



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS VACUNALES DE BRONQUITIS
INFECCIOSA EN AVES DE TRASPATIO EN UN PREDIO DE CHECA,
MEDIANTE PRUEBAS SEROLÓGICAS

AUTOR

NELLY ALEXANDRA ROJAS PASQUEL

AÑO

2019



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS VACUNALES DE BRONQUITIS
INFECCIOSA EN AVES DE TRASPATIO EN UN PREDIO DE CHECA,
MEDIANTE PRUEBAS SEROLÓGICAS.

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

Profesor guía
Dra. Olga Alexandra Angulo Cruz

Autor
Nelly Alexandra Rojas Pasquel

Año
2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, evaluación de anticuerpos vacunales de bronquitis infecciosa en aves de traspatio en un predio de Checa, mediante pruebas serológicas, a través de reuniones periódicas con la estudiante Nelly Alexandra Rojas Pasquel, en el semestre 2019-20 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”

Dra. Olga Alexandra Angulo Cruz

Médico Veterinario

C. I. 1714976295

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, evaluación de anticuerpos vacunales de bronquitis infecciosa en aves de traspatio en un predio de Checa, mediante pruebas serológicas, de la estudiante Nelly Alexandra Rojas Pasquel, en el semestre 2019-20, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.”

Dra. Claire Christine Muslin
Doctora en Virología
C. I. 1759007733

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.”

Nelly Alexandra Rojas Pasquel

C. I. 17222104740

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por su apoyo incondicional de cada día, a mis padres por enseñarme a seguir adelante y nunca rendirme, a mi profesora guía Dra. Alexandra Angulo, por su paciencia, motivación y amistad.

DEDICATORIA

Para mis padres por apoyarme y ayudarme en los momentos difíciles, con sus consejos y amor, a Dios por acompañarme y guiarme por el buen camino para cumplir un propósito más de vida.

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo la evaluación de anticuerpos vacunales contra la Bronquitis Infecciosa en aves traspatio mediante pruebas serológicas, en un predio de Checa, siendo motivo de esta investigación la observación de problemas y pérdidas que se sufre dentro de la crianza no tecnificada de aves de estirpe criolla por patologías aviarias, entre estas la Bronquitis Infecciosa Aviar. Después de haber verificado la calidad de las dos vacunas contra la Bronquitis Infecciosa usadas en el estudio, se evaluó la respuesta de anticuerpos pre y post vacunación en aves mayores a cuatro semanas, a través de la prueba ELISA Indirecto. La población considerada dentro de este estudio fue de 90 aves separadas en tres grupos: el grupo 1 fue inoculado con la vacuna sola, el grupo 2 con la vacuna bivalente y el grupo control sin vacuna, evaluando el título de anticuerpos en 4 tiempos diferentes, día 0, 7, 14, 21, con el fin de evaluar el desarrollo de la respuesta de anticuerpos en el transcurso del tiempo.

Se evidenció un aumento significativo de la cantidad de anticuerpos contra el virus de la Bronquitis Infecciosa después de la vacunación en los grupos 1 y 2, mientras que, en las aves no vacunadas no hubo modificación significativa a lo largo del experimento; por lo tanto, podemos concluir que hay una relación positiva entre la inoculación de la vacuna y el desarrollo de anticuerpos contra la Bronquitis Infecciosa y no existe virus de campo circulante en el ambiente.

Palabras clave: Enfermedad de Bronquitis, anticuerpos, aves de traspatio, prueba ELISA.

ABSTRACT

The present study had which objective the evaluation of vaccines antibodies against Infectious Bronchitis in backyard birds by means of serological tests, in a property of Checa, being the reason for this investigation the observation of problems and losses that are suffered within the non-technical breeding of birds of creole lineage due to avian pathologies, including Avian Infectious Bronchitis. After having verified the quality of the two vaccines against Infectious Bronchitis used in the study, the response of pre and post vaccination antibodies in birds older than four weeks was evaluated, through the Indirect ELISA test. The population considered in this study was 90 birds separated into three groups: group 1 was inoculated with the vaccine alone, group 2 with the bivalent vaccine and the control group without vaccine, evaluating the antibody titer at 4 different times, day 0, 7, 14, 21, in order to evaluate the development of the antibody response over time. There was a significant increase in the amount of antibodies against the Infectious Bronchitis virus after vaccination in groups 1 and 2, while in unvaccinated birds there was no significant difference; therefore, the relevant conclusion is that there is a positive relationship between the inoculation of the vaccine and the development of antibodies against Infectious Bronchitis and there is no circulating field virus in the environment.

Evidenced a significant increase of the amount of antibodies against Infectious Bronchitis virus after vaccination in groups 1 and 2, while, in unvaccinated birds there was no significant modification throughout the experiment; Therefore, we can conclude that there is a positive relationship between the inoculation of the vaccine and the development of antibodies against Infectious Bronchitis and there is no circulating field virus in the environment.

Key words: Bronchitis disease, antibodies, backyard birds, ELISA test.

INDICE

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVOS	2
1.1.1 Objetivo General	2
1.1.2 Objetivos específicos	2
1.2 HIPÓTESIS	2
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO	3
2.1 Características Bronquitis Aviar	3
2.2 Signos clínicos.....	3
2.3 Diagnóstico de la enfermedad de bronquitis infecciosa aviar	4
2.3.1 ELISA Indirecto	4
2.3.2 HA (Prueba de Hemaglutinación).....	6
2.3.3 HI (Inhibición de Hemaglutinación)	6
2.4 Tratamiento	7
2.5 Prevención	7
2.5.1 Tipos de vacunas.....	7
2.5.1.1 Vacunas vivas atenuadas	7
2.5.1.2 Vacunas inactivadas	8
2.5.1.3 Vacunas vectoriales o recombinadas.....	8
2.5.2 Prevención en contra de la Bronquitis Infecciosa Aviar.....	9
2.5.3 Programas de vacunación	10
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Ubicación.....	11
3.2 Población y muestra	12
3.3 Materiales	13
3.3.1 De campo	13
3.3.2 De laboratorio	13
3.3.3 De oficina.....	13
3.3.4 Materiales biológicos	13
3.3.5 Materiales químicos	14
3.4 Metodología.....	14

3.4.1 Identificación de aves	14
3.4.2 Toma de muestras	14
3.4.3 Análisis de las muestras	15
3.5 Diseño experimental	16
3.5.1 Variables.....	16
3.5.2 Diseño experimental	16
3.5.3 Análisis estadístico	17
3.5.3.1 Tablas de frecuencias	17
3.5.3.2 ANOVA	17
CAPITULO IV: RESULTADOS	19
4.1 Verificación de la calidad de las vacunas.....	19
4.2 Evaluación de los anticuerpos vacunales	20
4.2.1 Evaluación inmunológica prevacunal mediante la prueba ELISA Indirecto.....	20
4.2.2 Evaluación de la curva inmune post vacunal mediante la prueba ELISA Indirecto.....	20
4.2.3 Resultado análisis estadístico ANOVA.....	22
CAPITULO V: DISCUSIÓN	24
5.1 Discusión.....	24
5.2 Limitantes	25
CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	27
6.1 Conclusiones	27
6.2 Recomendaciones	28
REFERENCIAS	29
ANEXOS	34

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Criterios de inclusión.</i>	12
Tabla 2. <i>Operación de variables.</i>	16
Tabla 3. <i>Estudio observacional.</i>	17
Tabla 4. <i>Título dosis protectoras pruebas HI y HA</i>	19
Tabla 5. <i>Bronquitis ANOVA</i>	22
Tabla 6. <i>Bronquitis + Newcastle ANOVA</i>	23
Tabla 7. <i>Testigos ANOVA</i>	23

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> ELISA Indirecto.	5
<i>Figura 2.</i> Parroquia de Checa.	11
<i>Figura 3.</i> Bronquitis títulos de anticuerpos pre y post vacunales.	21
<i>Figura 4.</i> Bronquitis + Newcastle títulos de anticuerpos pre y post vacunales... ..	21
<i>Figura 5.</i> Testigos títulos de anticuerpos pre y post vacunales.	22

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

La Bronquitis Infecciosa Aviar es una patología de distribución mundial altamente contagiosa de las aves comerciales y de traspatio de todas las edades (Díaz, Ríos y Moreno, 2005, p. 30). Esta enfermedad ocasiona grandes pérdidas económicas por sus altos porcentajes de mortalidad y bajos rendimientos productivos debido a que el virus que causa esta enfermedad afecta a las aves del género gallináceas y su infección se da por contacto directo y aerosoles de individuos enfermos a sanos (Acevedo, 2017; Ecuared, 2018). Se caracteriza por ser uno de los agentes que mayoritariamente se encuentra involucrado en los complejos viral –bacteriano de las enfermedades respiratorias de las aves, acordes en nuestro país a las épocas del año, constituyéndose una problemática económica y sanitaria, que conlleva a tratamientos prolongados que muchas de las veces no resultan efectivos (Albéitar, 2011; Palomino, 2011).

