

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

HACIENDA “EL PRADO” IASA I

**“CINÉTICA DE ANTICUERPOS POSVACUNALES CONTRA
BRONQUITIS INFECCIOSA MEDIANTE LA TÉCNICA DE
MICROELISA EN AVES DE POSTURA”**

KARLA NOEMÍ ASTUDILLO ANGULO

**INFORME DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGROPECUARIO**

SANGOLQUÍ – ECUADOR

FEBRERO 2013

RESUMEN

En el Proyecto Avícola de la Carrera de Ciencias Agropecuarias, se realizó un estudio serológico para determinar y evaluar la cinética de anticuerpos frente al virus de la bronquitis infecciosa aviar, mediante la prueba de ELISA, en gallinas ponedoras de la línea Lohoman Brown. Las evaluaciones serológicas se realizaron antes y después de la aplicación de una vacuna trivalente inactivada que contiene este virus; cuando las ponedoras tenían entre 17 y 65 semanas de vida. En la semana 26, luego de la aplicación de la vacuna inactivada se detectó el mayor valor en los niveles de anticuerpos, se obtuvo un promedio de 8744,35 $\mu\text{g/ml}$, el cual descendió de forma significativa hasta la semana 44, sin dejar de ser valores protectivos, alcanzando un promedio de 2168 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, a la semana 53 se detectó un incremento en los niveles de anticuerpos que se consideró como evidencia de circulación viral (desafío de campo). Los niveles de inmunidad revelados confirieron protección a las aves durante la fase evaluación, con lo que se corroboró la efectividad del plan vacunal utilizado en la etapa de levante de las ponedoras y del efecto de la vacuna inactivada que se aplicó como refuerzo a las 22 semanas de edad de las aves.

ABSTRACT

In The Poultry Project of Agricultural Sciences Campus, a serological study was conducted in order to identify and evaluate the kinetic of antibody response against Infectious Bronchitis Virus, it was evaluated by ELISA, in line Lohoman Brown hens. The serological evaluations were performed before and after the immunization with an inactivated trivalent vaccine, what contains the virus, when the layers were between 17 and 65 weeks of life. At week 26, after the application of the inactivated vaccine the highest value of antibody levels was found, we obtained an average of 8744,35 $\mu\text{g/ml}$, which decreased significantly until week 44, but they continue being protective, reaching an average of 2168 $\mu\text{g/ml}$. However, at weeks 53, an increased in the antibody levels was detected; it was considered as evidence of viral circulation (field, challenge). The immunological levels revealed, conferred protection to birds during the evaluation phase, and they confirmed the effectiveness of the vaccination schedule used in the early development stage of layers and also the inactivated vaccine efficacy, what was used as a booster at week 22.

CERTIFICACIÓN

Dr. Joar García

Ing. Mario Ortiz

Certifican:

Que el trabajo titulado “Cinética de anticuerpos posvacunales contra bronquitis infecciosa mediante la técnica de microelisa en aves de postura” realizado por Karla Noemí Astudillo Angulo, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple las normas estatutarias establecidos por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela politécnica del Ejercito.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a Karla Noemí Astudillo Angulo que lo entregue a la Ing. Patricia Falconí, en su calidad de Directora de la Carrera.

Sangolquí, 15 de febrero del 2013

Dr. Joar García

DIRECTOR

Ing. Mario Ortiz

CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Karla Noemí Astudillo Angulo

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “CINÉTICA DE ANTICUERPOS POSVACUNALES CONTRA BRONQUITIS INFECCIOSA MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICROELISA EN AVES DE POSTURA”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 15 de febrero del 2013

Karla Noemí Astudillo Angulo

AUTORIZACIÓN

Yo, Karla Noemí Astudillo Angulo

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “Cinética de anticuerpos posvacunales contra bronquitis infecciosa mediante la técnica de microelisa en aves de postura”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 15 de febrero del 2013

Karla Noemí Astudillo Angulo

DEDICATORIA

A mi familia, ejemplo fundamental de apoyo y unidad.

A los compañeros y amigos que han hecho esto posible.

KARLA NOEMÍ ASTUDILLO ANGULO

AGRADECIMIENTO

Doy gracias a Dios guía y luz de mi vida.

A mis padres, ejemplo de vida.

A los docentes Dr. Joar García e Ing. Ortiz que supieron aconsejar y dirigir acertadamente la realización de esta investigación.

A los amigos y compañeros por su apoyo incondicional.

KARLA NOEMÍ ASTUDILLO ANGULO

AUTORÍA

Las ideas expuestas en el presente trabajo de investigación, así como los resultados, discusión y conclusiones son de exclusiva responsabilidad de la autora.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	17
II. OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
III. REVISIÓN DE LITERATURA	20
3.1 SISTEMA INMUNE AVIAR.....	20
3.1.1. ÓRGANOS LINFOIDES PRIMARIOS	21
3.1.1.1.Timo	21
3.1.1.2.Bolsa de Fabricio	21
3.1.1.3.Médula ósea.....	21
3.1.2. ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS.....	22
3.1.2.1.Bazo.....	22
3.1.2.2.Tejidos linfoides asociados a mucosas	22
3.1.2.2.1.Tonsilas cecales.....	23
3.1.2.2.2.Placas de Peyer.....	23
3.1.3. CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO IMPLICADAS EN LA RESPUESTA INMUNE	23
3.1.3.1.Macrófagos	23
3.1.3.2.Neutrófilos	23
3.1.3.3.Eosinófilos	24
3.1.3.4.Basófilos	24
3.1.3.5.Células dendríticas	24
3.1.4. LINFOCITOS.....	24
3.1.5. MOLÉCULAS DE SUPERFICIE DE LOS LINFOCITOS	25
3.1.5.1.Moléculas que integran el complejo receptor de antígeno.....	25
3.1.6. LINFOCITOS T	25

3.1.6.1.Linfocitos T colaboradores (Th)	26
3.1.6.1.1.Linfocitos Th1	26
3.1.6.1.2.Linfocitos Th2	26
3.1.6.2.Linfocitos T citotóxicos (Tc)	26
3.1.7. LINFOCITOS B	27
3.1.8. INMUNOGLOBULINAS O ANTICUERPOS	27
3.1.8.1.IgM	27
3.1.8.2.IgG	27
3.1.8.3.IgA	28
3.1.9. CÉLULAS ASESINAS NATURALES	28
3.1.10. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD	28
3.2. TIPOS DE INMUNIDAD	30
3.2.1. Inmunidad Inespecífica o Innata	30
3.2.2. Inmunidad Específica o Adquirida	30
3.2.3. Respuesta inmune mediada por células	30
3.2.4. Respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos	31
3.2.5. Inmunidad activa	31
3.2.6. Inmunidad pasiva en aves	31
3.3. BRONQUITIS INFECCIOSA (BI)	32
3.3.1.HISTORIA	32
3.3.2.DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	33
3.3.3. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y EN SALUD PÚBLICA	33
3.3.4. ETIOLOGÍA	34
3.3.5.CLASIFICACIÓN	34
3.3.6.MORFOLOGÍA	34
3.3.7.EPIDEMIOLOGÍA	35
3.3.7.1.Huésped	35
3.3.7.2.Factores influyentes	35
3.3.7.3.Difusión y transmisión	36

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
4.1. UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN	52
4.1.1. FASE DE CAMPO.....	52
4.1.1.1.Ubicación Política.....	52
4.1.1.2.Ubicación Geográfica	52
4.2. MATERIALES.....	52
4.2.1. Materiales de campo.....	52
4.2.2. Laboratorio	53
4.3. MÉTODOS.....	53
4.3.1. Cálculo Tamaño de la muestra.....	53
4.3.2. Análisis Estadístico	54
4.3.3. Métodos Específicos de Manejo del Experimento	55
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
5.1. INTERPRETACIÓN RESULTADOS SEROLÓGICOS.....	57
5.1.1. Semana 17	61
5.1.2. Semana 26	63
5.1.3. Semana 35	65
5.1.4. Semana 44.....	67
5.1.5. Semana 53	69
5.1.6. Semana 65	71
5.1.7.ANÁLISIS DEL CONTROL ESTADÍSTICO DE CALIDAD DEL PROCESO DE RESPUESTA INMUNOLÓGICA DE LAS AVES	73
VI. CONCLUSIONES.....	77
VII. RECOMENDACIONES	79
VIII. BIBLIOGRAFÍA	81
IX. ANEXOS	
.....	;

rrror! Marcador no definido.

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Esquema secuencial de las etapas de la técnica ELISA	43
Cuadro 2. Resumen de los resultados de las titulaciones serológicas de la semana 17 a la 65	58
Cuadro 3. Criterio de interpretación del CV en un esquema de vacunación contra BI	59
Cuadro 4. Grupos (titer group) y rangos de títulos mínimo y máximo, establecidos para la interpretación de titulaciones serológicas contra Bronquitis (VBI) mediante la técnica de ELISA indirecto.....	60
Cuadro 5. Promedios títulos de anticuerpos semana 17.....	61
Cuadro 6. Promedios títulos de anticuerpos semana 26.....	63
Cuadro 7. Promedios títulos de anticuerpos semana 35.....	65
Cuadro 8. Promedios títulos de anticuerpos semana 44.....	67
Cuadro 9. Promedios títulos de anticuerpos semana 53.....	69
Cuadro 10. Promedios títulos de anticuerpos semana 65.....	71

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Cantidad relativa de cada clase de inmunoglobulina producida durante las respuestas inmunitarias primaria y secundaria. La IgM predomina en la respuesta inmunitaria primaria y la IgG predomina en la subsecuente.	28
Figura 2. Participación clave de las moléculas del CMH en la presentación del antígeno a las células que le son sensibles.	29
Figura 3. Producción de huevo y la reducción en la calidad del mismo en una parvada afectada con bronquitis infecciosa.	39
Figura 4. Representación gráfica del nivel esperado de protección de una parvada a través del tiempo.	51
Figura 5. Histograma gráfico semana 17.	61
Figura 6. Histograma gráfico semana 26.	63
Figura 7. Histograma gráfico semana 35.	65
Figura 8. Histograma gráfico semana 44.	67
Figura 9. Histograma gráfico semana 53.	69
Figura 10. Histograma gráfico semana 53.	71
Figura 11. Promedios de las titulaciones de anticuerpos de la semana 17 a la 65	73
Figura 12. Desviación estándar de respuesta inmunológica contra VBI... 75	

LISTADO DE ANEXOS

- Anexo 1. Programa de vacunación hasta la semana 17; **Error! Marcador no definido.**
- Anexo 2. Programa sanitario contra BI recomendado para el Proyecto Avícola IASA. **¡Error! Marcador no definido.**
- Anexo 2. Fotografías de la investigación llevada a cabo **¡Error! Marcador no definido.**
- Anexo 2.1 Ponedoras de 65 semanas **¡Error! Marcador no definido.**
- Anexo 2.1 Extracción de las muestras de sangre ... **¡Error! Marcador no definido.**
- Anexo 2.2 Obtención del suero **¡Error! Marcador no definido.**

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la industria avícola provee una considerable proporción de la proteína de origen animal a la población humana. Se encuentra en constante crecimiento, generando y produciendo las proteínas animales para el consumo humano en la forma más efectiva (Vargas, 2003).

Razones por las cuales durante los últimos años se ha intensificado la búsqueda de programas sanitarios que permitan frenar la introducción y diseminación de diferentes enfermedades (Moreno, 1994).

En el Ecuador, y en especial en la región sierra, la Bronquitis Infecciosa (BI) se constituye en un grave problema, ya que es una de las enfermedades más comunes y más difíciles de controlar, principalmente en aves de postura, por las consecuencias económicas que acarrea, debido al daño que causa en el tracto reproductor, disminuyendo la producción de huevos en forma drástica y la calidad interna y externa de los mismos (Moreno, 1994).

La principal forma de control preventivo es la aplicación de medidas de bioseguridad y la inmunización. Al hablar de inmunización, se hace referencia a la vacunación (Comotto, 2000).

No existe un programa sanitario rígido e infalible que pueda ser utilizado en un lote de aves de postura en una zona. Por lo que es importante implantar programas sanitarios específicos para cada zona, de acuerdo con las condiciones de manejo, el grado de desafío local, la presencia de nuevas enfermedades o serotipos de un determinado agente y la disponibilidad de productos para inmunizar a las aves (Cuello *et al.*, 2004).

Es importante que los programas de vacunación se encuentren evaluados por pruebas serológicas para luego ser modificados de acuerdo con los resultados del laboratorio o cambios en el desafío local. Cuando se administran inapropiadamente, varias vacunas, pueden causar efectos adversos en la salud y productividad de las aves.

La modificación del programa de vacunación vigente y la selección de vacunas, basadas en pruebas serológicas de laboratorio es indispensable, ya que tan importante como la aplicación de vacunas resulta el monitoreo de la respuesta inmunitaria frente a las mismas (Villegas, 1996).

El presente trabajo pretende evaluar los valores de títulos de anticuerpos contra VBI que presentan las aves al llegar al Plantel Avícola IASA, y las respuestas inmunitarias luego de la aplicación de los refuerzos con el fin de diseñar un programa sanitario contra BI adecuado, para que las aves se encuentren protegidas de la enfermedad durante la etapa de producción.

II. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la cinética de los anticuerpos posvacunales contra Bronquitis Infecciosa (BI), mediante pruebas serológicas, para el diseño de un programa sanitario en aves de postura

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los valores de títulos de anticuerpos posvacunales desde la semana 17a la 65 de las aves.
- Determinar los valores de títulos de anticuerpos posteriores a las aplicaciones de los refuerzos.
- Elaborar un programa sanitario para BI en el proyecto avícola IASA-ESPE.
- Difundir los resultados obtenidos mediante publicaciones.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 SISTEMA INMUNE AVIAR

El sistema inmune de aves y mamíferos difieren un tanto en cuanto a las estructuras que los conforman, pero en síntesis ambos cumplen el mismo objetivo: resistir a enfermedades o sobrellevar infecciones.

