero de igual manera ha tenido serios impactos en Sudamérica tanto en aves de corral como en aves silvestres. La enfermedad probablemente era existente en California en los años de 1936 pero no era detectada ya que no era muy agresiva hasta 1944 que se la detectó en Estados Unidos (Davis, Anderson, Karstad y Trainer, 1977).

Varias aves son las afectadas tanto domésticas como salvajes, un ejemplo de esto, son los descubrimientos de Quortup (1957) en California, al encontrar anticuerpos de Newcastle en ánades silvestres y cercetas, de igual manera se hallaron anticuerpos en el Ganso de Corbata en 1966 por Bradshaw y Trainer (Davis, Anderson, Karstad y Trainer, 1977).

La enfermedad ha sido reportada en todo el mundo, la presentación velogénica viscerotrópica está controlada en Canadá, Estados Unidos y algunos países de Europa occidental, pero sigue persistente en algunos sitios de África, Asia y Sudamérica (OIE, 2016).

Los principales brotes panzoóticos de la enfermedad fueron en el sudeste de Asia en el año de 1926 hasta la década de los años 1950, de ahí fue en Oriente Medio desde 1960 hasta 1970, el tercer brote fue toda la década de los años 1980 y el último fue en Asia desde la década de 1990 hasta el presente (Seuk-Choi, 2014, p.4).

Los casos oficialmente notificados a la OIE en el período del 2009, 2010 y 2011 en América del Norte fueron de 54, 32 y 4 respectivamente, y en América Central y América del Sur fueron 15, 17 y 44; América Central y del Sur equivalen al 0.6% (Seuk-Choi, 2014, p.21).

En el año de 2001 fue reportada en 63 países, posteriormente en el año 2007 fue reportada en 151 países, de los cuales 81 casos fueron brotes en su manera más agresiva (Angulo, 2016).

En Argentina, en el año de 1965 se autorizó el uso de vacunas vivas con lo que se dio el primer paso para el control de la enfermedad, la cual tuvo su primer reporte en el año de 1961 (SENASA, 2004, p.10).

2.7.2. Taxonomía y descripción del virus de Newcastle

La enfermedad de Newcastle se da por un Paramixovirus Aviar 1 (Tabla N°1), en años pasados fue clasificado como un Rubulavirus, pero desde 1999 se lo clasificó como un Avulavirus, es un virus ARN el cual contiene una cadena simple, siendo el causante de varios signos clínicos los cuales pueden variar de leves a graves dependiendo la cepa del virus que ataca (Angulo, 2016).

Tabla 1

Taxonomía del Virus de Newcastle.

FAMILIA	<i>Paramyxoviridae</i>
SUBFAMILIA	<i>Paramixovirinae</i>
GÉNERO	<i>Avulavirus</i>

(Torrubia, Gómez, Van den Berg, Téllez y Hauck, 2014)

2.8. Pruebas de laboratorio

En la actualidad las pruebas usadas para el control y monitoreo del virus de la Enfermedad Newcastle es ELISA e Inhibición de la Hemaglutinación (Angulo, 2016).

2.8.1. Elisa

La técnica de ELISA o Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay trabaja en la detección de un antígeno en especial, el cual está inmóvil o fijado a alguna

base (canastillas), los antígenos producirán una reacción (coloración), que, mediante espectrofotometría se la puede medir o dar rangos de valoración (Neyra, 2015).

Los equipos básicos para la realización de un test de Elisa son: lector de placas o espectrofotómetro, canastillas o microplacas, reactivos y solución de lavado (Neyra, 2015).

2.8.1.1. Elisa competitivo

Dentro de la práctica del test de Elisa Competitivo existen tanto los directos que son utilizados para detectar antígenos y los indirectos los cuales son utilizados para detectar anticuerpos (Neyra, 2015).

En Elisa Competitivo, como su nombre lo dice, va a existir una competencia entre el anticuerpo de la muestra y el conjugado por llegar primero al sitio de unión con el antígeno el cual está fijado en la canastilla, en el caso de ser negativa se dará una coloración ya que no existen anticuerpos que se unan a los sitios de unión del antígeno, al darse un resultado positivo, no existirá coloración, ya que, los anticuerpos presentes en el suero problema o a evaluar, se han unido a todos los antígenos sin dejar espacio para el conjugado (Neyra, 2015).

2.8.1.2. Elisa no competitivo

En esta prueba puede estar, Anticuerpo o Antígeno fijado a la canastilla, al existir en el suero problema antígenos o anticuerpos de la enfermedad en estudio, se dará como resultado un complejo antígeno-anticuerpo, que, al agregar un conjugado dará como reacción una coloración (Neyra, 2015).

2.8.2 Inhibición de la hemaglutinación

Se conoce que los virus pueden unirse a la membrana de las células rojas de la sangre o eritrocitos, unión la cual generará una aglutinación, todo se debe a el estudio realizado por Hirst, el cual mezcló el virus de Influenza con eritrocitos y dio como resultado una aglutinación por la unión de eritrocito más el virus de manera alternada, a esto se lo conoce como Aglutinación y es el primer paso que debe efectuarse antes de la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (HI), la cual busca anticuerpos en sueros problema (UNAM, 2017). En la prueba de HI los anticuerpos presentes en el suero no van a permitir que los virus se unan a la superficie de la membrana celular (OMS, 2011).

Mediante el uso de la técnica de HI se pueden determinar anticuerpos específicos para alguna enfermedad en el suero sanguíneo de individuos sospechosos, se realizan varias diluciones para tener un conocimiento relativo de la cantidad de anticuerpos, se coloca cierta cantidad de suero en cada tubo del cual se hacen varias diluciones.

CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Unidad de estudio de la investigación

El estudio se realizó en la Granja Experimental UDLA, la cual está ubicada en la parroquia de Nono (Figura N°5), que está a 1 hora de la ciudad de Quito. La granja cuenta con instalaciones para realizar una correcta crianza de animales, entre estos, las aves de engorde. El clima y la topografía son las adecuadas para este tipo de producción, además de que en sus alrededores no existen planteles avícolas, por lo que llevando una bioseguridad y manejo adecuados se pueden obtener resultados óptimos.



País: Ecuador.

Provincia: Pichincha.

Cantón: Quito.

Parroquia: Nono.

Elevación: 2627 msnm

78°33'48.71" O

0°02'19.48" S

Figura 5. Ubicación del galpón en la Granja Experimental Nono tomado de (Google Earth)

3.2. Población y muestra.

Según Glatz y Pym, (2013), en su publicación sobre alojamiento y manejo de las aves de corral, nombran como producción de pequeña escala a aquella que tenga un grupo de 50 a 100 aves homogéneas. Por otro lado, en el Ecuador los censos realizados por el MAGAP determinan que el número base de aves en un galpón es de 500 aves, lo que correspondería a pequeñas producciones semi-intensivas o intensivas; en consecuencia, al direccionarse el estudio a

pequeños productores se consideró una muestra de 200 aves que corresponden a este tipo de productores.