La prevención es esencialmente mediante la aplicación de la vacuna para esta enfermedad, ya que no existe un sistema de monitorización eficiente que reconozca la presencia del virus en sitios productivos. Sin embargo, no existen procesos de control epidemiológico planificados simultáneamente con el fin de aislar y caracterizar el virus, para caracterizar con precisión el o los serotipos y las variedades que se encuentran implicadas en un brote para implementar un programa de vacunación específico (AGROCALIDAD, 2013, p. 13). No se encuentran censos que identifiquen los casos que se han presentado en la avicultura comercial (Albéitar, 2011; Palomino, 2011). Los estudios realizados sobre la respuesta inmune que generan las vacunas son realizados en las aves comerciales y en aves traspatio no se hace este tipo de pruebas por lo que se tratará en este estudio de identificar mediante pruebas de serología la respuesta de anticuerpos en aves de crianza no tecnificada para su protección a la Bronquitis.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo General

- Evaluar los anticuerpos vacunales de bronquitis en aves traspatio mediante pruebas serológicas, en un predio de Checa.

1.1.2 Objetivos específicos

- Verificar la calidad de vacunas contra bronquitis previamente a su aplicación, mediante pruebas de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación.
- Evaluar la respuesta inmune en aves mayores a cuatro semanas vacunadas o no, mediante la detección de anticuerpos serológicos para bronquitis.

1.2 HIPÓTESIS

Hipótesis nula H_0 :

Las aves de crianza no tecnificada de estirpe criolla no desarrollan anticuerpos frente a la exposición del virus vacunal para bronquitis infecciosa aviar cepa Massachusetts.

Hipótesis de estudio H_1 :

Las aves de crianza no tecnificada de estirpe criolla desarrollan anticuerpos frente a la exposición del virus vacunal para bronquitis infecciosa aviar cepa Massachusetts.

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Características Bronquitis Aviar

La Bronquitis Infecciosa Aviar es ocasionada por un coronavirus, con afinidad muy amplia por las células epiteliales del sistema respiratorio y reproductivo, riñón e intestinos por lo que su transmisión se da por aerosoles y heces de animales enfermos hacia los sanos. Este virus posee gran habilidad mutagénica por lo que es imprescindible identificar los serotipos y no se presenta una protección cruzada entre los serotipos (Merk Animal Health Website (MSD), 2018).

2.2 Signos clínicos

Los signos clínicos se presentan en pollos y gallinas de cualquier edad, siendo en las aves jóvenes más severos. Aves de más de cuatro semanas se agrupan en las fuentes de calor, por lo tanto, el consumo de alimento y la ganancia de peso se ven reducidos, para en lo posterior, presentar signos respiratorios tales como descargas nasales, estornudos, estertores, tos, conjuntivitis, con una mortalidad que puede alcanzar hasta un 25% en pollitos de tres a cuatro semanas o menores, siendo mucho más baja en pollos de seis semanas de edad, siempre y cuando no exista una infección secundaria ocasionada por un agente diferente, donde se puede alcanzar el 100% de aves muertas. En aves adultas, la mortalidad es del 1% y morbilidad del 90-100% (Albéitar, 2011; Dolz, 2011; MSD, 2018).

En las gallinas se presenta brusca baja de postura de un 25-30% o más y huevos de mala calidad (cáscara fina y frágil) por lo que puede afectar la fertilidad de estos, reduciendo de esta manera la fertilidad hasta un 92% y la incubabilidad de un 7% con mortalidad levemente aumentada de un 30-40% y morbilidad

mediana a alta de un 80- 100%. La infección en aves susceptibles se difunde rápidamente dependiendo de las condiciones ambientales, presencia o ausencia de anticuerpos y de la edad afectando al 80-100% de las aves del galpón en un tiempo aproximado de 24-48 horas. De forma general las aves presentan malestar, camas mojadas, heces acuosas (albéitar, 2011; Dolz, 2011; MSD, 2018).

2.3 Diagnóstico de la enfermedad de bronquitis infecciosa aviar

El diagnóstico de la enfermedad proporciona información confirmatoria o no de la existencia de la enfermedad en una determinada parvada para toma de decisiones óptimas y oportunas por medio de implementación de medidas y normas de bioseguridad adecuadas.

Para su diagnóstico existen un sin número de métodos diagnósticos por lo que se pueden utilizar métodos clínicos por medio de la anamnesis y sinología clínica a través de la observación directa de las lesiones presentes en una necropsia, pero a más de esto se requiere de una técnica confirmatoria por lo que se emplean pruebas serológicas tales como Prueba de Inmunoensayo (ELISA) y Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (HI) con el fin de identificar anticuerpos presentes. A demás, se recomienda la identificación por medio de la RT-PCR, el aislamiento viral o la Prueba de Hemaglutinación (HA).

2.3.1 ELISA Indirecto

El inmunoensayo indirecto es útil en la detección de anticuerpos siendo capturados por los antígenos donde su reacción se observa por medio del conjugado anti inmunoglobulina-enzima, o proteína A-enzima. La cantidad de anticuerpos en suero se indica acorde a la cantidad de enzimas enlazadas que se miden acorde a la degradación del sustrato. Esta correlación se ve afectada

cuando la concentración de anticuerpos es relativamente baja debido a que esta prueba suele sobreestimar los sueros con títulos bajos, debido a la presencia de anticuerpos de baja afinidad o Inmunoglobulinas inespecíficas. Esta técnica identifica anticuerpos de clase IgG o IgA.

La IgM puede estudiarse previa absorción de los anticuerpos IgG, aunque este isótopo debe evaluarse preferentemente con ensayos de captura IgM (Ochoa, 2012 y Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2013, p. 13).

Los anticuerpos IgY en las aves son mal nombrados IgG como en los mamíferos deberán ser específicos con relación al agente etiológico en este caso el virus que produjo a su formación, de la misma manera que ocurre en el sistema inmune de las aves, se produce en las placas de ELISA (figura 1) (Mejía, 2016).

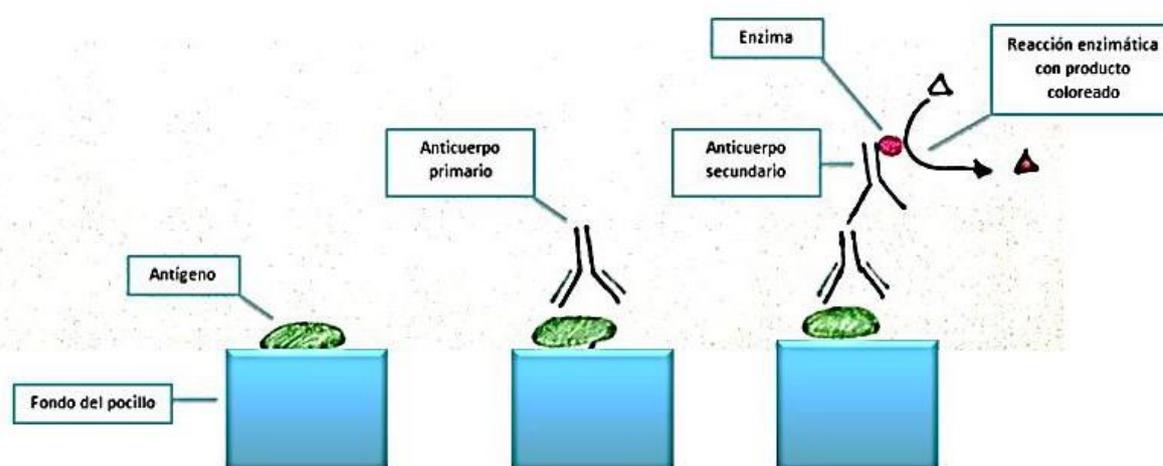


Figura 1. ELISA Indirecto.