Las aves presentan una estructura linfoepiteal denominada Bolsa de Fabricio, que no está presente en mamíferos. Mientras que los mamíferos tienen un sistema organizado de ganglios linfáticos del que carecen las aves (Echeverría y Guanochang, 1996).

Todas las especies aviares presentan tres órganos linfoides primarios donde se producen y diferencian los linfocitos, estos son: la Bolsa de Fabricio, el Timo y la médula ósea (Gómez, 2006).

Además el sistema inmune presenta órganos linfoides secundarios que son los responsables de la captación y del procesamiento del antígeno (materia extraña), en dichos órganos se crea el medio adecuado para que los linfocitos puedan interactuar entre sí y con los antígenos. Los órganos linfoides secundarios son: el Bazo, la glándula de Harder, las placas de Peyer, las tonsilas cecales y los tejidos asociados a las mucosas (Robin, 2006).

3.1.1. ÓRGANOS LINFOIDES PRIMARIOS

3.1.1.1. Timo

Es un órgano plano y lobulado que se encuentra en el cuello, a lo largo del nervio vago paralelo a la vena yugular. Es el sitio donde se desarrollan principalmente los linfocitos T (Weeb, 1991).

Está dividido en corteza y médula, la corteza es rica en linfocitos. En las aves es un órgano multilobulado y posee 7 a 8 lóbulos a cada lado relacionado con la inmunidad celular, se atrofia con la madurez sexual incluyéndose en la grasa cervical pero sigue siendo funcional (Robin, 2006).

3.1.1.2. Bolsa de Fabricio

La Bolsa de Fabricio es un órgano exclusivo de las aves, es un saco ciego que se encuentra en la zona de la cloaca, en su interior se forman invaginaciones en las que la organización celular se presenta en forma de folículos (Ramírez, 2008).

Es el único sitio de maduración y diferenciación de las células B, estas células son las responsables de la inmunidad humoral, es decir, de la producción de inmunoglobulinas (Sharma, 1999).

3.1.1.3. Médula ósea

Las zonas hematopoyéticas de la médula ósea contienen precursores de todas las células sanguíneas, así como macrófagos y linfocitos.

3.1.2. ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS

3.1.2.1. Bazo

El bazo, es el órgano donde predominan los linfocitos, es un sitio importante de procesamiento de antígenos y producción de anticuerpos en las aves maduras (Ramírez, 2008).

Según Gutiérrez 2010 puede describirse como una especie de gran ganglio linfático encargado de capturar antígenos del torrente sanguíneo y proporcionar el microambiente necesario para que se desarrolle una respuesta inmune. Otra función muy importante del bazo es la de servir como reserva de eritrocitos. Esta doble función da lugar a sus dos componentes designados como “pulpa roja” y “pulpa blanca”, esta última es la asociada con la función inmunitaria.

3.1.2.2. Tejidos linfoides asociados a mucosas

Los tejidos linfoides asociados a las mucosas se encuentran en diversas partes del cuerpo como en el tracto gastrointestinal y en la cabeza (Ramírez, 2008).

Existen un gran número de agentes infecciosos que penetran al huésped a través de las mucosas de los tractos digestivo, respiratorio y genitourinario, debido a esto es importante la presencia de tejido linfoide asociado a las mismas (Gutiérrez, 2010).

Hay dos tipos de estructuras linfoides relevantes: las Tonsilas y las Placas de Peyer.

3.1.2.2.1. Tonsilas cecales

Son tejido linfoide que se encuentra en forma bilateral en la cavidad orofaríngea, y por tanto pueden captar antígenos que penetre al organismo ingerido e inhalado para iniciar una respuesta inmunitaria (Gutiérrez, 2010).

3.1.2.2.2. Placas de Peyer

Se encuentran en la parte terminal del intestino, son cúmulos de tejido linfático, formados principalmente por linfocitos B, que sintetizan inmunoglobulinas A (Gutiérrez, 2010).

3.1.3. CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO IMPLICADAS EN LA RESPUESTA INMUNE

3.1.3.1. Macrófagos

Los macrófagos capturan y destruyen materias extrañas. Además secretan moléculas que amplifican la respuesta inmunitaria, controlan la inflamación, contribuyen directamente a la reparación del daño hístico mediante la eliminación del tejido que está en proceso de muerte y el tejido dañado, asisten el proceso de restauración, transforman y presentan antígenos para la preparación de una respuesta inmunitaria (Tizard, 1996).

3.1.3.2. Neutrófilos

La función de los neutrófilos es capturar y destruir materias extrañas a través de la fagocitosis (Tizard, 1996).

3.1.3.3. Eosinófilos

Son células con capacidad fagocítica. Su principal función radica en la liberación al exterior del contenido de sus gránulos citoplasmáticos que poseen grandes cantidades de fosfata ácida y peroxidasa, particularmente importante en las infestaciones por helmintos (Arnaiz-Villena *et al.*, 1995).

La peroxidasa eosiofílica es efectiva en matar ciertos microorganismos y su principal actividad biológica es la destrucción de parásitos invasores (Tizard, 1996).

3.1.3.4. Basófilos

Se encuentran en un número muy pequeño en la circulación (<5%) y no presentan actividad fagocítica significativa (Gómez-Lucía *et al.*, 2006).

Intervienen en la inflamación de tipo agudo, siendo muy importantes en el aviso de alarma al sistema inmune (Arnaiz-Villena *et al.*, 1995).

3.1.3.5. Células dendríticas

Las células dendríticas captan, procesan y presentan antígenos a los linfocitos T en combinación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, las células dendríticas son vistas como el puente entre el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo (Gómez-Lucía *et al.*, 2006).

3.1.4. LINFOCITOS

Los linfocitos son los leucocitos responsables del reconocimiento específico de antígenos y de establecer respuesta inmunitaria adaptativa; en el animal adulto

todos los linfocitos derivan de células madre hematopoyéticas existentes en la médula ósea (Tizard, 1996; Gómez-Lucía *et al*, 2006).

En las aves existen dos tipos de linfocitos: los linfocitos B y los linfocitos T. La letra asociada con cada tipo representa su sitio de diferenciación: B para la bolsa de Fabricio y T para el timo (Bermúdez, 2006).

3.1.5. MOLÉCULAS DE SUPERFICIE DE LOS LINFOCITOS

Las células del sistema inmune y los linfocitos en particular se distinguen por sus moléculas de superficie o marcadores CD (Cluster of Differentiation). Los linfocitos expresan un gran número de diferentes moléculas en su superficie celular, lo que permite “marcar” las distintas subclases de linfocitos según las moléculas que expresan (Gómez-Lucía *et al*, 2006).

3.1.5.1. Moléculas que integran el complejo receptor de antígeno

Las estructuras más importantes en la superficie de los linfocitos son sus receptores de antígenos, denominados receptores de células T, y receptores de células B. Los anticuerpos son simplemente receptores de células B solubles (Tizard, 1996).

3.1.6. LINFOCITOS T

Las células T son los componentes principales de la inmunidad mediada por células (Bermúdez, 2006).

Ejercen sus funciones por medio de la secreción de unas moléculas denominadas citoquinas, que transmiten señales a otras células, así como por contacto directo (Gómez-Lucía *et al*, 2006).

3.1.6.1. Linfocitos T colaboradores (Th)

Son la subpoblación de linfocitos T encargada de transmitir señales a los linfocitos tanto T como B que haya reconocido el antígeno para activarlos y transformarlos en células efectoras (Gómez-Lucía *et al*, 2006).

3.1.6.1.1. Linfocitos Th1

Su estimulación antigénica favorece las funciones relacionadas con citotoxicidad y con reacciones inflamatorias (respuesta celular) (Gómez-Lucía *et al*, 2006).

3.1.6.1.2. Linfocitos Th2

Al estar expuestos a un antígeno promueven los procesos de inmunidad humoral. Son efectivos en la estimulación de linfocitos B y la consiguiente producción de anticuerpos (Gómez-Lucía *et al*, 2006).

3.1.6.2. Linfocitos T citotóxicos (Tc)

Presentan en su superficie el receptor característico de los linfocitos T. Luego de su estimulación se expanden gracias a las citoquinas, incrementando el número de células específicas para el antígeno que desencadenó el proceso (Gómez-Lucía *et al*, 2006).

3.1.7. LINFOCITOS B

Son los responsables de la producción de inmunoglobulinas. Hacia los 6 meses de vida la bolsa de Fabricio ha involucionado hasta el punto de que sólo queda un remanente necrótico. Lo que sugiere que la función de la bolsa se traslada a otro lugar a medida que las aves maduran (Bermúdez, 2006).

3.1.8. INMUNOGLOBULINAS O ANTICUERPOS

El componente humoral comprende los anticuerpos, que son proteínas conocidas como inmunoglobulinas, que en las aves sanas son producidas por los linfocitos B (Rives, 1992).

Existen tres clases de anticuerpos que son producidos en el ave luego de la exposición a un microorganismo: Ig M, Ig G e Ig A.

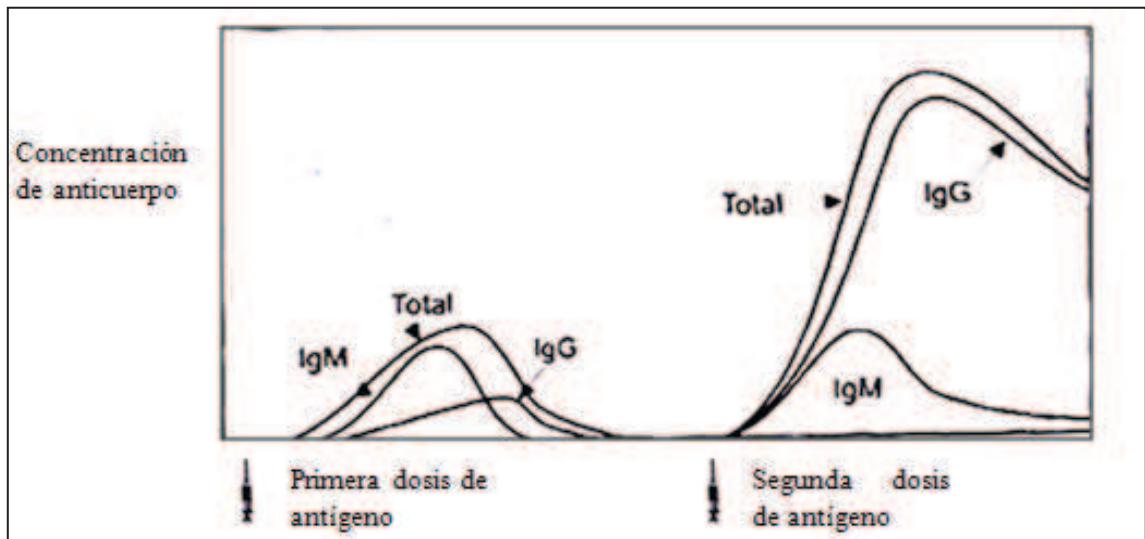
3.1.8.1. IgM

Sirve como un receptor de células B, su función es principalmente aglutinar. Aparece a los 4 o 5 días siguientes a la exposición al antígeno, para luego desaparecer a los 10 o 12 días (Arnaiz-Villena et al., 1995).

3.1.8.2. IgG

La IgG de las aves se denomina IgY, debido a que es de mayor tamaño que la IgG de los mamíferos. La IgG es detectada a los 5 días de la exposición al antígeno y el pico se presenta a las 3 semanas para luego decrecer lentamente.

En serología la principal inmunoglobulina que se monitorea es la IgG y en un menor grado la IgM.



Fuente: Tizard, I. 1996.

Figura 1. Cantidad relativa de cada clase de inmunoglobulina producida durante las respuestas inmunitarias primaria y secundaria. La IgM predomina en la respuesta inmunitaria primaria y la IgG predomina en la subsecuente.

3.1.8.3. IgA

Es importante como anticuerpo secretorio en las mucosas, se encuentra en las secreciones del ojo, intestino y tracto respiratorio confiriendo protección local a estos tejidos. Aparece al quinto día de exposición (Sharma, 1997).

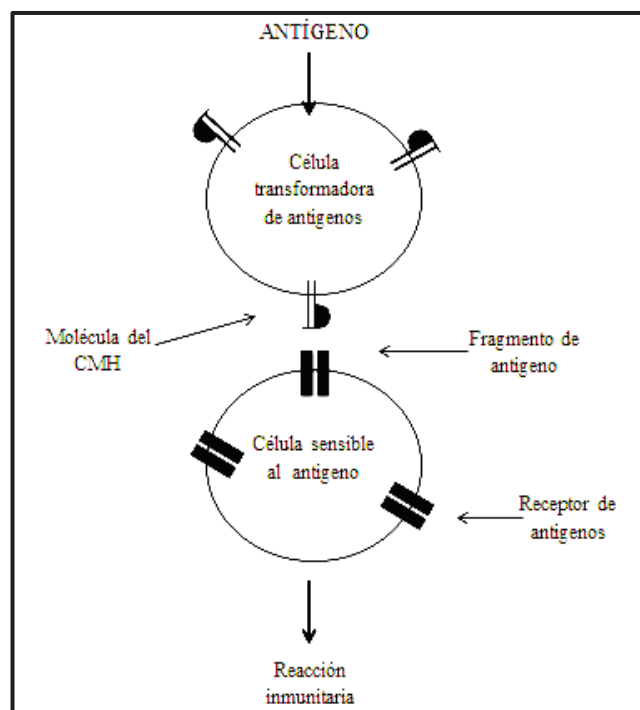
3.1.9. CÉLULAS ASESINAS NATURALES

Son una población de linfocitos citotóxicos. Se caracterizan por su capacidad para matar células tumorales, infectadas por virus y algunas normales sin sensibilización previa (Tizard, 1996).

