

**UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZÁN**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA**



---

**TITULO DE ANTICUERPOS CONTRA BRONQUITIS  
INFECCIOSA EN BROILERS VACUNADOS CON LA CEPA  
MASSACHUSETTS VÍA OCULAR Y AGUA DE BEBIDA**

---

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
MÉDICO VETERINARIO**

**WILSON JHON ESTELA COTRINA**

Bachiller en Medicina Veterinaria

**ROSEL APAÉSTEGUI LIVAQUE**

Asesor de la Tesis

**HUÁNUCO, PERÚ  
2017**

## **DEDICATORIA**

- ❖ A Dios por ser el creador de todas las cosas y por sus bendiciones.
  
- ❖ A mi madre Eugenia que me brinda su apoyo incondicional para poder culminar mis metas.
  
- ❖ A mi padre José quien con sus consejos ha sabido guiarme para culminar mi carrera profesional.
  
- ❖ A mis hermanos Percy, Raul, Gilber y Yanina por estar siempre presentes acompañándome.
  
- ❖ A mi esposa Tifany y mis dos hijas, Valentina y Brithany que son el motor y motivo para seguir adelante.

## **AGRADECIMIENTO**

- ❖ A mi alma mater la Universidad Nacional Hermilio Valdizan por ser parte de ella y el haberme brindado la oportunidad de continuar con mi carrera.
  
- ❖ A mí querida Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por haberme albergado durante estos años de estudios.
  
- ❖ A todos los profesores de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por contribuir en mi formación profesional.
  
- ❖ Al M. Sc. Rosel Apaéstegui Livaque asesor del presente trabajo por su apoyo brindado en la presente investigación.
  
- ❖ Al M.V. e Ing. Zoot. Javier Luyo Flores por su apoyo desinteresado en la redacción y ejecución del presente trabajo de investigación.
  
- ❖ A los todos los profesionales de la Unidad de Centro de Diagnóstico de Sanidad Animal, SENASA – LIMA. Por su apoyo en el procesamiento de las muestras.

# **TITULO DE ANTICUERPOS CONTRA BRONQUITIS INFECCIOSA EN BROILERS VACUNADOS CON LA CEPA MASSACHUSETTS VÍA OCULAR Y AGUA DE BEBIDA**

**Bachiller: Wilson jhon ESTELA COTRINA.**

## **RESUMEN**

El presente trabajo se realizó en la unidad de producción de animales menores (galpón de aves) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Hermilio Valdizán, el análisis del suero se realizó en la Unidad Experimental del Laboratorio de Patología Aviar de SENASA – LIMA, realizando la Prueba de ELISA indirecta con el kit del laboratorio IDEXX, con el objetivo de evaluar la titulación de anticuerpos contra la enfermedad de bronquitis infecciosa en pollos broilers usando vacunas a virus vivo con 2 vías diferentes de aplicación. Se utilizaron 150 pollitos broilers de la línea Cobb 500 distribuidos en 3 grupos: 2 grupos experimentales y un grupo control: Grupo A: vacunados por la vía ocular a los 7 días de edad presentó una titulación de anticuerpos promedio de 1451  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; Grupo B: vacunados por la vía agua de bebida a los 7 días de edad 1325  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y el grupo C: control, sin vacunar 494  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; existiendo diferencia significativa ( $p \geq 0,05$ ) de los dos grupos experimentales (A y B) con relación al Grupo control (C) sin vacunar. Los resultados mostraron que los grupos vacunados a los 7 días de edad tuvieron una titulación de anticuerpos similar contra la enfermedad de bronquitis infecciosa, reflejándose esto en los niveles de anticuerpos obtenidos, contrario al grupo control (C) en donde se encontraron una titulación baja, procedentes de la inmunidad pasiva. Del mismo modo en la revacunación a los 20 días de edad; los resultados mostraron que los grupos revacunados tuvieron una titulación de anticuerpos similar contra la enfermedad de bronquitis infecciosa: el grupo A (vía ocular) presentó una titulación promedio de 4080  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , el grupo B (vía agua de bebida) 3568  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y el grupo C (sin vacunar) 130  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  existiendo diferencia significativa ( $p \geq 0,05$ ) de los dos grupos experimentales con relación al grupo control reflejándose con mayores niveles de anticuerpos, contrario al grupo Control en donde se encontraron niveles de anticuerpos muy bajos. Se concluye que con la vacunación 7 días de edad más la revacunación a los 20 días de edad por la vía ocular y la vía agua de bebida se logra títulos de anticuerpos para la protección contra la enfermedad de bronquitis infecciosa en pollos broilers.