Tapizado de los pocillos con el antígeno de estudio, el cual se adhiere a las paredes, el antígeno es reconocido por un anticuerpo primario que carece de enzima conjugada, posteriormente es reconocido por un anticuerpo secundario conjugado a una enzima que desencadenara a reacción enzimática y la formación de un compuesto coloreado (BIOLOGYBLOGG, 2014).

2.3.2 HA (Prueba de Hemaglutinación)

Esta prueba de hemaglutinación es la recomendada para hallar títulos hemoaglutinantes de virus de Bronquitis Infecciosa Aviar, Newcastle e Influenza Aviar (Villacís, Sánchez, Castillo y Neira, 2014, p. 88).

Permite determinar la cantidad de virus presente en una muestra, llevada a cabo mediante diluciones seriadas haciéndose visibles cuando el antígeno se une o forma parte de la superficie de los eritrocitos. El resultado de HA es la aglutinación de los glóbulos rojos, unión producida por el virus, dando lugar a un patrón que se forma en el fondo del pozuelo debido a la unión de los eritrocitos por la hemaglutinina viral. Esta técnica consta con una sensibilidad del 98% y una especificidad del 79% (Villalobos, Gómez y León, 2010, p.54).

2.3.3 HI (Inhibición de Hemaglutinación)

La prueba de HI también es empleada para la determinación de anticuerpos en particular la detección de Inmunoglobulinas IgM e IgG lo que permite detectar tempranamente la respuesta inmune que presentan aves posteriores a la vacunación (OIE, 2004, 2013).

Requiere para su ejecución de glóbulos rojos y antígenos inactivados. Es una técnica que se realiza en tres pasos el primero consiste en la titulación del antígeno; el segundo en el control de unidades hemaglutinantes y el tercero es la realización de la Inhibición de la hemaglutinación con los sueros (OIE, 2008, p. 8).

2.4 Tratamiento

Tratamiento como tal de la enfermedad no existe por lo que se recomienda para su prevención la vacunación de las aves.

2.5 Prevención

2.5.1 Tipos de vacunas

Existen tres tipos de vacunas aviares: vacunas vivas atenuadas, vacunas inactivadas y vacunas vectoriales o recombinantes (Torrubia, Gómez, Thierry, Peña y Hauck, 2014, p.15).

2.5.1.1 Vacunas vivas atenuadas

Este tipo de vacuna tiene el virus debilitado o modificado, con la capacidad de generar inmunidad sin producir la enfermedad, imitando a una infección de forma natural (OIE, 2008, p.9).

Los virus atenuados inducen a la formación de inmunoglobulinas IgA y sirven para la producción de inmunidad local. La vacuna es procesada por células presentadoras de antígeno activando las células T y B para formar células de memoria para generar células Th y Tc a varios epítopes, los antígenos persisten y continua el reclutamiento de células B de memoria produciendo anticuerpos de alta afinidad. La inmunidad generada por las vacunas es similar a la originada por la enfermedad, la vacunación desencadena una respuesta humoral y celular del organismo mediante la formación de anticuerpos que van actuar neutralizando o facilitando la fagocitosis de los agentes infecciosos específicos (OIE, 2008, p.10).

La principal ventaja de esta vacuna es que puede ser administrada por técnicas de aplicación masiva y a bajos costos, puede proveerse a las aves en el agua de bebida, de forma conjuntival o intranasal (OIE, 2008, p.9).

2.5.1.2 Vacunas inactivadas

Este tipo de vacunas se encuentra compuesta por el microorganismo inactivado, mediante el uso de calor o a través de agentes químicos, incapaz de reproducirse o producir la enfermedad. Se utiliza en aves de vida larga como ponedoras y reproductoras. Aunque también se emplea en pollos comerciales en países donde existen cepas de alta patogenicidad (Torrubia et al., 2014, p.15).

Su modo de administración es individual por vía intramuscular o subcutánea. Su principal ventaja es producir bajos grados de reacciones adversas en las aves vacunadas (OIE, 2008, p.9).

2.5.1.3 Vacunas vectoriales o recombinadas

Estas vacunas están compuestas por virus vivos que han sido modificados que expresan antígenos exógenos, siendo insertados uno o más genes que codifican antígenos, generalmente proteínas, en el ADN del vector, así cuando el vector se replique en el huésped no solo expresa sus proteínas propias sino también expresa los genes insertos y ofrece una fuerte respuesta inmune humoral y celular.

Su principal ventaja es que no existe excreción del virus al ambiente, brindado seguridad a las aves ya que no son expuestas ante un virus vivo, pueden ser aplicadas al primer día de vida y sus reacciones postvacunales son mínimas (Santander, Álvarez, Olaya, Gómez y Villamil, 2014, p.269).

2.5.2 Prevención en contra de la Bronquitis Infecciosa Aviar

La vacunación es la manera de prevención y control de la bronquitis infecciosa aviar acorde a los planes de vacunación y calendarios establecidos en cada una de las granjas avícolas. Las vacunas de uso comercial que se utilizan para la prevención e inmunización de aves sanas son: Bronquitis, la vacuna liofilizada contra la Bronquitis Infecciosa Aviar que contiene virus vivo del serotipo *Massachusetts* de la enfermedad, mientras que, Newcastle más Bronquitis, la vacuna liofilizada de virus vivo modificado de Newcastle cepa *La Sota* tipo *B1* y de Bronquitis Infecciosa virus vivo cepa *Massachusetts* contra Newcastle y Bronquitis. Se aplica por vía ocular y nasal una gota, agua de bebida y aspiración a gota gruesa acorde a las tablas recomendadas.

La vacunación desde el primer día de vida de las aves es una práctica aceptada por muchos investigadores y productores ya que de esta manera se desafía al individuo por medio del virus vacunal que por medio de los anticuerpos maternos algunos virus son neutralizados, pero a pesar de eso, existe una colonización en el tracto respiratorio superior permitiendo estimular el sistema inmunitario dando como resultado una primovacunación que prepara al sistema inmune para una reacción mayor frente a una segunda exposición del virus. De acuerdo a los programas de vacunación, las aves de vida larga reciben en la etapa de crianza y desarrollo de 3 a 4 vacunas vivas seguido de una vacuna inactiva antes de que inicie la etapa de producción, aplicadas por vía ocular y nasal una gota, agua de bebida o por aspersion a gota gruesa (Torrubia et al., 2014, p.18).

En ponedoras y reproductoras se aplica a la edad de 1-7 días y a las 8 semanas mientras que en los pollos de engorde solamente se aplica de 1-7 días debido a su periodo corto de producción. La vacunación va conjuntamente acompañada de normas de bioseguridad que se encuentran establecidos por medio de la identificación y conocimiento que se tiene del agente patógeno que se encuentre presente en el medio ambiente. Para ello, se utilizan vacunas a virus vivo

atenuadas y vacunas inactivadas con la recomendación de revacunación a los 7 días de la primera vacunación para una mejor inmunización, luego cada 6 meses (albéitar, 2011).

2.5.3 Programas de vacunación

Actividad fundamental con el objetivo de proteger a las aves frente al virus durante toda su vida con la finalidad de proporcionarle inmunidad frente a este, su diseño depende de la zona donde se encuentre el plantel avícola y será elaborado acorde a la incidencia de la enfermedad y los problemas que se encuentren en las parvadas (Briceño, Rodríguez y Rodríguez, 2012, p.28).

Desafortunadamente existe desinformación de la enfermedad de Bronquitis Infecciosa Aviar en el territorio ecuatoriano (Villacís et al., 2014, p.86).

CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación

El presente estudio está enfocado hacia la avicultura de traspatio en un predio de la parroquia de Checa (figura 1) ubicada al noroeste del Distrito Metropolitano de Quito perteneciente al sector de Oyambaro (Montenegro, 2007, p. 19).

