

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**  
**SEDE CUENCA**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

*Trabajo de titulación previo  
a la obtención del título de  
Médica Veterinaria Zootecnista*

**TRABAJO EXPERIMENTAL:**

**“DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS MATERNALES CONTRA NEWCASTLE  
EN POLLOS BROILER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTA”**

**AUTORA:**

FANNY ROCÍO PERALTA VIÑANZACA

**TUTOR:**

ING. MAURICIO XAVIER SALAS RUEDA

CUENCA - ECUADOR

2021

## CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Fanny Rocío Peralta Viñanzaca con documento de identificación N° 0105820815, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación: **“DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS MATERNALES CONTRA NEWCASTLE EN POLLOS BROILER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTA”**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: *Médica Veterinaria Zootecnista*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, abril del 2021.



---

Fanny Rocío Peralta Viñanzaca

C.I. 0105820815

## CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS MATERNALES CONTRA NEWCASTLE EN POLLOS BROILER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTA”**, realizado por Fanny Rocío Peralta Viñanzaca, obteniendo el *Trabajo Experimental*, que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, abril del 2021.



---

Ing. Mauricio Xavier Salas Rueda

C.I. 0603329681

## **DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD**

Yo, Fanny Rocío Peralta Viñanzaca con documento de identificación N° 0105820815, autora del trabajo de titulación: **“DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS MATERNALES CONTRA NEWCASTLE EN POLLOS BROILER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTA”**, certifico que el total contenido del *Trabajo Experimental*, es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, abril del 2021.



---

Fanny Rocío Peralta Viñanzaca

C.I. 0105820815

## DEDICATORIA

Primeramente, agradezco a Dios por la salud y por permitir que llegara este momento y culminar mi carrera profesional.

Este trabajo dedico a mi familia, con todo mi cariño especialmente para mis abuelos Jesús Benjamín Viñanzaca Barbecho y Dolores Victoria Cumbe Muñoz, por quien decidí la carrera y me enfocaron al trabajo en el campo y hoy al culminar le agradezco por haberme enseñado a ver la producción agropecuaria como mi profesión también dedico este trabajo a mis hermanas Yolanda y Alicia por haberme apoyado durante todo este tiempo y a superar juntas momentos difíciles y por seguir presente en mis proyectos, también a mis padres Víctor Ángel Peralta Muñoz y María Elsa Viñanzaca Cumbe, que han sido el apoyo fundamental tanto moral como económico les dedico mi título porque gracias a ellos culmine la carrera profesional.

## AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por haberme guiado por un buen camino y permitir seguir cumpliendo otros objetivos.

A mis padres por haberme dado apoyo desde el inicio de mis estudios, a mis hermanas por siempre estar presente y pendiente de las cosas que pasan y saber darme ánimos en los momentos difíciles siendo el pilar fundamental.

A una persona especial e incondicional, Juan por estar presente en estos años y apoyarme en los momentos buenos y malos.

A mis profesores de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia por compartir sus conocimientos, especialmente al Ing. Mauricio Xavier Salas Rueda por guiarme en la realización de este trabajo.

A mis amigos y a todas las personas que de una u otra manera me apoyaron durante toda la carrera.

## INDICE GENERAL

RESUMEN .....	14
ABSTRACT .....	15
1. INTRODUCCIÓN .....	16
1.1 . EL PROBLEMA .....	18
1.2 . DELIMITACIÓN .....	19
1.2.1 Temporal.....	19
1.2.2. Espacial.....	19
1.2.3. Académica .....	20
1.3 EXPLICACION DEL PROBLEMA.....	20
1.4. OBJETIVOS .....	21
1.5. HIPOTESIS .....	22
1.5.1. Alternativa .....	22
1.5.2. Nula .....	22
1.6. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA .....	22
2. REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL.....	23
2.1. Sistema inmunológico en aves.....	23
2.2. Clases y funciones de las inmunoglobulinas en aves.....	24
2.2.1. Inmunoglobulina Y.....	24
2.2.2. Inmunoglobulina A.....	25

2.2.3.	Inmunoglobulina M .....	25
2.3.	Respuesta inmune de las aves .....	26
2.3.1.	Respuesta inmune innata .....	27
2.3.2.	Respuesta inmune adquirida.....	29
2.3.3.	Respuesta Th1 y Th2 .....	29
2.4.	Métodos de inmunización .....	30
2.4.1.	Inmunidad pasiva.....	30
2.4.2.	Inmunidad activa .....	30
2.5.	Estructura del sistema inmune aviar, órganos linfoides primarios. ....	30
2.5.1.	Timo .....	31
2.5.2.	Bolsa de Fabricio (BF) .....	31
2.5.3.	Placas de Peyer .....	32
2.5.4.	Medula ósea.....	32
2.6.	Órganos linfoides secundarios .....	32
2.6.1.	Ganglios linfáticos.....	32
2.6.2.	Bazo .....	33
2.6.3.	Tejido Linfoide Asociado a Mucosas del Intestino .....	34
2.6.4.	Tonsilas.....	34
2.6.5.	Placas de Peyer .....	34
2.7.	Serología .....	35

2.7.1.	Controles serológicos .....	35
2.8.	Enfermedad de Newcastle (E.N.).....	38
2.8.1.	Etiología .....	38
2.8.2.	Distribución geográfica .....	38
2.8.3.	Especies afectadas.....	38
2.8.4.	Transmisión .....	39
2.8.6.	Signos y Síntomas .....	40
2.8.7.	Lesiones .....	41
2.8.8.	Diagnóstico diferencial.....	42
2.8.9.	Diagnóstico clínico.....	43
2.8.10.	Tratamiento.....	44
2.8.11.	Prevención y control.....	44
2.8.12.	Vacunación .....	45
2.8.13.	Tipos de vacunas .....	45
2.8.14.	Administración: programa y vía idónea .....	46
2.8.15.	Vías de administración .....	47
2.8.16.	Control de la pérdida de eficiencia de la vacuna .....	48
2.1.	RESUMEN DEL ESTADO DEL ARTE DE ESTUDIO DEL PROBLEMA.....	48
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
3.1.	Materiales físicos .....	50

3.2.	Materiales químicos y biológicos. ....	51
3.3.	Materiales biológicos. ....	52
4.	MÉTODO. ....	52
4.1.	Método de campo ....	52
4.2.	Selección de aves ....	52
4.3.	Obtención de muestras. ....	52
4.4.	Procedimiento para realizar el ELISA Indirecta. ....	53
4.4.3.	Procedimiento.....	55
4.5.	DISEÑO ESTADÍSTICO ....	56
4.5.1.	Validación.....	57
4.5.2.	Interpretación.....	57
4.6.	POBLACIÓN Y MUESTRAS ....	58
4.7.	VARIABLES.....	58
4.8.	CONSIDERACIONES ÉTICAS ....	59
5.	RESULTADOS Y DISCUSIONES ....	60
5.1.	Datos de títulos de anticuerpos maternos contra la enfermedad de Newcastle.....	60
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES ....	64
6.1.	Conclusiones.....	64
6.2.	Recomendaciones ....	65
7.	BIBLIOGRAFIA.....	66

8.	ANEXOS.....	73
8.1.	Fotografías del trabajo experimental.....	73

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Localización de Moromoro-Piñas</i> .....	19
Tabla 2. <i>Laboratorio</i> .....	50
Tabla 3. <i>Oficina</i> .....	51
Tabla 4. <i>Laboratorio</i> .....	51
Tabla 5. <i>Animales</i> .....	52
Tabla 6. <i>Variables independientes</i> .....	58
Tabla 7. <i>Variables dependientes</i> .....	59

## INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Parroquia Moromoro-Piñas .....	20
<i>Figura 2.</i> Inmunoglobulinas .....	26
<i>Figura 3.</i> Esquema simplificados de un ensayo de ELISA Indirecto .....	36
<i>Figura 4.</i> Forma de Transmisión .....	40
<i>Figura 5.</i> Lesiones hemorrágicas en el proventrículo que pueden ser causadas por el virus de Newcastle o de Influenza aviar.....	43
<i>Figura 6.</i> Frecuencia general de datos positivos y negativos... <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
<i>Figura 7.</i> Declinación de la inmunidad maternal. .... <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
<i>Figura 8.</i> Porcentaje de pollos positivos y negativos contra Newcastle. .. <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	

## RESUMEN

Con el objetivo de determinar los anticuerpos maternos contra la enfermedad de Newcastle en pollos broiler utilizando la técnica de ELISA indirecta en una granja avícola del sitio el Palto, Parroquia Moromoro, Cantón Piñas. Se realizó el presente estudio serológico de 140 muestras, el mismo que correspondió a un diseño experimental utilizando el análisis de datos ID Soft el cual permite realizar un análisis y medir los títulos de anticuerpos maternos contra la enfermedad NDV. Resultados del día 1 fueron 100% positivos, 70 pollos presentan anticuerpos maternos contra la enfermedad de Newcastle con niveles de 2,394 a 4,185. Los resultados positivos se clasifican en 4 grupos de acuerdo al nivel de anticuerpos. Observando que en el grupo 3 se encuentra la mayor concentración de muestras de anticuerpos siendo un valor alto considerando una inmunidad buena el primer día de vida. Día 8 de vida, como resultado fue 28 (40%) muestras positivas, se obtuvo 42 (60%) muestras negativas. Observando que para el día 8 de vida ya el nivel de anticuerpos es bajo, es decir, 42 pollos no presentan inmunidad contra la enfermedad de Newcastle. Realizando una comparación los títulos de anticuerpos maternos se establece para el día 1, una media de 3,617, mínimo de 2,394, máximo de 4,185. Para el día 8, presenta una media de 1,324, mínimo de 1, máximo de 4,115, por lo cual para el día 8 la inmunidad es baja, las aves deben ser vacunadas antes del día 8.

## ABSTRACT

With the objective of determining maternal antibodies against Newcastle disease in broiler chickens using the indirect ELISA technique in a poultry farm at the El Palto site, Moromoro Parish, Piñas Cantón. The present serological study of 140 samples was carried out, the same one that corresponded to an experimental design using the ID Soft data analysis, which allows an analysis and measurement of maternal antibody titers against NDV disease. Results on day 1 were 100% positive, 70 chickens present maternal antibodies against Newcastle disease with levels from 2,394 to 4,185. Positive results are classified into 4 groups according to the level of antibodies. Observing that in group 3 there is the highest concentration of antibody samples, being a high value considering a good immunity on the first day of life. Day 8 of life, as a result there were 28 (40%) positive samples, 42 (60%) negative samples were obtained. Observing that by day 8 of life the level of antibodies is already low, that is, 42 chickens do not present immunity against Newcastle disease. By making a comparison, the maternal antibody titers are established for day 1, a mean of 3,617, a minimum of 2,394, and a maximum of 4,185. For day 8, it presents an average of 1,324, minimum of 1, maximum of 4,115, therefore for day 8 the immunity is low, the birds must be vaccinated before day 8.

## PALABRAS CLAVES TEMÁTICA

Newcastle – Enfermedad

NDV - Newcastle

Inmunidad - Anticuerpos maternos

## 1. INTRODUCCIÓN

Newcastle es una de las enfermedades que afectan al sector avícola de gran importancia a nivel mundial en Ecuador se considera a la zona costera como la de mayor producción avícola en carne y huevos representando un alto porcentaje dentro de la producción agropecuaria. Esta enfermedad es considerada por su nivel de contagio, afectando considerablemente en el rendimiento de la producción observando síntomas a nivel respiratorio, nervioso y digestivo provocando consecuencias devastadoras en la producción e impacto económico. El sistema inmune en los pollos está establecido por los anticuerpos maternos presentes al nacer y que han sido transmitidos por la madre siendo variable en los pollos ya que al cursar los días posteriores al nacimiento este valor de anticuerpos desaparece y es la razón de los distintos protocolos de vacunación y normas de bioseguridad por lo tanto la inmunología aviar es una ciencia en pleno desarrollo.

Según Pérez (2017), manifestó que el consumo de pollo de los ecuatorianos hace 20 años era de 10 kilos por persona, en la actualidad el valor es triplicado, se ha convertido en la proteína animal avícola de principal consumo entre los ecuatorianos por lo tanto en la actualidad es la industria que está en mayor crecimiento considerando a grandes, medianos y pequeños productores observando en las estadísticas aproximadamente 1.900 granjas avícolas en el Ecuador.

Newcastle es una enfermedad viral caracterizada por su alta morbilidad y mortalidad presentando signos clínicos viscerotrópicos o neurotrópicos. En la forma viscerotrópica presenta lesiones hemorrágicas diftéricas del tracto digestivo, son remarcables las hemorragias en el epitelio del esófago y molleja. La forma neurotrópica presenta ataxia, torticollis, paresia y parálisis de las piernas (Dinev, 2019).

La forma usual es una infección respiratoria los signos clínicos predominantes puede ser depresión, manifestaciones nerviosas o diarrea, esta enfermedad está inscrita en la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y es de declaración obligatoria a la OIE. Sus síntomas son muy parecidos a los de la Influenza Aviar y por esta razón es una enfermedad de control oficial. (Ecured, 2020)

En aves el sistema inmune comprende, Inmunidad innata (natural o inespecífica) esta constituye la primera barrera de defensa como es la piel, la conjuntiva y las membranas mucosas, si el patógeno atraviesa esta barrera se produce una respuesta inflamatoria aguda o temprana en la que actual componentes celulares y humorales, las células que se destacan son los halterófilos, macrófagos, mastocitos, eosinófilos y células NK entre los componentes humorales tenemos el sistema complemento, proteínas de la fase aguda e interferón  $\alpha$  y  $\beta$ . Inmunidad adquirida (adaptativa o específica), inicia cuando la inmunidad innata no logra detener algún patógeno, proporcionando una respuesta específica frente a cada agente infeccioso intervienen receptores como linfocitos B y T, caracterizada por presentar memoria inmunológica específica evitando que el mismo agente infeccioso no provoque una segunda infección mediante respuesta de anticuerpos dada por la inmunidad humoral o mediante el reconocimiento específico como la inmunidad celular. La protección específica puede ser el resultado de la inmunidad pasiva que está dada por los anticuerpos maternos presentes al nacer, por haber sido vacunada o por un desafío natural. La inmunidad activa es la que desarrolla mediante la exposición directa a los patógenos ya sea por infección o por vacunación. (Pascual & De Marzi, 2016)

Las enfermedades virales además de ser un problema dentro de la producción avícola requieren de un estudio de interés para valorar los niveles de anticuerpos maternos contra Newcastle siendo una de las principales enfermedades lo cual requiere de un estudio para

establecer estos valores y mejorar la economía avícola y dar solución a un problema y aportar con conocimiento.

Esta enfermedad tiene importancia debido a que presenta una zoonosis muy leve la cual podría causar conjuntivitis en el hombre, pero suele ser muy leve y limitada. Dado que el virus se reproduce en las células cancerosas del hombre más rápidamente que en la mayor parte de las células humanas normales y puede eliminar estas células huésped, ha sido usado experimentalmente como un tratamiento del cáncer (OIE, 2020).

El presente trabajo investigativo se realizará con el propósito de facilitar y establecer información al sector avícola para mejorar ciertos estándares de producción en aves.

### 1.1 . EL PROBLEMA

El presente trabajo investigativo tiene como finalidad determinar los valores de anticuerpos maternos existentes en pollos broiler contra Newcastle y establecer valores referenciales de anticuerpos en la especie y de esta manera contribuimos al sector avícola y Médicos Veterinarios al momento de realizar un plan de vacunación y así determinar la eficacia de la vacuna en la edad adecuada para evitar los diferentes brotes de la enfermedad.