### **Palabras claves:**

Bronquitis infecciosa (BI), Enzyme Linked Inmunoabsorvent Assay (ELISA), vacunas a virus vivo.

**TITLE OF ANTIBODIES AGAINST INFECTIOUS BRONCHITIS IN BROILERS VACCINATED  
WITH CEPA MASSACHUSETTS EYE AND BEVERAGE WATER**

**Bachiller: Wilson jhon ESTELA COTRINA.**

**SUMMARY**

The present work was carried out in the unit of production of smaller animals (poultry house) of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of the National University Hermilio Valdizán, while the serum analysis was carried out in the Experimental Unit of the Laboratory of Avian Pathology of SENASA - LIMA, carrying out the Elisa test, with the objective of evaluating immunoprotection using live virus vaccines with 2 different pathways in the prevention of infectious bronchitis disease in broiler chickens. A total of 150 Cobb 500 fattening chicks were divided into 3 groups: 2 experimental groups and a control group: Group A: vaccinated by the ocular route at 7 days of age and revaccinated at 20 days; Group B: vaccinated via drinking water at 7 days of age and revaccinated at 20 days and Group C (control) without vaccination. The results showed that the groups vaccinated at 7 days had a similar behavior in the protection of the animal, this being reflected in high levels of antibodies, contrary to the group C (Control) where a low titration was found, being understood that they are coming from the in which group A (ocular pathway) presented an average titre of 1451 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , Group B (via water and drink) 1325  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  and group C (Control) 494  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  and there was a significant difference ( $p \geq 0.05$ ) of the two experimental groups relative to the control group. Similarly in the revaccination at day 20 the results showed that the revaccinated groups had a similar behavior in the protection of the animal, being reflected with higher levels of antibodies, contrary to the Control group where very low antibody levels were found, in which Group A (ocular pathway) had a mean titre of 4080  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , group B (via drinking water) 3568  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  and group C (Control) 130  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  with a significant difference ( $p \geq 0.05$ ) Of the two experimental groups relative to the control group. The 3 groups showed a similar mortality, not significant on the grounds that they were not exposed to the viral agent. It is concluded that with vaccination at day 7 plus revaccination at day 20 by the ocular route and via drinking water, an immunological protection is guaranteed in the prevention of infectious bronchitis in broilers.

Keywords:

Infectious bronchitis (IB), Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA), live virus vaccines.

# CONTENIDO

	pág.
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
I. INTRODUCCIÓN.....	13
II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	15
2.1. ESTUDIOS REALIZADOS.....	15
2.2. BRONQUITIS INFECCIOSA.....	16
2.2.1. HISTORIA.....	16
2.2.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	16
2.2.3. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y EN LA SALUD PÚBLICA.....	16
2.2.4. ETIOLOGÍA.....	17
2.2.5. CLASIFICACIÓN.....	17
2.2.6. MORFOLOGÍA.....	18
2.2.7. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.....	20
2.2.8. EPIDEMIOLOGÍA.....	21
2.2.9. DIFUSIÓN Y TRANSMISIÓN.....	22
2.2.10. PERIODO DE INCUBACIÓN.....	23
2.2.11. PATOGENIA.....	23
2.2.12. SIGNOS CLÍNICOS.....	23
2.2.12.1. Signos respiratorios.....	23
2.2.12.2. Signos renales.....	24
2.2.12.3. Signos reproductivos.....	24
2.2.13. LESIONES.....	25
2.2.14. MORBILIDAD Y MORTALIDAD.....	25