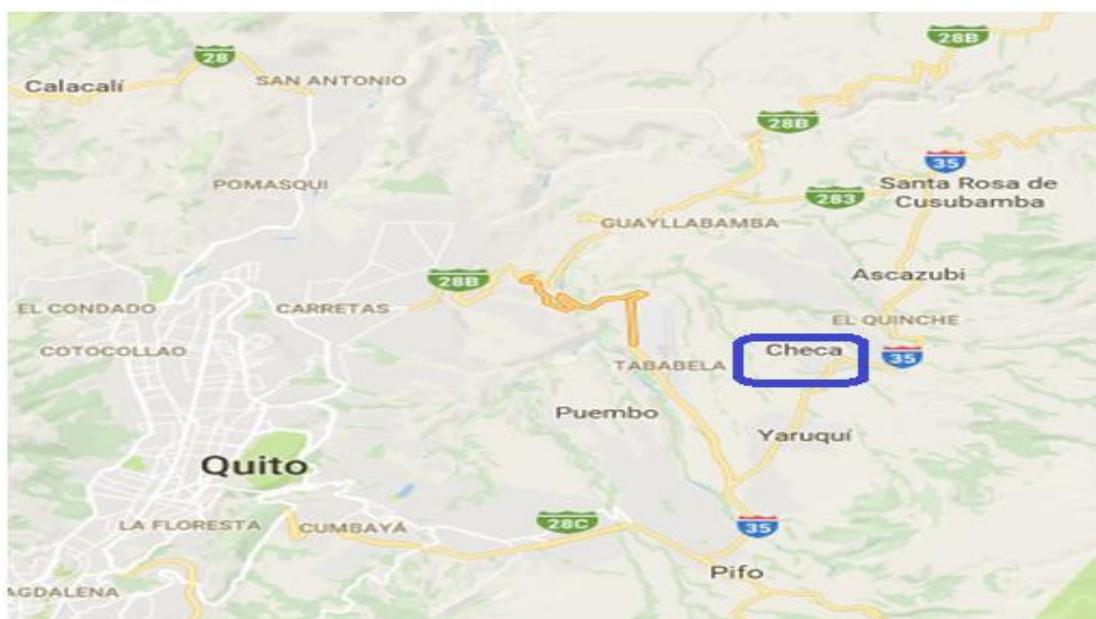


Figura 2. Parroquia de Checa.

El área delimitada dentro de la línea azul, es la ubicación de dicha parroquia (Digitalglobe, 2017).

La parroquia de Checa consta con una superficie de 116,28 Km² siendo sus límites: Norte: con la parroquia El Quinche y Cantón Cayambe, Sur: la parroquia de Yaruquí, Este: Provincia de Napo y Guayllabamba y Oeste: Parroquia Tababela (González, 2003).

Checa posee una altitud de 4.452 msnm para las zonas altas y 1.850 msnm para las zonas bajas con un clima templado con temperaturas que oscilan entre los 10-17°C (Montenegro, 2007).

3.2 Población y muestra

El predio cuenta con 100 aves mestizas, gallos y gallinas finas, con tipo de crianza traspatio, siendo su actividad principal la venta de las aves en pie y también para el consumo de la casa los huevos y aves. Para el presente estudio se tomarán en cuenta 90 aves conformadas en 3 grupo de 30 aves cada uno siendo consideradas aves no vacunadas las gallinas, pollos y pollas mayores a cuatro semanas; aves vacunadas con la vacuna sola y otro grupo con la vacuna bivalente se consideran los gallos mayores a 1 año (Tabla 1).

Tabla 1.

Criterios de inclusión.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Aves mayores a 4 semanas de edad.	Aves menores a las 4 semanas de edad.
Aves sanas	Aves enfermas (que presente signos de enfermedad).

3.3 Materiales

3.3.1 De campo

- Overol
- Guantes desechables
- Jeringas descartables de 5ml
- Algodón
- Hielera
- Tubos tapa roja estériles

3.3.2 De laboratorio

- Kit ELISA indirecto, HA, Hi
- Refrigeradora

3.3.3 De oficina

- Computador
- Esferográfico
- libreta
- Cámara fotográfica
- Libreta de campo

3.3.4 Materiales biológicos

- 90 aves
- Sangre (suero)

- Vacunas (Bronquitis cepa Massachusetts, Newcastle más Bronquitis cepa *La Sota* tipo *B1* y de Bronquitis Infecciosa cepa Massachusetts)

3.3.5 Materiales químicos

- Alcohol

3.4 Metodología

3.4.1 Identificación de aves

Cada ave fue identificada de manera individual y por colores, facilitando de esta manera la toma de muestras y la lectura de resultados siendo distribuidos de la siguiente manera: Vacuna 1 (Bronquitis) con bandas de color rojo y con numeración del 1 al 30, Vacuna 2 (Bronquitis + Newcastle) con bandas amarillas y numeración del 31 al 60, Testigos con bandas azules y con numeración del 61 al 90, este procedimiento es de gran importancia para el reconocimiento si el ave fue o no vacunada.

3.4.2 Toma de muestras

Este procedimiento se realizó en cada una de las aves por cuatro ocasiones a los 0, 7, 14,21 días acorde a los criterios de inclusión tomados en cuenta.

El protocolo de extracción de sangre fue el siguiente ((Briceño et al., 2012, p.29; Livexlab, 2017):

- Exponer la vena braquial del ala por medio de eliminación de plumas.
- Realizar el proceso de desinfección con una torunda de alcohol.

- Inserta la aguja calibre 22, manteniendo al ave bajo sujeción.
- Extraer aproximadamente de 1 a 3 ml de sangre.
- Trasvasar cuidadosamente a un tubo de ensayo estéril sin anticoagulante.
- Dejar reposar los tubos de ensayo a temperatura ambiente en un plano inclinado por un tiempo de una a dos horas, para favorecer la formación del coágulo y obtención del suero.
- Trasvasar cuidadosamente el suero obtenido a un nuevo tubo estéril.
- Refrigerar a una temperatura de 3 a 4 °C para su posterior análisis.

Cada muestra fue identificada con el número asignado y color a cada ave en cada una de las muestras tomada por 4 ocasiones con un intervalo de 7 días cada toma.

3.4.3 Análisis de las muestras

Las muestras fueron transportadas hacia el laboratorio a 4 °C para su posterior análisis por medio de la prueba ELISA Indirecto, obteniendo información por medio de esta prueba si existe o no una respuesta de anticuerpos frente a la Bronquitis Aviar. Para la titulación de las vacunas se utilizó pruebas de HI y HA para el análisis de la dosis protectora que aportan las vacunas acordes a la cantidad de antígeno viral que presenten las vacunas para en lo posterior análisis de resultados. El análisis fue realizado acorde al protocolo del laboratorio que fue emitidos para analizar y elaborar tablas de frecuencias con el propósito de observar si existe o no una respuesta inmunitaria que presenten las aves frente a bronquitis infecciosa por medio de las pruebas ANOVA, DUNCAN, tablas de contingencia, de tal manera que, se acepte o rechace hipótesis nula o alterna valorando si existe o no una variación significativa de la respuesta inmunitaria de las aves.

3.5 Diseño experimental

3.5.1 Variables

En este estudio se consideraron las siguientes variables para poder llevarse a cabo (tabla2).

Tabla 2.

Operación de variables.

Variables	Tipo de variable	Definición	Indicador	Unidad de medida	Ítem	Instrumento
Títulos de antígenos de la vacuna	Cuantitativa Continua	Cantidad de Ag virales presentes en la vacuna.		10 ⁿ	Títulos de dosis protectora	HI
			Positivo	≥ 1/16	Dilución	HA
			Negativo.	< 1/16		
Presencia de anticuerpos serológicos para bronquitis	Cuantitativa / Continua	Estado de inmunidad	Positivo	≥400	Títulos pre vacunales;	ELISA
			Negativo.	0-399	Títulos postvacunales a los 7, 14 y 21 días	Indirecta

3.5.2 Diseño experimental

Es un estudio de tipo observacional y por ende se detalla a continuación la metodología a desarrollarse (tabla3).

Tabla 3.

Estudio observacional.

	Vac1	Vac2	No vac	Días
	30	30	30	0
# de	30	30	30	7
animales	30	30	30	14
	30	30	30	21

3.5.3 Análisis estadístico

3.5.3.1 Tablas de frecuencias

El análisis de resultados ELISA indirecto se tabuló mediante el uso de tablas de frecuencias tanto de las aves vacuna 1, aves vacuna 2 y testigos considerando las cuatro tomas en diferentes tiempos con intervalo de siete días, expresados de manera ordenada si existe o no respuesta inmunitaria observando un incremento en la generación de anticuerpos para Bronquitis en aves vacunadas y no vacunadas, expresando así el número de aves que desarrollan anticuerpos ante la exposición del virus vacunal y determinar si la población posee una cantidad de anticuerpos homogénea o dispersa y si existe diferencia significativa entre los grupos de respuesta inmune de las aves (Estadística Descriptiva).