“La enfermedad de Newcastle es altamente patógena está inscrita en la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal y es de declaración obligatoria al Código Sanitario para los Animales Terrestres.” (Ecured, 2020)

Hasta el momento no contamos con trabajos realizados sobre el tema por lo tanto es necesario investigar y establecer información dentro de la inmunología en aves para mejorar la producción y la economía beneficiando a los avicultores.

## 1.2 . DELIMITACIÓN

### 1.2.1 Temporal

El presente trabajo tuvo duración de 400 horas, las cuales fueron distribuidas en el proceso experimental, tabulación de datos y redacción del documento final.

### 1.2.2. Espacial

El presente estudio se llevó a cabo en la provincia del Oro en el cantón Piñas, parroquia Moromoro en la granja (Avícola Triple “A”), y los análisis serológicos se llevarán a cabo en el laboratorio de la clínica Polivet de la Universidad Politécnica Salesiana en la ciudad de Cuenca.

Tabla 1. *Localización de Moromoro-Piñas*

Descripción	Denominación
Altitud	2372 msnm.
Longitud	-79.7333
Latitud	-3.71667
Temperatura	20 -25°C
Población	1371
Superficie	85,77km <sup>2</sup>

Fuente: (Geodatos, 2020)

*Figura 1. Parroquia Moromoro-Piñas*



Fuente: (Google maps, 2020)

### 1.2.3. Académica

En el presente trabajo se llevó a cabo una investigación de campo y laboratorio en el área de zootecnia, se fomentó conocimientos específicos en aves.

### 1.3 EXPLICACION DEL PROBLEMA

En nuestro país no existen estudios realizados con relación a la determinación de anticuerpos maternos en sus primeros días de vida contra Newcastle. El estudio de la inmunidad en pollos broiler nos ayudara a mejorar las distintas producciones mediante la modificación de algunas técnicas de manejo con lo cual los productores se verán beneficiados.

Considerando que en Ecuador de acuerdo al transcurso del tiempo la producción avícola se ha incrementado y el valor económico siendo significativo por tanto en la actualidad las producciones avícolas tienen como objetivo la exportación de huevos y de carne de pollo a mercados internacionales planteando, que las autoridades sanitarias, gremios avícolas y los

industriales en general deben iniciar la campaña de erradicación de la forma velogénica-viscerotrópica de la enfermedad de Newcastle. (Acosta, 2014, pág. 7)

Por lo tanto es importante erradicar algunas enfermedades víricas ya que Ecuador se ha convertido en un país caro para criar pollos lo que produce también el aumento en el costo del producto final por lo tanto, no puede competir con aves que llegan desde Colombia o Perú. (Guitierrez, 2018)

Esta investigación se realizó con el objetivo de establecer los niveles de anticuerpos maternos en los pollos desde el día 1 de nacidos hasta el día 8. Tomando en cuenta los resultados se evaluará la inmunidad maternal contra la enfermedad de Newcastle.

#### 1.4. OBJETIVOS

##### 1.4.1. Objetivo general

- Determinar los anticuerpos maternos contra Newcastle en pollos broiler utilizando la técnica de ELISA indirecta en una granja avícola del sitio el Palto, Parroquia Moromoro, Cantón Pinas.

##### 1.4.2. Objetivo específicos

- Medir los títulos de anticuerpos maternos contra la enfermedad de Newcastle mediante la técnica de Elisa indirecta.
- Comparar los títulos de anticuerpos maternos contra la enfermedad de Newcastle

## 1.5. HIPÓTESIS

### 1.5.1. Alternativa

- Se determinó un porcentaje alto de anticuerpos maternos contra Newcastle en pollos broiler.

### 1.5.2. Nula

- Se determinó un porcentaje bajo de anticuerpos maternos contra Newcastle en pollos broiler.

## 1.6. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

El presente trabajo está enfocado en determinar los valores de anticuerpos maternos en pollos broiler mediante la técnica de ELISA y establecer conocimiento sobre este tema ya que los avicultores están expuestos a grandes pérdidas económicas tanto por muerte de pollos en sus primeros días y uso de medicamentos por las diversas enfermedades virales que presentan durante los primeros días de nacidos y la afección en la salud pública por consumo de carne con antibiótico, por lo tanto este estudio nos ayuda a determinar la inmunidad del pollo contra esta enfermedad y aportar con la información para realizar un método de prevención por medio de vacunas.

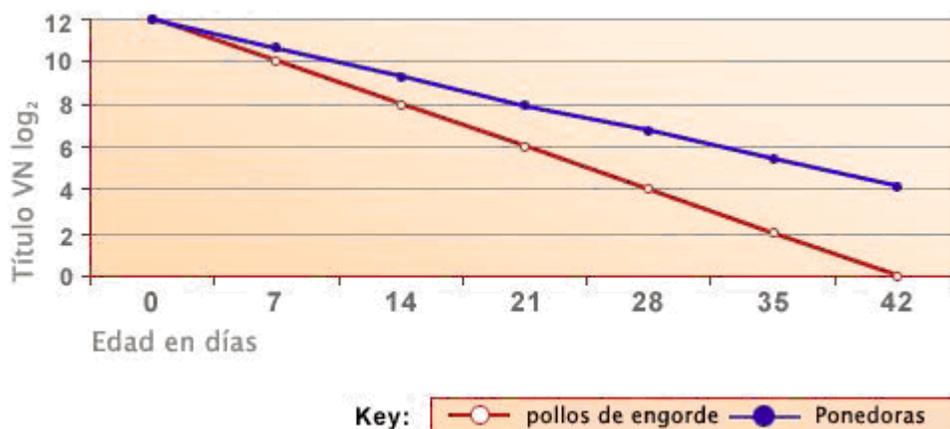
## 2. REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL.

### 2.1. Sistema inmunológico en aves

Un sistema inmunológico sano es el requerimiento de un productor avícola para la integridad inmunológica del ave y una respuesta a la vacuna para mantener la salud del lote y poder explotar la capacidad genética para la producción por lo tanto un sistema inmune alto garantiza la calidad de producción. La inmunidad se define como la resistencia relativa de un huésped a un determinado microorganismo patógeno. Se dice que un huésped es inmune cuando es resistente a contraer la enfermedad. (Barrera & Barrera, 2018, pág. 29).

La inmunidad maternal protegerá a la progenie siempre cuando esté a niveles suficientemente altos, debido al metabolismo, el título de los anticuerpos cae en un promedio de 1 log<sub>2</sub> (título VN) cada 3 a 5.5 días (pollos de engorde de 3 a 3.5 días, reproductores pesadas 4.5 días y ponedoras 5.5 días), es decir que aproximadamente entre las 2-3 semanas de vida aumenta la susceptibilidad a la infección. La inmunidad maternal protege a los pollos contra las infecciones de campo, pero también neutraliza las vacunas vivas provocando su fallo. Es importante saber el origen de los pollitos de un día y el nivel de inmunidad maternal circulante para la implementación de un programa efectivo con vacunas vivas. (Dr. Wit & Dr. Baxendale, 2003, págs. 19-23).

Figura 2. Declinación de la inmunidad maternal.



Fuente: (Dr. Wit & Dr. Baxendale, 2003).

Según Balaguer (2008). Los anticuerpos maternos —MDA, del inglés Maternal Derived Antibodies—, o también conocidos como Inmunidad Pasiva, son la transferencia natural de inmunoglobulinas de un individuo a otro. En las aves, los anticuerpos maternos pasan desde reproductoras hiperinmunizadas o infectadas de manera natural a la progenie a través del huevo. Esta inmunidad pasiva tiene relativamente corta duración, normalmente 1 o 2 semanas y, en general, menos de 4 semanas y su función es proteger a las aves jóvenes durante sus primeras semanas de vida, mientras su sistema inmune no está completamente desarrollado de cara a reaccionar y protegerse frente a una exposición temprana. (págs. 1-2).

## 2.2. Clases y funciones de las inmunoglobulinas en aves

### 2.2.1. Inmunoglobulina Y

Ig Y de las aves es el elemento fundamental de la defensa humoral frente a virus, bacterias y toxinas bacterianas, las funciones específicas de las subclases están relacionadas con las secundarias de las cadenas pesadas y son la fijación de complemento y la interacción con los

macrófagos. Ingresan en el pollito recién nacido a través del vitelo. Se ha encontrado que los anticuerpos con mayor proporción en el plasma sanguíneo, las Ig Y, son transferidos a la yema de huevo a través del epitelio folicular del ovario durante la ovogénesis y se van acumulando, proceso similar a la transferencia de los anticuerpos a través de la placenta en mamíferos. (Murcia, 2009, pág. 20).

### 2.2.2. Inmunoglobulina A

Ig A tiene el componente secretario, que es el activo y muy resistente a la proteólisis. Tiene muchas clases de inmunoactividad contra bacterias, micoplasma, virus, proteínas alimentarias y auto antígenos. Interviene en la defensa inicial contra los microorganismos, especialmente en el tracto respiratorio superior, y es posible que elimine antígenos alimentarios no destruidos por la digestión. Pas a las secreciones externas interviniendo por ello en la defensa local. (Closas, 1983, pág. 85).

La cantidad de Ig A e Ig M transferida a la descendencia es menor del 1% de la concentración de estas inmunoglobulinas en el plasma de las gallinas. Además de este bajo porcentaje transferido, la Ig M es el transferido desde la gallina a la progenie oscila entre un 27% y un 40% y está relacionado directamente con los títulos en la gallina. La Ig Y también la podemos encontrar en la secreción ocular del ave de un día con una proporción 1:5 respecto del nivel en el suero. Los anticuerpos contra Newcastle empiezan a ser catabolizados tan pronto del pollito nace. Cada 4 a 5 días hay una reducción a la mitad de los títulos medidos por HI (Inhibición de la hemoaglutinación). (Balaguer, 2008, pág. 2).

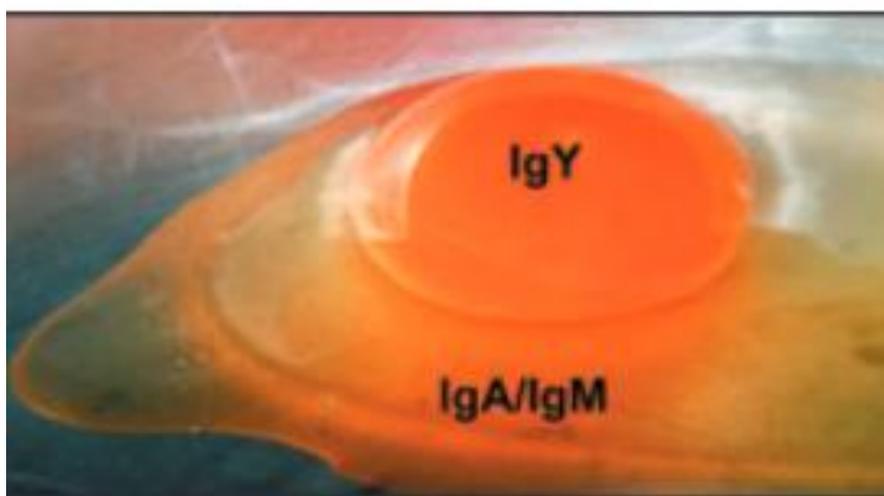
### 2.2.3. Inmunoglobulina M

Ig M fija el complemento y se forma como respuesta primaria al antígeno; se cree que interviene, sobre todo en la defensa contra las infecciones tempranas de origen hematógeno. Es

segregada al exterior localmente y aparece unida a la defensa celular sobre todo a nivel intestinal. Parece que, en aves, a nivel de las placas linfoides intestinales, la Ig. A. es necesaria para seguir la transformación de la Ig M en A y para la elaboración de la Ig A secretoria seria precisa la presencia de células T. (Closas, 1983, pág. 85).

Se encuentra principalmente en la albumina y son transferidas como resultado de una secreción mucosa en el oviducto y más concretamente en el magno. (Balaguer, 2008, pág. 1).

*Figura 3. Inmunoglobulinas*



Fuente: (Balaguer, 2008).

### 2.3. Respuesta inmune de las aves

La inmunidad no solo es crítica en la defensa de las aves contra la exposición natural de patógenos, también en la inmunidad protectora como respuesta a la administración de vacunas. (Perozo, 2015, pág. 24).

### 2.3.1. Respuesta inmune innata

Según el Doctor Perozo, (2015) es la primera línea de defensa contra los patógenos invasores es proporcionada por los mecanismos inmunes innatos, basada en una serie de componentes y mecanismos. (pág. 24).

- La piel y las plumas, que impiden el acceso de los patógenos a ave.
- Mecanismos innatos a nivel de las mucosas que permiten la identificación e impiden el paso de los microbios. (Perozo, 2015, pág. 24).
- Células fagocíticas como los heterófilos, que sustituyen a los neutrófilos presentes en los mamíferos. (Perozo, 2015, pág. 24).
- Las plaquetas que cumplen funciones fagocíticas y los macrófagos que se constituyen en el eslabón que conecta la respuesta inmune innata con la adquirida, pues fagocitan los microbios, los procesan y presentan al componente adaptativo de la respuesta inmune para su identificación y procesamiento. (Perozo, 2015, pág. 24).

Las células implicadas son Macrófagos, células dendríticas, Neutrófilos y células NK, receptores preexistentes y dirigidos contra moléculas microbianas comunes. (Tizard, 2010, pág. 2).

#### 2.3.1.1. Macrófagos

Una de las funciones es la fagocitosis la cual es similar al proceso que llevan a cabo los neutrófilos. Los macrófagos son atraídos no solo por productos bacterianos y los productos de activación del complemento, como C5a, sino también por moléculas liberadas por tejidos y células dañadas. Los neutrófilos que están en el proceso de morir liberan elastasa y colagenasa y, de este modo, generan factores quimiotácticos para los monocitos. Así los neutrófilos son los

mártires del sistema inmunitario: alcanzan y atacan el material extraño primero y, al morir, atraen macrófagos hacia el sitio invadido. Los macrófagos destruyen bacterias por mecanismos oxidativos y no oxidativos. Una función importante de los macrófagos es la eliminación de las células muertas y de las que están en proceso de morir. Otras funciones son la generación de óxido nítrico y la síntesis de proteínas (Ph.D. Tizard, 2002, págs. 29-30).

#### 2.3.1.2. Neutrófilos

Los neutrófilos capturan y destruyen partículas extrañas, como bacterias invasoras, a través de la fagocitosis. A través de cuatro etapas como quimiotaxis, adhesión-opsonización, ingestión y digestión. (Ph.D. Tizard, 2002, págs. 21-23).

#### 2.3.1.3. Células dendríticas

Son células presentadoras de antígenos profesionales (CPA), más importantes. Están especializadas en la captación, procesamiento y presentación de Ag a los linfocitos T. Estas se localizan en el timo, órganos linfáticos secundarios y, las de origen mielóide (DC1), también en epidermis y otros tejidos (células intersticiales). A diferencia de los linfocitos B y T, las células NK se activan rápidamente y pueden penetrar en los tejidos para atacar las células infectadas, mediante una respuesta inmunitaria innata o mediada por anticuerpos. (Blanco, et al., 2013, p. 11)

#### 2.3.1.4. Células NK

Las células NK participan en la respuesta innata frente a virus y microorganismos intracelulares. Reconocen células infectadas con complejo mayor de histocompatibilidad CMH-1 alterado, a las que destruyen mediante lisis por perforinas y enzimas. También destruyen células opsonizadas por Ac mediante un mecanismo denominado citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). (Doménech, et al., 2017, p. 5).