3.1.10. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Para inducir una respuesta inmunitaria, la transformación del antígeno requiere además de la fragmentación de sus moléculas en el interior de las células, de la unión de estos fragmentos con una molécula correcta presentadora de antígenos. A estas moléculas presentadoras de antígenos se las denomina moléculas de histocompatibilidad y se localizan en un complejo genético llamado complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (Tizard 1996).

Es absolutamente necesario que los antígenos se unan a dichas moléculas para que se produzca una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, el CMH, es el principal componente genético de la resistencia o susceptibilidad a una enfermedad infecciosa (Gómez-Lucía *et al*, 2006).



Fuente: Tizard, I. 1996.

Figura 2. Participación clave de las moléculas del CMH en la presentación del antígeno a las células que le son sensibles.

3.2. TIPOS DE INMUNIDAD

3.2.1. Inmunidad Inespecífica o Innata

Es la primera línea de defensa, responde a todos los antígenos, se encuentra constituida por las barreras físicas del organismo (mucosas, piel y factores inespecíficos como jugos gástricos, biliares y enzimas), barreras fisiológicas (temperatura y pH), células fagocitarias (neutrófilos y macrófagos). También actúan los factores humorales como proteínas plasmáticas, interferones y células asesinas naturales (Gómez, 2006).

3.2.2. Inmunidad Específica o Adquirida

Responde siempre y cuando haya un antígeno procesado, existe la interacción de células especializadas que reaccionan de una manera organizada y específica contra dicho agente.

Además tiene memoria, lo que le da la capacidad de responder de manera más rápida en exposiciones repetidas del mismo microorganismo. En virtud de su especificidad es mucho más eficaz que la innata en el cumplimiento de las funciones del sistema inmune (Gómez, 2006).

3.2.3. Respuesta inmune mediada por células

La respuesta inmune celular es especializada en la eliminación de antígenos intracelulares. Los ejecutores funcionales de la respuesta inmune celular son los linfocitos T, las células asesinas naturales y los macrófagos (Gómez, 2006).

3.2.4. Respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos

Los anticuerpos se forman en respuesta al contacto con elementos dañinos, denominados antígenos. Cada tipo de anticuerpo defiende al organismo de una clase específica de antígeno (Rives, 1992).

3.2.5. Inmunidad activa

Las aves recién recuperadas de la enfermedad natural son resistentes al desafío con el mismo virus (protección homóloga), pero el grado de protección al desafío con otras cepas de VBI (protección heteróloga) varía (Calnek *et al.*, 1997).

Según Morilla 1989 ésta puede ser:

- **Natural activa:** temporal y duradera, ocurre después de que el individuo sufre una infección.
- **Artificial activa:** variable en su duración, ocurre después de la inmunización con vacunas.

3.2.6. Inmunidad pasiva en aves

Las inmunoglobulinas del suero de la gallina se transfieren fácilmente a la yema, mientras el huevo aún se encuentra en el ovario. Por lo tanto, existe IgY (IgG) en la fase líquida de la yema, en concentraciones similares al suero de la gallina.

Cuando el huevo pasa por el oviducto se agregan la IgM y la IgA de las secreciones de este conducto a la clara del huevo.

Mientras se desarrolla, el embrión de pollo absorbe parte de la IgY, la cual aparece en la circulación. La IgM y la IgA se difunden por el líquido amniótico.

Cuando el pollo sale del cascarón cuenta con IgY en el suero y con IgM e IgA en el intestino (Tizard, 1996).

3.3. BRONQUITIS INFECCIOSA (BI)

3.3.1.HISTORIA

El primer informe de esta enfermedad fue notificado en Estados Unidos en el año de 1931. Se describió a la BI como una enfermedad respiratoria altamente contagiosa en gallinas domésticas de cualquier edad (Jordan y Pattison, 1998).

En un principio, la BI se conoció como una enfermedad de pollitos jóvenes; sin embargo, después se observó que era frecuente en ponedoras. Otras manifestaciones de la BI comprenden declinación en la producción de huevo de las gallinas ponedoras, que se notó después de la enfermedad respiratoria típica en el decenio de 1940, y lesiones en el riñón observadas en el de 1960 (Calnek *et al.*, 1997).

La prevalencia e importancia económica de la enfermedad, originaron esfuerzos para prevenir la BI en parvadas de ponedoras controlando la exposición de los pollos al Virus de la Bronquitis Infecciosa (VBI) durante la etapa de crecimiento previa al inicio de la postura. Dichos esfuerzos tuvieron cierto éxito y fueron el paso inicial para el desarrollo de los programas de inmunización usados en la actualidad (Calnek *et al.*, 1997).

Con el pasar del tiempo se han originado nuevas variedades del virus, por lo que las lesiones y síntomas se han extendido a otros órganos y tejidos. Así, además de afectar al aparato respiratorio, el virus también puede afectar al aparato reproductivo y urinario, dependiendo de la cepa viral de la que se trate.

3.3.2.DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La BI se encuentra distribuida en todo el mundo. Existen fundamentalmente tres serotipos del virus de la BI en Norte América, los denominados Massachussets, Connecticut y Arkansas 99. Muchos otros serotipos, diferentes a los de Norte América, también se han aislado en Europa y Australia. En Europa, las denominadas se han identificado variantes holandesas, designadas mediante números (D-274, D-212) (Acevedo, 2010).

3.3.3.IMPORTANCIA ECONÓMICA Y EN SALUD PÚBLICA

La BI es una enfermedad que ocasiona un impacto socio-económico severo en la industria avícola mundial. La enfermedad asume características graves especialmente en ponedoras, con efectos desastrosos sobre los índices de postura y en la calidad de los huevos (Jordan y Pattison, 1998).

Esta enfermedad no solo es problemática por las lesiones y complicaciones que causa por sí sola, sino que es común que se presente asociada a otros patógenos como micoplasmas, además el VBI es conocido como detonador de ciertas cepas de *Escherichia coli*, lo que aumenta la gravedad y duración de la enfermedad resultante (Comotto, 2000).

La BI no parece tener importancia en salud pública. Los coronavirus humanos difieren extensamente del VBI en lo que se refiere a la secuencia de proteínas y a la antigenicidad. Se han realizado pruebas serológicas a los sueros de personas que estuvieron en contacto con pollos proporcionando cuidados directos o manejando procedimientos diagnósticos en aves de corral, y se encontró que dichos sueros presentaron títulos de anticuerpos neutralizantes bajos contra el VBI (Calnek *et al.*, 1997).

3.3.4. ETIOLOGÍA

La BI es producida por un coronavirus que tiene un tropismo especial por el tracto respiratorio, reproductivo y renal (Moreno, 1994).

Este virus tiene la habilidad de mutar rápidamente, esto puede resultar en la aparición de virus variantes o nuevos serotipos. Mediante pruebas de neutralización de virus en embrión de pollo y de inhibición de hemaglutinación se ha demostrado, que existen muchos serotipos diferentes antigénicamente (Jordan y Pattison, 1998).

3.3.5. CLASIFICACIÓN

El agente etiológico de esta enfermedad es el virus de la BI aviar clasificado dentro del género Coronavirus, familia Coronaviridae, orden Nidovirales (Acevedo, 2010).

Las cepas más comunes son: Massachusetts, Connecticut, JMK, Arkansas, Georgia, Gray, Holte, y T. Australian.

La presentación de la bronquitis varía según la cepa; Massachusetts, Connecticut, JMK, Arkansas, Georgia, producen mayores lesiones y signos en el sistema respiratorio, mientras que las cepas Gray, Holte, y T. Australian, tienen mayor tropismo renal y producen el síndrome de nefritis-nefrosis (Rojo, 1996).

3.3.6. MORFOLOGÍA

El VBI es pleomórfico, pero por lo general redondeado. Posee una envoltura de aproximadamente 120 nm de diámetro con proyecciones superficiales en forma de palos de golf (espículas) (Calnek *et al.*, 1997).

El VBI contiene cuatro proteínas estructurales, las proteínas de la espícula (S), la membrana (M), nucleocápside (N) y pequeñas proteínas de membrana (E).

3.3.7.EPIDEMIOLOGÍA

3.3.7.1. Huésped

El VBI afecta a las gallinas domésticas de cualquier edad. Aunque la susceptibilidad a la enfermedad varía entre líneas o razas de pollos.

Mientras más joven es el ave más severos serán los síntomas. Al aumentar la edad, las aves se vuelven más resistentes a los efectos nefritogénicos, lesiones del oviducto y mortalidad (Calnek *et al.*, 1997).

Cuando la infección ataca a pollitas de un día, ocasiona anomalías en el desarrollo del oviducto y este daño es permanente e irreversible. En el inicio de la postura pueden producirse excreciones del virus que tal vez haya estado latente en la gallina durante varios meses anteriores. Cuando afecta a aves adultas produce un descenso de la postura y afecta notablemente a la calidad del huevo (Moreno, 1994).

La susceptibilidad del huésped se encuentra directamente influenciada por la inmunidad activa (infecciones naturales, vacunación) o pasiva que esté presente. Dicha inmunidad puede prevenir o reducir la enfermedad y limitar la excreción del virus (Jordan y Pattison, 1998).

3.3.7.2. Factores influyentes

Los brotes de BI son más comunes en los meses de invierno. Son factores predisponentes a la BI una ventilación deficiente de la caseta, malas condiciones higiénicas, calendario intensivo de vacunaciones; estados de tensión; la presencia de otros virus o patógenos y, en general todos los agentes inmunodepresores

predisponen a los animales a una enfermedad más grave y prolongada (Moreno, 1994).

3.3.7.3. Difusión y transmisión

El IBV se propaga con rapidez entre las aves de una parvada. Las aves susceptibles colocadas cerca de pollos infectados pueden desarrollar síntomas dentro de 48 horas. El virus es moderadamente sensible: pero es bastante sensible a los desinfectantes y a los ambientes secos y, por eso no sobrevive largos periodos en el ambiente (Villegas, 1996).

La forma más frecuente de transmisión del virus es en forma horizontal, por transmisión aérea directa a partir de exudados nasales y traqueales o de las deyecciones de un animal enfermo o portador a otro, también puede transmitirse por personas y equipo contaminado. Aunque es prácticamente excepcional, la enfermedad puede difundirse también a través del huevo.

La fuente de contagio más importante son las aves en que el virus se replica y excreta rápidamente, dentro de este grupo se encuentran los animales susceptibles con infección reciente y los animales en los que la replicación del virus se estimula por factores como el inicio de la postura (por cambios hormonales) (Jordan y Pattison, 1998).

Es altamente contagiosa a través del aire, pudiéndose transmitir incluso entre granjas. No se conoce la frecuencia de propagación por aire entre las parvadas, pero se han registrado informes de transmisión del VBI a través de una distancia de 400 metros (Calnek *et al.*, 1997).

3.3.7.4. Periodo de incubación

El periodo de incubación de la BI varía de 18 a 36 horas, dependiendo de la dosis infectante, de la vía de inoculación y de la cepa de que se trate (Rojo, 1996).

3.3.8. PATOGENIA

El VBI puede ingresar por dos vías:

Aerógena: multiplicación en tráquea, sacos aéreos o pulmón, causando la pérdida de las células protectoras que cubren los senos y la tráquea. Tras una breve viremia, el virus puede ser detectado en los riñones, el tracto reproductor y en las tonsilas cecales. Algunas cepas del VBI conocidas como nefropatógenas, causan lesiones especialmente en los riñones.

Digestiva: multiplicación en mucosa del proventrículo.

3.3.9. SIGNOS CLÍNICOS

La enfermedad puede ser asintomática o presentar signos en el aparato respiratorio, reproductivo o urinario, según la cepa de la que se trate. En su forma más común suele exhibir síntomas respiratorios, aunque también lesiona los aparatos urinario y reproductivo. En todos los casos el virus inicialmente ataca al aparato reproductor y es el agente que con más frecuencia desencadena la enfermedad respiratoria crónica complicada (Comotto, 2000).

Generalmente se observa depresión, somnolencia, pérdida de peso y apetito (Calnek *et al.*, 1997).

3.3.9.1. Signos respiratorios

Los signos respiratorios (tos, estornudos, descargas nasales acuosas, etc.) son la manifestación clínica más común en gallinas de todas las edades, la severidad de

los signos disminuye conforme avanza la edad de las aves. En aves de más de 7 semanas o adultas los signos clínicos son leves, incluso la enfermedad podría pasar desapercibida (Rojo, 1996).

3.3.9.2. Signos renales

En las aves jóvenes afectadas por cepas con afinidad renal, la mortalidad puede llegar a ser hasta del 30%, si la enfermedad no se complica puede durar de 10 a 14 días, aunque pueden presentarse infecciones intermitentes; pueden aparentar haberse curado de la fase respiratoria y luego empezar a mostrar síntomas genéricos como somnolencia, plumas erizadas, excrementos húmedos, deyecciones blancas (por presencia de uratos), deshidratación, plumas manchadas de blanco alrededor de la cloaca (Jordan y Pattison, 1998).