2.2.15. DIAGNÓSTICO.....	25
2.2.16. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO.....	26
2.2.16.1.    Identificación del serotipo.....	27
2.2.16.2.    Pruebas serológicas.....	27
2.2.16.3.    Variedad de serotipos.....	28
2.2.16.4.    Detección de anticuerpos.....	28
2.2.16.5.    Titulación de anticuerpos.....	29
2.2.16.6.    Prueba de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA).....	29
2.2.16.7.    Serología ELISA en la avicultura.....	31
2.2.17. CONTROL.....	32
2.2.17.1.    Vacunación.....	33
2.2.18. CALENDARIO DE VACUNACIÓN.....	36
2.2.19. INMUNIDAD.....	36
2.3. SISTEMA INMUNE AVIAR.....	37
2.3.1. ÓRGANOS LINFOIDES PRIMARIOS.....	37
2.3.1.1    Timo.....	37
2.3.1.2    Bolsa de Fabricio.....	38
2.3.1.3    Médula ósea.....	38
2.3.2. ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS.....	38
2.3.2.1.    Bazo.....	38
2.3.2.2.    Tejidos linfoides asociados a mucosas.....	39
2.3.2.3.    Tonsilas cecales.....	39
2.3.2.4.    Placas de Peyer.....	39

2.3.3. CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO IMPLICADAS EN LA RESPUESTA INMUNE.....	39
2.3.3.1.    Macrófagos.....	39
2.3.3.2.    Neutrófilos.....	40
2.3.3.3.    Eosinófilos.....	40
2.3.3.4.    Basófilos.....	40
2.3.3.5.    Células dendríticas.....	40
2.3.4. LINFOCITOS.....	40
2.3.5. MOLECULAS DE SUPERFICIE DE LOS LINFOCITOS.....	41
2.3.5.1.    Moléculas que integran el complejo receptor de antígeno.....	41
2.3.6. LINFOCITOS T.....	41
2.3.6.1.    Linfocitos T colaboradores (Th).....	42
2.3.6.2.    Linfocitos T citotóxicos (Tc).....	42
2.3.7. LINFOCITOS B.....	42
2.3.8. INMUNOGLOBULINAS O ANTICUERPOS.....	43
2.3.9. CELULAS ASESINAS NATURALES.....	43
2.3.10. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD.....	44
2.4. TIPOS DE INMUNIDAD.....	44
2.4.1. Inmunidad Inespecífica o Innata.....	44
2.4.2. Inmunidad específica o adquirida.....	44
2.4.3. Respuesta inmune mediada por células.....	45
2.4.4. Respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos.....	45
2.4.5. Inmunidad activa.....	45



2.4.6.	Inmunidad pasiva en aves.....	46
III.	MATERIALES Y METODOS.....	47
3.1.	ÁMBITO DE ESTUDIO.....	47
3.2.	MATERIALES.....	47
3.2.1	Del alojamiento de las aves.....	47
3.2.2	De la población de animales.....	47
3.2.3	De la muestra.....	48
3.2.4	De las vacunas.....	49
3.3.	METODOLÓGIA.....	49
3.3.1.	Tipo de investigación.....	49
3.3.2.	Nivel de investigación.....	49
3.4.	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	49
3.4.1.	Las vacunaciones.....	51
3.4.2.	Respuesta inmunológica Humoral.....	52
3.4.3.	PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA (prueba de ELISA indirecta).....	52
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56
4.1.	RESPUESTA INMUNOLOGICA HUMORAL.....	56
V.	CONCLUSIONES.....	65
VI.	RECOMENDACIONES.....	66
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	67
VIII.	WEBGRAFÍA.....	71
IX.	ANEXOS.....	72