### 2.3.2. Respuesta inmune adquirida

Las células mediante la inmunidad adaptativa específica retienen “memoria” de su encuentro con el patógeno aun después de la eliminación de este cuerpo y la finalización de la respuesta inmunológica. La inmunidad adaptativa es mediada por una variedad de células de las cuales las más importantes son las células B y T y las presentadoras de antígeno como los macrófagos y células dendríticas. (Fariñas, 2015, pp. 55-56).

Según Tizard (2010) también cita que los linfocitos B son los encargados de la producción de anticuerpos específicos por lo que se constituyen en el componente de la respuesta inmune más conocida. (pág. 4).

Los linfocitos T pueden dar lugar tanto a respuestas de inmunidad celular, llamada Th1, como de inmunidad humoral o Th2. Adquiriendo una memoria significativa y mejorando frente a la exposición, con receptores producidos en respuesta a moléculas extrañas. (Tizard, 2010, pág. 4)

### 2.3.3. Respuesta Th1 y Th2

A finales de la década de los ochenta se describieron dos subgrupos de linfocitos T atendiendo al patrón de citoquinas que producían, y se les denominó T helper 1 (Th1) y T helper 2 (Th2). En respuesta a la estimulación antigénica, los linfocitos Th1 producen interleucina-2 (IL2) e interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), estimulando la inmunidad mediada por células. Los linfocitos Th2 por su parte producen IL-4, IL-5 e IL-10, favoreciendo la inmunidad humoral e induciendo la producción de anticuerpos. Las respuestas extremas de este espectro son capaces de inhibir el desarrollo de la contraria, y así el IFN- $\gamma$  producido por las células Th1 puede inhibir la proliferación de las células Th2. Contrariamente, la IL-4 y la IL-10 producidas por las células Th2 pueden inhibir la proliferación de las células Th1. La respuesta Th1 está encargada de la defensa frente a agentes patógenos intracelulares, mientras que la vía Th2 se activa en respuesta

a infecciones por agentes extracelulares y sus toxinas, y frente a infestaciones parasitarias. Aunque en aves está menos descrito, la sobre activación no regulada de los Th1 puede dar lugar a enfermedades autoinmunes, mientras que la de la Th2 puede producir fenómenos de hipersensibilidad de tipo I (alergias). (Fariñas, 2015, pp. 56-57).

## 2.4. Métodos de inmunización

### 2.4.1. Inmunidad pasiva

En las aves, la inmunidad pasiva o maternal, proporciona cierto grado de protección contra las infecciones del virus de la enfermedad de Newcastle. Las inmunoglobulinas provenientes de la inmunidad pasiva, se encuentran localizadas en el saco vitelino y el pollito las incorpora a su sistema al momento de nacer; por ejemplo, la yema contiene IgG que resultan ser los anticuerpos humorales y la albúmina contiene IgA principalmente, la cual al momento del nacimiento del pollito cubre la superficie de las membranas. (Acosta, 2014, págs. 2-3).

Se basa en la administración directa de anticuerpos frente a un agente patógeno que se ha obtenido de un animal donador. Se administra directamente al animal receptor y se confiere inmunidad inmediata. (Agrinews, 2014).

### 2.4.2. Inmunidad activa

Presenta varias ventajas, entre ellas el periodo prolongado de protección y la posibilidad de recordar y reestimar las respuestas protectoras frente al proceso mediante la aplicación repetida de la vacuna. (Agrinews, 2014).

## 2.5. Estructura del sistema inmune aviar, órganos linfoides primarios.

Se considera como uno de los más grandes al ser el sitio que contiene mayor cantidad de células inmunológicas organizadas en diferentes estructuras. (Gimeno, 2013, p. 23).

### 2.5.1. Timo

El timo está formado por múltiples lóbulos que presentan dos zonas diferenciadas: la corteza y la medula. (Gimeno, 2013, p. 23).

En el timo se lleva a cabo un proceso de selección positiva y de selección negativa de linfocitos; aquellos linfocitos que expresen un receptor que reconozca un Ag propio serán eliminados mediante la inducción de apoptosis (selección negativa); mientras que los linfocitos que expresen receptores que no reconozcan Ags propios y que puedan acoplarse con los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad del huésped continuarán su proceso de maduración y diferenciación (selección positiva). En suma, al timo llegan precursores de linfocitos provenientes de la medula ósea para atravesar por un proceso de maduración y diferenciación que los convertirá en linfocitos T listos para salir a la circulación sanguínea y funcionar como células reguladoras de la inmunidad celular. En ese proceso de maduración y diferenciación serán eliminados aquellos que hayan expresado un receptor capaz de reconocer un Ag propio. Esta función es tan crítica para la sobrevivencia del animal que se tiene que llevar a cabo durante las primeras etapas de la vida extrauterina, de tal suerte que conforme el animal crece el timo involuciona y va siendo infiltrado por tejido graso. (Gutiérrez, 2010, p. 11).

### 2.5.2. Bolsa de Fabricio (BF)

Esta estructura se observa como un saco ciego en la región dorsal de la cloaca. Es un órgano linfóide primario en las aves por lo que en este sitio se realizan procesos de diferenciación y maduración de los linfocitos B. El desarrollo embrionario de la BF se inicia desde el día 4; posteriormente entre los días 8 y 14, se encuentran presentes las células precursoras (célula madre) de los linfocitos B. Al nacimiento del pollo la BF está integrada estructuralmente por pliegues que desembocan en un ducto central o bursal. Este tiene comunicación directa entre el

lumen de la BF y el lumen intestinal, lo que permite la captación de antígenos. La aplicación de estos en la cloaca da como resultado el desarrollo de respuestas de anticuerpos. Microscópicamente se observa folículos linfoides que interactúan con células epiteliales y vasos sanguíneos. También se describe la presencia de linfocitos T, infiltrados de manera difusa en el área dorsal del ducto de la bolsa, los cuales tienen un papel importante en el desarrollo de una respuesta inmune local. Este órgano involuciona cuando las aves alcanzan la maduración sexual. (Gómez, López, Maldona, & Ávila, 2010, págs. 9-16).

### 2.5.3. Placas de Peyer

Las placas de Peyer (PP) son acúmulos de tejido linfoide que se encuentra en la submucosa del intestino delgado. Se han descrito dos tipos de PP, las del yeyuno y las del Íleon. Las PP del íleon están consideradas órganos linfoides primarios (OLP) en rumiantes, cerdos, equinos y caninos. Su funcionamiento es equivalente al de la BF en aves. (Gutiérrez, 2010, p. 14).

### 2.5.4. Medula ósea

La medula ósea es el tejido hematopoyético (productor de todas las células sanguíneas) en la vida extrauterina, pero además es un OLP en el humano, primates superiores realiza funciones equivalentes a la bolsa de Fabricio en las aves. Es decir, en la medula ósea no solo se generan las células precursoras de todos los linfocitos, sino que en ella terminan su diferenciación los linfocitos B. (Gutiérrez, 2010, p. 14).

## 2.6. Órganos linfoides secundarios

### 2.6.1. Ganglios linfáticos

Son estructuras que están distribuidas por todo el organismo además de la vasculatura normal están conectados a la red de vasos linfáticos; estos captan el líquido intersticial denominadas

linfa, y conduce hacia el ganglio linfático regional. Se divide en dos zonas una rama cortical (más externa), paracortical y otra medular. La zona cortical está poblada por linfocitos B organizada en estructuras circulares denominadas folículos. La región paracortical se encuentra poblada por linfocitos T y en la medular se hallan células que han concluido su diferenciación en el ganglio y están próximas a salir de él. La salida de linfocitos T se da debido a una inflamación las cuales se activan en caso de reconocer Ag en este micro entorno de lo contrario los linfocitos abandonan el ganglio por la circulación linfática eferente, incorporándose a la circulación venosa para encontrar agentes extraños y activar su sistema. (Gutiérrez, 2010, pp. 14-15).

#### 2.6.2. Bazo

Para estudiarlo en la inmunología debemos de imaginar como un gran ganglio linfático encargado de capturar Ag presente en el torrente sanguíneo y proporcionar el microambiente necesario para que se desarrolle una redistribución del flujo sanguíneo. Es reservorio de eritrocitos y se encarga de la remoción de las células cuando envejecen, esta doble función es la que da al bazo, dos componentes designados como “pulpa roja” y “pulpa blanca” esta última es asociada con la función inmunitaria. El tejido linfoide en el bazo se encuentra formando una vaina alrededor de las arteriolas; en esta vaina periarteriolar se encuentra tanto linfocitos T, como linfocitos B, estos últimos formando el tipo de acúmulos circulares (folículos) que también se encuentra en los ganglios linfáticos. Las células accesorias dendríticas y los macrófagos se encuentran en la denominada zona marginal que se ubica entre la “pulpa roja” y “pulpa blanca”. (Gutiérrez, 2010, p. 15).

### 2.6.3. Tejido Linfoide Asociado a Mucosas del Intestino

Es un tejido linfoide presente en los intestinos. El intestino ayuda en el desglose y absorción de los ingredientes del alimento y ayuda en el crecimiento del ave, actúa como una membrana permeable para apoyar el intercambio de los nutrientes del alimento hacia el interior del cuerpo, esta tiene como función fortalecer la inmunidad en el intestino para proteger de la invasión patogénica también mantiene el equilibrio entre la microbiota normal del intestino la bacteria patogénica. (El Productor, 2019, págs. 1-3).

### 2.6.4. Tonsilas

Son tejido linfoide que se encuentra en forma bilateral en la cavidad orofaríngea, y por tanto pueden captar Ag que penetre al organismo ingerido o inhalado. En las tonsilas se encuentran los tipos de linfocitos y células accesorias para iniciar una respuesta inmunitaria. (Gutiérrez, 2010, p. 16).

### 2.6.5. Placas de Peyer

Hace referencia a las placas de Peyer del yeyuno. Lo que esto quiere decir es que se a podido demostrar que Ag que se administra por vía oral y alcanza a las placas de Peyer, puede estimular la producción de un tipo particular de Ac, denominado Ig A secretora (Ig AS). La Ag que penetra al organismo por vía oral y llega intacto al intestino delgado es captado por las denominadas células M; estas pueden ser consideradas como una especie de y “puerta de entrada” a las placas de Peyer .una vez que el Ag atraviesa el epitelio intestinal se encuentra con el epitelio linfoide que se denomina las placas de Peyer una parte importante de los linfocitos B que aquí residen se especializan en la producción de Ig A. (Gutiérrez, 2010, p. 16).

## 2.7. Serología

### 2.7.1. Controles serológicos

Los controles serológicos para medir los niveles de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle proporcionan información valiosa en el establecimiento de los planes preventivos de la enfermedad. Las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación (conocida comúnmente como prueba HI) y la prueba de ELISA son utilizadas rutinariamente. (MVZ.Villegas, 2015, pág. 85).

### 2.7.2. Técnica de ELISA

Los resultados obtenidos mediante la prueba ELISA facilitan la interpretación y la comparación de resultados con otros países o con otras empresas que utilizan este sistema, pues existe uniformidad en la forma como se expresan los resultados debido a que la lectura se realiza por medio de un espectrofotómetro que permite la estandarización de los resultados. (MVZ.Villegas, 2015, pág. 83).

### 2.7.3. Tipos de ELISA

#### 2.7.3.1. ELISA directo

Es el ensayo más simple y rápido de todos, donde un anticuerpo primario marcado con una enzima se une directamente al antígeno de interés permitiendo la detección y/o cuantificación del mismo.

El procedimiento sería el siguiente:

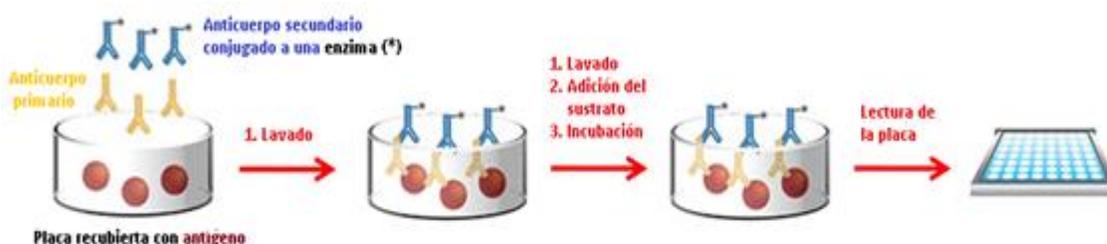
- El antígeno se inmoviliza sobre una placa
- Se añade un anticuerpo primario marcado con una enzima que se une al antígeno de interés

- Se añade el sustrato que al reaccionar con la enzima proporcionará una señal visible que permitirá la detección y/o cuantificación del antígeno de interés. (Biotech, 2013, págs. 1-3).

### 2.7.3.2. ELISA Indirecto

Allscience (2019), define esta técnica como un proceso de unión de dos pasos que implica el uso de un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario marcado. En este método, el anticuerpo primario se incuba con los pocillos de una placa recubiertos con antígeno. A continuación, se agrega un anticuerpo secundario marcado que reconoce el anticuerpo primario. Luego se agrega un sustrato para producir una amplificación de la señal. Este método se utiliza comúnmente para diagnosticar infecciones por bacterias, virus o parásitos y cuantificar los anticuerpos contra este antígeno extraño. La detección por ELISA indirecta es versátil, ya que se pueden usar diferentes marcadores de visualización con el mismo anticuerpo marcado por objetivo de anticuerpo, se considera que el ELISA indirecto es altamente sensible y más flexible que el ELISA directo. Sin embargo, puede producirse reactividad cruzada y una señal no específica con el anticuerpo secundario. (págs. 1-3).

*Figura 4.* Esquema simplificado de un ensayo de ELISA Indirecto



Fuente: (AllScience, 2019).

### 2.7.3.3. ELISA tipo sándwich

- Según Abyntek(2019), en esta técnica el antígeno queda inmovilizados entre dos anticuerpos, uno de captura y otro de detección también conocidos como pares de anticuerpos, que se unirán a dos epítomos distintos de un mismo antígeno. (págs. 1-3).

El procedimiento simplificado sería:

- El anticuerpo de captura se inmoviliza sobre la placa
- Se añade la muestra que contiene el antígeno de interés que se unir a al anticuerpo de captura
- Se añade el anticuerpo de detección que se unir a al antígeno unido a su vez al anticuerpo de captura.
- En caso de que el anticuerpo de detección vaya conjugado a una enzima, procederemos directamente con el 5º paso. En caso contrario (que es lo más habitual en los ELISA tipo sándwich), será necesario añadir un anticuerpo secundario marcado con una enzima que se unir a al anticuerpo de detección.
- Se añade el sustrato que al reaccionar sobre la enzima proporcionará una señal visible que permitirá la detección y/o cuantificación del antígeno de interés. (Abyntek, 2019, págs. 1-3).

#### 2.7.3.4. ELISA competitivo

Los anticuerpos o los antígenos son inmovilizados sobre la fase sólida y su unión con el conjugado antígeno-enzima, es inhibida por la presencia de analito no marcado en la muestra. Las incubaciones entre muestra y conjugados pueden ser simultaneas o secuenciales. Esta última variante no es estrictamente competitiva, con ella se alcanza una mayor detectabilidad y es recomendada cuando se quieren detectar anticuerpos de baja afinidad. (Ochoa, 2012, pág. 20).

## 2.8. Enfermedad de Newcastle (E.N.)

### 2.8.1. Etiología

La enfermedad de Newcastle está causada por un virus de la familia *Paramyxoviridae*, del genero *Avulavirus*. Solo se conoce un serotipo del virus de E.N. Dentro de este serotipo se pueden considerar, de acuerdo a su virulencia, cepas víricas suaves (lentogénicas), medianas (mesogénicas) y virulentas (velogénicas). Las cepas víricas que se utilizan para las vacunas vivas pertenecen en su mayoría al grupo lentogénico. (Farfan, 2014, p. 131).