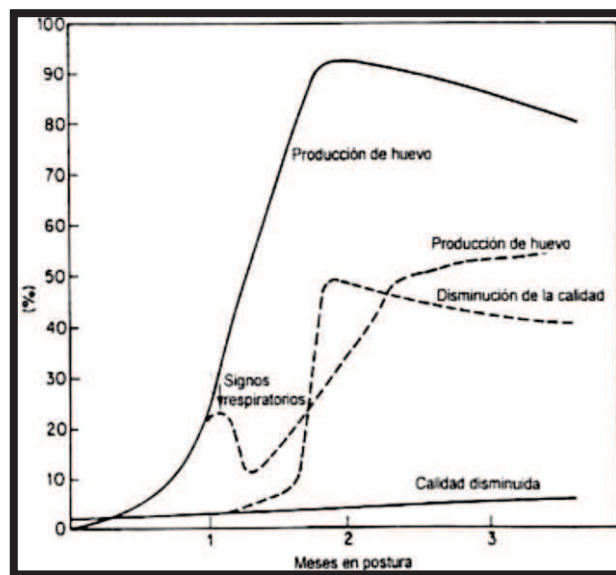
En ponedoras la uroliasis asociada a la BI presenta una mortalidad moderada. Aparentan estar sanas, pero disminuye el índice de postura y la calidad de los huevos, y es posible que se noten problemas respiratorios. Aunque las ponedoras pueden recuperar su nivel normal de postura, no siempre sucede así, y además los huevos disminuyen su calidad interna y externa, los huevos aparecen blandos, con cáscaras pálidas, deformes o rugosos, con albumen acuosos, sin demarcación con la clara espesa (Comotto, 2000).

3.3.9.3. Signos reproductivos

El síndrome reproductivo más frecuente se vincula con el daño al oviducto funcional en cualquier momento durante la postura, como resultado disminuye la producción y calidad del huevo. La producción puede disminuir entre un 10 y 50% durante cuatro semanas, luego sube durante cuatro semanas, pero nunca llega a lo normal (Rojo, 1996).

La reanudación de la producción, puede acompañarse por el deterioro en la calidad interna y externa del huevo. Los huevos pueden ser más pequeños, carecer de simetría, presentar corrugaciones en el borde, cascarones despigmentados, con depósitos calcáreos, más delgados delo normal. En su aspecto interno la albúmina pierde su viscosidad y a menudo la chalaza se rompe y la yema flota libremente (Rojo, 1996).

La forma menos frecuente de la enfermedad en el aparato reproductor se refiere al desarrollo anormal del oviducto, esto ocurre como consecuencia de la infección en aves jóvenes. Estas podrán desarrollarse normalmente pero no producirán huevos, estas aves ovulan normalmente pero el oviducto malformado no acepta los huevos, los cuales se depositan en la cavidad abdominal. Estas aves son llamadas “falsas ponedoras” (Jordan y Pattison, 1998).



Fuente: Jordan F. y Pattison M., 1998.

Figura 3. Producción de huevo y la reducción en la calidad del mismo en una parvada afectada con bronquitis infecciosa — Parvada no afectada, ----- parvada afectada.

3.3.10. LESIONES

En la forma respiratoria se produce exceso de moco y exudado catarral. Los pulmones pueden presentar congestión y las paredes de los sacos aéreos estar turbias y engrosadas. Las lesiones histopatológicas del tracto respiratorio consisten en infiltración celular y edema de la mucosa y submucosa traqueales, pudiendo haber hemorragia en la submucosa (Jordan y Pattison, 1998).

En la enfermedad urémica se hinchan los riñones y los túbulos distendidos blancos presentan uratos. Se produce infiltración linfocítica intersticial y, al final, necrosis del epitelio tubular con acumulación de uratos y material necrótico. En algunas aves tienen lugar la gota visceral (Rojo, 1996).

La enfermedad del oviducto funcional ocasiona una regresión en tamaño con metaplasia del epitelio, dilatación glandular, infiltración de tejidos subpíteleales con monocitos y proliferación de folículos linfoides y fibroplasia tardía. En pollos muy jóvenes puede causar diferentes grados de desarrollo anormal, desde la ausencia casi total del conducto, vestigios obstruidos o quistes (Moreno, 1994).

3.3.11. MORBILIDAD Y MORTALIDAD

Todas las aves de la parvada se infectan, pero la mortalidad es variable dependiendo de la virulencia del serotipo infectante, edad, estado de inmunidad, ya sea materna o activa y estrés por frío o infecciones bacterianas secundarias (Calnek *et al.*, 1997).

3.3.12. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico rápido y preciso de la enfermedad es una condición necesaria para estructurar programas de erradicación y control (Peralta y Frías, 1987).

Para diagnosticar la BI se deben observar los signos clínicos y las lesiones macroscópicas. En las etapas iniciales la BI puede confundirse fácilmente con enfermedades como: Enfermedad de Newcastle, Coriza infecciosa, Laringotraqueítis Aviar, Enfermedad respiratoria crónica complicada, Infección de la Bolsa de Fabricio, Síndrome de la Baja de Postura, Coriza, entre otras (Rojo, 1996).

Por lo tanto, los síntomas clínicos son indicativos de BI, pero no son de valor diagnóstico, y la confirmación requiere el aislamiento o la demostración directa de la presencia del VBI o de la titulación de anticuerpos presentes en el suero de las aves mediante técnicas de serología (Jordan y Pattison., 1998).

El examen serológico constituye un método extremadamente eficaz para el diagnóstico de la bronquitis, por su especificidad y por la reproducibilidad de los resultados.

Este diagnóstico se basa en la demostración de un título ascendente de anticuerpos en el suero de las aves infectadas, tomada la primera muestra en la fase inicial de la enfermedad y, la segunda, dos o tres semanas después. La demostración de un título bajo o negativo en la primera muestra y un título más alto en la segunda es prueba de la enfermedad.

Para la detección de anticuerpos se pueden utilizar distintos métodos que incluyen: neutralización del virus, inmunidifusión, inhibición de la hemaglutinación, inmunofluorescencia y ELISA (Rojo, 1996).

3.3.12.1. Detección de anticuerpos

Las respuestas inmunitarias de los animales pueden emplearse en dos formas generales en el laboratorio de diagnóstico. Primero, pueden usarse anticuerpos específicos para detectar e identificar un antígeno. Segundo, la detección de anticuerpos específicos en el suero permite establecer si un animal estuvo expuesto a un antígeno en especial (Tizard, 1996).

Las técnicas de serología caen en tres categorías generales: las pruebas de unión primaria, que miden directamente el enlace de antígenos y anticuerpos; las pruebas de unión secundaria, que miden la interacción antígeno-anticuerpo *in vitro* y las de unión terciaria, que miden el efecto protector real de los anticuerpos en un animal.

3.3.12.1.1. Titulación de anticuerpos

La titulación es una forma de medir la cantidad de anticuerpos específicos. Muchas veces es suficiente la detección de anticuerpos en ciertas pruebas, pero en muchas otras es necesario estimar la cantidad de anticuerpos presentes (Tizard, 1996).

3.3.12.1.2. Prueba de inmunoadsorción ligada a enzimas

(ELISA)

Es una prueba de unión primaria que detecta el enlace específico antígeno-anticuerpo y cuantifica los inmunocomplejos formados, su fundamento es el empleo de enzimas para detectar estas uniones (Gómez-Lucía *et al.*, 2006).

La técnica ELISA es el método serológico más sensible, presenta una sensibilidad $< 0,0001-0,01 \mu\text{g}$ de anticuerpos/ml (Fenner *et al.*, 1993).

Carece de especificidad de cepa o de tipo, pero es adecuada para analizar respuestas a la vacunación en condiciones de campo (Peralta *et al.*, 1987).

Es ampliamente utilizada para identificar poblaciones infectadas por VBI (Villegas, 1996).

Cuadro 1. Esquema secuencial de las etapas de la técnica ELISA

Etapas de la técnica ELISA
1° Tapizado del pocillo con concentraciones de antígeno anticuerpo
2° Adición de la muestra problema que contiene el anticuerpo o antígeno a cuantificar
3° Incubación: Unión del antígeno o anticuerpo problema la anticuerpo o antígeno adsorbido al pocillo
4° Lavado del pocillo para eliminar el exceso de antígeno o anticuerpo no unido
5° Adición del anticuerpo secundario marcado con una enzima (conjugado) ¹
6° Incubación: Unión del anticuerpo secundario al antígeno o al anticuerpo
7° Lavado del pocillo para eliminar el exceso del conjugado no unido
8° Adición del sustrato adecuado a la enzima. Incubación
Reacción del sustrato adecuado a la enzima, y formación de un producto coloreado Soluble
9° Valoración colorimétrica por espectrofotometría a una determinada longitud de onda(en un lector de microplacas) ²

Fuente: Gómez-Lucía, E. *et al.*, 2006.

¹La enzima utilizada normalmente es la peroxidasa de rábano picante (HRPO), aunque también se emplean fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, betagalactosidasa, etc.

²La lectura de la absorbancia se expresa en valores de densidad óptica (DO).

3.3.12.1.2.1. ELISA indirecto para la cuantificación de anticuerpos

Permite analizar simultáneamente y en un corto periodo de tiempo a grandes colectivos, por lo tanto es útil en el sondeo serológico de poblaciones para conocer la situación sanitaria frente a una infección determinada (Gómez-Lucía *et al*, 2006).

Es una prueba muy sensible para detectar bajos niveles de anticuerpos y específica para los anticuerpos que se buscan (Tizard, 1996).

3.2.12.1.2.2. ELISA competitivo

Puede utilizarse para la determinación de anticuerpos o de antígenos.

3.2.12.1.2.3. ELISA directo para la detección de antígenos

La rentabilidad de esta técnica es muy limitada, pues se debe contar con tantos tipos de anticuerpos como antígenos se quieran detectar (Gómez-Lucía *et al*, 2006).

3.2.12.2. Serología- ELISA en la Avicultura

La utilización de pruebas serológicas, en especial de la técnica de ELISA constituye una de las más importantes herramientas en la industria avícola, para establecer un excelente programa de medicina preventiva.

Estas determinan el nivel relativo de inmunoglobulinas IgY e IgM presentes en el suero sanguíneo (Vargas, 2003).

Solvay A (1992), afirma que las pruebas serológicas persiguen los siguientes objetivos:

1. Establecer valores serológicos estándar para regiones o granjas, que sean factibles de utilizar como punto de referencia para realizar comparaciones.
2. Diagnosticar problemas de campo, evaluando los desafíos de campo e investigando los motivos de brotes de la enfermedad.
3. Dar seguimiento o monitorear los programas de vacunación, es decir, cuantificar los anticuerpos maternos, determinar la edad apropiada para la vacunación, y evaluar las respuestas posvacunales inducidas por las vacunas.
4. Evaluar la eficiencia de la aplicación de las vacunas vivas y saber si se está preparando bien el sistema inmune para una buena respuesta con las vacunas inactivadas, si no se logra una buena respuesta con las vacunas vivas, no se podrá esperar una elevación adecuada de los títulos de la vacuna inactivada, o si no se ha logrado una respuesta uniforme en la vacunación, se pueden afectar los CV de la vacuna inactivada y verlos reflejados casi inmediatamente en el monitoreo previo a la semana 35 de producción.
5. Monitorear y comparar rutas de aplicación en la eficiencia y uniformidad de cubrimiento de la parvada.

3.2.12.3. Interpretación de los resultados serológicos

Para interpretar los resultados obtenidos es necesario establecer previamente el concepto de títulos altos, medios y bajos.

Los títulos altos pueden resultar como consecuencia de la exposición de las aves a desafíos de campo o como resultado de programas vacunales con varias vacunas o con productos emulsionados o concentrados.

Los niveles de anticuerpos maternos pueden variar de 3000 a 5000, mientras que los títulos resultantes de una vacunación a temprana edad pueden ser similares y a veces menores.

Los títulos mayores a 8 000 en aves vacunadas una sola vez pueden ser interpretados como títulos muy altos y pueden resultar de una exposición a virus de campo (Villegas *et al.*, 1992).

La correlación del rendimiento de la parvada con los parámetros serológicos es muy importante para interpretar los resultados adecuadamente.

3.2.13. CONTROL

El control de la enfermedad en todo el mundo se hace únicamente por medio de la vacunación, asociada a los principios básicos de desinfección, aislamiento y sanidad (Villegas, 1996).

Una vez que la enfermedad se ha manifestado no existe un tratamiento específico, es decir que la terapéutica farmacéutica no es útil en el control de este virus, tampoco es práctico intentar excluirlo por medios higiénicos (Jordan y Pattison, 1998).

La forma más efectiva de control, consiste en el aumento de la resistencia de las aves. Se utilizan vacunas con virus vivos o muertos, dependiendo de la edad y objetivos de la crianza. Las vacunas más utilizadas en ponedoras son las vacunas con virus muertos. Sin embargo, en cualquiera de los casos debe precederse por una vacuna de virus vivo bien atenuado.

La cepa Massachusetts (M41), es usada mundialmente, debido a que el aislamiento inicial del virus de la Bronquitis Infecciosa en muchos países correspondía a este serotipo (Comotto, 2000).

Una elevación de anticuerpos después de la vacunación o la infección natural indica cierto grado de protección contra la cepa homóloga del VBI, pero no puede interpretarse como protección contra cepas heterólogas (Jordan y Pattison, 1998).

3.2.13.1. Vacunación

Las cepas vacunales se seleccionan para representar el espectro antigénico de aislamientos de un país o región particular. La cepa Massachusetts 41 (M41) se usa mundialmente, debido a que los aislamientos de muchos países corresponden a este tipo, incluyendo al Ecuador (Calnek *et al.*, 1997).

En ponedoras se utilizan las vacunas vivas para las primeras vacunaciones. . Durante el periodo de producción hay necesidad de una protección amplia y duradera y para esto se utilizan por tanto las vacunas inactivadas (Calnek *et al.*, 1997).

La aplicación de las vacunas se lleva a cabo desde el nacimiento hasta las 18 semanas de edad, mientras que las vacunas inactivadas se utilizan como refuerzo en la etapa de producción (Gutiérrez, 2010).