3.3. Materiales

3.3.1. Material utilizado en campo:

- Aves de engorde de un día de nacidas de raza Cobb.
- Jeringas.
- Guantes de examinación.
- Tubos de ensayo sin anticoagulante (tapa roja).
- Alimento balanceado para aves de engorde de la casa comercial Aviforte inicial, engorde y finalización.
- Bebederos.
- Comederos.
- Criadoras.
- Tanques de gas (GLP).
- Tiras de madera de 4x2cm.
- Malla de gallinero.
- Viruta.
- Vacunas para Newcastle, Bronquitis y Gumboro.

3.3.2. Material de laboratorio:

- Guantes, mascarilla, bata y gafas de protección
- Puntas para micropipetas de 20-200 μ l.
- Puntas para micropipetas de 100-1000 μ l.
- Agua bi-destilada (ultrapura).
- Refrigerador a 2-8°C.
- Multipipeta de 12 canales.
- Autoclave.
- Balanza de precisión.

- Vasos de precipitación.
- Estufa.
- Matraces pyrex de 100 ml.

3.3.2.1. Elisa:

- Kit de Elisa Competitivo ID Screen® Newcastle Disease Competition
- Lector de Elisa.

3.3.2.2. Inhibición de hemaglutinación (HI):

- Aves de 4 semanas de edad como fuente de eritrocitos.
- Suspensión de eritrocitos.
- Alsever pH 7.2.
- Virus de la enfermedad de Newcastle inactivado "Hemaglutinina"
- Solución Fosfatada Buferada.
- PBS.
- Hipoclorito de sodio al 2%.

3.4. Diseño de la investigación.

En presente estudio fue de carácter observacional de corte transversal, en donde se utilizó una población de 200 pollos de engorde de raza Cobb 500, los cuales estuvieron divididos en 4 grupos (Tabla 2), uno con el esquema común de vacunas (Vacunación al día 7 y revacunación al día 28) y los tres restantes son variaciones del esquema. Se realizaron pruebas de laboratorio para valorar la presencia de anticuerpos maternos y la reacción inmunológica del organismo ante la vacuna; las pruebas de laboratorio fueron Elisa indirecto y HI en suero sanguíneo, el cual fue extraído de las aves a los días 1, 4, 11, 21, 33 y 42.

Tabla 2

Estructura de los grupos de investigación.

Grupo 0	Día	Actividad	Número de Animales
	7	Vacuna Newcastle	
	10	Enrofloxacina	
	11	Titulación de Anticuerpos	10
	21	Titulación de Anticuerpos	10
	28	Revacuna	
	31	Enrofloxacina	
	33	Titulación de Anticuerpos	10
	42	Titulación de Anticuerpos	10
Grupo 1	Día	Actividad	Número de Animales
	1	Titulación de Ac maternos	15
	4	Enrofloxacina	
	11	Titulación de Ac maternos	10
	21	Titulación de Ac maternos	10
	31	Enrofloxacina	
	33	Titulación de Ac maternos	10
	42	Titulación de Ac maternos	10
Grupo 2	Día	Actividad	Número de Animales
	1	Primo Vacuna	
	4	Enrofloxacina	
	4	Titulación de Anticuerpos	15
	11	Titulación de Anticuerpos	10
	21	Titulación de Anticuerpos	10
	28	Revacunación	
	31	Enrofloxacina	
	33	Titulación de Anticuerpos	10
	42	Titulación de Anticuerpos	10
Grupo 3	Día	Actividad	Número de Animales
	7	vacuna Newcastle	
	10	Enrofloxacina	
	11	Titulación de Anticuerpos	10
	21	Titulación de Anticuerpos	10
	31	Enrofloxacina	
	33	Titulación de Anticuerpos	10
	42	Titulación de Anticuerpos	10
		Cantidad	200

3.4.1. Obtención de muestras de sangre

El volumen de sangre requerido para los análisis de laboratorio corresponde a un mínimo de 3 ml, por lo cual se consideraron los siguientes métodos de recolección de las muestras: sacrificio de las aves de 1 a 15 días de vida (exanguinado completo). A partir de los quince días de edad, se obtuvieron las muestras de sangre de la vena alar mediante la técnica de venopunción.

3.4.2. Criterios para la muestra

a) Criterios de inclusión.

- Animales al día 1 de nacidos que no muestren signos de enfermedad,
- ni con problemas motrices,
- tampoco con alguna deformidad o traumatismo.

b) Criterios de exclusión.

- Animales al día 1 de nacidos que se vean erizados,
- apartados del grupo,
- anoréxicos o algún otro signo de enfermedad,
- con problemas motrices,
- con alguna deformidad o traumatismos.

3.5. Procedimiento de toma de muestras sangre-suero sanguíneo

Obtención de muestras de sangre en pollos de 1-15 días:

- Aspersión de agua sobre las aves para producir vaso-constricción periférica, lo que permite concentrar la sangre en la circulación central.
- Sujeción del ave.
- Aturdimiento: La insensibilización del ave se realizó mediante la ruptura del tallo encefálico, mediante la inserción de una aguja en la articulación Atlanto-Occipital.

- Degüello: Corte de los grandes vasos a nivel del cuello (Carótida y Yugular).
- Recolección de la sangre en tubos rotulados tapa roja (sin anticoagulante).

Obtención de muestras de sangre en pollos de 16-42 días:

- Sujeción del ave: Se colocó al ave en posición decúbito dorsal con la extensión del ala para exponer la vena alar.
- Limpieza de la zona de la vena alar: Mediante alcohol antiséptico se desinfectó el área correspondiente.
- Punción de la vena alar: Mediante agujas y capuchones Vacutainer® se realizó la recolección de la muestra en tubos rotulados (sin anticoagulante).

Obtención del suero sanguíneo:

- En las muestras tomadas se realizó la separación del suero sanguíneo mediante la espera de 30 minutos a temperatura ambiente para la formación del coágulo, centrifugación a 10rpm por 5 minutos para la separación del suero y su correspondiente recolección en tubos Eppendorf. Los sueros fueron mantenidos bajo congelación a -20°C hasta el fin del muestreo para su posterior análisis.

3.5. Métodos de análisis de laboratorio

A. PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE LABORATORIO DE ELISA COMPETITIVO.

Para la realización de los análisis de Elisa Competitivo se utilizó el kit *ID SCREEN. Newcastle Disease Competition* de la marca *ID.vet Innovative Diagnostics*. Consta de los siguientes pasos:

Para empezar, se debe llevar los reactivos a una temperatura de 21°C con una variación de 5 grados +/-, se los debe homogeneizar por Vortex o por inversión.