La forma más grave, o Newcastle velogénica, es una de las enfermedades que afecta a los pollos más devastadora en todo el mundo y puede causar a veces un índice de mortalidad del 100%. Existe una vacuna disponible en zonas donde la de Newcastle es una enfermedad común. (Damerow, 2013, p. 138).

El virus sobrevive a las temperaturas frías, pero no a la exposición directa al sol, las aves que llegan a recuperarse no son portadoras y no vive el virus más de 30 días a la intemperie o en las casetas se ha informado que este virus puede sobrevivir en la piel del pollo hasta 160 días y en la médula ósea casi 200 días. (Security The Center for Food; Health Public, 2008, pp. 1-2).

### 2.8.2. Distribución geográfica

Esta enfermedad infecciosa ha sido reportada a nivel mundial. (Sumano & Gutiérrez, 2010, p. 612).

### 2.8.3. Especies afectadas.

Es capaz de infectar a más de 200 especies. La mayoría de los virus son encontrados en las aves silvestres, especialmente en las acuáticas que tienden a ser portadoras asintomáticas, son lentogénicas. La sensibilidad varía ampliamente, así como las gallináceas son muy sensibles,

los pavos son menos propensos a desarrollar síntomas graves y en aves de caza la sensibilidad es variable. Los patos y gansos presentan generalmente infecciones inaparentes, y también se han descrito casos clínicos en patos y avestruces. Las palomas son sensibles y en sus poblaciones son endémicas los virus lentogénicas o mesogénicas. (Torruba, Bomez, Den, Tellez, & Hauck, 2014, pág. 10).

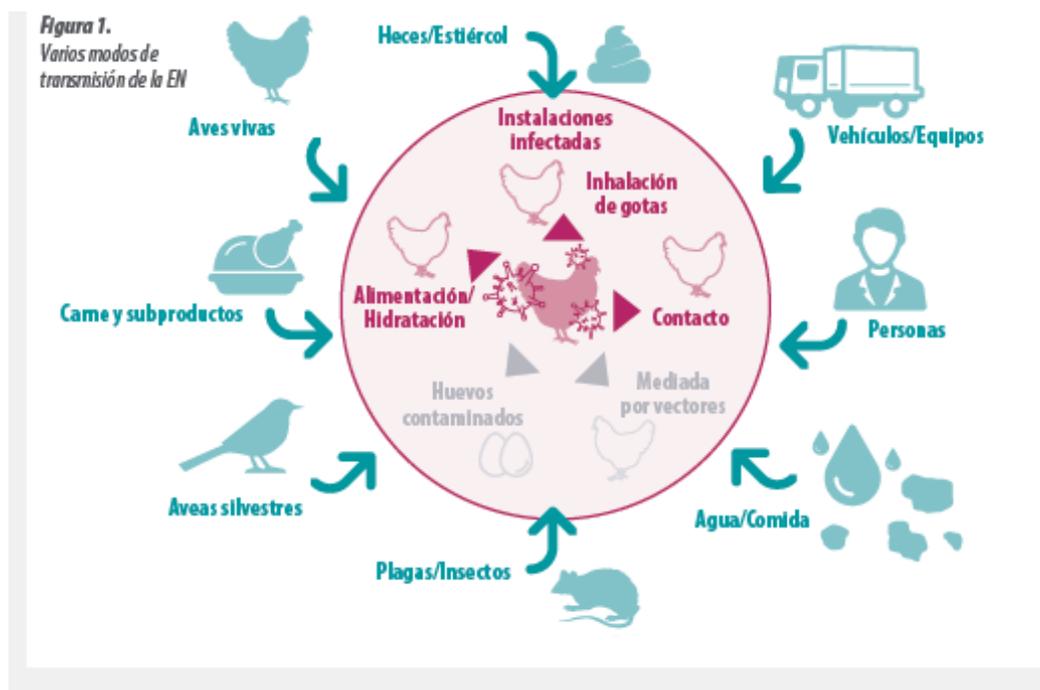
Presenta una patología zoonótica llegando a presentar síntomas leves de gripe y conjuntivitis, se ven afectados los profesionales que tienen contacto con las vacunas y están expuestos de manera habitual a grandes cantidades del virus. (Besteiros, 2019, págs. 1-2).

#### 2.8.4. Transmisión

El virus de la enfermedad de Newcastle es altamente contagioso a partir de los excrementos o de las descargas de las vías respiratorias de aves infectadas. La propagación entre granjas se produce a través del material infectado, camiones, personal, aves salvajes y el aire. (Intervet, 1972, p. 14).

Consumo de agua contaminada, objetos y personal contaminado. (Huamani de Nina, 2014, p. 115).

Figura 5. Forma de Transmisión



Fuente: (Agromeat, 2020).

### 2.8.5. Periodo de Incubación

El periodo de incubación varía de 2 a 15 días dependiendo de la virulencia de la cepa y la susceptibilidad de la población. En pollos infectados con cepas velogénicas, un periodo de incubación de 2 a 6 días. Periodos de incubación de hasta 25 días, se han registrado en algunas especies de aves. (Security The Center for Food; Health Public, 2008, pp. 1-7).

### 2.8.6. Signos y Síntomas

Los primeros síntomas son de naturaleza respiratoria: disnea, tos, estornudos, silbidos y muerte por inanición.

Seguidos de la fase nerviosa o neurotrópica (parálisis), algunas aves presentan parálisis de las patas y se sientan en las articulaciones de las rodillas, con los dedos más abiertos que de

costumbre, puede notarse falta completa o parcial de coordinación de los músculos del cuello (torticolis) y de las patas, parálisis de las alas. (Ing.Agr.Barbaro, 2004, pág. 31).

Signos viscerotrópicos: Conjuntivitis, inflamación periorbital, diarrea, depresión severa, y muerte. (Torruba, Bomez, Den, Tellez, & Hauck, 2014, pág. 12)

Según Sota y Espinoza (2004). Tras un estudio se pudo definir cinco grupos:

- Velogénico viscerotrópico: virus que provocan infecciones letales agudas, generalmente con lesiones hemorrágicas en los intestinos de las aves muertas.
- Velogénico neurotrópico: virus que se caracterizan por provocar altas mortalidades subsiguientes a síntomas respiratorios y neurológicos, generalmente sin lesiones intestinales.
- Mesogénico: virus que provocan signos clínicos de tipo respiratorio y neurológico con baja mortalidad.
- Lentogénico: virus que provocan infecciones leves del aparato respiratorio.
- Entérico asintomático: virus que provocan infecciones a virulentas en las cuales la replicación del virus parece presentarse en el intestino. (pág. 10).

#### 2.8.7. Lesiones

No se observan lesiones macroscópicas patognomónicas. Según, Barza (2016). Solo las cepas velogénicas provocan lesiones macroscópicas:

- Inflamación de la región periorbitaria o de toda la cabeza.
- Edema del tejido intersticial o peritraqueal del cuello, especialmente en la apertura torácica superior.

- Congestión y hemorragia en la mucosa de la tráquea y la faringe dirección caudal; podrían presentarse membranas diftéricas en el esófago, tráquea y orofarínge.
- Pequeñas equimosis y petequias en la mucosa del proventrículo; hemorragias en el proventrículo concentradas alrededor de los orificios de las glándulas mucosas.
- Ulceraciones, hemorragias, necrosis o edema del tejido linfoide respiratorio o digestivo, incluidas las tonsilas cecales y las placas de Peyer.
- Hemorragias, edema o degeneración ovárica.
- Aunque son menos evidentes en las aves de más edad, pueden observarse hemorragias en el timo y en la bolsa de Fabricio.
- El bazo podría mostrarse friable, aumentando de tamaño y de color rojo oscuro o con manchas.
- En algunos casos se puede dar necrosis pancreática o edema pulmonar.
- Aerosaculitis
- Placas necróticas en las tonsilas cecales, el intestino o el proventrículo.
- Las lesiones intestinales se aprecian sobre todo en la forma viscerotrópica. (p.89).

#### 2.8.8. Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial de la enfermedad de Newcastle velogénica comprende otras causas de septicemia, enteritis, afección respiratoria y signos neurológicos. En las aves de corral estas enfermedades incluyen al cólera aviar, influenza aviar altamente patógena, laringotraqueitis, la forma diftérica de la viruela aviar, psitacosis, micoplasmosis, bronquitis infecciosa, aspergilosis y problemas de manejo tales como la privación de agua o alimento y la mala ventilación. En aves domésticas, las enfermedades a considerar incluyen salmonelosis, adenovirus y las

deficiencias nutricionales, así como otras infecciones por *paramixovirus*. (Security The Center for Food; Health Public, 2008, p. 5).

*Figura 6.* Lesiones hemorrágicas en el proventrículo que pueden ser causadas por el virus de Newcastle o de Influenza aviar



Fuente: (Agromeat, 2020).

#### 2.8.9. Diagnóstico clínico

Algunos de los métodos y formas para diagnosticar según ICA, (2019).

- Sueros sanguíneos = Prueba solicitada inhibición de la hemaglutinación HI-NDV.
- Hisopados (cloacales o traqueales) = Prueba solicitada RT-PCR, O PCR para NDV, Aislamiento y secuenciación.
- Tejidos frescos (refrigerados) =Prueba solicitada RT-PCR, Ppcer para NDV, Aislamiento y Secuenciación.
- Tejidos conservados (en formalina buferada al 10%) = histopatología.

- En la necropsia es importante observar: Hinchazón de cabeza y zona periorbital, edema de tejidos intersticial y peritraqueal, congestión hemorragia moco en faringe o tráquea, membranas diftélicas en orofarínge, tráquea y esófago, petequias y equimosis especialmente en proventrículo, edema, hemorragia necrosis o ulceraciones del tejido linfoide especialmente respiratorio/digestivo incluyendo tonsilas cecales y placas de Peyer, hemorragia y degeneración de degeneración de ovarios, timo y bolsa de Fabricio, bazo de color rojo oscuro y moteado, edema pulmonar y necrosis pancreática. (pág. 1).

## 2.9. Tratamiento

No existe (S.A., 2017, p. 81).

## 2.10. Prevención y control

Es una enfermedad de declaración obligatoria en la mayoría de países en los lugares en los que la enfermedad es enzoótica, puede controlarse mediante una higiene adecuada combinada con la inmunización. Habitualmente se han utilizado vacunas de virus vivos de cepas lentogénicas naturales con un índice de patogenia intracerebral. (IPIC). Se han administrado en el agua de la bebida, que no debe contener cloro ni desinfectantes y mediante rociado las aves vacunadas pueden diseminar el virus vacunal hasta 15 días después de la vacunación. (Martinez, 2010, p. 359).

Dentro de la bioseguridad tenemos la limpieza y desinfección de quipos para controlar algas, y hongos, hay que lavar y desinfectar diariamente los bebederos, utilizando alguna sustancia inocua para las aves.

### 2.10.1. Vacunación

Vacunas y adecuado plan de bioseguridad, para prevenir enfermedades infectocontagiosas la protección dada por la vacuna depende de la calidad de antígeno o antígenos. Muchas de la vacuna viral son agentes infecciosos atenuados que son virtualmente incapaces de inducir la enfermedad como tal, pero generan la respuesta inmune correspondiente. (Sumano & Gutiérrez, 2010, pp. 602-603).

### 2.10.2. Tipos de vacunas

- Vacunas vivas atenuadas

Contienen el microorganismo vivo, pero en una forma atenuada o debilitada, de manera que no pueda causar la enfermedad. es el tipo de vacuna que mejor imita lo que sería la infección natural, por lo que el sistema inmunológico aprende fácilmente a generar la protección frente al microorganismo. Estas vacunas se mantienen refrigeradas, su efecto suele durar de por vida con una o dos dosis. Estas vacunas no se han de administrar a individuos con el sistema inmunológico debilitado, por causaría la enfermedad. (Saludemia, 2020, pág. 1).

- Vacunas inactivadas

Utilizadas en emulsión oleosa, son de uso común especialmente en aves de vida larga, como ponedoras comerciales y reproductoras, aunque también se emplean en pollos en aquellos países donde hay cepas de virus de alta patogenicidad y presentación temprana. (Torruba, Bomez, Den, Tellez, & Hauck, 2014, pág. 15).

- Vacunas vectoriales o recombinantes

Usadas para aplicar a tempranas edades (in ovo o al día de edad). En NDV el virus usado como vector es el herpes virus de pavo al que se le inserta una proteína del virus de Newcastle,

generalmente la proteína de fusión, así protegen de la infección sistémica por virus NDV velogénicas, sin embargo, la protección local a nivel de la tráquea frente a la replicación del NDV es baja, lo que induce a una reacción inmunitaria débil a nivel de mucosas. Además, la aparición de la inmunidad es más tardía en comparación con las vacunas vivas modificadas, determinándose entre los días 14 y 21 tras la vacunación. Para obtener una buena inmunidad local se ha demostrado que se debe administrar vacunas vivas. (Torruba, Bomez, Den, Tellez, & Hauck, 2014, pág. 15).

### 2.10.3. Administración: programa y vía idónea

Según el Doctor Sumano y Gutiérrez (2010) el programa de vacunación está basado en:

- Vacunar parvadas sanas
- Realizar la vacunación con las medidas de higiene más estrictas posibles, uso de reconstituyentes de calidad farmacéutica.
- No vacunar animales enfermos o debilitados.
- Las vacunas deben estar almacenadas siempre a temperaturas de +2 a +8°C. No congelar
- Los programas de vacunación son muy variados dependen sobretodo del riesgo y de la presión infecciosa del virus en determinados países.
- Evitar la exposición de las vacunas a la luz solar.
- Los sobrantes de vacunas deben ser incinerados
- Usar equipo de seguridad completo, con protección de aerosoles en ojos y vías respiratorias. Evitar contacto de las vacunas con mucosas o heridas de continuidad.
- Antes de usar las vacunas emulsionadas es necesario que estén a temperatura ambiente.

- Homogeneizar los preparados vacunales antes de usarlos y antes de cada aplicación durante todo el tiempo que dure la vacunación.
- Utilizar siempre equipo estéril.
- Cuando la vacuna es dosificada en el agua de bebida es imprescindible asegurarse que el agua este limpia, libre de cloro o cualquier otro desinfectante, ya que las vacunas de virus activo modificado (virus vivo) se pueden inactivar con facilidad. Es recomendable la utilización de productos que eliminen el cloro del agua y colorantes que permitan detectar si el ave consumió la vacuna.
- Cada vacuna tiene una vía de administración específica y siempre debe utilizarse la recomendada por el fabricante. (pp. 603-604).

#### 2.10.4. Vías de administración

In Ovo, según Sumano y Gutiérrez, se administra en embriones de aproximadamente de 18 días requiere de personal experto y de alta seguridad en medidas higiénicas, para asegurar la viabilidad y salud de los pollitos usada para vacuna de Marek. (Sara, 2013, pág. 1).

Gota ocular o nasal, principalmente vacunas vivas, implica un manejo individual y el estrés generado es relativo usado al iniciar programas vacunales de Newcastle, Bronquitis infecciosa, Gumboro, Micoplasma y Coccidiosis. (2010, p. 604) Una forma o método es en spray significa estimular la glándula Harderiana y la mucosa en el tracto respiratorio, tanto superior como inferior. Es la forma más eficaz de vacunar a los pollitos recién nacidos contra Newcastle. (Sara, 2013, pág. 1).