Generalmente se recomienda dejar 2 semanas entre dos vacunas vivas contra la BI. Para obtener el mejor efecto de la vacuna inactivada preferiblemente se deben dejar de 4-6 semanas entre la última vacuna viva y la aplicación de la vacuna inactivada.

3.2.13.2. Vacunas vivas

Se utilizan en pollos de engorde y para la vacunación inicial de reproductoras y ponedoras. Se pueden suministrar en ponedoras sin peligro a partir del primer día de edad. Sin embargo el uso de algunas vacunas vivas conlleva el riesgo de patogenicidad residual asociada con el pase de la vacuna en aves (Villegas, 1996).

Puede que las vacunas vivas no protejan durante toda la vida de la población ponedora, ya que el desafío por cepas de serotipo variante es un hecho muy común en granjas con aves de edades múltiples, y los descensos de producción son corrientes hacia las 40 semanas de edad (Gutiérrez, 2010).

3.2.13.3. Vacunas muertas o inactivadas

Para sacarle realmente ventaja al potencial que tiene una vacuna inactivada, las aves deberán ser estimuladas previamente y de manera correcta con el uso de vacunas vivas. Al menos que se haya administrado previamente una vacuna viva, no confiere protección.

Se obtendrán títulos más elevados cuando se deja un intervalo de 4-6 semanas entre la última vacuna viva y la vacuna inactivada (Calnek *et al.*, 1997).

Solamente se consigue tener un nivel constante de anticuerpos tras el uso de la vacuna inactivada (Álvarez, 2009).

3.2.13.4. Métodos de aplicación

La administración de la vacuna puede individualizarse para aplicación con gota ocular, intratraqueal o intranasal.

Los métodos masivos de aplicación incluyen rociamiento aerosol y por medio del agua de bebida. Estos métodos son muy populares por su conveniencia, pero

pueden producirse problemas para lograr una aplicación uniforme de la vacuna, y el método de aerosol puede ocasionar reacciones respiratorias más intensas (Calnek *et al.*, 1997).

Las vacunas aplicadas por medio del método de agua de bebida, son susceptibles de inactivarse por sustancias para saneamiento agregadas a fin de controlar la contaminación bacteriana y micótica del sistema hidráulico (Álvarez, 2009).

Se ha observado que la incorporación de leche descremada en polvo a una concentración de 1:400 estabiliza el título de virus durante la administración de la vacuna (Calnek *et al.*, 1997).

3.2.13.5. Calendario de vacunación

Todo el programa sanitario debe tener como objetivo la protección de las aves en la fase productiva (Jordan y Pattison, 1998).

La evaluación serológica periódica de los planteles durante toda su vida proveerá a los técnicos la información precisa y segura sobre el programa sanitario utilizado, la uniformidad de su aplicación y del nivel de protección del lote (Villegas, 1996).

Los calendarios de vacunación deben ser diseñados de acuerdo con las necesidades propias de cada zona, y ser evaluados rutinariamente, para luego ser modificados de acuerdo con los resultados del laboratorio o cambios en el desafío local (Villegas, 1996).

Las pruebas de tipo ELISA son muy sensibles y adecuadas para analizar la respuesta inmune a las vacunas (Tizard, 1996).

3.2.14. INMUNIDAD

Las aves que se recuperan de la infección natural son resistentes al desafío intratraqueal con cepas homólogas, y requieren después de la exposición, por lo menos tres semanas para alcanzar los más altos anticuerpos. Los huevos de gallinas que padecieron la infección contienen anticuerpos pasivos, que generalmente declinan a la cuarta semana de edad. Los anticuerpos en las aves son muy útiles para proteger o reducir la severidad de la enfermedad, aunque no siempre evitan la infección por virus de campo (Moreno, 1994).

3.2.14.1. Respuesta Inmune al VBI

En estudios realizados por Martins N., *et al.* (1991) se evidenció que después de la infección con una cepa vacunal del VBI, IgM es el primer anticuerpo en aparecer, los títulos pico se logran aproximadamente entre los 7 y 8 días de la infección. IgG es el anticuerpo de mayor presencia en el suero luego de una infección, se encuentra presente desde los 7 días posteriores a la infección por BI y puede persistir por algún tiempo.

La infección induce además, la secreción de IgA. La IgM e IgA, pasan al líquido amniótico del huevo, la IgY penetra en el embrión y es capaz de neutralizar el virus. Otros autores como Pei J., *et al.* (2001) han mostrado que la respuesta de los linfocitos T citotóxicos en los pollos está correlacionada con la disminución inicial de la infección y signos clínicos.

3.2.14.2. Perfil serológico en ponedoras contra la enfermedad de BI

La figura 3 corresponde a una representación gráfica del nivel de protección esperado de la parvada a través del tiempo. Los anticuerpos maternos tienen un catabolismo acelerado hasta la semana 3 aproximadamente.

Luego de ser estimulada por los procesos de vacunación a virus vivo el organismo responderá con una respuesta primaria con elevación de los anticuerpos, en tanto que entre las 4 y 18 semanas terminado el programa de vacunación con vacunas vivas, las aves responderán con una respuesta secundaria, que no es otra cosa que la elevación de los anticuerpos estimulada por la aplicación de vacunas inactivadas que le darán la protección necesaria durante la época de producción (Vásquez, 2009).



Fuente: Vásquez, 2009

Figura 4. Representación gráfica del nivel esperado de protección de una parvada a través del tiempo.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN

4.1.1. FASE DE CAMPO

4.1.1.1. Ubicación Política

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Proyecto Avícola de la Carrera de Ciencias Agropecuarias, ubicada en la provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Parroquia Loreto.

4.1.1.2. Ubicación Geográfica

LATITUD: 22' 42,76'' S

LONGITUD: 24' 58,93'' O

ALTITUD: 2748 msnm

4.2. MATERIALES

4.2.1. Materiales de campo

En la fase de campo se ocuparon 20 ponedoras de la línea Lohoman Brown de 17 semanas de edad, alojadas en un sistema de jaulas en pisos suspendidos que fueron inmunizadas con la vacuna contra el Virus de Bronquitis Infecciosa (VBI)Massachusetts 41, de virus inactivado.

Para la toma de muestras de sangre se utilizaron:

- Tubos de vidrio estériles de 5 ml sin anticoagulante.
- Libreta de campo

- Cámara fotográfica
- Jeringas estériles de 3cc
- Agujas desechables, calibre 20, de 1pulgada
- Tubos vacutainer
- Gradilla
- Cooler
- Computadora
- Calculadora
- Cámara fotográfica

4.2.2. Laboratorio

- Tubos eppendorf
- Pipetas monocanal de 100 μ l
- Kit Elisa
- Lector de Elisa
- Centrifugadora (5000 rpm)

4.3. MÉTODOS

4.3.1. Cálculo Tamaño de la muestra

$$Z_{\partial_p} = 0,02$$

$$\partial_p = \sqrt{pq/n}$$

$$p = 0,97$$

$$q = 0,03$$

$$z = 1,64 \text{ certeza del } 90\%$$

$$1,64 (\sqrt{pq/n}) = 0,02$$

$$\sqrt{pq/n} = 0,0122$$

$pq/n = 0,00014884$; se multiplica ambos lados por n

$$pq = 0,00014884n$$

$$n = pq / 0,00014884$$

$$n = 19,55 \approx 20 \text{ ponedoras}$$

4.3.2. Análisis Estadístico

En el análisis estadístico se utilizó Gráficas de Control Estadístico de Calidad con el objetivo de determinar si el proceso de respuesta inmune de las aves se mantuvo en un nivel aceptable, tomando en cuenta que en todo proceso existe una variabilidad natural debido a fuentes de variación incontrolables.

Se realizó dos gráficas, la primera representando la media (\bar{X}) del proceso de respuesta inmune, la segunda la desviación estándar (S). Los límites de control se eligieron de manera que se esperaba que todos los puntos muestrales quedaran cubiertos por estos límites.

Para la gráfica \bar{X} :

$$UCL = \bar{X} + SA_3$$

$$LCL = \bar{X} - SA_3$$

$$\text{Donde } A_3 = \frac{3}{C_4\sqrt{n}}$$

C_4 es una constante definida para diferentes tamaños muestrales.

Para la gráfica S:

$$UCL = SB_4$$

$$LCL = SB_3$$

Donde B_3 y B_4 son constantes definidas para diferentes tamaños muestrales.

Si uno de los valores cayera fuera de los límites de control, esto se tomaría como evidencia de que el proceso estaba fuera de control y se pasaría a analizar las causas y posibles soluciones.

Se utilizó el Software Estadístico *R*.

4.3.3. Métodos Específicos de Manejo del Experimento

En el presente experimento se monitoreó los títulos serológicos contra VBI en 2500 aves ponedoras de la línea Lohoman Brown, mismas que llegaron al Plantel Avícola del IASA a las 12 semanas de edad. Las aves fueron inmunizadas en su fase inicial con una plataforma de vacunas vivas contra VBI como se puede observar en el Anexo 1.

El primer muestreo se realizó a las 17 semanas de edad de las aves, seleccionando 20 aves al azar, ya que se monitoreó la cinética de todo el lote.

A cada una de las aves se le tomó una muestra de 1 a 2 ml de sangre por punción de la vena braquial en tubos de vidrio estériles de 5 ml sin anticoagulante.

La inmunización con la vacuna inactivada se llevó a cabo a la semana 22 de vida de las aves. Se aplicó la vacuna Triple (Bronquitis + Síndrome de Baja Postura+

Newcastle) que contiene la cepa Massachusetts 41 (M41), virus inactivado. Se aplicó por medio del agua de bebida.

Los 5 muestreos posteriores se realizaron siguiendo la misma metodología. Con un intervalo de 9 semanas entre muestreo.

Las muestras se transportaron al Laboratorio de Sanidad Animal de la Carrera de Ciencias Agropecuarias, a una temperatura entre 2 y 7°C, y se realizó una separación completa del suero por coagulación y centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos, congelándose a una temperatura bajo 0°C hasta su procesamiento.

Las muestras de sueros fueron llevadas al laboratorio especializado Lafavet, en donde se determinó la presencia de anticuerpos específicos contra VBI mediante la técnica de ELISA indirecto, utilizando el inmunoanálisis enzimático IDEXX IBV.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. INTERPRETACIÓN RESULTADOS SEROLÓGICOS

Los resultados de las titulaciones serológicas mediante la técnica de Inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA), desde la semana 17 hasta la 65, se pueden observar en cuadro 2. Así, como el Título Promedio Aritmético (MEAN), el Título Promedio Geométrico (GMT), desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV%), de las respectivas semanas de evaluación.

Ristow, E. (2010), afirma que es importante la validación de la respuesta serológica general de los animales de muestra por lo que se debe calcular el MEAN. Además del CV, que mide la uniformidad de los títulos de anticuerpos detectados, por lo que es un indicativo de la efectividad de un programa de vacunación como se puede observar en el cuadro 3, ya que muestra lo uniforme que fue el proceso de inmunización.

Según Vásquez, C. (2009), el GMT, es un valor más relevante que el MEAN, para la interpretación de resultados en cualquier situación de CV, ya que es menos sensible a valores extremos vs el MEAN (que solo es importante cuando se obtiene un CV menor a 30%).

Cuadro 2. Resumen de los resultados de las titulaciones serológicas de la semana 17 a la 65

MUESTRA	VALORES TÍTULOS ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA VBI (µg/ml)					
	Semana 17	Semana 26	Semana 35	Semana 44	Semana 53	Semana 65
1	4551	15085	4308	1623	8876	5687
2	6081	6840	6857	1301	5790	8304
3	4895	4943	5722	1512	2853	3782
4	6415	14960	4951	1752	2474	4211
5	4736	6739	6014	3821	4456	3753
6	4792	9443	2348	4432	7224	4508
7	3414	10679	3704	2015	3528	4752
8	1180	3595	4606	1623	2645	11159
9	6712	8682	2991	1329	4179	2529
10	4999	9373	4893	2206	4334	2181
11	4043	9597	3252	1752	3504	5336
12	6597	5887	5555	5499	10164	3800
13	7675	8459	5148	1541	3319	4808
14	4728	12049	6165	4776	3811	4366
15	5261	10415	8682	1978	5362	5472
16	4054	5787	6241	1356	2968	4077
17	6807	4747	2746	3476	2358	7257
18	6263	8699	2789	1394	3740	6111
19	9204	6876	5952	2129	2166	2612
20	4561	12032	5042	2955	3072	2973
MEAN ³	5348,4	8744,35	4898,3	2423,5	4341,15	4883,9
GMT ⁴	5008	8180	4636	2168	3926	4511
SD ⁵	1709,00	3193,69	1604,35	1283,91	2173,40	2130,92
CV% ⁶	31,1	35,6	31,9	51,6	47,4	42,5

Fuente: Astudillo, K. 2013.

³Título Promedio Aritmético

⁴Título Promedio Geométrico o Geometric Meter Titer

⁵Desviación estándar

⁶ Coeficiente de variación, se expresa en porcentaje

Cuadro 3. Criterio de interpretación del CV en un esquema de vacunación contra BI

Coefficiente de variación (CV%)	Interpretación
Menos de 30 %	Excelente
30-50%	Bueno
51-80%	Razonable
Más de 90%	Malo

Fuente: Ristow, E. 2010.

Para realizar la interpretación serológica de los resultados de los ELISAS, se utilizaron histogramas, en el eje horizontal, cada barra se ubicara en un grupo (0, 1, 2,3...) en tanto en el eje vertical se leerá la cantidad de aves.

Cada barra en el histograma, representa la cantidad de aves con títulos dentro de un rango determinado. Es por ello que no es muy importante leer títulos individuales, sino como están agrupados.