1. Distribuir:
 - 100 ul del Control Positivo en los pocillos A1 y B1.
 - 100 ul del Control Negativo en los pocillos C1 y D1.
2. Distribuir a los pocillos restantes:
Sueros aviares
 - 40 ul de diluyente 14
 - 10 ul de cada muestra a analizar en los pocillos y homogeneizar.
3. Cubrir la placa e incubar 30 minutos a 21°C.
4. Preparar el conjugado 1X diluyendo el conjugado 10X al 1:10 con diluyente 3.
5. Vaciar los pocillos. Lavar todos los pocillos 3 veces con aproximadamente 300ul de la solución de lavado. Evitar que los pocillos se sequen entre los lavados.
6. Distribuir 100ul del conjugado 1X a todos los pocillos.
7. Cubrir la placa e incubar 30 minutos a 21°C.
8. Vaciar los pocillos. Lavar todos los pocillos 3 veces con aproximadamente 300ul de la solución de lavado. Evitar que los pocillos se sequen entre lavados.
9. Distribuir 100ul de solución de revelación a todos los pocillos. Incubar 15 minutos a 21°C.
10. Distribuir 100ul de solución de parada a todos los pocillos para detener la reacción. La solución de parada debe ser agregada en el mismo orden que en la etapa N° 9.
11. Leer a una densidad óptica de 450 nm.
12. Interpretación de los Resultados de la prueba de Elisa Competitivo:
Se basa en los resultados de Porcentaje de Inhibición.
 - Si es menor a 30% es Negativo.
 - Si es entre 30% a 40% es Sospechoso.
 - Si es mayor a 40% es Positivo.

B. PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE LABORATORIO DE INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN (HI).

- Obtención de glóbulos rojos
 1. Medir en una jeringa anticoagulante Alsever 3 ml.
 2. Obtener por punción alar 3 ml de sangre.
 3. Mezclar bien y pasar a un tubo de ensayo y centrifugar a 1,500 r.p.m. durante 10 minutos con la finalidad de separar el paquete celular.
 4. Decantar el sobrenadante y agregar al tubo tres partes de PBS por una parte del paquete de glóbulos rojos.
 5. Centrifugar a 1,500 r.p.m. durante 10 minutos y decantar el sobrenadante, repetir dos veces más este paso.
 6. Realizar una suspensión de glóbulos rojos al 0.5%; agregar 99.5 ml de PBS más 0.5 ml de glóbulos rojos

- Titulación del antígeno

La titulación del antígeno es un paso previo para obtener las unidades hemoaglutinantes (UHa) del virus de la enfermedad del Newcastle. Se realizan diluciones dobles desde 1:2 hasta 1:64.

La identificación de la microplaca se realiza así:

Columnas 1-12 Filas de la letra A a la H

- a) Depositar 50 μ l de PBS en los pozos del 1-12, letra A y B.
- b) Depositar en el pozo número 1, letras A y B, 50 μ l de antígeno.
- c) Con una multipipeta de ocho canales, diluir la mezcla cinco veces y pasar 50 μ l al pozo número 2, repetir el proceso y de aquí al tres y así sucesivamente hasta la columna 12. Descartar finalmente 50 μ l en el desinfectante.
- d) Agregar 50 μ l de glóbulos rojos al 0.75% a todos los pozos.
- e) Coloca en la fila C el control de glóbulos rojos: 50 μ l de PBS y 50 μ l de glóbulos rojos por pozo.
- f) Mover ligeramente e incubar la microplaca a temperatura de laboratorio de 30-45 minutos.

Técnica:

1. Diluir el antígeno en PBS conteniendo 10 UHa por cada 50 µl 52/55
2. Depositar 50 µl del antígeno diluido a los pozos del 1 al 11 de todas las filas
3. Agregar 50 µl de cada uno de los sueros problema en los pozos número 1 de cada fila.
4. Realizar las diluciones, iniciar con el pozo número 1, mezclar cinco veces y pasa al pozo número 2 y así sucesivamente hasta el pozo número 11, descartar finalmente 50 µl.
5. Incubar la microplaca a temperatura de laboratorio durante 30 minutos.
6. Agregar 50 µl de glóbulos rojos al 0.5% a todos los pozos
7. Los pozos de la columna número 12 contendrán 50 µl de PBS y 50 µl de glóbulos rojos.
8. Mover ligeramente la placa e incubar a temperatura de laboratorio durante 30 minutos.

3.6 Variables

En la Tabla 3, se presentan las diferentes variables que fueron analizadas en esta investigación.

Tabla 3

Variables de Estudio

Variables	Definición	Indicador	Unidad de medida
Peso	Ganancia de peso semanal durante la experimentación	Peso por semana	kg / gr.
Anticuerpos Maternos	Anticuerpos que no son formados por el ave, es una inmunidad pasiva, la cual es transferida por parte de la madre	Títulos al día 1	% y dilución.
Anticuerpos post-vacunales	Anticuerpos sintetizados de manera artificial, ya que se producen a partir de la inoculación de un agente	Títulos al día 1, 4, 11, 21 33 y 42.	% y dilución.
Signos Clínicos		Evaluación Visual los días Lunes, Miércoles y Viernes	Presencia /Ausencia
Opistótono.	Torsión de la cabeza.		
Dificultad respiratoria	Las aves no pueden respirar fácilmente, hay secreciones nasales		
Edema facial.	Hinchazón de barbillas, ojo y cabeza.		

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

Los resultados obtenidos en esta investigación corresponden al análisis de 122 muestras seriadas de suero sanguíneo de aves de engorde Cobb 500, en las que se determinó: anticuerpos maternos, anticuerpos post-vacunales; además se valoraron condiciones de salud y ganancia de peso en los individuos de estudio.

4.1.1. Anticuerpos maternos en aves de un día.

Mediante las pruebas serológicas Elisa Competitivo e Inhibición de la Hemaglutinación (HI), se tomó una muestra aleatoria de 11 aves de un día para determinar la presencia de anticuerpos maternos, que servirían de base para los cuatro grupos experimentales (Tabla 4). Todas las aves resultaron positivas en la prueba de ELISA, por lo tanto, existe presencia de anticuerpos maternos específicos contra Newcastle, pero en la prueba de HI existió un porcentaje de positivos de 90.9% (10/11) y un porcentaje de 9.1% (1/11) para las aves con resultado negativo. Se encontró un promedio de 0,25 en la Densidad Óptica (DO) y un promedio de presencia de anticuerpos de 86,36% en la prueba de Elisa Competitivo. La moda de la dilución para el análisis de HI fue de 1/16, a pesar de que se obtuvo un individuo positivo con títulos a la dilución de 1/64.

Tabla 4

Resultados serológicos para anticuerpos maternos

Elisa			HI	
DO	%	Resultado	DILUCIÓN	RESULTADO
0,2	89	POSITIVO	1/32	POSITIVO
0,22	88	POSITIVO	1/32	POSITIVO
0,31	83	POSITIVO	1/16	POSITIVO
0,27	85	POSITIVO	1/16	POSITIVO
0,13	93	POSITIVO	1/32	POSITIVO
0,31	83	POSITIVO	1/16	POSITIVO
0,26	86	POSITIVO	1/32	POSITIVO
0,39	79	POSITIVO	1/8	NEGATIVO
0,29	84	POSITIVO	1/16	POSITIVO
0,17	91	POSITIVO	1/64	POSITIVO
0,21	89	POSITIVO	1/16	POSITIVO

Resultados Elisa: < 30% es Negativo; 30% - 40% es sospechoso; > 40% es Positivo

Resultados HI: $\geq 1/16$ Positivo; < 1/16 es Negativo.