## LISTA DE CUADROS

### EN EL TEXTO:

Cuadro	Pág.
1. Distribución de las aves en grupos experimentales vacunales.....	50
2. Grupos y rangos mínimos y máximos de los títulos de anticuerpos $\mu\text{g/ml}$ de suero, establecidos para la interpretación de titulaciones serológicas contra bronquitis infecciosa aviar mediante la técnica de ELISA indirecta.....	54
3. Título de anticuerpos obtenidos a los 12 días post vacunación, 19 días de edad. Prueba de ELISA Indirecta.....	57
4. Título de anticuerpos obtenidos a los 12 días post revacunación, 32 días de edad. Prueba de ELISA Indirecta.....	60
5. Título de anticuerpos obtenidos en la 1ra. Y 2da. Evaluación, (A y B grupos experimentales y C grupo control).....	63

### EN EL ANEXO:

Cuadro.	Pág.
6. Hoja de informe de vacunación vía ocular.....	72
7. Hoja de informe de vacunación vía agua de bebida.....	73
8. Análisis de varianza de los títulos promedios de los dos Grupos Experimentales y Grupo control a los 12 días post vacunación (19 días de edad).....	73
9. Prueba de Tukey de los títulos promedios de los dos grupos experimentales y Grupo control a los 12 días post vacunación (19 días de edad).....	73
10. Análisis de varianza de los títulos promedios de los dos grupos experimentales y Grupo control a los 12 días post revacunación (32 días de edad).....	74

11. Prueba de Tukey de los títulos promedios de los dos grupos experimentales y Grupo control a los 12 días post revacunación (32 días de edad).....74

**LISTA DE FIGURAS**

**EN EL TEXTO:**

Numero	Pág.
1. Título de anticuerpos de la vacunación vía ocular a los 19 días de edad.....	58
2. Título de anticuerpos de la vacunación vía agua de bebida a los 19 días de edad .....	58
3. Título de anticuerpos de la primera evaluación grupo C sin vacunar a los 19 días de edad .....	59
4. Título de anticuerpos de la revacunación vía ocular a los 32 días de edad.....	61
5. Título de anticuerpos de la revacunación vía agua de bebida a los 32 días de edad .....	61
6. Título de anticuerpos de la segunda evaluación del grupo C sin vacunar a los 32 días de edad.....	62
7. Títulos promedios de la vacunación y revacunación vía ocular y vía agua de bebida.....	64

**LISTA DE FIGURAS**

**EN EL ANEXO:**

Numero	Pág.
8. Fotografía de la viruta seca utilizado como material de cama para pollos BBs .....	74
9. Fotografía de la instalación de las cortinas para establecer el microclima.....	75
10. Fotografía de la recepción de pollos BBs.....	75

11. Fotografía del termómetro para monitorear la temperatura del ambiente.....	76
12. Fotografía de la medición del cloro del agua de bebida antes de la vacunación vía ocular .....	76
13. Fotografía de la reconstitución de la vacuna liofilizada para la vacunación vía ocular.....	77
14. Fotografía de la vacunación vía ocular a los 7 días de edad.....	77
15. Fotografía de la vacunación vía ocular a los 20 días de edad.....	77
16. . Medición del cloro previo a la vacunación vía agua de bebida (cloro = 1.5 y pH= 7.6).....	78
17. Fotografía de la reconstitución de la vacuna liofilizada para la vacunación vía agua de bebida.....	78
18. Fotografía de la vacunación vía agua de bebida a los 20 días de edad.....	78
19. Fotografía de la extracción de muestras en tubos al vacío post vacunación vía ocular.....	80
20. Fotografía de la extracción de muestras en tubos al vacío post vacunación vía agua de bebida.....	80
21. Fotografía de los sueros que fueron procesados en la Unidad de Centro de Diagnóstico de Sanidad Animal, SENASA – LIMA.....	80
22. Imágenes de procedimiento de la ejecución de la Prueba de ELISA indirecta.....	80-82

## I. INTRODUCCIÓN

La producción de pollos de engorde en la actualidad es una de las actividades pecuarias más explotadas debido a su fácil manejo y la crianza en poco tiempo. Esto involucra una investigación constante para producir nuevas líneas genéticas de aves, que presenten mayor incremento de peso en menor tiempo y con menor cantidad de alimento, considerando la resistencia a enfermedades, adaptabilidad a diferentes zonas y climas.