Los grupos (titer group) van del 1 hasta el 18, cada grupo tiene un rango de títulos mínimo y título máximo como se presenta en el cuadro 4.

La cantidad de grupos y rangos pueden variar dependiendo del kit que se utilice, En el presente ensayo se utilizó el kit de ELISA de IDEXX Laboratories, para este kit se establecen 18 grupos y los valores mínimos y máximos para cada grupo especificados en el cuadro 4.

Cuadro 4. Grupos (titer group) y rangos de títulos mínimo y máximo, establecidos para la interpretación de titulaciones serológicas contra Bronquitis (VBI) mediante la técnica de ELISA indirecto.

Titer group	Título Mínimo	Título Máximo
0	0	396
1	397	999
2	1000	1999
3	2000	2999
4	3000	3999
5	4000	4999
6	5000	5999
7	6000	6999
8	7000	7999
9	10000	11999
10	12000	13999
11	14000	15999
12	16000	17999
13	18000	19999
14	20000	21999
15	22000	23999
16	24000	27999
17	28000	31999
18	> 32000	

Fuente: Vásquez, C. 2009.

A continuación se detallan los resultados para cada semana.

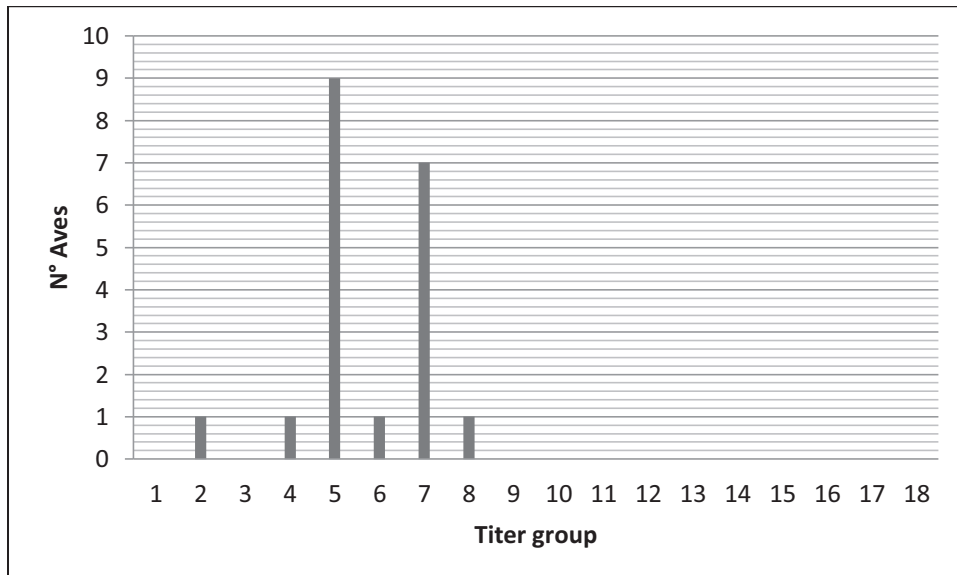
5.1.1. Semana 17

Luego del análisis estadístico de los datos obtenidos para la semana 17 (Cuadro 2) se obtuvo un GMT de 5008 $\mu\text{g/ml}$, un MEAN de 5348 u/ml, CV de 31,1 % y una SD de 1709,00. Los valores de las titulaciones de todas las aves se situaron entre 1180 y 9204 $\mu\text{g/ml}$ como se puede observar en el cuadro 5.

Cuadro 5. Promedios títulos de anticuerpos semana 17

Mean:	5348
GMT:	5008
SD	1709
%CV:	31,1
Min:	1180
Max:	9204

Fuente: Astudillo, K. 2013.



Fuente: Astudillo, K. 2013.

Figura 5. Histograma gráfico semana 17

Según Álvarez, A. (2009), los niveles de títulos mayores a 1000 u/ml, pueden considerarse protectivos.

Ristow, E. (2010), afirma que es importante evaluar la eficiencia de la aplicación de las vacunas vivas, para saber si se está preparando de manera adecuada el sistema inmune para una buena respuesta con las vacunas inactivadas. En cambio

Vineza, C. (2005) dice que en el caso de no lograr respuestas uniformes tras el uso de vacunas vivas, los CV de la vacuna inactivada también se verán afectados.

Por lo tanto todas las aves muestreadas en la semana 17, presentaron valores de títulos de anticuerpo protectivos. Estos datos evidencian la existencia de la inmunidad estimulada por las vacunas vivas, aplicadas en la fase de levante de las aves como se especifica en el Anexo 1.

En la figura 5 se observa que 9 aves se encuentran dentro del grupo 9, 7 dentro del grupo 7, mientras que en los grupos 2, 4, 6 y 8 se encuentra 1 ave en cada uno, según los rangos mínimos y máximos especificados en el cuadro 4.

Así mismo, en el histograma de la figura 5 se aprecia que las muestras están agrupadas, lo que representa una respuesta inmune homogénea a la vacunación, y que el proceso de inmunización se llevo a cabo de la manera correcta que se corrobora con el valor del CV de 31,1%, como se puede apreciar en el cuadro 3 elaborado por Ristow, E. (2010).

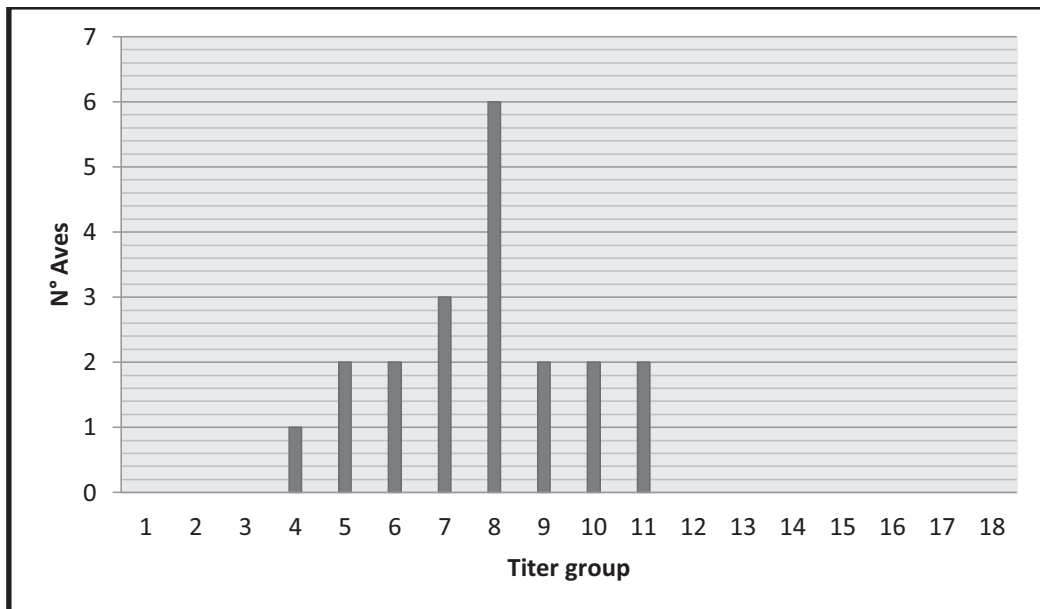
5.1.2. Semana 26

El estudio serológico llevado a cabo en la semana 26 luego de la aplicación de la vacuna inactivada oleosa contra VBI por vía intramuscular, reveló un aumento notable en los valores de los títulos de anticuerpos, respecto a la semana 17. El GMT fue de 8180, el MEAN de 8744. La SD de 3113 y el CV de 35,6% como se indica en el cuadro 6.

Cuadro 6. Promedios títulos de anticuerpos semana 26

Mean:	8744
GMT:	8180
SD:	3113
%CV:	35,6
Min:	3595
Max:	15085

Fuente: Astudillo, K. 2013.



Fuente: Astudillo, K. 2013

Figura 6. Histograma gráfico semana 26

Según Álvarez, A.(2009), el uso de vacunas oleosas, estimula un alto nivel de protección inmunológica y de larga duración, en especial cuando están precedidas por vacunas con virus vivo.

Y Sainsbury, D. (2002) afirma que para lograr el máximo potencial de las vacunas, es necesario inyectar a cada ave con una dosis completa.

Según Villegas, P. (1996), los títulos mayores a 8000 en aves vacunadas pueden ser interpretados como títulos muy altos y pueden resultar de una exposición a virus de campo.

Los títulos llegaron a su nivel máximo a las 4 semanas después de la aplicación de la vacuna inactivada. Este comportamiento es de esperarse por la influencia ejercida en la respuesta inmune, tanto por el tipo de vacuna inactivada aplicada, como por la existencia de inmunidad previa por las vacunas vivas aplicadas en la etapa de levante de las ponedoras.

En la figura 6 observa que los datos están distribuidos de manera uniforme en el centro del gráfico, lo que proporciona una idea global de los resultados estadísticos. El CV es de 35,6%, que se encuentra dentro del rango aceptable como se indicó en el cuadro 3, y evidencia una respuesta inmune uniforme en el lote.

A pesar de que para la semana 26 el GMT es mayor a 8000 $\mu\text{g/ml}$, el CV refleja una respuesta estable y según Vineza, C.(2005), por lo general cuando se presenta desafío de campo, además de un incremento en los títulos GMT, se observa una distorsión del CV y las barras del histograma se desplazarán hacia la derecha.

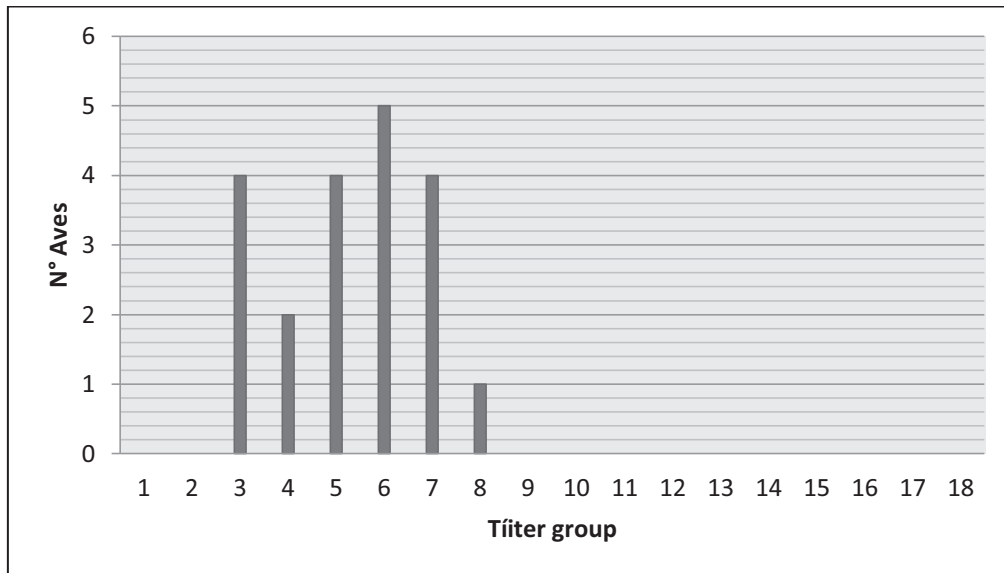
5.1.3. Semana 35

En los resultados obtenidos en la semana 35, se aprecia una disminución de los valores de los títulos de anticuerpos respecto a las semanas anteriores, el GMT fue de 4636, el MEAN de 4898, el CV de 31,9% y los títulos máximos y mínimos de 8682 y 2348 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Cuadro 7).

Cuadro 7. Promedios títulos de anticuerpos semana 35

Mean:	4898
GMT:	4636
SD:	1564
%CV:	31,9
Min:	2348
Max:	8682

Fuente: Astudillo, K. 2013.



Fuente: Astudillo, K. 2013

Figura 7. Histograma gráfico semana 35

Cuello, S., *et al.* (2004) afirma que este comportamiento de los títulos de anticuerpos se relaciona directamente con el comportamiento normal del catabolismo de los anticuerpos, los títulos disminuyen porque las aves no se encuentran expuestas al agente viral.

Como se observa en la figura 7, aunque existió homogeneidad en las frecuencias, como lo indica el CV, hubo un desplazamiento de los datos en el histograma hacia la izquierda, indicativo del descenso de la inmunidad, debido a que las aves no se encontraron expuestas al antígeno.

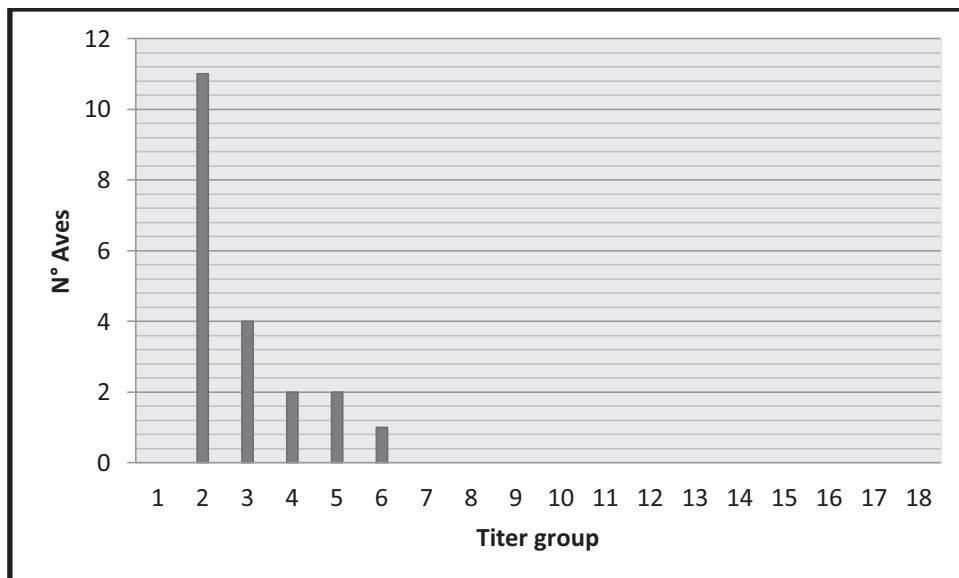
5.1.4. Semana 44

En contraste con las semanas 17, 26 y 35; en la semana 44 hubo un descenso del GMT y el MEAN obteniendo un valor de 2168 y 2424 respectivamente. Por otra parte el CV se incrementó con respecto a las anteriores semanas siendo del 51,6% (Cuadro 8).