3.5.3.2 ANOVA

Se utilizó el programa SPSS en donde se consideraron las variables de estudio como datos, el número de aves, los resultados de los títulos de anticuerpos de cada una de las 4 tomas de cada animal, de tal manera que, el programa da

como resultado si hay o no diferencia significativa entre los diferentes tiempos pre y post vacunales. Para de esta manera aceptar o rechazar la hipótesis nula o alterna.

La premisa de la hipótesis nula es que el tratamiento no tiene ningún efecto sobre los diferentes grupos y, por ende, sus promedios serán estadísticamente iguales.

“Ho: μ_1 toma prevacunal = μ_2 toma postvacunal 7 = μ_3 toma postvacunal 14 = μ_4 toma postvacunal 21.

H1: μ_1 toma prevacunal \neq μ_2 toma postvacunal 7 \neq μ_3 toma postvacunal 14 \neq μ_4 toma postvacunal 21” (Fallas, 2012).

CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1 Verificación de la calidad de las vacunas

Previamente al experimento de inmunización, se verificó la calidad de las vacunas mediante prueba HI y HA para confirmar que son aptas para la aplicación, pudiendo de esta manera determinar que la cantidad de antígeno viral que contienen las vacunas son los adecuados y los resultados obtenidos se presentan en la tabla 4.

Tabla 4.

Título dosis protectoras pruebas HI y HA

Pruebas	Vacuna	Título de dosis protectoras/dilución	Etiqueta
HI	Bronquitis	10^6	10^4
HI	Bronquitis + Newcastle	10^6	$10^{5,5}$
HA	Bronquitis	1/548	1/348
HA	Bronquitis + Newcastle	1/548	1/498

HI= Inhibición de la Hemaglutinación; HA=Hemaglutinación.

4.2 Evaluación de los anticuerpos vacunales

4.2.1 Evaluación inmunológica prevacunal mediante la prueba ELISA

Indirecto

En la toma prevacunal se pudo observar que las 30 aves de la vacuna 1 son positivas en la prueba ELISA Indirecto, 25 aves positivos y 5 negativos de la vacuna 2. Esto se puede explicar por una exposición vacunal anterior, ya que este tipo de aves adultas normalmente reciben una dosis de vacuna por año, mientras que en los testigos se obtuvieron resultados negativos ya que nunca fueron vacunados, y se puede, decir, que no existe virus de campo presente en el predio.

4.2.2 Evaluación de la curva inmune post vacunal mediante la prueba ELISA Indirecto

Considerando los resultados a los 7, 14, 21 días post vacunación se puede observar que las aves con la vacuna 1 y vacuna 2 tuvieron un incremento de anticuerpos sobrepasando los niveles de anticuerpos iniciales a diferencia de los testigos que se mantienen negativos por lo que se puede decir que no existe virus de campo circulando en el ambiente y la respuesta que tiene las aves es precisamente debido a vacunación como se observa en las figuras 3, 4 y 5.

Resultados de títulos de anticuerpos de bronquitis

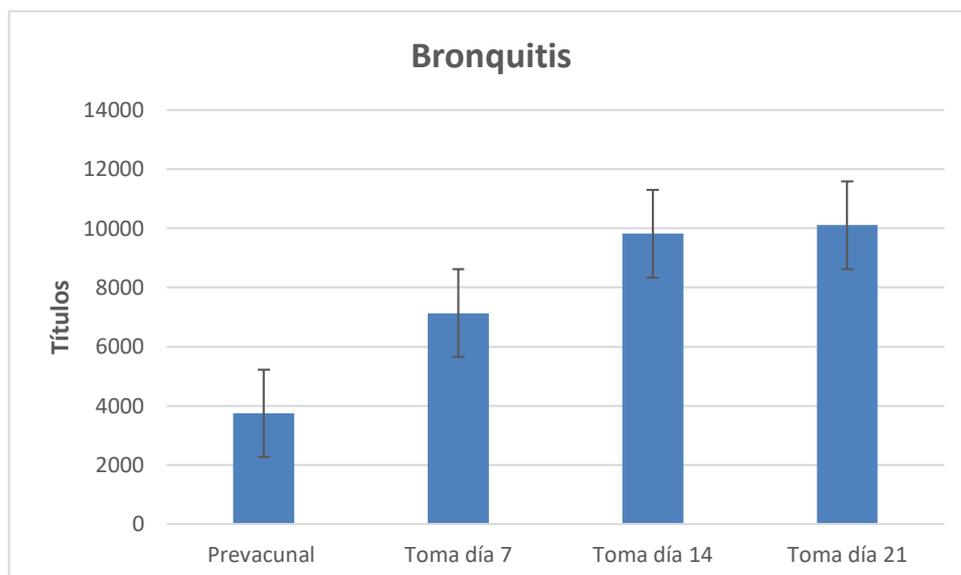


Figura 3. Bronquitis títulos de anticuerpos pre y post vacunales.

Resultados de títulos de anticuerpos de bronquitis + Newcastle

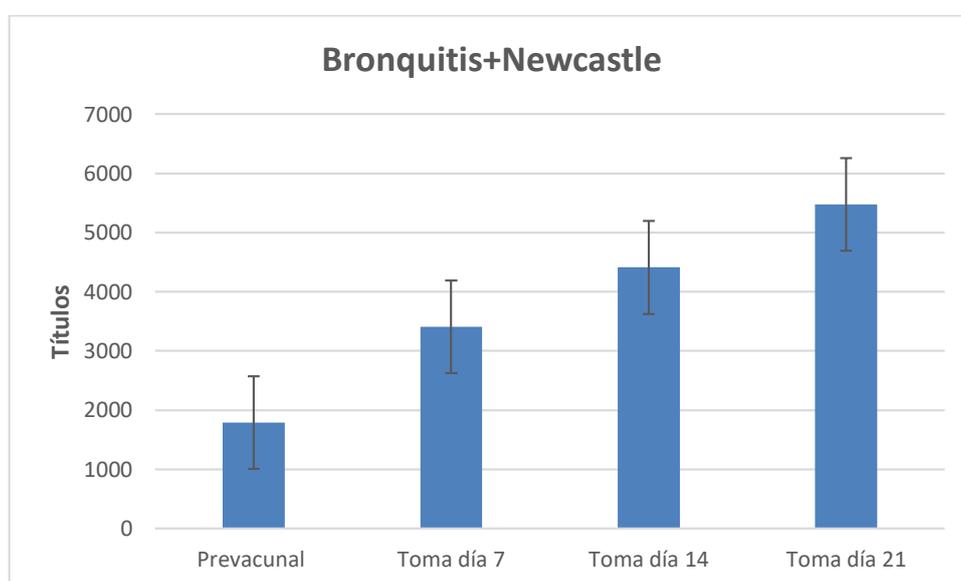


Figura 4. Bronquitis + Newcastle títulos de anticuerpos pre y post vacunales.

Resultados de títulos de anticuerpos de testigos

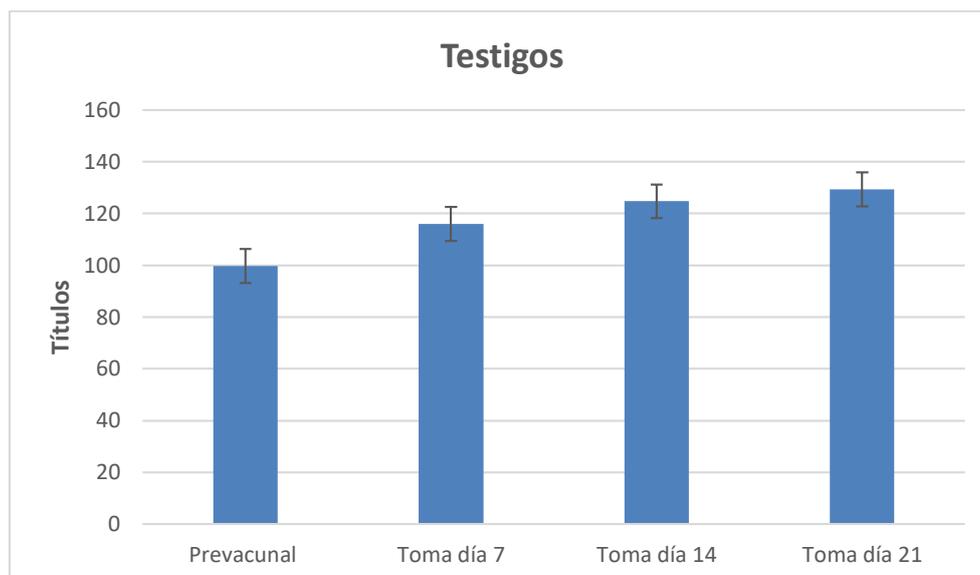


Figura 5. Testigos títulos de anticuerpos pre y post vacunales.