En los últimos 10 años, la producción de carne de ave se incrementó 3.5% anual en promedio, tasa superior a la alcanzada por las carnes de bovino y cerdo (0.8 y 1.7%, respectivamente). Por consiguiente la avicultura es una de las principales fuentes de obtención de proteínas para la población **(APA, 2013)**.

Durante los últimos años se ha intensificado la búsqueda de programas sanitarios que permitan frenar la introducción y diseminación de diferentes enfermedades **(Moreno, 1994)**.

En el Perú, y en especial en la región sierra, la Bronquitis Infecciosa (BI) se constituye un grave problema, ya que es una de las enfermedades más comunes y más difíciles de controlar, principalmente en las aves de engorde, por las consecuencias económicas que acarrea **(Moreno, 1994)**.

La principal forma de control es la aplicación de medidas preventivas y la bioseguridad. Al hablar prevención se hace referencia a la inmunización, por ende a la vacunación.

No existe un programa sanitario rígido e infalible que pueda ser utilizado en un lote de aves en una zona. Por lo que es importante implantar programas sanitarios específicos para cada zona, de acuerdo a las condiciones de manejo, el grado de desafío

local, la presencia de nuevas enfermedades o serotipos de un determinado agente y la disponibilidad de productos para inmunizar a las aves **(Cuello et al., 2004)**.

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

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

El presente trabajo pretende evaluar los títulos de anticuerpos contra el VBI que presentan las aves en una post vacunación, y una post revacunación, con el fin de conocer las respuestas inmunitarias y saber si las aves están protegidas contra la BI.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### 2.1. ESTUDIOS REALIZADOS

En estudios realizados se evidenció que después de la infección con una cepa vacunal viva de bronquitis infecciosa aviar se detecta una buena respuesta primaria de IgM e IgG **(Martins et al., 1991)**.

En algunos países latinoamericanos se ha detectado la presencia de las cepas Massachusetts y Connecticut, así como otras cepas que muestran diferencias mayores cuando se las compara con el serotipo Massachusetts, como fue el caso de Colombia el año 2005, donde se estudiaron 16 aislamientos procedentes de aves que presentaban fuertes problemas respiratorios. Los resultados mostraron que 12 de los aislamientos se clasificaron en cuatro genotipos diferentes a las cepas Massachusetts y Connecticut **(Villegas, 2012)**.

En Estados Unidos se han reportado otros serotipos, como Arkansas, Delaware 072 o GA98, contra los que se han desarrollado vacunas comerciales **(Villegas, 2012)**.

Se evidenció que después de la infección con una cepa vacunal del VBI, IgM es el primero en aparecer, los títulos pico se logran aproximadamente entre los 7 y 8 días de la infección. IgG es el anticuerpo de mayor presencia en el suero luego de una infección, se encuentra presente desde los 7 días posteriores a la infección por BI y puede persistir por algún tiempo. La infección induce además, la secreción de IgA. La IgM e IgA, pasan al líquido amniótico del huevo, la IgY penetra en el embrión y es capaz de neutralizar el virus **(Martins et al., 1991)**.

Se ha mostrado que la respuesta de los linfocitos T citotóxicos en los pollos esta correlacionada con la disminución inicial de la infección y signos clínicos **(Pei et al., 2001)**.

## **2.2 BRONQUITIS INFECCIOSA (BI)**

### **2.2.1. HISTORIA**

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

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

### **2.2.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA**

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

### **2.2.3. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y EN LA SALUD PÚBLICA**

La BI es una enfermedad que ocasiona un impacto socio-económico severo en la industria avícola mundial. La enfermedad asume características graves en ponedoras, con efectos desastrosos sobre los índices de postura y la calidad del huevo, en broilers afectando su crecimiento y desarrollo para su posterior comercialización **(Jordan y Pattison, 1998)**.



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

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

#### **2.2.4. ETIOLOGÍA**

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

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

#### **2.2.5. CLASIFICACIÓN**

El agente etiológico de esta enfermedad es el virus de la BIA clasificado dentro del género coronavirus, familia coronaviridae, orden nidovirales, es envuelto y presenta una cadena simple de ARN **(Acevedo, 2010)**.