Cuadro 8. Promedios títulos de anticuerpos semana 44

Mean:	2424
GMT:	2168
SD:	1251
%CV:	51,6
Min:	1301
Max:	5499

Fuente: Astudillo, K. 2013.



Fuente: Astudillo, K. 2013.

Figura 8. Histograma gráfico semana 44

Según Cuello, S., *et al.*, (2004), aunque la existencia de inmunidad de memoria es capaz de prevenir la ocurrencia de un brote, se debe considerar este descenso en la toma de decisiones sobre modificaciones al programa inmunoproliférico.

En la figura 8 se observa claramente que los datos se encuentran agrupados hacia la izquierda, lo que en términos generales significa un marcado descenso de los títulos de anticuerpos con respecto a las semanas anteriores. Esta disminución, demuestra el comportamiento de la respuesta inmune en ausencia de una exposición a agente viral de campo.

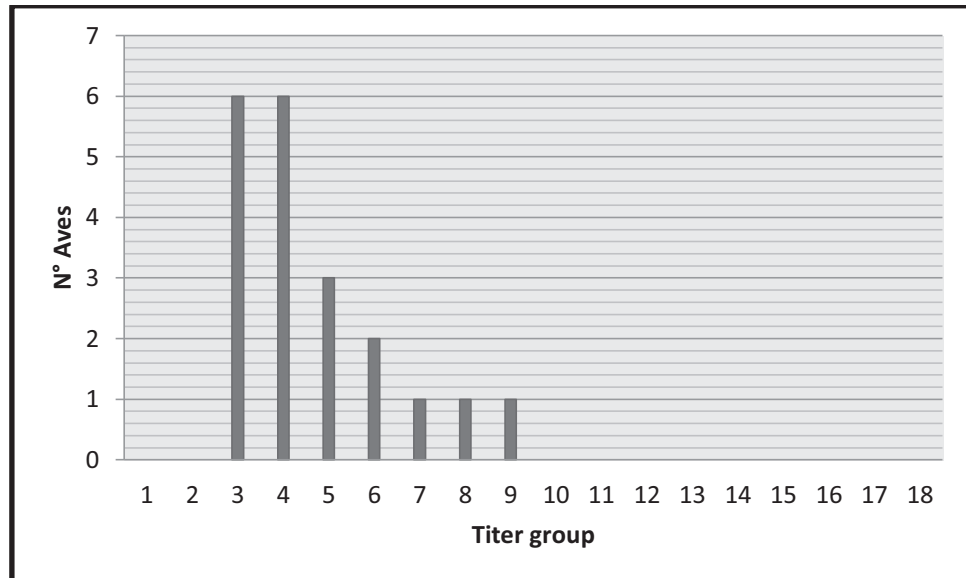
5.1.5. Semana 53

Para la semana 53, el GMT presentó un valor de 3926, un MEAN de 4301, estos valores presentan un notable aumento en relación a la semana 44. El CV fue de 47,4% como se observa en el cuadro 9.

Cuadro 9. Promedios títulos de anticuerpos semana 53

Mean:	4301
GMT:	3926
SD:	2038
%CV:	47,4
Min:	2166
Max:	10164

Fuente: Astudillo, K. 2013.



Fuente: Astudillo, K. 2010

Figura 9. Histograma gráfico semana 53

Según Tizard, I. (1996), en la respuesta inmunitaria se generan células de memoria que responden de manera eficaz al tener un nuevo contacto con el mismo antígeno.

El CV muestra que la uniformidad de la respuesta inmune es aceptable. Sin embargo en la figura 9 se puede observar indicios de que las barras se desplazaron hacia la derecha, lo que significa un aumento en los títulos de anticuerpos, que se confirma con el valor del GMT.

Por lo tanto este comportamiento, al no tener relación con la aplicación de vacunas, ni sintomatología asociada con la enfermedad, se interpreta como la respuesta serológica frente a un desafío de campo

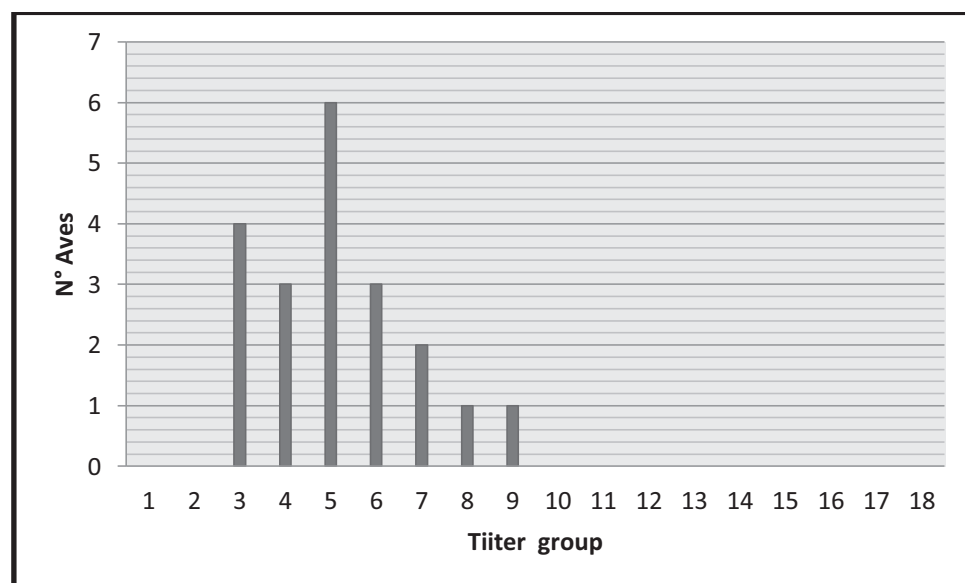
5.1.6. Semana 65

Se obtuvo un GMT de 4511, MEAN de 4884, un CV de 42,5%, que expresa un buen nivel de homogeneidad de la respuesta inmunitaria de las aves. Y los títulos mínimos y máximos fueron 2181 y 11159 respectivamente, como se muestra en el cuadro 10.

Cuadro 10. Promedios títulos de anticuerpos semana 65

Mean:	4884
GMT:	4511
SD:	2077
%CV:	42,5
Min:	2181
Max:	11159

Fuente: Astudillo, K. 2013.



Fuente: Astudillo, 2013.

Figura 10. Histograma gráfico semana 53

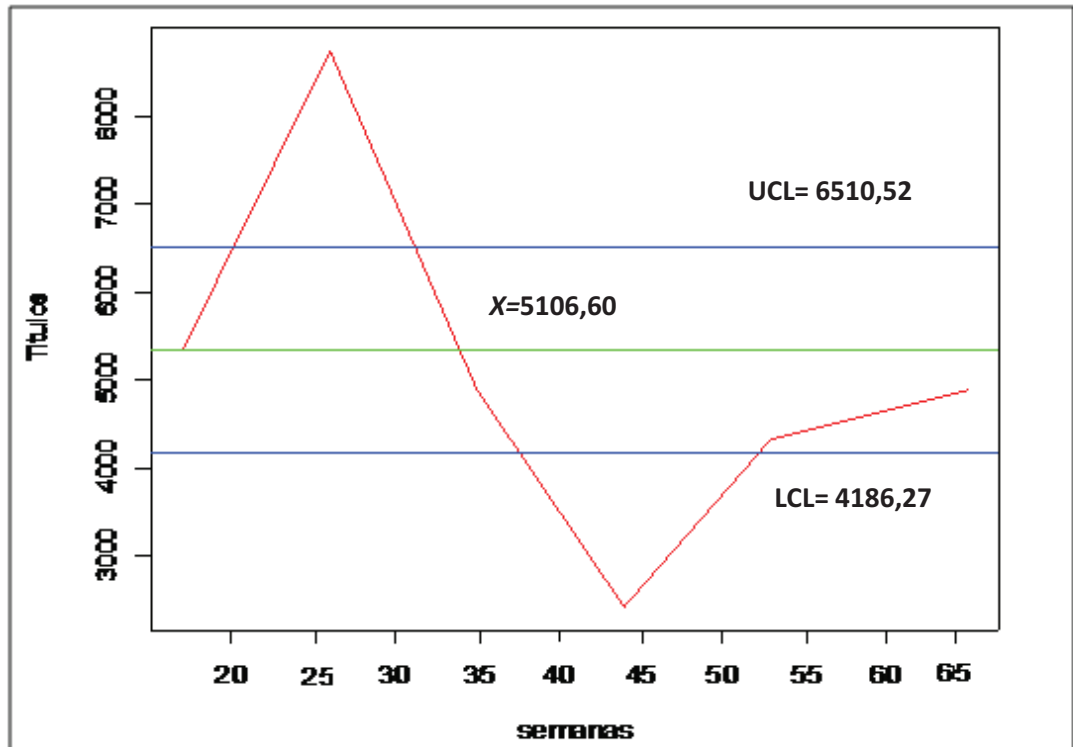
Según Tizard, I. (1996), las células B que se convierten en células de memoria forman una reserva de células sensibles al antígeno, que son invocadas durante el siguiente contacto con el antígeno, produciendo IgM e IgG.

El GMT de la semana 65 es mayor que el de la 53, el aumento de los títulos sugiere que las aves continúan expuestas a un importante desafío de campo.

El contacto con el antígeno estimuló la respuesta inmune de las aves, la producción de inmunoglobulinas no cesó, confiriendo protección a las aves hasta el final de su vida productiva.

5.1.7. ANÁLISIS DEL CONTROL ESTADÍSTICO DE CALIDAD DEL PROCESO DE RESPUESTA INMUNOLÓGICA DE LAS AVES

Gráfica X:



Fuente: Astudillo, K. 2013.

Figura 11. Promedios de las titulaciones de anticuerpos de la semana 17 a la 65

En la figura 11, se observa la cinética de la respuesta inmunológica de las aves de la semana 17 a la 65.

En el eje horizontal X se indica el tiempo (expresado en semanas de vida de las aves), mientras que en el eje vertical Y se representan los valores promedios de títulos de anticuerpos contra VBI (característica de calidad que se está

monitoreando). Además se incluyen otras dos líneas horizontales: los límites superior (LCL) e inferior (UCL) de control, que se calcularon tomando como referencia las medias de los títulos de las aves, antes de la aplicación de la vacuna inactivada.

Se busca determinar si el proceso de respuesta inmunitaria de las aves frente al programa sanitario contra VBI utilizado, se encuentra dentro de control estadístico.

De ser así, todos los valores de los resultados de las titulaciones serológicas de cada muestreo deben caer dentro de los límites de control, de lo contrario se asume que dicho proceso se encuentra fuera de control.

Como se observa en la figura 11, los promedios de los títulos correspondientes a la semana 26 y 44 (8744,35 y 2423,50 ug/ml respectivamente) caen fuera de los límites de control.

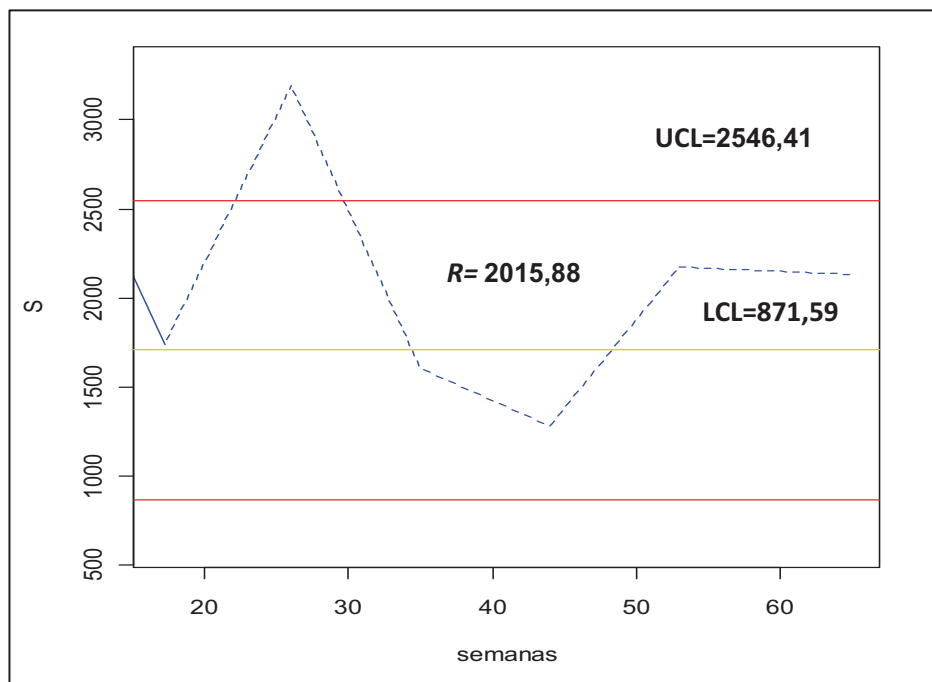
El cambio suscitado en la media de los títulos a la semana 26 se debe a la respuesta inmunitaria generada luego de la aplicación de la vacuna inactivada a la semana 22, según Vásquez 2009, el pico de la producción de anticuerpos se alcanza en la tercera o cuarta semana postaplicación de la vacuna. Además se alcanzaron títulos más altos por la existencia de la inmunidad estimulada por las vacunas vivas aplicadas en la fase de levante de las ponedoras.