Intraalar, punción para evaluar una reacción posvacunal (pápula a los 4-5 días) vía de elección para viruela + encefalitis y anemia infecciosa. (Sumano & Gutiérrez, 2010, p. 604)

Intramuscular o subcutánea, se puede aplicar en pollito de 1 día mediante jeringa en enfermedades como Marek y Gumboro. (Sumano & Gutiérrez, 2010, p. 605).

Agua de bebida, esto depende de un sin número de factores como clima, edad, ingesta diaria de agua consumida en un día se aplicará la vacuna en el 40%. No se recomienda aguas duras ya que inactivan las partículas vacunales, es práctica común añadir leche descremada ya que actúa como neutralizador de ciertas impurezas 20 minutos antes de adicionar la vacuna. (Sumano & Gutiérrez, 2010, p. 605).

#### 2.10.5. Control de la pérdida de eficiencia de la vacuna

Se debe tener en cuenta ciertos factores que afectan directamente a la pérdida en la eficiencia de la vacuna: sedimentación, evaporación y corriente de aire. En la sedimentación se deberá observar que las gotas no se junten y que cuando salen de los picos sea una niebla. Las vacunas se deben de aplicar en horas de la madrugada cuando el clima sea fresco. (Sara, 2013)

#### 2.11. RESUMEN DEL ESTADO DEL ARTE DE ESTUDIO DEL PROBLEMA

Los anticuerpos maternos en aves se transfieren de las gallinas a los polluelos a través del huevo. Para obtener información sobre la transferencia de anticuerpos maternos y la producción endógena de anticuerpos en pollos de engorde, se debe examinar los niveles de anticuerpos totales de IgY, IgA, IgM, (Hamal, Burgess, Pevzner, & Erf, 2006, págs. 1364-1372).

La enfermedad de Newcastle junto con la influenza aviar, ha sido clasificada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), organismo que se encarga de regular la sanidad animal de los países a nivel mundial, como una enfermedad de declaración obligatoria. Este ordenamiento, obedece a la alta capacidad de diseminación del virus, el cual puede

atravesar fácilmente las fronteras convirtiéndose en una amenaza para los países libres desde el punto de vista económico y social. (ICA., 2009, pág. 11).

La enfermedad de Newcastle tiene varias cepas que se diferencian por su agresividad. La de mayor importancia es la cepa neurotrópica, causando hasta el 100 por ciento de mortalidad. Para la detección de la enfermedad se realizan pruebas de serología; la prueba de tamizaje es ELISA y la prueba de oro es la Inhibición de la Hemaglutinación (HI), en las que se ocupan kits específicos más la muestra (suero) problema. Las aves ya presentan una inmunidad específica desde el nacimiento gracias a los anticuerpos de la madre. (Merino, 2017, pág. 37)

Hoy en día una de las técnicas más utilizadas para un estudio serológico son las técnicas de ELISA indirecta, en otros países es la técnica más común para determinar estos estudios contra diversas enfermedades en aves.

Por la gran importancia que tiene conocer los niveles de inmunidad, se define en este trabajo investigativo a determinar los anticuerpos maternos contra Newcastle en pollos broiler para posterior a esto conocer el día que presenta mayor susceptibilidad a enfermedades lo cual es importante en la producción avícola para realizar protocolos de vacunación en base a los resultados.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales físicos

Tabla 2. *Laboratorio.*

Descripción	Unidad	Cantidad
Centrifugadora	Unidad	1
Refrigeradora	Unidad	1
Multipipeta	Unidad	1
Pipeta automática	Unidad	1
Tubos de tapa roja	Paquete (100 unidades)	2
Tubos eppendorf	Paquete (100 unidades)	2
Jeringuillas de 3 ml	Caja (100 unidades)	2
Mascarillas	Unidad	10
Guantes	Caja	1
Mandil	Unidad	1
Cofias	Caja	1
Gradillas	Unidad	1
Lector de ELISA	Unidad	1

Tabla 3. *Oficina.*

Descripción	Unidad	Cantidad
Laptop	Unidad	1
Hojas A4	Paquete (100 hojas)	1
Esferos	Unidad	2
Impresora	Unidad	1
Libreta de notas	Unidad	1
Tinta de impresora	Unidad	1

## 3.2. Materiales químicos y biológicos.

Tabla 4. *Laboratorio*

Descripción	Unidad	Cantidad
Microplacas sensibilizadas con el antígeno purificado NDV	Frasco	1
Control positivo	Frasco	1
Control negativo	Frasco	1
Diluyente 14	Frasco	1
Diluyente 3	Frasco	1
Solución de lavado concentrado (20X)	Frasco	1
Solución de revelación	Frasco	1
Solución de parada (0,5 M)	Frasco	1

### 3.3. Materiales biológicos.

Tabla 5. *Animales*

Descripción	Cantidad
Aves	140

## 4. MÉTODO.

El tipo de metodología de esta investigación fue experimental.

### 4.1. Método de campo

Una vez seleccionada la granja y el galpón se muestrea de un lote de 1.500 aves de la línea cobb 500.

- Día 1 de nacidos se recolectan 70 muestras.
- Día 8 de vida se recolectan 70 muestras.

### 4.2. Selección de aves

Para esta investigación necesitamos 140 aves para su respectiva toma de muestra (Suero sanguíneo) el día 1 de nacidos y el día 8. Las muestras serán analizadas (análisis serológico) en el laboratorio clínico de la Universidad Politécnica Salesiana.

### 4.3. Obtención de muestras.

La toma de muestras para nuestro estudio se realizó en la granja avícola Triple “A” en la parroquia Moromoro-Piñas siendo una de las granjas de mayor la producción de la zona en pollos broiler.

Para la toma de muestra se utilizó una aguja vacutainer número 22 se coloca el capuchón luego colocamos sobre el tubo de la tapa roja con vacío, se extrae 2 ml de muestra sanguínea.

También podemos tomar la muestra a través de una jeringa y procedemos a pasar la muestra al tubo de la tapa roja con vacío. La muestra se tomó mediante veno-punción cardiaca.

Se centrifugo la muestra a 3500 revoluciones durante un tiempo de 5 minutos y una vez que haya pasado este tiempo procedemos a sacar el tubo con la muestra centrifugada y con la ayuda de una pipeta Pasteur se extrajo el suero y colocamos 0.5 ml en un tubo eppendorf y el sobrante y rotulamos la muestra y lo congelamos a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Posterior a esto realizar la prueba de ELISA indirecto

#### 4.4. Procedimiento para realizar el ELISA Indirecta.

El análisis de laboratorio para obtener los datos serológicos se realizó mediante un kit serológico de ELISA en el laboratorio de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca-Ecuador.

Este kit de diagnóstico está destinado a detectar anticuerpos dirigidos contra el virus de la enfermedad de Newcastle (siglas en inglés, NDV = Newcastle Disease Virus)

El kit permite la cuantificación de anticuerpos específicos presentes en los sueros de gallina o pavos.

Este kit puede ser usado para monitoreo de la vacunación con vacunas convencionales (muertas o atenuadas).

Los pocillos son sensibilizados con el antígeno purificados de NDV.

Las muestras a analizar y los controles son añadidos a los pocillos.

Los anticuerpos de NDV, si están presentes, formaran un complejo antígeno-anticuerpo.

Un conjunto anti-gallina marcado a la peroxidasa (HRP) s distribuido en los pocillos. Este se fija a los anticuerpos anti-NDV, formando un complejo antígeno-anticuerpo-conjugado-HRP.

Después de la eliminación del exceso del con jugado mediante lavado, la reacción es revelada a través de una solución de revelación (TMB).

La coloración que resulta está ligada a la cantidad de anticuerpos específicos presentes en las muestras a analizar.

- En presencia de anticuerpos en las muestras, aparece una coloración azul que se convierte en amarilla después de añadir a solución de parada.
- En ausencia de anticuerpos en las muestras, no aparece ninguna coloración.
- La lectura es realizada a una longitud de onda de 450 nm.

#### 4.4.1. Preparación de la muestra

Con el fin de evitar diferencias en los tiempos de incubación entre las muestras, es posible preparar en una placa de 96 pocillos las muestras a analizar y los controles para después transferirlos a la microplaca ELISA con la ayuda de una pipeta multicanal.

#### 4.4.2. Preparación de la solución de lavado

Es necesario equilibrar la solución de lavado concentrada (20X) a temperatura ambiente ( $21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) y agitar correctamente para obtener la disolución de los cristales.

Preparar la solución de lavado (1X) diluyendo 1:20 la solución de lavado (20X) en agua destilada/desionizada.

Los resultados pueden ser influenciados dependiendo de la calidad del lavado. Asegúrese que los pocillos se encuentren completamente vacíos entre cada lavado. Si utiliza una máquina

de lavado automática, es de suma importancia ajustar correctamente los parámetros (modo, tipo y altura de aspiración). Para mayor información sírvase contactar [info@id-vet.com](mailto:info@id-vet.com) y solicitar la “Guía de lavado “de IDvet.

#### 4.4.3. Procedimiento

Colocar todos los reactivos a temperatura ambiente ( $21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) antes de ser utilizados y homogenizarlos por vortex o por inversión.

Los controles positivo y negativo son suministrados listos para usar. **NO AGREGAR** diluyente a los pocillos A1, B1, C1 Y D1- los controles debe ser analizado sin diluir.

Las muestras siguen siendo analizadas a la dilución final 1:500 en el diluyente 14 (1:50 pre-dilución, seguido de 1:10 de dilución en la microplaca).

- En una pre-placa de pre-dilución, dejar de lado los pocillos destinados a los controles A1, B1, C1 Y D1, y añadir.
  - 5  $\mu\text{l}$  de cada muestra a analizar
  - 245  $\mu\text{l}$  de diluyente 14 a todos los pocillos EXCEPTO a los pocillos A1, B1, C1 Y D1.

Nota: se recomienda respetar el orden indicado de la distribución de los pocillos con el objetivo de poder observar la adición de los controles en cada pocillo.

- En la placa ELISA, añadir:
  - 100  $\mu\text{l}$  de Control negativo en los pocillos A1 Y B1.
  - 100  $\mu\text{l}$  de control positivo en los pocillos C1 Y D1.
  - 4790  $\mu\text{l}$  de Diluyente 14 a todos los pocillos que contengan las muestras a analizar (no a los pocillos A1, B1, C1 Y D1).
  - 10  $\mu\text{l}$  de las muestras pre-diluidas previamente preparadas.

- Cubrir la placa e incubar 30 minutos ( $\pm 3$  min) a  $21^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ).
- Preparar el conjugado (1X) diluyendo el conjugado concentrado (10X) a 1:10 con el diluyente 3.
- Vaciar los pocillos, lavar cada pocillo 3 veces con aprox. 300  $\mu\text{l}$  de solución de lavado 1X. evitar el desecado de los pocillos durante los lavados.
- Añadir 100  $\mu\text{l}$  del conjugado 1X a cada pocillo.
- Cubrir la placa e incubar 30 minutos ( $\pm 3$  min) a  $21^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ).
- Vaciar los pocillos. Lavar cada pocillo 3 veces con aprox. 300  $\mu\text{l}$  de solución de lavado 1X. evitar el desecado de los pocillos durante los lavados.
- Añadir 100  $\mu\text{l}$  de la solución de revelación a cada pocillo.
- Incubar 15 min ( $\pm 2$  min) a  $21^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) en la oscuridad.
- Añadir 100  $\mu\text{l}$  de la solución de parada a cada pocillo para detectar la reacción. La solución de parada debe ser agregada en el mismo orden que la etapa n°9.
- Leer y guardar la DO a 450 nm.

#### 4.5. DISEÑO ESTADÍSTICO

Para realizar la estadística e interpretar los datos obtenidos con la experimentación se usó el programa para el análisis de datos ID Soft.

Este programa informático permite calcular los diferentes parámetros del kit (criterios de validación, valores S/P, títulos, determinación de la edad de vacunación, grupos) y así mismo propone una síntesis grafica de los perfiles serológicos de los animales. Los resultados analizados se representarán en tablas y mediante gráficos de barras.

## 4.5.1. Validación

El test es válido si:

- La densidad óptica media del control positivo ( $DO_{CP}$ ) es superior a 0,250

$$DO_{CP} > 0,250$$

- El valor medio de la densidad óptica del control positivo ( $DO_{CP}$ ) y del control negativo ( $DO_{CN}$ ) es superior a 3.

$$\frac{DO_{CP}}{DO_{CN}} > 3$$

## 4.5.2. Interpretación

Para cada muestra, calcular el valor S/P y el título de anticuerpos, de la siguiente manera.

- Cálculo del valor S/P:

$$S/P = \frac{DO_{muestra} - DO_{CN}}{DO_{CP} - DO_{CN}}$$

- Cálculo del título de anticuerpos:

$$\log_{10}(título) = 1.00 \times \log_{10}(S/P) + 3.520$$

$$título = 10^{\log_{10} título}$$

Los resultados son interpretados de la siguiente manera:

<b>VALOR S/P</b>	<b>Título de anticuerpos ELISA</b>	<b>Estatus inmunitario Newcastle</b>
<b>S/P ≤ 0.3</b>	<b>Título ≤ 993</b>	<b>Negativo</b>
<b>S/P &gt; 0.3</b>	<b>Título &gt; 993</b>	<b>Positivo</b>

#### 4.6. POBLACIÓN Y MUESTRAS

El tamaño de la muestra fue de 140 en total de Aves provenientes de la Granja Triple “A”, Moromoro-Piñas.

Las muestras fueron tomadas al azar.

- El día 1 de nacidos en un número de 70 muestras sanguíneas
- El día 8 en número de 70 muestras sanguíneas

Las muestras fueron tomadas de un lote de 1.500 pollos broiler, las muestras posteriores a su centrifugación fueron almacenadas mediante congelación luego se llevó a cabo la medición de anticuerpos maternos mediante la técnica de ELISA. Este kit de diagnóstico está destinado a detectar anticuerpos dirigidos contra el virus de la enfermedad de Newcastle (siglas en inglés, NDV = Newcastle Disease Virus)

#### 4.7. VARIABLES

Tabla 6. *Variables independientes*

Concepto	Categorías	Indicadores	Índice
Plasma sanguíneo; el plasma es la fracción líquida y acelular de la sangre. Se obtiene al dejar la sangre. Desprovista de células como glóbulos rojos y los glóbulos blancos.	Química	Títulos de anticuerpos presentes.	Cantidad en números

Tabla 7. *Variables dependientes*

Concepto	Categoría	Indicadores	Índice
Medición de anticuerpos maternos contra Newcastle	Muestra de sangre	Volúmen de sangre	ml
	Anticuerpos	Medición de anticuerpos.	Densidad óptica

#### 4.8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

La investigación aquí sustentada que se titula “**DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS MATERNALES CONTRA NEWCASTLE EN POLLOS BROILER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTA**” no tuvo ningún impacto sobre el bienestar animal, debido a que las muestras fueron tomadas cumpliendo todas las medidas de bienestar animal. Por otra parte, se tomó en cuenta que no se cause malestar al propietario de la granja manteniendo la integridad de sus aves; en cuanto a las personas que intervinieron en esta investigación se tomaron las siguientes medidas preventivas:

- Para la recolección de sangre mediante jeringas, guantes, mascarilla, mandil.
- Colocar las muestras en tubos eppendorf debidamente sellados y rotulados.
- El uso de guantes, cofia, mascarilla y mandil estériles dentro del laboratorio.
- Manejo de la muestra en un campo adecuadamente estéril dentro del laboratorio.