4.2.3 Resultado análisis estadístico ANOVA

Según los datos obtenidos en la prueba estadística ANOVA, presentados en las tablas 5 y 6 se puede observar para la vacuna Bronquitis y la vacuna Bronquitis+Newcastle, que existe una diferencia significativa en el título de anticuerpos pre y post-vacunación, el valor crítico mayor, por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 existiendo una respuesta inmune positiva.

Tabla 5.

Bronquitis ANOVA

Títulos	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre tomas	787131241,400	3	262377080,500	70,844	,000

Dentro de tomas	429616836,600	116	3703593,419
Total	1216748078,000	119	

Tabla 6.

Bronquitis + Newcastle ANOVA

Títulos	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre tomas	221466810,200	3	73822270,080	9,545	,000
Dentro de tomas	897177035,600	116	7734284,789		
Total	1118643846,000	119			

En cuanto al grupo testigos de aves no vacunadas, se observa en la tabla 7 que no existe una diferencia significativa en el título de anticuerpos pre y post-vacunación. El valor crítico es menor, por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , y se concluye que no se ha desarrollado una respuesta inmune. Además, se puede afirmar que el virus de campo de la Bronquitis no se encuentra presente.

Tabla 7.

Testigos ANOVA

Títulos	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre tomas	15390,425	3	5130,142	1,084	,359
Dentro de tomas	549124,900	116	4733,835		
Total	564515,325	119			

CAPITULO V: DISCUSIÓN

5.1 Discusión

En las figuras 3 y 4, que representan el incremento de la respuesta inmune para Bronquitis Aviar en aves de crianza no tecnificada se puede evidenciar que existe una relación positiva entre la actividad de vacunación y el desarrollo de anticuerpos post- vacunales. Hilario (2013, p.72) con un cronograma similar de vacunación reporta que observó un desarrollo significativo en la respuesta inmunológica de las aves de traspatio ante la enfermedad de Bronquitis con un incremento del nivel de anticuerpos.

Es importante recalcar que existe un aumento significativo de la cantidad de anticuerpos contra el virus de la Bronquitis Infecciosa en las aves vacunadas; mientras que, en las aves no vacunas no hubo modificación significativa confirmando que el virus de campo no se encuentra presente, pero puede presentarse. Cuello et al (2011, p. 20), reporta que “la actividad de inmunización en las aves es la forma más económica y efectiva de protegerlos ante las enfermedades infecciosas y el uso combinado de vacunas vivas e inactivadas proporciona a las aves mejores repuestas inmunes”.

El grupo de testigos que son aves no vacunadas, están en riesgo de contaminación por las aves que entran y salen del predio, sin embargo, en la figura 5, se observa que no presentan anticuerpos, indica que el virus no se encuentra presente en el ambiente, aunque exista la posibilidad de presentarse en este tipo de explotaciones. Ferrer, Icohea, Salas y Alba (2008, p.71) indican que la Bronquitis puede mantenerse en la actividad avícola no tecnificada de forma endémica; las aves infectadas tienen la capacidad de infectar a aves sanas generando un ciclo de diseminación de virus continuo siendo portadores. Briceño et al (2012, p.32) señala que “existe un continuo reto del virus en poblaciones de

traspatio haciendo evidente la necesidad de implementar planes de vacunación y medidas de bioseguridad para este tipo de aves”; OIE (2016) señala que el virus de la enfermedad de Bronquitis se encuentra presente en el país, siendo reportada por última ocasión en septiembre del 2016 en la provincia de Cotopaxi.

El movimiento de aves de traspatio principalmente por efectos de su comercio presenta un factor predisponente para que se presente la enfermedad en este tipo de aves debido a la exposición en algunas ocasiones con aves de pelea que regularmente se encuentran en ferias, Briceño et al (2012, p.32) indica que “el virus se encuentra presente en gallos de pelea principalmente por el movimiento continuo y el contacto entre aves de diferentes predios”.

5.2 Limitantes

- Encontrar aves sin exposición previa a la vacunación, ya que, por lo general, este tipo de aves reciben una dosis vacunal por año debido a la exposición en ferias y contacto continuo entre aves de diferentes predios. Por esta razón, no se tiene un grupo testigos homogéneo ni comparte las mismas características para hacer las comparaciones pertinentes.
- Disposición de aves para este tipo de estudio, debido a que muchos propietarios no permiten la extracción de muestras sanguíneas ya que son aves que se encuentran en constante actividad y se les causa estrés. Además de producirse hematomas en el área de punción lo que genera desagrado en el propietario. Pero a pesar de estos inconvenientes, se realizó las tomas en los diferentes tiempos considerando el bienestar animal.
- Los costos elevados de las pruebas serológicas y titulación de la vacuna, ya que, para una respuesta inmune adecuada se debe conocer la carga de antígenos virales que contiene una vacuna, para de esta manera evaluar si esta apta o no para ser aplicado a las aves de pelea y obtener una protección adecuada frente a la enfermedad.

- Disponibilidad de tiempo para la realización de las pruebas, ya que las pruebas serológicas tienen un protocolo de análisis de muestras lo cual retrasa el avance en el análisis de resultados.

CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

Los resultados obtenidos de la titulación de la vacuna permitieron confirmar que son aptas para la vacunación, permitiendo observar un incremento de producción de anticuerpos en las aves vacunadas.

Al finalizar la presente investigación, en base a los resultados obtenidos y analizados de la prueba ELISA Indirecto se concluye, que, existe una relación positiva entre la vacunación y el desarrollo de anticuerpos post-vacunales ante la enfermedad de Bronquitis Aviar en las aves.

En las aves testigo no hubo modificación significativa de anticuerpos ante el virus de la Bronquitis lo que nos indica que no existe virus de campo circulando en el ambiente y por ende las aves no tienen contacto con el virus de campo a pesar de ser una enfermedad altamente contagiosa.

6.2 Recomendaciones

Posterior a la evaluación de esta investigación, es recomendable realizar un estudio con aves sin vacunación previa para evaluar la respuesta inmune ante la primovacunación de la Bronquitis Infecciosa Aviar.

En este estudio se ha demostrado que la vacuna induce a la producción de anticuerpos por lo que se debe demostrar que esta respuesta es protectora infectando las aves vacunadas con el virus de la Bronquitis Infecciosa.

Realizar monitoreos en las aves de traspatio de manera rutinaria, para obtener información acerca de las enfermedades que prevalecen en ellas, en especial la enfermedad de Bronquitis.

Desarrollar más estudios acerca del estado de Bronquitis Aviar en aves de crianza no técnica de diferentes zonas del país y verificar qué zonas son endémicas y zonas en las que no se detecta el virus de campo.

REFERENCIAS

- Acevedo, A., Burgher, Y., Colás, M., Relova, D., Correa, A., Bacallao, E., & Noda, J. (2010). Detección en muestra clínica e identificación de aislados de virus de la bronquitis infecciosa aviar por un ensayo de reverso transcripción acoplado a reacción en cadena de la polimerasa. *Revista de Salud Animal*, 32(2), 112-117. Recuperado en 13 de diciembre de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2010000200007&lng=es&tlng=es.
- Acevedo, M. (2017). Virus de la bronquitis infecciosa: un desafío para la avicultura. *Revista de Salud Animal*, 39(3), 00. Recuperado en 13 de diciembre de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2017000300007&lng=es&tlng=es.
- Acevedo Beiras, A. (2010). Bronquitis infecciosa aviar: diagnóstico y control. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 11 (3), 1-23. Recuperado el 13 de diciembre del 2018 de : <http://veterinaria.org/revistas/redvet/n030310/031025.pdf>
- AGROCALIDAD. (2018). Instructivo toma y envío de muestras en animales domésticos. recuperado el 21 de diciembre del 2019 de : <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2018/02/11-INT-DA-19-Rev-4.pdf>.
- Albéitar. (2011). *Prevención y tratamiento de la bronquitis infecciosa aviar*. Recuperado el 28 de septiembre del 2010 de: <https://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/10522/articulos-aves-archivo/prevencion-y-tratamiento-de-la-bronquitis-infecciosa-aviar.html>
<https://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/11727/articulos-aves/control-de-la-bronquitis-infecciosa-aviar.html>
- Aviplanet. (2017). *Monitorización serológica*. Recuperado de: <https://aviplanet.com/monitorizacion-serologica/>