4.1.2. Evaluación de los cuatro esquemas de vacunación.

En los análisis de ELISA y HI se identificaron los siguientes resultados (Tabla 5):

Tabla 5

Resultados obtenidos en ELISA y HI

Positivo		Negativo	
ELISA	HI	ELISA	HI
31	11	91	111

Se estimó la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA en base a HI, considerando a esta última la prueba gold standard. (Tabla 6):

Tabla 6

Matriz para valoración de sensibilidad y especificidad

Validez		HI		TOTAL
		Positivo	Negativo	
ELISA	Positivo	VP	FP	TP
	Negativo	FN	VN	TN
TOTAL		TE	TS	N

Nota: VP=Verdadero Positivo; FP=Falso Positivo; TP=Total Positivos; FN=Falsos Negativos; VN=Verdaderos Negativos; TN=Total Negativos; TE=Total Enfermos; TS=Total Sanos; N=Número de Pacientes.

Para obtener los valores de sensibilidad y especificidad se obtuvieron las siguientes probabilidades (Tabla 7)

Tabla 7

Matriz para valoración de sensibilidad y especificidad de Newcastle

Validez		HI		TOTAL
		Positivo	Negativo	
ELISA	Positivo	11	20	31
	Negativo	0	91	91
TOTAL		11	111	122

Considerando las probabilidades de la Tabla 7 se obtuvieron valores de Sensibilidad del 100% y de Especificidad de 81,98% para ELISA Competitivo.

Al valorar la respuesta inmune de los individuos de estudio, mediante la prueba de Elisa Competitivo se observó que la tendencia en la capacidad inmunitaria presenta un decrecimiento a medida que el estudio transcurrió, el valor promedio inicial fue de 86,4% (Figura 6) correspondiente a la inmunidad maternal y el promedio al final del estudio fue de 10,3%.

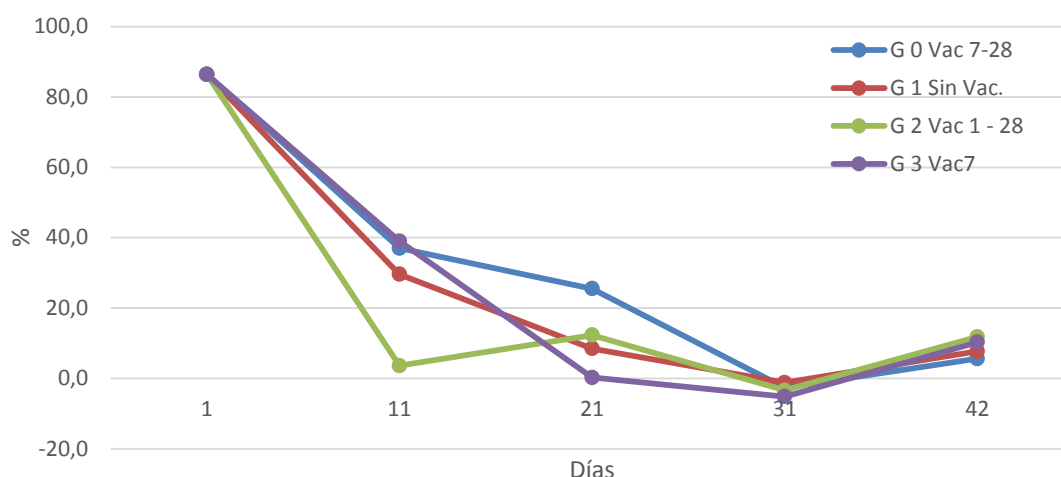


Figura 6. Medición de Inmunidad por ELISA (%)

Mediante la Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación se observó que hubo presencia de anticuerpos desde el día 1 hasta el día 11 (Figura 7), al día 1 existieron anticuerpos en diluciones de 1/16 en adelante, lo que demuestra la presencia de inmunidad y de igual manera al día 11, a partir del día 11 existió un decrecimiento de la tendencia lo que quiere decir que no hay presencia de inmunidad, lo que demuestra que los animales estuvieron expuestos a cualquier desafío inmunitario.

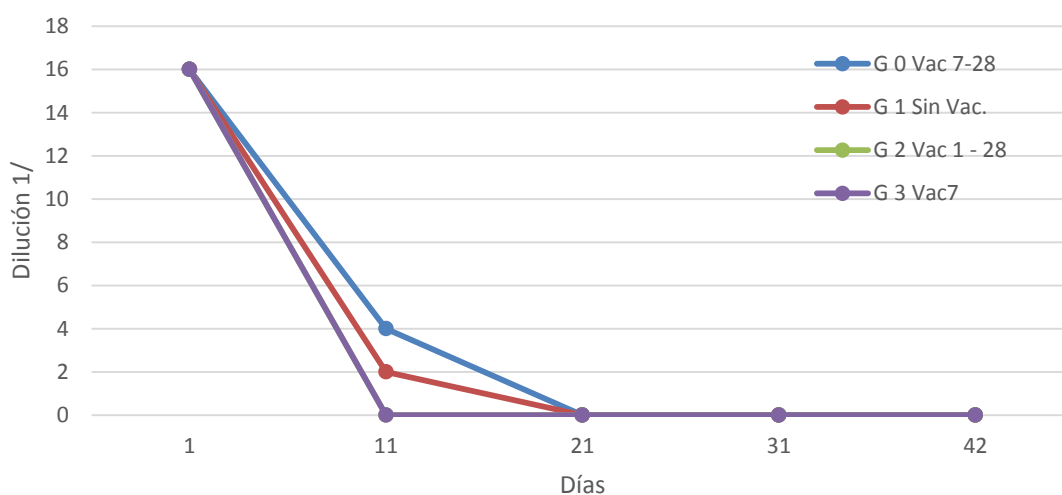


Figura 7. Medición de Inmunidad por HI

4.1.3. COMPARACIÓN DE LOS CUATRO ESQUEMAS DE VACUNACIÓN EN BASE A LA RESPUESTA INMUNE.

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se identificó que no existe diferencia entre los cuatro esquemas de vacunación, porque el p-valor obtenido fue mayor a 0,05 (Tabla 8).

Tabla 8

Análisis ANOVA de los 4 esquemas de vacunación

	<i>Suma cuadrados</i>	<i>de GL</i>	<i>Media cuadrados</i>	<i>de F-calc</i>	<i>P-Valor</i>
Entre grupos	282,129	3	94,043	0,06	0,9806
Intra grupos	19317,4	12	1609,78		
Total (Corr.)	19599,5	15			

4.1.4. Comparación de pesos entre cada esquema de vacunación.

Durante el período experimental se realizaron 5 pesajes, se tuvo un incremento progresivo en la ganancia de peso (Figura 8), lo que demuestra que hubo un correcto manejo productivo de las aves, de igual manera, se demuestra que el manejo de cualquiera de estos esquemas de vacunación no influye en la ganancia de peso.