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

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

#### **2.2.6. MORFOLOGÍA**

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

El VBIA tiene 4 proteínas estructurales:

una proyección en la superficie, la espícula (S) de «spike» o espícula en inglés, la proteína de la nucleocápside (N), la de la membrana (M) y la de la envoltura (E), habiéndose identificado las regiones que codifican esas proteínas a nivel del genoma. La glicoproteína de la espícula (S), es la responsable de la unión y fusión de la membrana del virus a la membrana de la célula hospedadora, permitiendo la entrada de su genoma en la misma, así como es la principal responsable de la inducción de la respuesta inmune protectora y de la determinación del serotipo **(Panisello y Giner, 2010)**.

#### **La espícula (S)**

Está conformada por dos subunidades, la S1 que es la parte más externa en forma de bulbo, responsable de la unión del virus a la célula y está conformada por unos 500 aminoácidos, y la subunidad S2 que une a la subunidad S1 con la superficie del virus, que es responsable de la fusión de la membrana del virus con la célula

hospedadora y está formada por unos 600 aminoácidos (constituyen la corona que da nombre a este tipo de virus cuando se visualizan por microscopía electrónica). La subunidad S1 de la espícula confiere al virus su identidad antigénica. Cuando se comparan los aminoácidos de distintos serotipos, las variaciones pueden llegar a ser de hasta un 50%, pero se considera que variaciones tan pequeñas como 2 a 3% en los residuos aminoácidos (10 a 15 residuos), puede originar un cambio en el serotipo. Los cambios en la secuencia del ácido nucleico del gen de la espícula y los consiguientes cambios en la configuración de los aminoácidos de la espícula son los responsables de las variaciones de serotipo del virus. La subunidad S1 de la espícula juega un papel fundamental en la antigenicidad del virus debido a que induce la producción de anticuerpos neutralizantes, serotipo-específicos e inhibidores de la hemoaglutinación. **(Panisello y Giner, 2010).**

La subunidad S1 está relacionada con la infectividad, la actividad hemaglutinante, virus neutralización y lleva secuencias serotipo-específicas, mientras que la subunidad S2 es responsable de la fusión de la membrana **(Cavanagh et al., 1986).**

La glicoproteína M es altamente hidrofóbica y variable, se encuentra asociada a la proteína N para formar parte de la nucleocápside, y en la envoltura se asocia con la proteína E de 12 KDa. Ésta es imprescindible para el ensamblaje de la partícula viral y su liberación a través de las membranas del complejo de Golgi.

La proteína N es una fosfoproteína de 50-60 KDa posee 3 dominios estructurales relativamente conservados, se fosforila rápidamente en el citosol una vez sintetizada y juega un papel en la replicación del ARN viral, la transcripción, ensamblaje y en la inmunidad a la infección. La proteína E juega un papel esencial en el ensamblaje del virión **(Lai y Cavanagh, 1997).**

## **Causas de la variación genética del virus**

Al igual que otros virus ARN, la polimerasa viral del VBI, no tiene función de "edición-reparación/corrección de lectura", siendo esta enzima la responsable de copiar el genoma viral durante la replicación. Pero si durante ésta se produce un error en la copia del genoma, la enzima no es capaz de repararlo, hecho que confiere a este virus una alta capacidad de mutación, capacidad que le permite también una adaptación más rápida y cambio, como respuesta a la presión de selección o a la respuesta inmunitaria específica del hospedador. Esta característica se manifiesta especialmente en el gen responsable de la proteína S de la espícula. Se han identificado algunos mecanismos como causas de la variación genética: mutaciones puntuales que incluyen sustituciones, inserciones, deleciones e inversiones de nucleótidos específicos, así como recombinaciones que se pueden producir al coincidir más de una cepa distinta del virus en una misma célula hospedadora, recombinándose el genoma de ambos virus. Continuamente se están produciendo cambios en su genoma, pero se cree que la gran mayoría son letales para su supervivencia, o no le dan ninguna ventaja para su supervivencia con respecto a los genotipos ya establecidos (**Panisello y Giner, 2010**).