El bienestar es el estado de salud física y mental completo donde el animal está en armonía con su ambiente, libre de cualquier trastorno y daño fisiológico. (Schunemann, 2011, págs. 11-43)

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 5.1. Datos de títulos de anticuerpos maternos contra la enfermedad de Newcastle.

El presente trabajo exhibe una serie de datos que fueron obtenidos después del muestreo de campo y su posterior análisis de laboratorio con el fin de medir los títulos de anticuerpos maternos presentando los siguientes datos:

Tabla 8. *Resultados obtenidos de los niveles de anticuerpos de 70 pollos de 1 día de nacidos*

Datos obtenidos mediante la técnica de ELISA Indirecta										
Negativos 0%		Positivos (70) 100%								
Grupo 0 -	Grupo 1 +	Grupo 2 +	Grupo 3 +	Grupo 3 +	Grupo 3 +	Grupo 3 +	Grupo 3 +	Grupo 3 +	Grupo 3 +	Grupo 4 +
-	-	2.394	3.629	3.380	3.486	3.503	3.976	3.721	3.973	4.115
			3.486	3.738	3.614	3.357	3.506	3.480	3.483	4.009
			3.923	3.897	3.569	3.317	3.960	3.423	3.301	4.066
			3.668	3.506	3.357	3.738	3.404	3.202	3.781	4.185
			3.503	3.884	3.351	3.572	3.321	3.304	3.655	4.062
			3.364	3.642	3.738	3.923	3.152	3.341	3.427	4.009
			3.771	3.374	3.602	3.569	3.112	3.976	3.874	4.066
			3.549	3.317	3.410	3.298	3.579	3.549		4.185
			3.817	3.738	3.870	3.288	3.678	3.960		

Fuente: Autor

Tabla 9. Resultados de anticuerpos de 70 pollos de 8 días de nacidos.

Datos obtenidos mediante la técnica de ELISA Indirecta									
Negativos (42) 60%				Positivos (28) 40%					
Grupo 0 -	Grupo 0 -	Grupo 0 -	Grupo 0 -	Grupo 1 +	Grupo 2 +	Grupo 3 +	Grupo 3 +	Grupo 4 +	
503	19	1	837	1.606	2.165	3.466	3.486	4.115	
251	1	923	754	1.523	2.572	3.870	3.666	4.009	
1	649	1	592	1.039	2.927	3.884	3.182		
721	493	370	675	1.516		3.483	3.490		
1	771	841	271	1.645		3.447			
1	1	1	983	1.145		3.288			
486	503	1	1	1.301		3.639			
490	473	430	1	1.394		3.569			
19	417	1	1			3.589			
1	1	135	1			3.205			
1	298					3.629			

Fuente: Autor

## 5.2. Comparación de títulos de anticuerpos maternos entre el día 1 y día 8.

Tabla 10. Resultados relevantes del muestreo.

Valores	Día 1	Día 8	Caseta	El Palto
Media	3.617	1.324	Código	A
Mínimo	2.394	1	Tipo de bandada	Pollo broiler
Máximo	4.185	4.115	N° de muestras	70
G.M.T.	3.603	196		
%CV.	9	108		
Positivos	70 (100%)	28 (40%)		
Negativos	0%	42 (60%)		

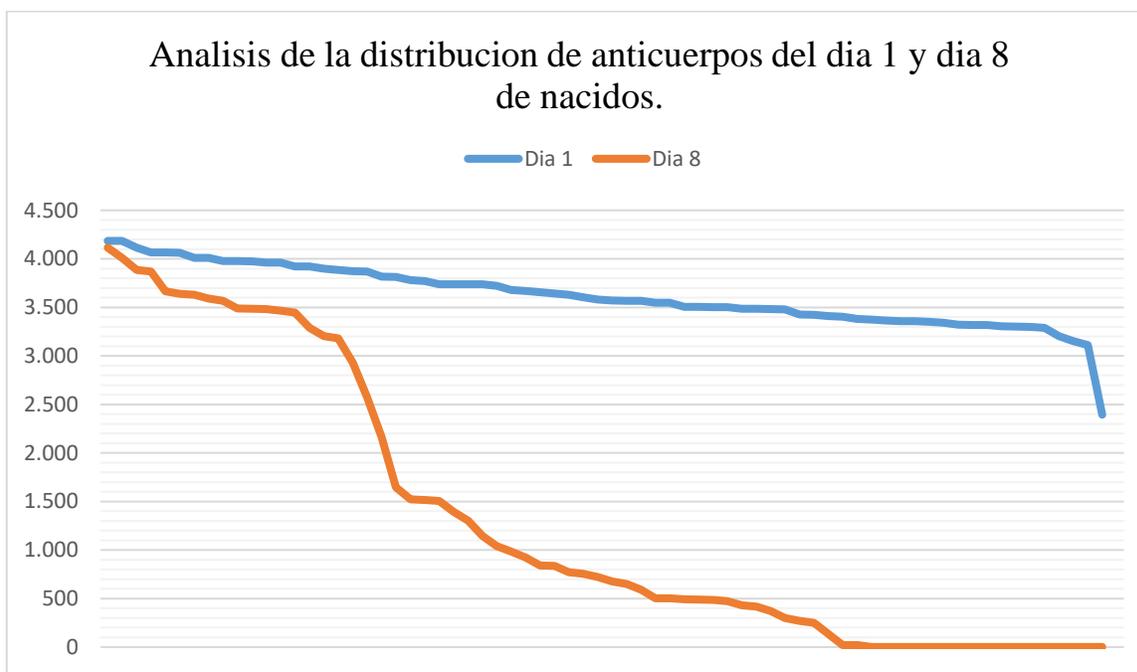
Fuente: El Autor

Los niveles de anticuerpos maternos obtenidos en pollos broiler de 1 día de edad corresponde a una máxima de 4.185 y para el día 8 baja gradualmente a 4.115 entre estos dos valores se observa una diferencia significativa que empieza a decrecer de acuerdo al tiempo.

El valor mínimo correspondiente para el día 1 es de 2.394 y para el día 8 es de 1 lo cual es muy significativo siendo totalmente bajo.

La media del día 1 es 3.617 y del día 8 desciende a 1.324 reflejando notoriamente que la inmunidad en el día 1 es buena y el día 8 ya los pollos tienen un número bajo de anticuerpos maternos.

*Figura 7.* Títulos de anticuerpos maternos del día 1 y día 8



Fuente: Autor

Como podemos observar en la *Figura 7*, la curva de anticuerpos del día 1 es alta ya que no presenta valores negativos observando en el gráfico la representación de estos valores altos (Grupo 3) haciéndose notar la diferencia entre el día 8. El día 8 se observa la representación de

70 muestras con una gráfica ya decreciente, los valores negativos corresponden a 42 muestras equivalentes al 60% presentando ya una inmunidad muy baja siendo un grupo de aves susceptibles para cualquier enfermedad y viéndose una diferencia significativa al pasar los días.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio no tienen similitud con el estudio realizado por Gharaibenh & Mahmoud (2013) ya que los resultados obtenidos fueron los siguientes niveles de anticuerpos maternos, día 0 (5.9), día 5 (4.9) y día 10 (3.5) lo cual determina que hay una disminución significativa en el título y casi se agota a los 10 días. En días se considera la vida media de 6.3 días, estos valores son altos en relación a nuestro estudio. En nuestros resultados de los niveles de anticuerpos maternos fueron, el día 1(3.617) y el día 8 (1.324) siendo niveles muy bajos que no tienen relación con los niveles de anticuerpos determinados por Gharaibenh & Mahmoud, en nuestro trabajo consideramos el nivel de anticuerpos del día 8 que es un nivel ya muy bajo en base a esto, consideramos la vida media en días, entre el día 5-6 de acuerdo a nuestro estudio.

Los niveles de anticuerpos maternos contra Newcastle en esta investigación dan como resultado que el día 8 de nacidos ya los pollos tienen un nivel muy bajo de inmunidad contra la enfermedad. Los anticuerpos maternos para NDV en la investigación de (Leandro, y otros, 2011) concluye que a los 5 días de edad ya los pollos presentan niveles bajos.

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1. Conclusiones

De acuerdo a nuestro estudio en la determinación de anticuerpos maternos en pollos broiler contra Newcastle podemos concluir:

- La técnica de ELISA Indirecta en pollos de 1 día de nacidos fueron 100% muestras positivas es decir 70 pollos presentan anticuerpos maternos contra Newcastle el cual presento un Coeficiente de Variación que da confiabilidad de los datos.
- El nivel de anticuerpos en pollos de 1 día de nacidos tiene una media de 3,617 lo cual es un valor intermedio, por lo que no se considera alto, por lo tanto, se debe de realizar un protocolo de vacunación para aplicarlo dentro de los primeros días de nacidos.
- A los 8 días de edad observamos que los pollos presentan baja inmunidad, para este día el lote de aves presenta una ventana de susceptibilidad muy amplia.
- Como conclusión, las aves ya presentan una inmunidad específica desde el nacimiento gracias a los anticuerpos de la madre, mediante nuestro estudio se determina el día en el que presentan ya anticuerpos maternos bajos mediante los resultados del día 8 consideramos que el día más apto para realizar la aplicación de la primera vacuna esta entre el día 5 y 6 de nacidos.
- La calidad inmune está dada desde la nutrición de la madre y el proceso de incubación y los primeros días de nacidos considerando el ambiente, ventilación, cama, bebederos, higiene y bioseguridad.

## 6.2. Recomendaciones

- Para controlar el apareamiento de enfermedades se aplica un plan preventivo de inmunización o vacunación a las aves, para que de esta manera las mismas puedan desarrollar un sistema inmune competente.
- Para la detección de la enfermedad se realizan pruebas de serología; la prueba de tamizaje es ELISA y la prueba de oro es la Inhibición de la Hemaglutinación (HI), en las que se ocupan kits específicos más la muestra (suero) problema.
- Al momento de tomar las muestras en campo evitar causar stress en las aves y mantener su debida asepsia.
- Las muestras deben ser rotuladas cuidadosamente.
- Con respecto al análisis con el kit de ELISA se debe realizar estrictamente siguiendo paso a paso el procedimiento descrito y tener precaución al momento de los lavados para obtener resultados reales y no alterados.
- Realizar la aplicación de la vacuna entre el día 5 y 6 de nacidos.
- Realizar trabajos investigativos en gallinas ponedoras y reproductoras para continuar con el estudio de determinación de anticuerpos maternos en pollos broiler y de esta manera establecer el día más susceptible para proceder a realizar calendarios de vacunación.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Abyntek. (27 de Junio de 2019). *Tipos de ELISA(I)*. Recuperado el 15 de Septiembre de 2020, de <https://www.abyntek.com/tipos-de-elisa/>
- Acosta, M. E. (05 de 03 de 2014). DOCPLAYER., (pág. 9). Recuperado el 1 de Noviembre de 2020, de DOCPLAYER: <https://docplayer.es/31511416-Enfermedad-de-newcastle-gran-problema-de-la-avicultura-ecuatoriana-que-hacer.html>
- Agrinews. (2014). *Grupo de Comunicacion Agrinews*. Obtenido de <https://agrinews.es/2014/11/11/inmunidad-en-avicultura/>
- Agromeat. (30 de Junio de 2020). *Agromeat*. Recuperado el 24 de Noviembre de 2020, de <https://www.agromeat.com/297125/control-de-la-enfermedad-de-newcastle-2>
- AllScience. (17 de Abril de 2019). *AllScience/Ciencia, Tecnologia y Ambiente*. Recuperado el 11 de Julio de 2020, de <https://www.e-allscience.com/blogs/news/elisa-que-es-en-que-consiste-cuales-son-los-distintos-tipos-de-este-ensayo-y-en-que-se-diferencian>
- Balaguer, J. L. (Agosto de 2008). *CEVA Salud Animal*. Recuperado el 12 de Julio de 2020, de <https://seleccionesavicolas.com/pdf-files/2008/8/4082-inmunidad-pasiva-i.pdf>
- Baraza, E. (2016). *Principales Enfermedades en Avicultura, Infecciones Viricas*. (1 ed.). Zaragoza, España: Servet.
- Barrera, C. A., & Barrera, B. k. (2018). *NFLUENCIA DE TIEMPOS DE INSTALACIÓN DE POLLITOSBB SOBRE TÍTULO DE ANTICUERPOS MATERNOS Y MORFOMETRÍA*

*DELAS VELLOSIDADES INTESTINALES(Tesis de pregrado)*. Universidad de Cuenca, Ciencias agropecuarias.

Besteiros, M. (28 de Agosto de 2019). *Experto Animal*. Recuperado el 21 de Marzo de 2020, de Experto animal: <https://www.expertoanimal.com/enfermedad-de-newcastle-sintomas-y-tratamiento-24407.html>

Biotech. (2013). *Tipos de ELISA(I)*. Barcelona. Recuperado el 5 de Mayo de 2020, de <http://biotech-spain.com/es/articles/tipos-de-elisa-conoces-las-diferencias/>

Blanco, G. M., Orden, G. J., Cutuli de Simón, M. T., Doménech, G. A., Domínguez Bernal , G., Gibello, Prieto, A., . . . Simano, Fernández, I. (2013). *Inmunología y Enfermedades Infecciosas*. Zaragoza, España: SERVET.

Closas, A. S. (1983). Respuesta Inmune de las Aves y sus Alteraciones. *Arxius*(1), 90. Recuperado el 5 de Julio de 2020, de <file:///C:/Users/HP/Downloads/105061-Text%20de%20l'article-151121-1-10-20080923.pdf>

Damerow, G. (2013). *Pollos y Gallinas de la A a la Z*. Barcelona, España: Omega,S.A.

De la Sota, M., & Espinoza, C. (Marzo de 2004). *SENASA*. Recuperado el 30 de Julio de 2020, de Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria: [http://www.intranet.senasa.gov.ar/intranet/imagenes/archivos/dnsa/manuales\\_de\\_procedimiento/06%20Newcastle.pdf](http://www.intranet.senasa.gov.ar/intranet/imagenes/archivos/dnsa/manuales_de_procedimiento/06%20Newcastle.pdf)

Dinev, I. (2019). *El Sitio Avícola*. Obtenido de <https://www.elsitioavicola.com/publications/6/enfermedades-de-las-aves/275/enfermedad-de-newcastle-nd/>

- Doménech, G. A., Blanco, G. M., Cid, V. M., Cutuli de Simon, M. T., Díez, G. A., Domínguez, B. G., . . . Duato, L. (2017). *Inmunología y Enfermedades Infecciosas*. Zaragoza, España: Servet-Grupo Asis S.L.
- Dr. Wit, S., & Dr. Baxendale, W. (2003). Vacunación. *Animal Health*, 11, 19-23. Recuperado el 8 de Diciembre de 2020, de <http://www.enfermedad-gumboro.com/control/vacunacion/declinacion-immunidad-maternal.asp>
- Ecured. (2020). Obtenido de [https://www.ecured.cu/Enfermedad\\_de\\_Newcastle](https://www.ecured.cu/Enfermedad_de_Newcastle)
- El Productor. (2019). *Inmunidad intestinal en aves*. Obtenido de <https://elproductor.com/inmunidad-intestinal-en-aves-una-relacion-dominante/>
- Farfan, Z. (2014). *Manuales para educacion agropecuaria, Aves de Corral* (4 ed.). Mexico: Trillas.
- Fariñas, F. (2015). Funcionamiento del sistema inmune del ave. *Asociacion Española de Ciencia Avicola.*, (pp. 55-58). Magala-España. Retrieved from [https://www.wpsa-aeca.es/aeca\\_imgs\\_docs/16751\\_sistema%20inmune%20del%20ave\\_farinas.pdf](https://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/16751_sistema%20inmune%20del%20ave_farinas.pdf)
- Geodatos. (1 de Junio de 2020). *Geodatos*. Obtenido de <https://www.geodatos.net/coordenadas/ecuador/pinas>
- Gharaibeh, S., & Mahmoud, K. (2013). Decay of maternal antibodies in broiler chickens. *Poultry Science*.(92), 2333 - 2336. Recuperado el 10 de Enero de 2021
- Gimeno, I. (2013). *Enfermedades Inmunosupresoras en Aviculturas*. Zaragoza, España: Servet Grupo Asis Biomedica S.L.