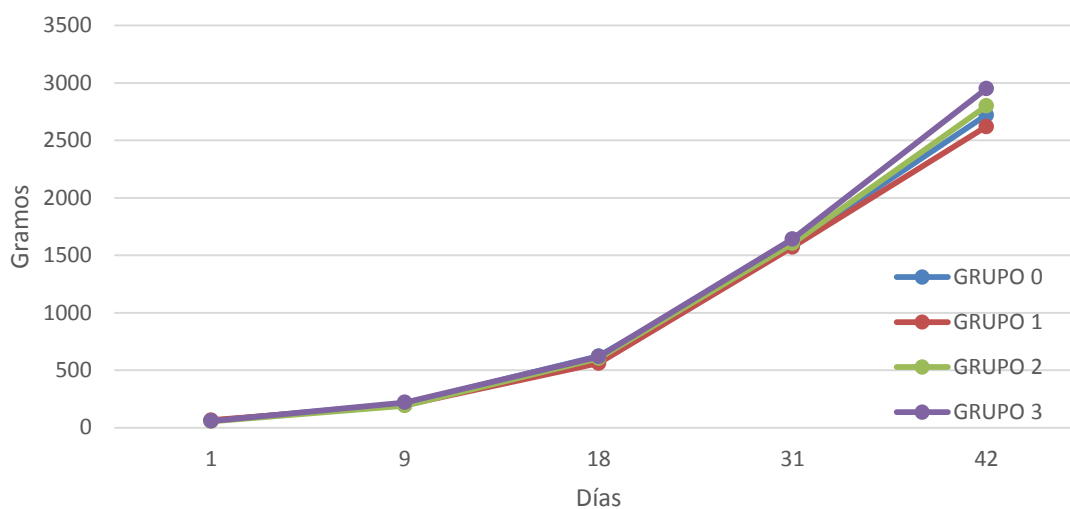


Figura 8. Comparación de los pesos en cada esquema de vacunación

La ganancia media de peso (Figura 9) demuestra el incremento de peso promedio por etapa de las aves de cada grupo, lo que permitió saber en qué etapa las aves no ganaron peso. En todos los grupos existió una ganancia de peso constante desde el día 1 al día 31, pero a partir del día 31 al día 42 se evidenció un decrecimiento de la ganancia media de peso en todos los grupos.

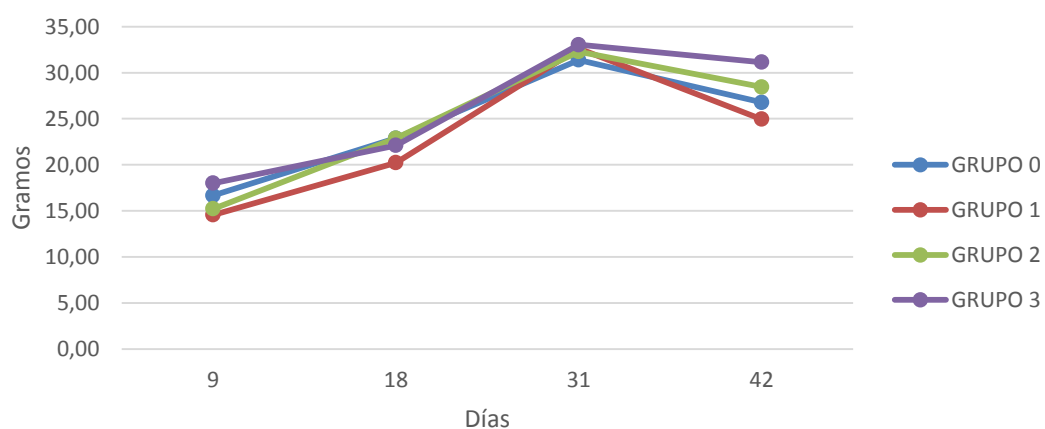


Figura 9. Comparación de Ganancia Media Diaria (GMD) en cada esquema de vacunación

Al comparar la ganancia de peso de los individuos de cada esquema de vacunación mediante el ANOVA se obtuvo un p-valor mayor a 0,05 (tabla 9), lo que nos indica que no existen diferencias entre los grupos experimentales.

Tabla 9

Análisis ANOVA de los pesos de los 4 esquemas de vacunación

	Suma de cuadrados	de GL	Media de cuadrados	de F-calc	P-Valor
Entre grupos	2645,69	3	881,896	0,00	0,9999
Intra grupos	5,81842E6	12	484868,		
Total (Corr.)	5,82107E6	15			

4.1.5. Mortalidad y enfermedades

Durante el estudio se identificaron en todos los grupos las siguientes enfermedades: a) intestinales, en la 4ta semana y b) respiratorias a la 3ra semana. Además, se presentaron los siguientes porcentajes de mortalidad: a) grupo 0: 6%, (3/50) b) grupo 1: 4%, (2/50) c) grupo 2: 2% (1/50) y d) grupo 3: 2%. (1/50) Considerando que la mortalidad esperada en una empresa avícola se estima del 3 al 5%, se demostró que los grupos 1, 2 y 3 los valores se mantienen dentro de la tolerancia, mientras que el grupo 0 supera en 1% este rango.

4.1. Discusión

Schat, Kaspers y Kaiser (2014), mencionan en su estudio que las aves generan su inmunidad en la última etapa embrionaria y por un período corto después del nacimiento, lo cual fue demostrado en nuestro estudio, ya que los animales muestreados al día 1 resultaron positivo en las pruebas de Elisa Competitivo y HI, con lo que se evidencia que las aves tienen inmunidad específica contra la enfermedad de Newcastle gracias a la transmisión de anticuerpos por parte de la madre a la progenie. En este estudio se detectó la presencia de anticuerpos hasta los 11 días de edad, valor que supera a lo mencionado en el estudio

realizado por Kaleta (1997), donde reporta un promedio de 5,2 días de presentación de anticuerpos.

En los resultados de HI se presenta un resultado negativo, según el Sitio Avícola (2008) la cantidad de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle que son transferidos desde la reproductora hacia la progenie son de un 27% a un 40%, pero dicha transferencia va a depender exclusivamente de la cantidad de anticuerpos que la reproductora posea, puede existir la posibilidad que la reproductora de donde vino el ave no contaba con una cantidad de anticuerpos suficiente para que sean transferidos a la progenie y brinde protección inmunitaria.

Castillo (2012), menciona que al existir una ruptura de la cadena de frío existe una pérdida de la eficacia de la vacuna, la cual no puede recuperarse aun así se reestablezca la temperatura de refrigeración que debe ser de 2°C a 8°C; de igual manera García, Nieto y Zamora (2004), menciona que existen modificaciones de carácter físico, químico, terapéutico y toxicológicas al momento de someter a las vacunas a temperaturas mayores a las recomendadas por el laboratorio y se produce una velocidad de degradación de la vacuna más rápida de lo normal; estos dos criterios, tanto de Castillo como de García, Nieto y Zamora concuerdan con nuestro estudio ya que no existió una reacción a la vacuna en ninguna etapa ya que no se observó incremento de los Anticuerpos como lo demuestran las pruebas de ELISA y HI.

En la investigación realizado por Hamal (2006) encontraron que los anticuerpos maternos en aves pueden estar presentes hasta la edad de un mes, lo cual no concuerda con nuestro estudio ya que a partir del día 11 ya no se evidenció presencia de anticuerpos maternos.