- BIOLOGIBLOGG. (2014). Técnica de ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay. Recuperado de: <https://biologyblogg.wordpress.com/2014/10/19/tecnica-de-elisa-enzyme-linked-immunosorbent-assay/>
- Briceño, E., Rodríguez, J. y Rodríguez, S. (2012). Seroprevalencia de la enfermedad de Newcastle y Bronquitis infecciosa aviar en gallos de pelea del municipio de Saboyá, Boyaca. *Rev Conexión agropecuaria JDC*. 2(1), 28 Recuperado de <http://www.revistasjdc.com/main/index.php/conexagro/article/view/182>
- CEVA. (2009). *Bronquitis Infecciosa Aviar*. Recuperado de : <https://aviplanet.com/bronquitis-infecciosa-aviar-fundamentos-patogenicos/> https://aviplanet.com/ibv-muestreo-interpretacion-pruebas_laboratorio/
- Collingwood-Selby, A., & Toro G., H. (1992). Virus bronquitis infecciosa aviar unido a fase sólida para detección de anticuerpos específicos en pruebas de ELISA. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 7(2). doi:10.5354/0719-5273.2010.10433
- Córdoba Argoti, G., Vera Alfonso, V., Correa Jaime, J., & Ramírez Nieto, G. (2015). Comportamiento del virus de la bronquitis infecciosa aviar en aves con sintomatología respiratoria provenientes de granjas de producción del Departamento de Cundinamarca. *Nova*, 13(23), 47-64. doi:<https://doi.org/10.22490/24629448.1705>
- Cuello, S., Noda, J., & Perera, Ay C. (2004). Bronquitis infecciosa aviar. Cinética de anticuerpos posvacunales en reproductoras y su transferencia a la progenie. *Rev. Salud Anim.* 26 (1), 42-47
- Díaz, J., Ríos, H., & Moreno, O. (2005). Determinación serológica para las enfermedades de Newcastle y bronquitis infecciosa en las aves de combate de Bucaramanga. *ICA*, recuperado de : [file:///C:/Users/biblioteca/Downloads/555-1140-1-SM%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/biblioteca/Downloads/555-1140-1-SM%20(1).pdf)
- EcuRed. (2018). *bronquitis infecciosa aviar*. Recuperado el 28 de septiembre del 2010 de: https://www.ecured.cu/Bronquitis_Infecciosa_Aviar

- Dolz, R., Bertran, K., & Masferrer, N. (2011). Prevención y tratamiento de la bronquitis infecciosa aviar. Recuperado de : <https://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/10522/articulos-aves-archivo/prevencion-y-tratamiento-de-la-bronquitis-infecciosa-aviar.html>
- Fallas, J. (2012). *Análisis de varianza*. Recuperado de : http://www.ucipfg.com/Repositorio/MGAP/MGAP-05/BLOQUE-ACADEMICO/Unidad-2/complementarias/analisis_de_varianza_2012.pdf
- FAVET. (2016). *Facultad de Ciencias Veterinarias y pecuarias*. Obtenido de: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/140714/Evaluacion-serologica-del-plan-de-vacunacion-contrabronquitis-infecciosa-en-gallinas-ponedoras-de-diferentes-edades-de-un-plantel-comercial.pdf?sequence=1>
- Gonzalez, R. (2003). Plan de desarrollo participativo 2002- 2012 Parroquia Checa. Quito: Editorial Pedro Jorge Vera.
- Jove, A. (2004). *Evaluación de las cepas H120 y M48 en programas de vacunación contra bronquitis infecciosa aviar en pollos de carne*. Recuperado de: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/2266/Jove_ma.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Levrier, B. (1994). *El diagnóstico vírico, desde el examen clínico al test ELISA: ¿cuál escoger?*. Recuperado de: https://ddd.uab.cat/pub/selavi/selavi_a1994m8v36n8/selavi_a1994m8v36n8p495.pdf
- Livexlab. (2017). *Procedimiento operativo estándar toma y envío de muestras al laboratorio manual de procedimientos*. Recuperado de: <http://livex.com.ec/wp/wp-content/uploads/2017/12/MANUAL-DE-TOMA-Y-ENVIO-DE-MUESTRAS-AL-LABORATORIO-V3.pdf>
<http://www.livex.com.ec/uploads/documentos/Manual%20de%20Toma%20de%20muestras.pdf>
- Mejía, B. (2016). *ELISA resultados con incertidumbre*. Recuperado de <http://patologiaaviarmidiagnostico.blogspot.com/2016/05/elisa-resultados-con-incertidumbre.html>

- Merk Animal Health Website. (2017). *Bronquitis infecciosa*. Recuperado de : <http://www.bronquitis-infecciosa.com/patogenesis.asp>
- Montenegro, M. (2007). *Checa pueblo andino realidades y recuerdos*. Quito: Don Bosco.
- Nagy, G. (2011). *Vacunaciones de las aves*. Recuperado de: http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/05_04_23_Manejo_de_vacunas_y_vacunacion.es.pdf
- Ochoa, R. (2012). *Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos*. la Habana, ediciones: Finlay.
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2004). *Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres*. [versión electrónica] Recuperado de: <http://www.oie.int/doc/ged/d6508.pdf>
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2008). *Manual de la OIE sobre animales terrestres, enfermedad de Bronquitis infecciosa aviar*. [versión electrónica] Recuperado de http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.03.14.%20Enfermedad%20de%20Bronquitis.pdf
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2013). *Bronquitis Infecciosa Aviar*. [versión electrónica] Recuperado de: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.03.02_AI_B.pdf
- Palomino, T., Icochea, D., Guzmán, G., Sam, T., Manchego, S. (2011). Interferencia de la vacunación simultánea contra Metapneumovirus aviar, bronquitis infecciosa y enfermedad de Newcastle en pollos de carne. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22(1), 45-52. Recuperado en 18 de octubre de 2018, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172011000100008&lng=es&tlng=es.
- Revelo, M., García, W. (2016). Detección de bronquitis infecciosa aviar mediante diagnóstico molecular en aves de traspatio. Recuperado de

<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/11984/1/T-UCE-0014-033-2016.pdf>

Santander, A., Álvarez, D., Olaya, J., Gómez, A. y Villamil, L. (2014). Diseño de vacunas recombinantes en las enfermedades de Gumboro, Newcastle y Bronquitis infecciosa aviar. *Rev CES Med Zootec.* 9(2), 269
Recuperado de <http://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/view/3149/2248>

Torrubia, F., Gómez, C., Thierry, B., Peña, S. y Hauck, R. (2014). *Vacunación en avicultura*. España: Servet.

Villacís, G., Sánchez, G., Castillo, F. y Neira, A. (2014). Aislamiento del virus de la enfermedad de Newcastle en zonas rurales del sur del Ecuador. *Rev Cedamaz.* 4(1), 87-89
Recuperado de https://unl.edu.ec/sites/default/files/investigacion/revistas/2014-12-1/art_9.pdf

Villalobos, C., Gómez, V. y León, P. (2010). *La epidemia de influenza A/ H1N1 en México*. (2.ª ed.). [versión electrónica] Recuperado de [https://books.google.com.ec/books?id=HguGafrWe8YC&pg=PA54&dq=prueba+de+hemaglutinaci%C3%B3n+\(HA\)&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjSvsu96NbQAhVDWCYKHfRKBNIQ6AEIIDAB#v=onepage&q=prueba%20de%20hemaglutinaci%C3%B3n%20\(HA\)&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=HguGafrWe8YC&pg=PA54&dq=prueba+de+hemaglutinaci%C3%B3n+(HA)&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjSvsu96NbQAhVDWCYKHfRKBNIQ6AEIIDAB#v=onepage&q=prueba%20de%20hemaglutinaci%C3%B3n%20(HA)&f=false)