Gómez, G., López, C., Maldona, C., & Ávila, E. (Enero de 2010). El Sistema Inmune Digestivo en las aves. *Investigacion y Ciencia*, 18(48), 9-16. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/674/67413203003.pdf>

Google maps. (2020). Obtenido de <https://www.google.com/maps/dir/pi%C3%B1as/moromoro/@-3.668208,-79.7302919,14z/data=!3m1!4b1!4m13!4m12!1m5!1m1!1s0x90335f647f9a626f:0xc17395634b04989f!2m2!1d-79.6825275!2d-3.680412!1m5!1m1!1s0x90336001b2401767:0x9a1cd14c101b06f9!2m2!1d-79.74305!2d-3.68205>

Guitierrez, M. d. (9 de Enero de 2018). *AviNew*. Recuperado el 11 de Julio de 2020, de <https://avicultura.info/avicultores-ecuatorianos-anuncian-que-estan-produciendo-a-perdidas/>

Gutiérrez, P. J. (2010). *Inmunología Veterinaria*. Mexico: El Manual Moderno, S.A. de C.V.

Hamal, K. R., Burgess, S. C., Pevzner, I. Y., & Erf, G. F. (Agosto de 2006). Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. *Poult Sci*, 85(8), 1364-1372. Recuperado el 12 de Diciembre de 2020, de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16903465/>

Huamani de Nina, N. R. (2014). *Crianza, Produccion y Comercializacion de Pollos de Engorde*. (1 ed.). Lima, Peru: Macro EIRL.

ICA. (2019). *Instituto Colombiano Agropecuario*. Colombia. Recuperado el 18 de Diciembre de 2019, de <https://www.ica.gov.co/areas/pecuaria/servicios/enfermedades-animales/newcastle-1.aspx>

- ICA. (2009). *Guía para la prevención, control y erradicación de la enfermedad de Newcastle*. Instituto Colombiano Agropecuario. Bogotá-Colombia: Produmedios. Recuperado el 10 de Diciembre de 2020, de <https://www.ica.gov.co/getattachment/51203171-b7ca-4552-b8a3-2c3daebfadfc/Brucecelosis-bovina.aspx>
- Ing.Agr.Barbaro, J. L. (2004). *Cria de Aves.Gallinas Ponedoras y Pollos Parrilleros*. (1ra, Ed.) Buenos Aires, Republica Argentina.: Albatros Saci.
- Intervet, I. (1972). *Las enfermedades mas importantes de las aves* (1 ed.). Salamanga, España: Intervet.
- Leandro, N. M., Ali, R., Koci, M., Moraes, V., Malheiros, R. D., Wineland, M. J., & Oviedo-Rondón, E. O. (2011). Effects of broiler breeder genetic, diet type, and feeding program on maternal antibody transfer and development of lymphoid tissues in chicken progeny. *Poultry Science Association*, 20, 474-484. Recuperado el 1 de Enero de 2021
- Martinez, R. (2010). *Medicina Aviaria* (2 ed.). (J. MVZ.PhD.Samour, Ed.) Barcelona, España: Elsevier Mosby España.
- Merino, L. A. (2017). Evaluación serológica de cuatro esquemas de vacunación para Newcastle en pollos de engorde por un período de seis semanas en la granja experimental nono UDLA. Quito, Ecuador: Universidad de las Américas. Recuperado el 12 de Diciembre de 2020
- Murcia, G. H. (Julio de 2009). Importancia de las inmunoglobulinas aviares y sus aplicaciones en inmunoensayos. *TEORIA Y PRAXIS INVESTIGATIVA*, 4(2), 26. Recuperado el 13 de Mayo de 2020, de <file:///C:/Users/HP/Downloads/Dialnet-ImportanciaDeLasInmunoglobulinasAviariasYSusAplicac-3726659.pdf>

- MVZ.Villegas, P. (Marzo de 2015). Enfermedad de Newcastle epidemiología & estrategias de control. *Amevea Colombia*, 85. Recuperado el 15 de Enero de 2020, de <https://avicultura.info/newcastle-epidemiologia-estrategias-de-control/>
- Ochoa, A. R. (2012). *Técnicas Inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos*. La Habana: FINLAY.
- OIE. (2020). Obtenido de Organización Mundial de Sanidad Animal.: <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/enfermedad-de-newcastle/>
- Pascual, G., & De Marzi, M. (2016). *Engormix*. Obtenido de <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/sistema-inmune-aves-t39895.htm>
- Pérez, A. (30 de 10 de 2017). *aviNews*. Obtenido de <https://avicultura.info/ecuador-avicultura-provee-la-mayor-fuente-de-proteina-animal/>
- Perozo, F. (2015). Importancia del Sistema Inmunológico sano en aves comerciales. *Merial*, 1(1), 23-26. Obtenido de <https://seleccionesavicolas.com/pdf-files/2015/6/023-026-Patologia-Importancia-Sistema-inmunologico-aves-Merial-SA201506-rectificado.pdf>
- Ph.D. Tizard, I. (2002). *Inmunología Veterinaria* (Sexta ed.). Mexico,D.F.: McGraw-Hill Interamerica.
- S.A. (2017). *Centro de Estudios Agropecuarios, Crianza de Gallinas de Postura* (1 ed.). Mexico, Mexico: Trillas.
- Saludemia. (2020). *Saludemia*. Recuperado el 04 de Octubre de 2020, de <https://www.saludemia.com/-/vacunaciones-lo-fundamental-tipos-de-vacunas>

- Sara, L. (2 de Diciembre de 2013). Inmunidad Pasiva en Aves. *Ceva Mundo avicola*, 16. Recuperado el 13 de Agosto de 2020, de <http://www.connectingonline.com.ar/v2/Uploads/NewsLetters/CEV0411NewsLetter20131202153102.htm>
- Schunemann, H. A. (28 de Febrero de 2011). Bienestar animal en la enseñanza de Medicina Veterinaria y Zootecnia. *Scielo*, 42(2). Obtenido de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-50922011000200004](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922011000200004)
- Security The Center for Food; Health Public. (2008). *Enfermedad Newcastle*. Institute for International Cooperation in Animal Biologics. Retrieved febrero 13, 2020, from [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/enfermedad\\_de\\_newcastle.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/enfermedad_de_newcastle.pdf)
- Sumano, L., & Gutiérrez, O. (2010). *Farmacología Clínica en aves comerciales* (Cuarta ed.). Mexico: McGRAW-HILL.
- Tizard, I. (2010). *Inmunología veterinaria* (Decima ed.). Barcelona, España: ELSEVIER España.
- Torruba, F., Bomez, C., Den, T., Tellez, S., & Hauck, R. (2014). *Vacunacion en Avicultura*. Zaragoza, España: Servet-Grupo Asis Biomedica S.L.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Fotografías del trabajo experimental.



Foto 1. Toma de muestras y colocación en tubos vacutainer



Foto 2. Centrifugado de muestras, extracción de suero y colocación en tubos eppendorf.

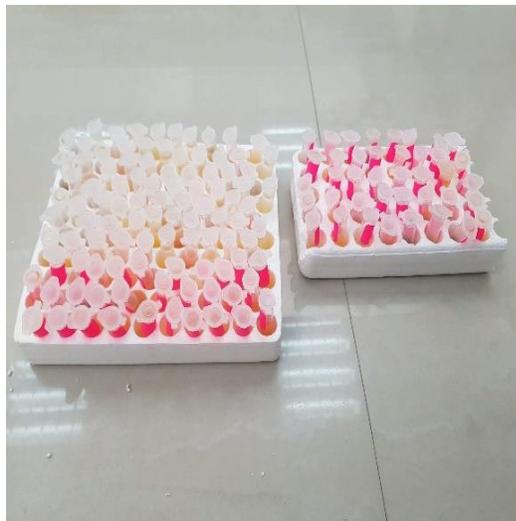


Foto 3. Muestras del día 1 de nacidos y muestras del día 8 de vida.

## 8.2. Kit de ELISA

**IDvet**  
Innovative Diagnostics

**ID Screen°**  
**Newcastle Disease Indirect**  
**Conventional Vaccines**

Elisa indirecto para la detección de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle en muestras de suero de gallinas o pavos.

Para monitoreo de vacunación con vacunas convencionales (atenuadas o muertas)

*Solo para uso in vitro*

Abril 2016

Nuevo protocolo con controles positivo y negativo listo para usar

NDVS-CV ver 0416 ES

### INFORMACION GENERAL

Este kit de diagnóstico está destinado a detectar anticuerpos dirigidos contra el virus de la enfermedad de Newcastle (siglas en inglés, NDV = Newcastle Disease Virus)

El kit permite la cuantificación de anticuerpos específicos presentes en los sueros de gallina o pavos.

Este kit puede ser usado para monitoreo de la vacunación con vacunas convencionales (muertas o atenuadas).

### DESCRIPCION Y PRINCIPIO

Los pocillos son sensibilizados con el antígeno purificados de NDV.

Las muestras a analizar y los controles son añadidos a los pocillos. Los anticuerpos de NDV, si están presentes, formaran un complejo antígeno-anticuerpo.

Un conjunto anti-gallina marcado a la peroxidasa (HRP) es distribuido en los pocillos. Este se fija a los anticuerpos anti-NDV, formando un complejo antígeno-anticuerpo-conjugado-HRP.

Después de la eliminación del exceso del conjugado mediante lavado, la reacción es revelada a través de una solución de revelación (TMB).

La coloración que resulta está ligada a la cantidad de anticuerpos específicos presentes en las muestras a analizar.

- En presencia de anticuerpos en las muestras, aparece una coloración azul que se convierte en amarilla después de añadir a solución de parada.
- En ausencia de anticuerpos en las muestras, no aparece ninguna coloración.

La lectura es realizada a una longitud de onda de 450 nm.

### COMPONENTES

REACTIVOS*
Microplacas sensibilizadas con el antígeno purificado NDV
Control positivo
Control negativo
Conjugado concentrado (10X)
Diluyente 14
Diluyente 3
Solución de lavado concentrado (20X)
Solución de revelación
Solución de parada (0,5 M)

La composición del kit aparece en la etiqueta del mismo.

1. El conjugado, los controles y la solución de revelación deben almacenarse a 5°C (±3°C).
2. El resto de los componentes deben ser almacenados entre +2°C y +26°C.
3. Los componentes con la misma denominación (solución de lavado, diluyente), pueden ser utilizados en toda la gama de productos IDvet.

### MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

1. Micropipetas o pipetas monocanales o multicanales de volúmenes de 5 µl, 10µl, 100µl y 200µl.
2. Puntas de pipeta desechables.

Foto 4. Prospecto. pág. 1.

Foto 5. Prospecto. pág. 2.

3. Lector de Microplacas de 96 pocillos.
4. Agua destilada o desionizada.
5. Lavador de placas (manual o automático).

#### **PRECAUCION DE USO**

1. No pipetear con la boca.
2. La solución de revelación puede ser irritante para la piel.
3. La solución de parada (0,5M) puede ser peligrosa en caso de ingestión y puede causar sensibilización en contacto con la piel (R22-43). evitar el contacto con la piel (S24-37).
4. No exponer la solución de revelación a la luz o a agentes oxidantes.
5. Todo material de un solo uso utilizado para los ensayos debe descontaminarse por inmersión en hipoclorito de sodio al 5% recién preparado durante un minuto de 1 hora antes de la eliminación, o en autoclave a 120°C.

#### **PREPARACION DE LA MUESTRA**

Con el fin de evitar diferencias en los tiempos de incubación entre las muestras, es posible preparar en una placa de 96 pocillos las muestras a analizar y los controles para después transferirlos a la microplaca ELISA con la ayuda de una pipeta multicanal.

#### **PREPARACION DE LA SOLUCION DE LAVADO**

Es necesario equilibrar la solución de lavado concentrada (20X) a temperatura ambiente (21°C ±5°C) y agitar correctamente para obtener la disolución de los cristales.

Preparar la solución de lavado (1X) diluyendo 1:20 la solución de lavado (20X) en agua destilada/desionizada.

Los resultados pueden ser influenciados dependiendo de la calidad del lavado. Asegúrese que los pocillos se encuentren completamente vacíos entre cada lavado. Si utiliza una máquina de lavado automática, es de suma importancia ajustar correctamente los parámetros (modo, tipo y altura de aspiración). Para mayor información sírvase contactar info@id-vet.com y solicitar la "Guía de lavado" de IDvet.

#### **PROCEDIMIENTO**

Colocar todos los reactivos a temperatura ambiente (21°C ±5°C) antes de ser utilizados y homogenizarlos por vortex o por inversión.

Los controles positivo y negativo son suministrados listos para usar. **NO AGREGAR** diluyente a los pocillos A1, B1, C1 Y D1- los controles deben ser analizados sin diluir.

Las muestras siguen siendo analizadas a la dilución final 1:500 en el diluyente 14 (1:50 pre-dilución, seguido de 1:10 de dilución en la microplaca).

1. En una pre-placa de pre-dilución, dejar de lado los pocillos destinados a los controles A1, B1, C1 Y D1, y añadir.
  - 5 µl de cada muestra a analizar
  - 245 µl de diluyente 14 a todos los pocillos EXCEPTO a los pocillos A1, B1, C1 Y D1.

Nota: se recomienda respetar el orden indicado de la distribución de los pocillos con el objetivo de poder observar la adición de los controles en cada pocillo.

2. En la placa ELISA, añadir:
  - 100 µl de Control negativo en los pocillos A1 Y B1.
  - 100 µl de control positivo en los pocillos C1 Y D1.
  - 90 µl de Diluyente 14 a todos los pocillos que contengan las muestras a analizar (no a los pocillos A1, B1, C1 Y D1).
  - 10 µl de las muestras pre-diluidas previamente preparadas.
3. Cubrir la placa e incubar 39 minutos (±3 min) a 21°C (±5°C).
4. Preparar el conjugado (1X) diluyendo el conjugado concentrado (10X) a 1:10 con el diluyente 3.
5. Vaciar los pocillos, lavar cada pocillo 3 veces con aprox. 300 µl de solución de lavado 1X. evitar el desecado de los pocillos durante los lavados.
6. Añadir 100 µl del conjugado 1X a cada pocillo.
7. Cubrir la placa e incubar 30 minutos (±3 min) a 21°C (±5°C).
8. Vaciar los pocillos. Lavar cada pocillo 3 veces con aprox. 300 µl de solución de lavado 1X. evitar el desecado de los pocillos durante los lavados.
9. Añadir 100 µl de la solución de revelación a cada pocillo.
10. Incubar 15 min (±2 min) a 21°C (±5°C) en la oscuridad.
11. Añadir 100 µl de la solución de parada a cada pocillo para detectar la reacción. La solución de parada debe ser agregada en el mismo orden que la etapa n°9.
12. Leer y guardar la DO a 450 nm.

#### **VALIDACION**

El test es válido si:

- ✓ La densidad óptica media del control positivo (DO<sub>CP</sub>) es superior a 0,250

El valor medio de la densidad óptica del control positivo (DO<sub>CP</sub>) y del control negativo (DO<sub>CN</sub>) es superior a 3.