Acorde a los prospectos que acompañan a las vacunas, es recomendable realizar la primovacunación o vacunación al día 1 o dentro de la primera semana de edad, lo que no podría ser sustentado con nuestro estudio, porque

se demostró que los animales si cuentan con anticuerpos específicos de origen maternal contra Newcastle; de igual manera Mast y Godderis (1999) indican que la vacuna al día que las aves han nacido no tiene actividad alguna, ya que los animales constan de la presencia de anticuerpos maternos y al realizar una vacunación al día 1 se realiza una unión antígeno vacunal y anticuerpo maternal, con lo que estaríamos limitando la respuesta de reacción ante un virus de campo.

El SENASA (Perú), recomienda que se vacunen las aves de pelea a partir de los tres meses de vida, lo que no tendría sentido de acuerdo a los resultados obtenidos, porque las aves quedarían sin protección inmunológica, ya que a partir día 11 al 42 no hay reacción inmune, lo que deja a los gallos de pelea susceptibles a la enfermedad.

Maturín (2010), en su publicación recomienda que la vacunación contra Newcastle sea a partir de los 14 días, lo que sobrepasa nuestro tiempo considerado para vacunación, pero se podría aplicar este método llevando un estricto control de anticuerpos de las aves, viendo la titulación de anticuerpos para tener un estimado de la duración de los mismos.

Johnston (1997), en su estudio vacuna aves tanto in ovo como al día de nacidas contra la enfermedad de Gumboro (IBD) y valora la reacción vacunal de la misma, encontrando reacción en las aves vacunadas in ovo, mas no en las vacunadas al día de nacidas, lo que concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio, ya que las aves vacunadas contra el virus de Newcastle al día 1 no tuvieron reacción contra la vacuna por la presencia de anticuerpos maternos, además de tener una respuesta similar en las aves que no fueron inmunizadas.

En el estudio realizado por Bublot (2013), menciona que la vacunación con la cepa la Sota puede provocar una reacción respiratoria en las aves, lo que no tiene similitud en este estudio, ya que, las aves presentaron complicaciones de

carácter respiratorio a la semana 3 pero fueron todas las aves, incluyendo al grupo de aves no vacunadas, por lo cual no se puede deducir que fue por la reacción a la vacuna. Las enfermedades respiratorias se presentan a menudo en las explotaciones avícolas ya que intervienen varios factores como ventilación, genética, densidad de la población y entrada de un microorganismo patógeno; las enfermedades respiratorias pueden presentarse en cualquier etapa de la producción, por lo que el monitoreo de las enfermedades debe ser estricto, la ventilación es importante ya que aquí existe el intercambio de aire lo que ayuda también a la estabilización de la temperatura y evitar el acúmulo de gases como amoníaco el cual es irritante para las vías aéreas, dicha irritación se convierte en la puerta de entrada para un agente patógeno como son los virus como: Paramixovirus y Orthomixovirus; mycoplasmas como: Gallisepticum y Sinoviae; bacterias como: E. coli y Pasteurella; y hongos como: Aspergillus (Martínez y Sanz, 2006).

En el manual de manejo Cobb500 (2015), menciona que los pesos de las aves a los 42 días de edad deben ser de 2.8 kilogramos, lo que concuerda con nuestro estudio ya que los animales sí tuvieron dicho peso o tenían una diferencia mínima, el problema intestinal que se presentó en las aves puede haber sido Síndrome de Tránsito Rápido, el cual puede producirse por efectos nutricionales, un claro ejemplo son los inhibidores de la tripsina que contiene la soya del balanceado o por existir rancidez en la grasa y aceites ocupados en la mezcla del balanceado, otro factor puede ser la granulometría del alimento (El Sitio Avícola, 2015).

4.2. Limitaciones

Económica: La disposición de recursos económica para la realización del estudio fue limitada por lo que se trabajó con un número reducido de animales e insumos.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

5.1. Conclusiones

Al finalizar el presente estudio, y valorar los resultados obtenidos, se llegan a las siguientes conclusiones:

Las aves de un día de nacidas presentaron inmunidad específica contra el virus de la Enfermedad de Newcastle, lo cual se atribuye la transferencia de inmunidad materna, ya que no se realizaron vacunaciones previas.

La curva inmunitaria de las aves tiene un decrecimiento desde el día 1 hasta el día 31, a partir de este hasta el día 42 se evidencia un leve crecimiento en la curva inmunitaria en la prueba de ELISA, lo que podría deberse a desafíos de virus de campo, pero al momento de realizar la prueba gold standard HI se ve que no hay dicho incremento de los anticuerpos con lo que se concluye que las aves no estuvieron bajo desafío y también se debe considerar que en la zona en donde se realizó la investigación no existen explotaciones avícolas cercanas.

Los 4 esquemas de vacunación actúan de manera similar, ya que presentaron valores de respuesta inmune sin significancia de valoración estadística.

Mediante los análisis estadísticos Anova y Tukey se observó que las variaciones en los esquemas de vacunación no influyeron en la ganancia de peso en los cuatro grupos experimentales. En relación a la ganancia media de peso por cada etapa tuvo un incremento hasta el día 31, y en adelante hubo una ganancia de peso, pero no la esperada que fue de 33,3% aproximadamente.

En esta investigación se encontraron anticuerpos maternos en animales de un 1 día, lo que demuestra la presencia de inmunidad materna que cubre los

animales durante un período corto, además se evidenció que la respuesta inmune por la vacunación no fue la esperada, a causa de que no existió reacción ante la inmunización. En consecuencia, se concluye que el sistema de bioseguridad es indispensable para evitar el ingreso de patógenos al núcleo productivo, o establecer producciones avícolas en zonas donde no hay explotaciones avícolas cercanas. Se concluye que puede existir problemas con la vacuna y dar como resultado aves sin presencia de anticuerpos como se vio en nuestro estudio, lo que quiere decir que estarían susceptibles a estar bajo desafío de cualquier virus de campo, por lo que el manejo de la bioseguridad en el núcleo productivo es indispensable, de igual manera para evitar la entrada de algún agente patógeno externo hay que tratar de ubicar las producciones en zonas donde no existan explotaciones avícolas cercanas.

5.2. Recomendaciones

Realizar una titulación de la vacuna previa a la inoculación de la misma, para confirmar su validez.

Realizar un plan de vacunación en aves mayores a dos semanas, como se vio en el estudio se tiene una protección de anticuerpos maternos hasta los 11 días de edad.

Tomando en cuenta que hubo mortalidad por ascitis, trabajar con una restricción de alimentos para bajar el porcentaje de mortalidad que podría presentarse.

El plan de iluminación de las aves debe ser solamente los 3 primeros días de luz 24 horas, después de esto trabajar con horarios naturales de luz.