Mientras que el notable descenso de los títulos observado en la semana 44 según Álvarez, A., *et al.* (2009), se debe al comportamiento normal del catabolismo de los anticuerpos.

Cuello, S., *et al.* (2004), afirma que ante un drástico descenso en los títulos de anticuerpos, debe considerarse revacunar a las aves, para eliminar la posibilidad de un brote, a pesar de la existencia de la inmunidad de memoria.

En el presente estudio no se revacunó a las aves porque aunque los títulos descendieron a la semana 44, a la semana 53 se observó un marcado incremento, que evidenció la presencia de un importante desafío de campo, continuando el incremento de títulos hasta la semana 65.

Gráfica S:



Fuente: Astudillo, K. 2013.

Figura 12. Desviación estándar de respuesta inmunológica contra VBI

En la figura 12 se representa la desviación estándar respecto al tiempo, que indica la medida de la dispersión del conjunto de datos, es decir, que tan lejos de la media se encuentran los valores de los títulos de anticuerpos para cada muestreo.

En el eje horizontal X se indica el tiempo, mientras que en el eje vertical Y se representan los valores para la desviación estándar. Las otras dos líneas horizontales representan el LCL y UCL.

Según Villegas, P. (1982), la respuesta inmunológica y la curva de anticuerpos, como toda respuesta biológica, sufren una variabilidad natural de individuo a individuo.

Como se observa en la figura 12 la desviación estándar para la semana 26 es de 3113, y sobrepasa el LCL. Este es un indicativo de que la variabilidad del proceso de respuesta de las aves no es estable y se encuentra fuera de control estadístico.

Pero cabe resaltar que el CV para la semana 26 es de 31,9% (Cuadro 6), que refleja que la respuesta inmune del lote de aves fue homogénea, y el proceso de inmunización se realizó de manera adecuada como se muestra en el cuadro 3 elaborado por Ristow, E. (2010).

Por lo tanto el valor de la desviación estándar para la semana 26 es tan alto, porque en este momento se presenta el mayor título de anticuerpos de los momentos evaluados y el GMT de esta semana es el que más se aleja de la media.

VI. CONCLUSIONES

- El programa sanitario contra BI empleado en la granja de levante de las aves fue adecuado. El Título Promedio Geométrico presentado por las aves a las 17 semanas, antes de la aplicación de la vacuna inactivada fue de 5008 $\mu\text{g/ml}$, además el Coeficiente de Variación fue de 31,1 %, lo que demuestra la homogeneidad de la respuesta inmune de las aves, y que el proceso de inmunización se llevó a cabo de manera apropiada.
- En la semana 26 se obtuvieron los títulos de anticuerpos más altos, con un Título Promedio Geométrico de 8180 $\mu\text{g/ml}$, este resultado se correspondió con la respuesta humoral esperada luego de la aplicación de la vacuna oleosa inactivada y con la estimulación previa del sistema inmune con las vacunas vivas. Además se obtuvo un Coeficiente de Variación de 31,9% que refleja que la respuesta a la inmunización fue uniforme.
- El estudio serológico reveló que en la semana 44 se produjo una sostenida disminución de los valores de los títulos de anticuerpos, presentándose un Título Promedio Geométrico significativamente menor a todos los periodos evaluados, este fue de 2168 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, los títulos continuaron siendo protectivos. No se revacunó a las aves debido que a la semana 53 se observó que los títulos aumentaron y se observó un Título Promedio Geométrico de 3926 $\mu\text{g/ml}$, que al no deberse a la aplicación de vacunas, ni observarse síntomas asociados a la BI, evidenció la presencia de un importante desafío de campo dentro del plantel avícola.
- Posteriormente a la evaluación serológica se determinó que la aplicación de la vacuna oleosa inactivada contra BI, por vía intramuscular, junto con la correcta

estimulación del sistema inmune de las aves con las vacunas vivas, brinda la protección durante la fase productiva de las aves, a pesar de la presencia de un agente viral de campo.

- Como consecuencia de la evaluación serológica de la semana 17 a la 65, se elaboró el programa sanitario contra BI para el Proyecto Avícola de la Carrera de Ciencias Agropecuarias, para conferir protección contra la enfermedad durante la fase de producción (Anexo 2).

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar la respuesta frente a las vacunas vivas aplicadas, con el fin de conocer si el sistema inmune de las aves ha sido estimulado adecuadamente y predecir los resultados que se obtendrán tras la aplicación de las vacunas inactivadas.
- Durante el periodo de producción hay necesidad de una protección amplia y duradera y para lograrlo es recomendable la utilización de vacunas inactivadas.
- Se recomienda la evaluación periódica de los niveles inmunológicos de los planteles durante su etapa productiva, para evaluar la respuesta frente a la vacunación, la uniformidad de su aplicación y el nivel de protección del lote, además para poder establecer cuando se hace presente un desafío de campo y modificar los programas de vacunación de ser necesario.
- Es recomendable que los resultados obtenidos de los estudios serológicos, se comparen constantemente con el fin de identificar los cambios en la respuesta inmune relacionados con el nivel y tipo de desafío, además los resultados deben interpretarse asociándolos con la situación particular de cada plantel, de esta manera se establecerá si existe una respuesta inmunológica debido a un desafío de campo o enfermedad clínica.
- Dada la evidencia de actividad viral referida, es recomendable llevar un manejo adecuado de los lotes de aves, suministrando alimento y agua en cantidades adecuadas, controlando la ventilación, los niveles de amoníaco y temperatura, así como la presencia de otros virus o patógenos y en general evitando los agentes inmunodepresores.

- Dadas las condiciones de alto desafío de campo en la zona en que se encuentra el Proyecto Avícola de la Carrera de ciencias Agropecuarias, se recomienda realizar una vacunación de refuerzo con fines protectivos a la semana 60.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, A. (2010). Bronquitis infecciosa aviar: diagnóstico y control (en línea). Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504. Vol. 11, N° 03. Consultado 8 dic. 2012. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030/031025.pdf>.
- Álvarez, D; Usma, J; Jaime, J; Vera, V. (2009). Dinámica serológica del virus de bronquitis infecciosa en una granja de pollos de engorde del departamento de Cundinamarca. Revista Médica de Veterinaria y Zootecnia 56:105-112. Consultado 13 dic. 2012. Disponible en: <https://www.revistas.unal.edu.co/index.php/remavez/article/download>
- Arnaiz-Villena, A; Regueiro, JR; López, C. (1995). Inmunología. Madrid: Editorial Complutense S.A.
- Bermúdez, S. (2006). Patología Aviar (en línea). Consultado 22 nov. 2012. Disponible en: <http://patologiaaviaruptc.blogspot.com/2006/11/el-sistema-inmune-aviar.html>.
- Calnek, BW; Barnes, H; Beard, C; Mc Douglald, L. (1997). Trads. A Lemus Gamboa y A Matínez Haro. Enfermedades de las aves. México: Editorial El Manual Moderno.
- Comotto, GE. (2000). Enfermedades de las aves. Lima: S.e.
- Colas, M (2010). Estudio serológico de agentes asociados con el síndrome respiratorio crónico en gallinas ponedoras (en línea). Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1027>.
- Colour Manual: Diseases of birds. (2000). Tokyo: Japanese Society of Poultry Diseases.

- Cuello, S; Noda, J; Alfonso, P; Perera, C. (2004). Bronquitis Infecciosa Aviar. Cinética de anticuerpos posvacunales en reproductoras y su transferencia a la progenie (en línea). Consultado 5 dic. 2012. Disponible en: http://www.censa.edu.cu/index2.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=407&Itemid=105
- Cuello, Sandra; Noda, Julia; Perera, Carmen L.; Alfonso, P.; Núñez, Amalia y Acosta, Isis (2006). Estandarización de un ELISA para la detección de anticuerpos a bronquitis infecciosa aviar (en línea). Revista Salud Animal: p.131-136. Consultado 11 dic. 2012. Disponible en: http://www.censa.edu.cu/index2.php?option=com_docman&task=doc_view&gid.
- Echeverría, R; Guanochang, JC. (1996). Titulación de anticuerpos contra Newcastle y bronquitis Infecciosa en dos razas de reproductoras para broiler tanto en la madre como en la descendencia en tres etapas diferentes. Tesis de doctor en medicina Veterinaria. Universidad central del Ecuador.
- Fenner, F; Gibbs E; Murphy, F; White, D. (1993). Veterinary virology. 2da ed.
- Gómez –Lucía, E.; Blanco, M.; Domenech, A, (2006). Manual de inmunología Veterinaria. Madrid: Prentice Hall.
- Gutiérrez, JE. (2010). Inmunología Veterinaria. Texas: El Manual Moderno.
- Jordan, F; Pattison, M. (1998). Enfermedades de las aves. Trads. AF Martínez Haro y A Lemus Gamboa. 3 ed. México: El manual Moderno.
- Majó, N.; Dolz, R (2011). Atlas de Necropsia Aviar: Diagnóstico macroscópico y toma de muestras 3 ed. Zaragoza: Servet Editorial.
- Martins, N.R., Mockett, A.P., Barrett, A.D., Cook, J.K. (1991). Responses in chicken serum to live and inactivated infectious bronchitis virus vaccines. Vol. 35. New Jersey: Se.

- Merck (2000). Manual de Veterinaria. 5ta ed. Barcelona: Editorial Océano.
- Moreno Chan, R. (1994). La Bronquitis Infecciosa de las aves y Métodos de Genética Molecular usados para su diagnóstico (en línea), Consultado 5 nov. 2012. Disponible en: <http://minnie.uab.es/BRONQUITIS/INFECCIOS/AVIAR.pdf>
- Morilla, A. (1989). Inmunología Veterinaria. 2 ed. México: Editorial Diana.
- Noda, J; Cuello, S; Alfonso, P. (2002). Bronquitis Infecciosa Aviar: obtención de antígeno y detección de anticuerpos por inhibición de la hemoaglutinación (en línea). Consultado 4 nov. 2011. Disponible en: http://www.iiia.cu/pdf/v26_89.pdf
- Ossa, J. 1990. Bases de Inmunología Aviar. Medellín: Publicaciones Politécnico Colombiano.
- Pei, J., Sekellick, M.J., Marcus, P.I., Choi, I.S., Collisson, E.W. (2001). Chicken interferon type I inhibit infectious bronchitis virus replication and associated respiratory illness. Toronto: S.e.
- Peralta, E; Frías, M. (1987). Manual sobre la técnica inmunoenzimática ELISA. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. La Habana.
- Ramirez, A. (2008). Sistema inmune de las aves (en línea). Disponible en: http://www.avicultura.com.mx/uploads/temp/Articulo_Sistema_inmune_del_pollo%289%29.pdf.
- Ricaurte, S. (2005). Bioseguridad en granjas avícolas (en línea). España. Revista Electrónica de Veterinaria. ISSN 1695-7504, 6(2): 1-3. Consultado 15 dic. 2011. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020205.html>
- Rives, D. (1992). Entendiendo a la Serología en la Industria Avícola. Bogotá: Se.
- Ristow, E. 2010. Consideraciones para la interpretación de resultados serológicos a través de la metodología ELISA en avicultura. (en línea). Perú. Disponible en:

http://www.microclin.com/archivos/interpretacion_de_examenes_serologicos_ELISA_D_L_E_Ristow.pdf.

- Robin, O. (2006). Sistema inmune aviar: Estrategia de protección de las aves e importancia de su buen funcionamiento (en línea). Disponible en: http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/dr._oscar_robin.pdf.
- Rojo, E. 1984. Curso de especialización en producción animal: Enfermedades de las aves. 2da ed. México: Editorial Trillas.
- Sainsbury, D. (2002). Salud y Manejo Sanitario de Aves de Corral. 4ta ed. Buenos Aires: Editorial Inter Médica.
- Sharma, JM. (1997). Estructura y función del sistema inmune aviar. 3 ed. México: Se.
- Solvay, A. (1992). Memorias del III Seminario Latinoamericano de Sanidad Avícola: El Sistema Inmunológico Aviar. Bogotá.
- Tizard, I. 1996. Inmunología Veterinaria. Trad. ME Aiaza. 5ta edición. México: Mc Graw Hill Ineramericana.
- Vargas, O. (2003). Memorias VI Seminario de Actualización Avícola Ecuador: Importancia del Laboratorio de diagnóstico en la Avicultura. PRONACA.
- Vásquez, C. (2009). Consideraciones para la interpretación serológica en ELISA Resultado exámenes ELISA (en línea). Perú. Disponible en: <http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/algunas-consideraciones-interpretacion-serologica-t2558/165-p0.htm>.
- Villegas, P. (1982). Técnicas en virología histopatología y micoplasmas aviaries. Universidad de Georgia, Centro de educación Continua, Facultad de Medicina Veterinaria de Georgia.

- Villegas, P. (1996). Memorias VII Seminario Internacional de Patología Aviar. Trads. G Zavala y S Leal. Universidad de Georgia.
- Vineza, C. (2005). Interpretación y uso de exámenes de ELISA en Avicultura (en línea). Ecuador. Revista Veterinaria REDVET Vol. 6. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070705/070501.pdf>.
- Weeb, D. (1991). Mediators of celular Immunity. Academic press. Roche institute of molecular biology. New Yersey.

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Karla Noemí Astudillo Angulo

DIRECTORA DE LA CARRERA DE INGENIERIA EN CIENCIAS

AGROPECUARIAS

Ing. Patricia Falconí

DELEGADO UNIDAD DE ADMISION Y REGISTRO

Abg. Carlos Orozco B.

Lugar y fecha: Sangolquí, 15 de febrero del 2013