### **2.2.7. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

La mayoría de las cepas del virus de la BIA son inactivadas después de 15 minutos a 56°C y después de 90 minutos a 45°C. Se debe evitar almacenar el virus a -20°C, sin embargo, el líquido alantoideo infeccioso ha permanecido viable después de almacenado a -30°C por varios años. Los tejidos infectados se preservan bien conservados en glicerol al 50% (**Otsuki *et al.*, 1979**).

Existe una variación entre las cepas con respecto a la estabilidad al pH. En estudios realizados, la reducción en el título después de un tratamiento a pH 3 a temperatura ambiente por 4 horas varió desde 1-2 log<sub>10</sub> en la mayoría de los aislados, a 5 log<sub>10</sub> para otros **(Cowen y Hitchner, 1975)**.

Se considera que este virus es fácilmente destruido por la luz solar, el calor, los desinfectantes y otros factores del medio ambiente. El tratamiento con una concentración final de 0.05 o 0.1% de beta-propiolactona o 0.1% de formalina elimina la infectividad del virus **(King, 1984)**.

#### **2.2.8. EPIDEMIOLOGÍA**

##### **Huésped**

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

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

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

##### **Factores influyentes**

Los brotes de BI son más comunes en los meses de invierno. Son factores predisponentes a la BI una ventilación deficiente de la caseta, malas condiciones higiénicas, calendario intensivo de vacunaciones; estados de tensión; la presencia de

otros virus o patógenos y en general todos los agentes inmunodepresores predisponen a las aves a una enfermedad más grave y prolongada **(Moreno, 1994)**.

### **2.2.9. DIFUSIÓN Y TRANSMISIÓN**

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

La forma más frecuente de transmisión del virus es en forma horizontal, por vía aérea directa a partir de exudados nasales y traqueales o de las deyecciones de una animal enfermo o portador a otro, también puede transmitirse por personas y equipo contaminado. Aunque es prácticamente excepcional, la enfermedad puede difundirse también a través del huevo **(Jordan y Pattison, 1998)**.

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

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

### **2.2.10. PERIODO DE INCUBACIÓN**

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

### **2.2.11. PATOGENIA**

El VBI puede ingresar por dos vías:

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

Digestiva: multiplicación en mucosa del proventrículo **(Comotto, 2000)**.

### **2.2.12. SIGNOS CLÍNICOS**

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

#### **2.2.12.1. Signos respiratorios**

Los signos clínicos característicos son tos, estornudos, descargas nasales, estertores traqueales, ojos acuosos y letargo. Los pollos parecen deprimidos, pueden estar agrupados bajo una fuente de calor y el consumo de alimentos y ganancia de peso son significativamente reducidos **(Cavanagh, 2003)**.

En los pollos mayores de 6 semanas de edad y en aves adultas los signos clínicos son similares a los señalados pero las descargas nasales no ocurren tan frecuentemente y la enfermedad puede no ser advertida a menos que las aves sean examinadas cuidadosamente **(Cavanagh, 2003)**.

Los pollos jóvenes pueden morir directamente de la infección por el virus pero un gran número muere debido a infecciones bacterianas secundarias **(Cavanagh, 2003)**.

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

#### **2.2.12.2. Signos renales**

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

#### **2.2.12.3. Signos reproductivos**

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



### **2.2.13. LESIONES**

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

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

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

### **2.2.14. MORBILIDAD Y MORTALIDAD**

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

### **2.2.15. DIAGNÓSTICO**

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

Para diagnosticar la BI se deben observar los signos clínicos y las lesiones macroscópicas. En las etapas iniciales la BI puede confundirse fácilmente con enfermedades como: enfermedad de Newcastle, Coriza infecciosa, laringotraqueitis aviar, enfermedad respiratoria crónica complicada, infección de la bolsa de Fabricio, síndrome de la baja postura, entre otros **(Rojo, 1996)**.