REFERENCIAS

- Acosta, M. (2005). *ENFERMEDAD DE NEWCASTLE: GRAN PROBLEMA DE LA AVICULTURA ECUATORIANA. ¿QUE HACER?* Obtenido el 6 de Octubre de 2016 de: http://amevea-ecuador.org/web_antigua/datos/Enfermedad_de_Newcastle___DR%5B1%5D._MANUEL_ACOSTA.PDF
- Aillón, M. (2012). Propuesta de implementación de un proyecto comunitario que se dedicará a la crianza, producción y comercialización avícola en la parroquia de Ascázubi. Obtenido el 21 de Octubre de 2016 de: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1473/1/T-UCE-0003-272.pdf>
- Angulo, E. (2016). Enfermedad de Newcastle Aviar. Obtenido el 6 de Octubre de 2016 de: <http://www.webveterinaria.com/virbac/news16/aves.pdf>
- Bernal, J. y González, D. (2015). *EVALUACIÓN DE CINCO PLANES DE VACUNACIÓN CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE EN POLLOS DE ENGORDE.* Obtenido el 21 de Octubre de 2016 de: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/22249/1/TESIS.pdf.pdf>
- Bublott, M. (2013). *Mecanismos de acción de vacunas vectoriales HVT+IBD, vacunas vectoriales HVT-ND y de inmunocomplejos frente a IBD.* Obtenido el 10 de mayo de 2017 de: <http://seleccionesavicolas.com/avicultura/2013/07/mecanismos-de-accion-de-vacunas-vectoriales-hvt-ibd-vacunas-vectoriales-hvt-nd-y-de-inmunocomplejos-frente-a-ibd>
- Chavez, R. (2017). *PROGRAMA NACIONAL DE SALUD AVIAR (SENASA).* Obtenido el 15 de Marzo de 2017 de: <http://www.senasa.go.cr/senasa/sitio/files/181211055357.pdf>
- Cornell University College of Veterinary Medicine. (2012). *Atlas of Avian Diseases.* Obtenido el 5 de Diciembre de 2016 de: <http://www.poultrydisease.ir/Atlases/avian-atlas/index.html>

- Davis, J., Anderson, R., Karstad, L. y Trainer, D. (1977). *ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y PARASITARIAS DE LAS AVES SILVESTRES*. Zaragoza, España: ACRIBIA
- Díaz, J., Ríos, H. y Moreno, O. (2005). *Determinación serológica para las enfermedades de Newcastle y bronquitis infecciosa en las aves de combate de Bucaramanga*. Obtenido el 26 de Noviembre de 2016 de: <http://wb.ucc.edu.co/sdmvz/files/2013/06/articulo-3-vol-1-n-1.pdf>
- El Sitio Avícola. (2015). Inician censo avícola nacional en el Ecuador. Obtenido el 5 de Diciembre de 2016 de: <http://www.elsitioavicola.com/poultrynews/30417/inician-censo-avicola-nacional-en-ecuador/>
- El Telégrafo. (2013). *Ecuador produce 200 millones de pollos al año*. Obtenido el 13 de mayo de 2017 de: <http://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/8/ecuador-produce-200-millones-de-pollos-al-ano>
- Fariñas, F. (2015). *Funcionamiento del sistema inmune del ave*. Obtenido el 19 de abril de 2017 de: http://www.wpsa-aeca.com/aeca_imgs_docs/16751_sistema%20inmune%20del%20ave_farinas.pdf
- García, A., Bahrndorff, S., Hald, B., Hoorfar, J., Madsen, M. y Vigre, H. (2012). *Design and data analysis of experimental trials to test vaccine candidates against zoonotic pathogens in animals: the case of a clinical trial against campylobacter in broilers*. Obtenido el 5 de Diciembre de 2016 de: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/erv.12.98?journalCode=ier> v20
- Glatz, P. y Pym, R. (2013). *REVISIÓN DEL DASARROLLO AVÍCOLA. Alojamiento y manejo de las aves de corral en los países en desarrollo (FAO)*. Obtenido el 5 de Diciembre de 2016 de: <http://www.fao.org/docrep/019/i3531s/i3531s.pdf>
- Gómez, G., López, C., Maldonado, C. y Ávila, E. (2010). *El sistema inmune digestivo de las aves*. Obtenido el 26 de Noviembre de 2016 de:

<http://www.uaa.mx/investigacion/revista/archivo/revista48/Articulo%202.pdf>

- Guevara, V. y Salazar, E. (2013). *DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS SÉRICOS CONTRA NEWCASTLE EN AVES DE PELEA DE VEINTE CRIADEROS UBICADOS EN LA CIUDAD DE RIOBAMBA*. Obtenido el 21 de Octubre de 2016 de: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/3128/1/T-UCE-0014-47.pdf>
- Hamal, K. R., Burgess, S. C., Pevzner, I. Y. and Erf, G. F. (2006). *Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens*. Poultry Science.
- Hein, R., Rios, F. y Mebatsion, T. (2008). Newcastle Disease (ND) efficacy in broilers vaccinated at 1 day of age with the recombinant HVT/F(ND). *Selecciones Avícolas*
- Houriet, J. (2007). *GUIA PRACTICA DE ENFERMEDADES MAS COMUNES EN AVES DE CORRAL (PONEDORAS Y POLLOS)*. Obtenido el 13 de mayo de 2017 de: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_aves/enfermedades_aves/90-enfermedades.pdf
- Johnston, S., O'connel, T., Phelps, P., Bland, M., Tyczkowski, J., Kemper, A., Harding, T., Avakian, A., Haddad, E., Whitfill, C., Gildersleeve, R. y Ricks, C. (1997). *Applications in In ovo Technology*. Poultry Science.
- Kaleta, E. F., Siegmann, O., Lai, K. W. and Aussum, D. (1977). *Kinetics of NDV-specific antibodies in chickens. VI. Elimination of maternal and injected antibodies*. Berl. Munch.Wochenschr
- MAGAP. (2015). *ÍNDICE DE TABLAS DE SALIDA DEL CENSO AVÍCOLA DEL ECUADOR*. Obtenido el 5 de Diciembre de 2016 de: <http://simce.ambiente.gob.ec/sites/default/files/documentos/anny/Tabla%20de%20Salida%20de%20Censos%20Av%C3%ADcolas%20Ecuatorianos.pdf>
- Mast, J. and Goddeeris, B. M. (1999). *Development of immunocompetence of broiler chickens*. Vet. Immunol. Immunopathology

- Maturín, A. (2010). Principales Enfermedades de las Aves. Obtenido el 8 de mayo de 2017 de: <http://elygomez.aprenderapensar.net/files/2011/11/Programas-sanitarios-en-Aves.pdf>
- Neyra, I. (2015). *METODOLOGIA Y METODOLOGIA Y CLASIFICACION DEL ELISA EN LA DEL ELISA EN LA DETERMINACION DE ANTIGENOS Y DE ANTIGENOS Y ANTICUERPOS*. Obtenido el 10 de mayo de 2017 de: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/C2%20%20METODOLOGIA%20Y%20CLASIFICACION%20DE%20LOS%20ELISAS%20%20Ibeth%20Neyra.pdf>
- OIE. (2016). *Enfermedad de Newcastle*. Obtenido el 6 de Octubre de 2016 de: <http://www.oie.int/doc/ged/D13966.PDF>
- OMS. (2011). *Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza*. Obtenido el 3 de Mayo de 2017 de: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44518/1/9789241548090_eng.pdf
- Osorio, J. (1984). *Morfología de la Glándula de Harder en Gallinas (Gallus gallus)*. Obtenido el 19 de abril de 2017 de: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/29632/1/Osorio%20Guarin.pdf>
- Parmentier, H. K., Lammers, A., Hoekman, J. J., De Vries Reilingh, G., Zaanen, I. T. and Savelkoul, H. F. (2004). *Different levels of natural antibodies in chickens divergently selected for specific antibody responses*. Dev. Comp. Immunol.
- Perozo, F. (2015). *IMPORTANCIA DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO SANO EN AVES COMERCIALES*. Obtenido el 26 de Noviembre de 2016 de: <http://seleccionesavicolas.com/pdf-files/2015/6/023-026-Patologia-Importancia-Sistema-inmunologico-aves-Merial-SA201506-rectificado.pdf>
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. (2004). *Manual de Procedimientos, Enfermedad de Newcastle*. Obtenido el 6 de Octubre