- ✓ El valor medio de la densidad óptica del control positivo (DO<sub>CP</sub>) y del control negativo (DO<sub>CN</sub>) es superior a 3.

#### **INTERPRETACION**

#### **INTERPRETACION**

Foto 5. Prospecto pág.3

Foto 1.Prospecto pág.4

#### **INTERPRETACION**

#### **INTERPRETACION**

Para cada muestra, calcular el valor S/P y el título de anticuerpos, de la siguiente manera.

1. Calculo del valor S/P:

Calculo del título de anticuerpos:

2. Calculo del título de anticuerpos:

Los resultados son interpretados de la siguiente manera:

Los resultados son interpretados de la siguiente manera:

Los resultados son interpretados de la siguiente manera:

VALOR S/P	Título de anticuerpos ELISA	Estatus inmunitario Newcastle
S/P ≤ 0.3	Título ≤ 993	Negativo
S/P > 0.3	Título > 993	Positivo

Foto 2. Prospecto pág. 5



Foto 3. Componentes del kit de ELISA

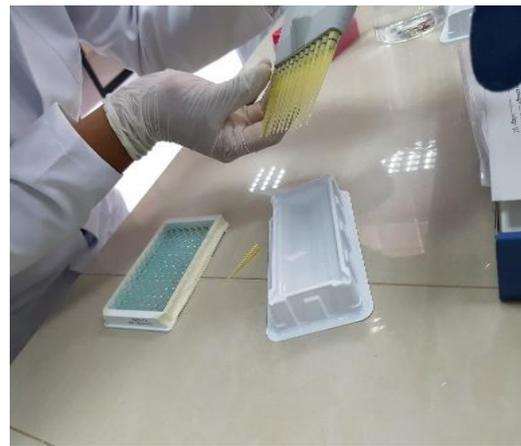


Foto 4 Colocación del grupo control y del suero diluido en la placa

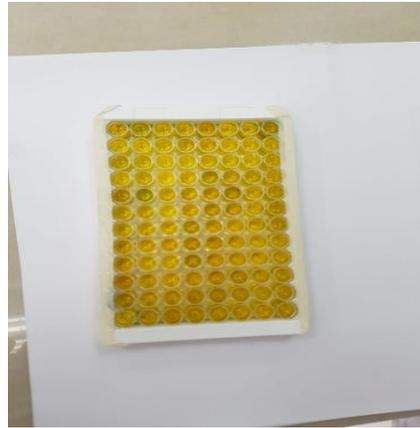


Foto 5. Lavado de la placa y lectura.

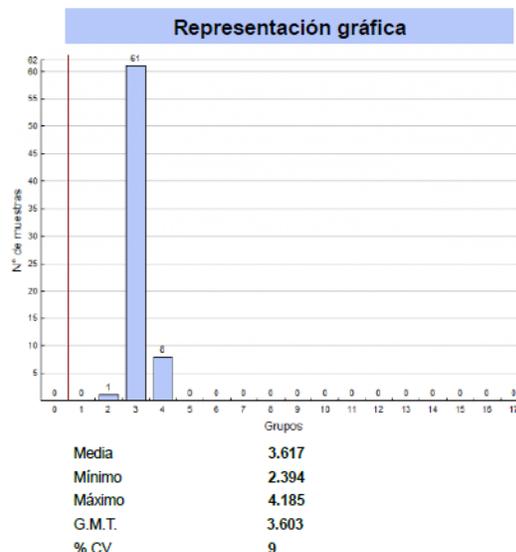


Foto 6. Equipo de ELISA y Lectura de datos.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10									
34																				
35	A	P	0,798	B45	2,172	B45	1,344	B45	1,449	1	3,276	1	2,221	1	3,191	1	3,145	1	3,124	1
36	B	P	0,528	B45	2,892	B45	2,749	B45	2,351	1	3,05	1	3,147	1	3,033	1	2,386	1	2,943	1
37	C	N	2,883	B45	1,738	B45	1,353	B45	2,699	1	2,943	1	2,33	1	2,86	1	2,849	1	2,849	1
38	D	N	2,752	B45	2,75	B45	2,484	B45	2,199	1	2,853	1	2,864	1	2,823	1	2,843	1	2,823	1
39	E	B45	2,448	B45	2,934	B45	2,777	1	3,025	1	3,117	1	3,037	1	3,037	1	3,037	1	3,037	1
40	F	B45	2,811	B45	1,976	B45	2,482	1	3,341	1	3,309	1	3,2	1	2,811	1	3,008	1	3,309	1
41	G	B45	2,637	B45	3,003	B45	1,35	1	2,332	1	2,373	1	2,345	1	2,332	1	2,882	1	2,388	1
42	H	B45	2,462	B45	1,885	B45	3,307	1	3,273	1	3,386	1	3,307	1	3,273	1	3,182	1	3,386	1
43																				
44																				
45																				
46																				
47	A	P	0,798	8	3,191	8	3,031	8	3,048	8	0,432	8	1,339	8	1,265	8	0,628	8	0,839	8
48	B	P	0,528	8	2,33	8	2,386	8	2,338	8	0,246	8	0,385	8	0,565	8	0,343	8	1,57	8
49	C	N	2,883	8	2,306	8	3	8	1,132	8	0,38	8	1,165	8	0,304	8	0,411	8	1,303	8
50	D	N	2,752	8	2,803	8	2,75	8	2,733	8	0,382	8	0,381	8	1,651	8	1,209	8	0,416	8
51	E	1		3,185	8	0,39	8	3,025	8	2,335	8	0,676	8	0,391	8	1,733	8	1,509	8	0,656
52	F	1		3,25	8	2,072	8	3,341	8	2,568	8	0,676	8	0,372	8	1,408	8	1,155	8	0,247
53	G	8		2,319	8	0,826	8	2,332	8	1,644	8	0,638	8	0,335	8	1,211	8	1,048	8	0,232
54	H	8		3,183	8	0,5	8	3,273	8	1,654	8	1,086	8	0,25	8	0,4	8	1,103	8	0,575

Foto 7. Resultados del día 1 y del día 8

Referencia	Coordenadas	DO	S/P Ratio	Resultado	Título	Título Grupo
Control Negativo	A1	0,798				
Control Negativo	B1	0,528				
Control Positivo	C1	2,883				
Control Positivo	D1	2,752				
01	E4	3,025	1,066	P	3.629	3
02	F4	3,341	1,243	P	4.115	4
03	G4	2,932	1,053	P	3.486	3
04	H4	3,273	1,211	P	4.009	4
05	A5	3,216	1,185	P	3.923	3
06	B5	3,050	1,108	P	3.868	3
07	C5	2,943	1,058	P	3.503	3
08	D5	2,853	1,016	P	3.364	3
09	E5	3,117	1,139	P	3.771	3
10	F5	3,309	1,228	P	4.066	4
11	G5	2,973	1,072	P	3.549	3
12	H5	3,386	1,264	P	4.185	4
13	A6	2,221	0,723	P	2.394	2
14	B6	3,147	1,153	P	3.817	3
15	C6	2,930	1,052	P	3.483	3
16	D6	2,864	1,021	P	3.380	3
17	E6	3,097	1,129	P	3.738	3
18	F6	3,200	1,177	P	3.897	3
19	G6	2,945	1,059	P	3.508	3
20	H6	3,307	1,227	P	4.062	4
21	A7	3,191	1,173	P	3.884	3
22	B7	3,033	1,100	P	3.642	3
23	C7	2,860	1,019	P	3.374	3
24	D7	2,823	1,002	P	3.317	3
25	E7	3,097	1,129	P	3.738	3
26	F7	2,811	0,997	P	3.301	3
27	G7	2,932	1,053	P	3.486	3
28	H7	3,273	1,211	P	4.009	4
29	A8	3,145	1,152	P	3.814	3
30	B8	2,966	1,078	P	3.569	3
31	C8	2,849	1,014	P	3.357	3
32	D8	2,843	1,012	P	3.351	3
33	E8	3,097	1,129	P	3.738	3
34	F8	3,008	1,088	P	3.602	3
35	G8	2,882	1,030	P	3.410	3
36	H8	3,182	1,169	P	3.870	3
37	A9	3,124	1,142	P	3.781	3
38	B9	2,943	1,058	P	3.503	3
39	C9	2,849	1,014	P	3.357	3
40	D9	2,823	1,002	P	3.317	3
41	E9	3,097	1,129	P	3.738	3
42	F9	3,309	1,228	P	4.066	4
43	G9	2,968	1,079	P	3.572	3
44	H9	3,386	1,264	P	4.185	4
45	A10	3,216	1,185	P	3.923	3
46	B10	2,966	1,078	P	3.569	3
47	C10	2,809	0,996	P	3.298	3
48	D10	2,803	0,993	P	3.288	3
49	E10	3,042	1,104	P	3.655	3
50	F10	3,251	1,201	P	3.976	3
51	G10	2,945	1,059	P	3.508	3
52	H10	3,240	1,196	P	3.960	3
53	A11	2,878	1,028	P	3.404	3
54	B11	2,825	1,003	P	3.321	3
55	C11	2,714	0,952	P	3.152	3
56	D11	2,688	0,940	P	3.112	3
57	E11	2,992	1,081	P	3.579	3
58	F11	3,057	1,111	P	3.678	3
59	G11	2,894	1,035	P	3.427	3
60	H11	3,085	1,124	P	3.721	3
61	A12	2,928	1,051	P	3.480	3
62	B12	2,892	1,034	P	3.423	3
63	C12	2,746	0,967	P	3.202	3
64	D12	2,813	0,998	P	3.304	3
65	E12	2,838	1,009	P	3.341	3
66	F12	3,251	1,201	P	3.976	3
67	G12	2,973	1,072	P	3.549	3
68	H12	3,240	1,196	P	3.960	3



**Criterio de validación**

Media DOcp > 0,25	2,818
Media DOcn	0,663
DOcp / DOcn > 3,00	4,25

**Criterio válido**

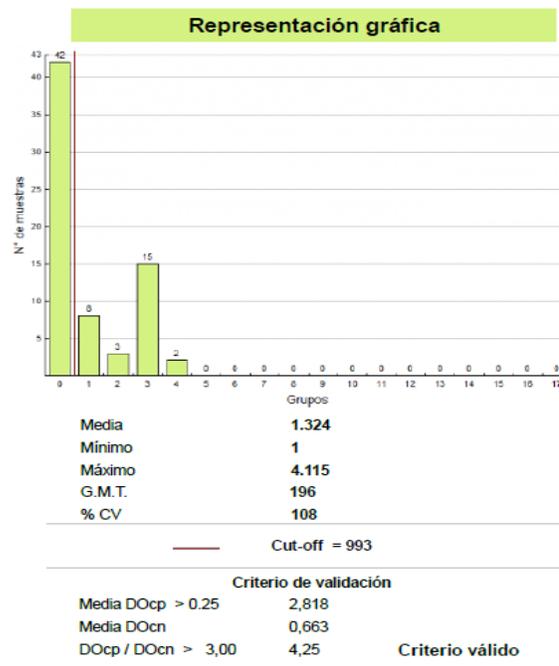
**Estadísticas**

Estado	Nº de muestras	%
Positivo	70	100,00
Negativo	0	0,00
Total	70	100,00

Referencia	Coordenadas	DO	S/P Ratio	Resultado	Título	Título Grupo
Control Negativo	A1	0,798				
Control Negativo	B1	0,528				
Control Positivo	C1	2,883				
Control Positivo	D1	2,752				
69	E1	3,185	1,170	P	3.874	3
70	F1	3,250	1,200	P	3.973	3

Foto 15. Resultados finales del día 8.

Referencia	Coordenadas	DO	S/P Ratio	Resultado	Título	Título Grupo
Control Negativo	A1	0,798				
Control Negativo	B1	0,528				
Control Positivo	C1	2,883				
Control Positivo	D1	2,752				
01	G1	2,919	1,047	P	3.486	3
02	H1	3,183	1,169	P	3.870	3
03	A2	3,191	1,173	P	3.884	3
04	B2	2,930	1,052	P	3.483	3
05	C2	2,906	1,041	P	3.447	3
06	D2	2,803	0,993	P	3.288	3
07	E2	0,990	0,152	N	503	0
08	F2	2,072	0,654	P	2.165	2
09	G2	0,826	0,076	N	251	0
10	H2	0,500	-0,076	N	1	0
11	A3	3,031	1,099	P	3.639	3
12	B3	2,986	1,078	P	3.569	3
13	C3	3,000	1,084	P	3.589	3
14	D3	2,750	0,968	P	3.205	3
15	E3	3,025	1,096	P	3.629	3
16	F3	3,341	1,243	P	4.115	4
17	G3	2,932	1,053	P	3.486	3
18	H3	3,273	1,211	P	4.009	4
19	A4	3,048	1,107	P	3.665	3
20	B4	2,338	0,777	P	2.572	2
21	C4	1,132	0,218	N	721	0
22	D4	2,733	0,961	P	3.182	3
23	E4	2,935	1,054	P	3.490	3
24	F4	2,568	0,884	P	2.927	2
25	G4	1,644	0,455	P	1.506	1
26	H4	1,654	0,460	P	1.523	1
27	A5	0,492	-0,079	N	1	0
28	B5	0,246	-0,194	N	1	0
29	C5	0,980	0,147	N	486	0
30	D5	0,962	0,148	N	490	0
31	E5	0,676	0,006	N	19	0
32	F5	0,676	0,006	N	19	0
33	G5	0,638	-0,012	N	1	0
34	H5	1,086	0,196	N	649	0
35	A6	1,339	0,314	P	1.039	1
36	B6	0,985	0,149	N	493	0
37	C6	1,165	0,233	N	771	0
38	D6	0,381	-0,131	N	1	0
39	E6	0,991	0,152	N	503	0
40	F6	0,972	0,143	N	473	0
41	G6	0,935	0,126	N	417	0
42	H6	0,250	-0,192	N	1	0
43	A7	1,265	0,279	N	923	0
44	B7	0,565	-0,045	N	1	0
45	C7	0,904	0,112	N	370	0
46	D7	1,651	0,458	P	1.516	1
47	E7	1,733	0,497	P	1.645	1
48	F7	1,408	0,346	P	1.145	1
49	G7	1,211	0,254	N	841	0
50	H7	0,400	-0,122	N	1	0
51	A8	0,628	-0,016	N	1	0
52	B8	0,943	0,130	N	430	0
53	C8	0,411	-0,117	N	1	0
54	D8	1,209	0,253	N	837	0
55	E8	1,509	0,393	P	1.301	1
56	F8	1,155	0,228	N	754	0
57	G8	1,048	0,179	N	592	0
58	H8	1,103	0,204	N	675	0
59	A9	0,839	0,082	N	271	0
60	B9	1,570	0,421	P	1.394	1
61	C9	1,303	0,297	N	983	0
62	D9	0,416	-0,115	N	1	0
63	E9	0,656	-0,003	N	1	0
64	F9	0,247	-0,193	N	1	0
65	G9	0,292	-0,172	N	1	0
66	H9	0,575	-0,041	N	1	0
67	A10	0,751	0,041	N	135	0
68	B10	0,535	-0,059	N	1	0
69	C10	0,200	-0,215	N	1	0
70	D10	0,857	0,090	N	298	0



Estadísticas		
Estado	N° de muestras	%
Positivo	28	40,00
Negativo	42	60,00
<b>Total</b>	<b>70</b>	<b>100,00</b>

Foto 14. Resultado final del día 8 de nacidos.