ANEXOS

Anexo 1: Identificación de las aves



Anexo 2: Vacunas



Anexo 3: Materiales



Anexo 4: Recolección de muestras y obtención de suero



Anexo 5



Anexo 6



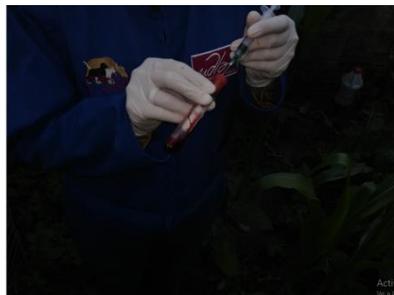
Anexo 7



Anexo 8



Anexo 9



Anexo10



Anexo 11



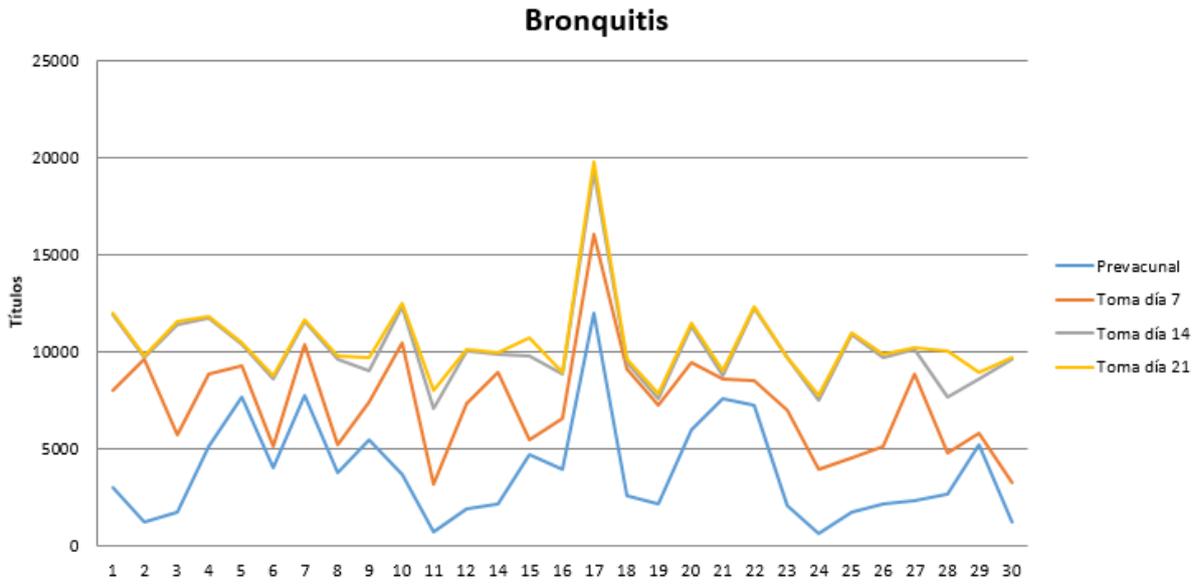
Anexo 12



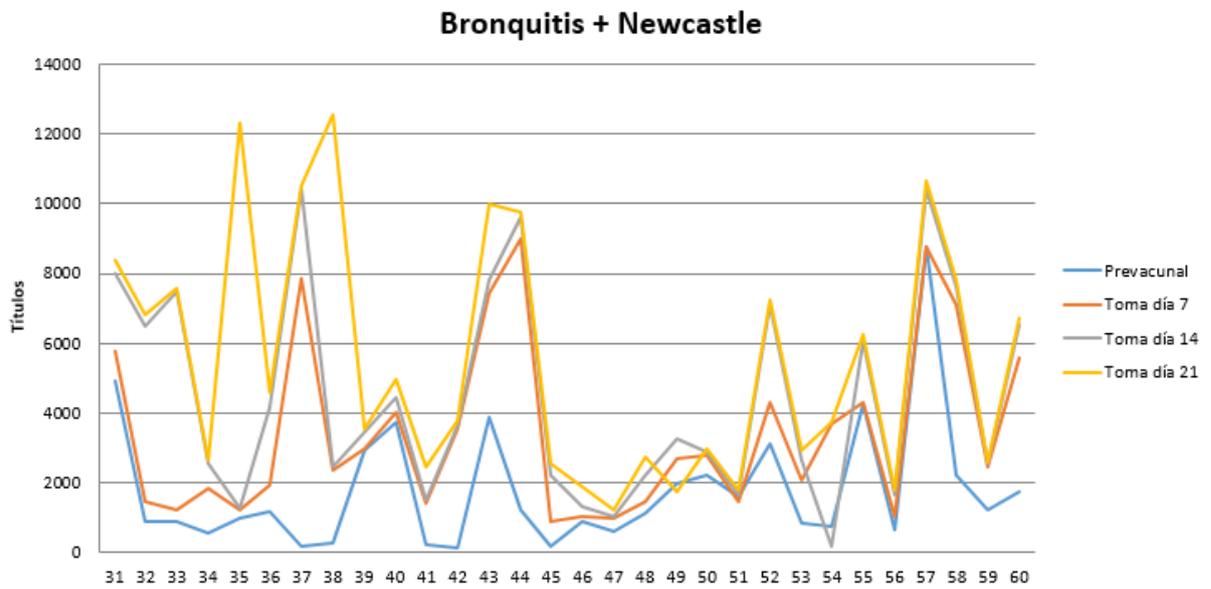
Anexo 13



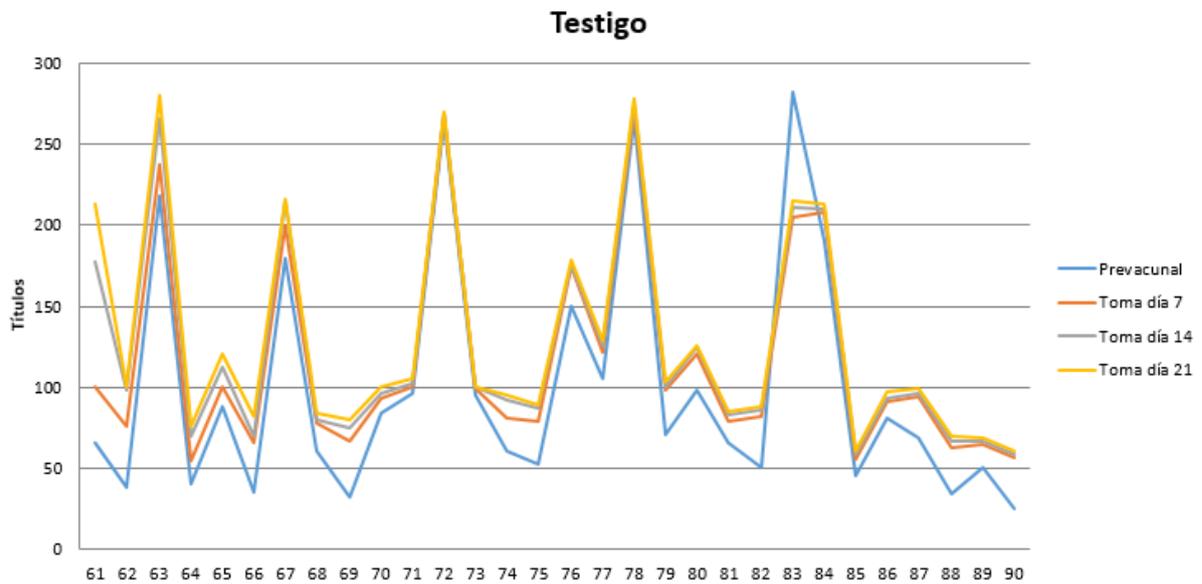
Anexo 14: Bronquitis títulos de anticuerpos pre y post vacunales.



Anexo 15: Bronquitis + Newcastle títulos de anticuerpos pre y post vacunales.



Anexo 16: Testigos títulos de anticuerpos pre y post vacunales.



Anexo 17: DUNCAN Títulos de anticuerpos Bronquitis

Subconjunto para alfa = 0.05

Tiempo	N	1	2	3
Prevacunal	30	3743,27		
Postvacunal 7	30		7132,20	
Postvacunal 14	30			9815,97
Postvacunal 21	30			10104,63
Sig.		1,000	1,000	,562

“Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 30,000” (Fallas, 2012).

Anexo 18: DUNCAN Títulos de anticuerpos Bronquitis + Newcastle

Subconjunto para alfa = 0.05

Tiempo	N	1	2	3
Prevacunal	30	1786,77		

Postvacunal 7	30	3406,17	
Postvacunal 14	30	4409,83	4409,83
Postvacunal 21	30		5475,07
Sig.	1,000	,165	,141

“Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 30,000” (Fallas, 2012).

Anexo 19: DUNCAN Títulos de anticuerpos Testigos

Subconjunto para alfa = 0.05

Tiempo	N	1
Prevacunal	30	99,67
Postvacunal 7	30	115,97
Postvacunal 14	30	124,70
Postvacunal 21	30	129,37
Sig.		,131

“Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 30,000” (Fallas, 2012).