- de 2016 de:
http://www.aviculturaargentina.com.ar/sanidad/manual_newcastle.pdf
- Seuk-Choi, K. (2014). *Enfermedad de Newcastle*. Zaragoza, España: SERVET.
- Schat, K., Kaspers, B. y Kaiser, P. (2014). *Avian Immunology*. San Diego, USA: Elsevier
- Torrubia, F., Gómez, C., Van den Berg, T., Téllez, S. y Hauck, R. (2014). *VACUNACIÓN EN AVICULTURA*. Zaragoza, España: Grupo Milán.
- UNAM. (2017). *MANUAL DE PRACTICAS DE LABORATORIO DE VIROLOGIA*. Obtenido el 3 de Mayo de 2017 de: http://veterinaria.uaemex.mx/_docs/607_974_MP%20Virolog%C3%ADa.pdf
- UNAM. (2016). *MANUAL DE PRACTICAS DE LABORATORIO DE VIROLOGIA*. Obtenido el 20 de Mayo de 2017 de: http://veterinaria.uaemex.mx/_docs/607_974_MP%20Virolog%C3%ADa.pdf
- Cobb-Vantres. (2015). *Suplemento informativo sobre rendimiento y nutrición de pollos de engorde. Cobb500*. Obtenido el 20 de Mayo de 2017 de: <https://cobb-guides.s3.amazonaws.com/9000e3b0-bcc7-11e6-bd5d-55bb08833e29.pdf>
- El Sitio Avícola. (2008). *Inmunidad Pasiva*. Obtenido el 6 de julio de 2017 de: <http://seleccionesavicolas.com/pdf-files/2008/8/4082-inmunidad-pasiva-i.pdf>
- Tizard, I. (2002). *Inmunología Veterinaria*. México, D.F.: McGraw-Hill
- Sharma, J. (2011). *Transferencia pasiva de inmunidad en pollos*. Obtenido el 6 de julio de 2017 de: <http://www.veterinariargentina.com/revista/2011/12/transferencia-pasiva-de-inmunidad-en-pollos/>
- El Sitio Avícola. (2015). *El Síndrome de Tránsito Rápido en pollos*. Obtenido el 6 de julio de 2017 de: <http://www.elsitioavicola.com/articles/2660/el-sandrome-de-transito-rapido-en-pollos-2-a-factores-nutricionales/>

- Castillo, R. (2012). *Quiebre de la cadena de frío*. Obtenido el 7 de julio de 2017 de: <http://www.enfermeriaaps.com/portal/wp-content/uploads/2012/01/Quiebre-Cadena-Frio.pdf>
- García, M., Nieto, M. y Zamora, M. (2004). *Conservación de Medicamentos Termolábiles*. Obtenido el 7 de julio de 2017 de: <https://www.sefh.es/pdfs/ConservacionDeMedicamentos.pdf>
- Martínez, R., y Sanz, A. (2006). *Problemas Respiratorios en Aves. El Complejo Respiratorio*. Obtenido el 7 de julio de 2017 de: http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/wpsa1164027007a.pdf

ANEXOS

Anexo 1. Preparación del galpón.



Anexo 2. Desinfección del galpón.



Anexo 3. Procedimiento de aturdimiento para toma de muestras.



Anexo 4. Aturdimiento en ave de 1 día para la extracción de muestra de sangre.



Anexo 5. Decapitación en ave de 1 día para extracción de muestra de sangre.



Anexo 6. Colecta de sangre en ave de 1 día.



Anexo 7. Colecta de sangre en ave de 1 día.



Anexo 8. Período de espera para la separación del coágulo sanguíneo y el plasma.



Anexo 9. Transporte de muestras.



Anexo 10. División de los grupos para el estudio.



Anexo11. Vacunación en aves de 1 día.



Anexo 12. Control nocturno de aves.



Anexo 13. Control de temperatura mediante termómetros digitales.



Anexo 14: Tasa de crecimiento para pollo de engorde Cobb500.

Objetivos de desempeño - sistema métrico						
COMO AL NACIMIENTO						
Edad en días	Peso para la edad (g)	Ganancia diaria (g)	Ganancia diaria promedio (g)	Conversión alimenticia acumulada	Consumo diario de alimento (g)	Consumo de alimento acumulado (g)
0	42	0				
1	56	14		0,232	13	13
2	72	16		0,417	17	30
3	89	17		0,573	21	51
4	109	20		0,679	23	74
5	131	22		0,773	27	101
6	157	26		0,841	31	132
7	185	28	26,4	0,902	35	167
8	215	30	26,9	0,958	39	206
9	247	32	27,4	1,012	44	250
10	283	36	28,3	1,053	48	298
11	321	38	29,2	1,097	54	352
12	364	43	30,3	1,126	58	410
13	412	48	31,7	1,150	64	474
14	465	53	33,2	1,165	68	542
15	524	59	34,9	1,177	75	617
16	586	62	36,6	1,191	81	698
17	651	65	38,3	1,206	87	785
18	719	68	39,9	1,221	93	878
19	790	71	41,6	1,235	98	976
20	865	75	43,3	1,250	105	1081
21	943	78	44,9	1,264	111	1192
22	1023	80	46,4	1,284	117	1309
23	1104	81	47,8	1,303	123	1432
24	1186	82	49,3	1,321	130	1562
25	1269	83	50,8	1,337	134	1696
26	1353	84	52,1	1,356	141	1837
27	1438	85	53,6	1,373	148	1985
28	1524	86	54,4	1,402	152	2137
29	1613	89	55,6	1,423	158	2295
30	1705	92	56,8	1,442	163	2458
31	1799	94	58,0	1,460	169	2627
32	1895	96	59,2	1,478	174	2801
33	1993	98	60,4	1,496	180	2981
34	2092	99	61,5	1,512	182	3163
35	2191	99	62,6	1,530	189	3352
36	2289	98	63,6	1,549	193	3545
37	2386	97	64,5	1,568	197	3742
38	2482	96	65,3	1,589	201	3943
39	2577	95	66,1	1,610	205	4148
40	2671	94	66,8	1,631	209	4357
41	2764	93	67,4	1,653	213	4570
42	2857	93	68,0	1,675	216	4786