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

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

Este diagnóstico se basa en la demostración de un título ascendente de anticuerpos en el suero de las aves infectadas, tomada la primera muestra en la fase inicial de la enfermedad y la segunda dos o tres semanas después. La demostración de un título bajo o negativo en la primera muestra y un título más alto en la segunda es prueba de la enfermedad **(Rojo, 1996)**.

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

#### **2.2.16. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO**

La confirmación del diagnóstico se basa en la demostración del virus, algunas veces en el aislamiento apoyado en ocasiones por datos serológicos. Se hace un uso muy amplio de vacunas vivas y de vacunas inactivadas, lo cual puede complicar el diagnóstico por métodos serológicos, porque los anticuerpos debidos a la vacunación

y a la infección natural no siempre pueden distinguirse. La persistencia del virus de vacunas vivas también puede equivocar los ensayos de recogida de la cepa de campo del agente causal **(Dawson y Gouch, 1971)**.

#### **2.2.16.1. Identificación del serotipo**

Es común la variación antigénica entre las cepas de IBV (11, 16, 23, 28, 31), pero en la actualidad no hay acuerdo sobre un sistema de clasificación definitivo. Sin embargo, las relaciones y diferencias antigénicas entre las cepas son importantes, pues las vacunas basadas en un serotipo particular pueden mostrar una escasa o nula protección frente a los virus de un grupo antigénico distinto. Como consecuencia de la aparición regular de las variantes antigénicas, los virus, y por lo tanto, la enfermedad y las vacunas, pueden ser muy diferentes en sitios geográficos distintos. Es necesaria una valoración continua de los virus presentes en el ambiente natural para producir vacunas que sean eficaces de cara a las variantes antigénicas que surjan. La serotipificación de aislamientos y de cepas de VBI se ha realizado utilizando pruebas de inhibición de la hemoaglutinación (IH) y la neutralización del virus (NV) en embriones de polluelos **(Dawson y Gouch, 1971)**.

#### **2.2.16.2. Pruebas serológicas**

Se han descrito varias pruebas. Las que se consideran aquí comprenden la NV, la inmunodifusión en gel de agar (IGDA), la IH y los ELISA. Cada prueba tiene sus ventajas e inconvenientes respecto a la realización, la especificidad, la sensibilidad y el coste. En general, para pruebas serológicas rutinarias, las pruebas de la NV son demasiado costosas y poco prácticas, las de tipo IGDA carecen de sensibilidad. Las pruebas ELISA e IH son muy adecuadas para la serología de rutina. Los ELISA son útiles para el control general de la exposición al VBI y pueden detectar las respuestas de anticuerpos a todos los serotipos. Cuando la IH se utiliza en sueros de pollos jóvenes

en crecimiento tales como pollas y pollos para carne (broilers), puede proporcionar información sobre el estado de los anticuerpos específicos de serotipo en la bandada. El control regular de los sueros de las poblaciones aviares respecto a los títulos de anticuerpo contra BIA puede servir de ayuda para indicar el nivel de respuesta a la vacuna o al desafío natural. Debido a que los sueros de pollo de más edad, contienen anticuerpos que presentan fuerte reacción cruzada contra cepas antigénicamente no relacionadas, no se puede utilizar el serodiagnóstico de brotes sospechosos de la enfermedad con un grado alto de seguridad **(Mockett y Darbyshire, 1981)**.

#### **2.2.16.3. Variedad de serotipos**

Uno de los factores más influyentes en el diagnóstico y control de la bronquitis infecciosa es la variedad de serotipos reportados en los diferentes países. Los serotipos de más frecuente presentación en todo el mundo han sido el Massachusetts y el Connecticut, utilizados en la preparación de las vacunas comerciales de mayor uso en la industria. Estos dos serotipos, principalmente el Massachusetts, han servido de modelos de comparación cuando se aíslan nuevas cepas del virus **(Villegas-Narváez, 2012)**.

#### **2.2.16.4. Detección de anticuerpos**

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

Las técnicas de serología caen en tres categorías generales: las pruebas de unión primaria, que miden directamente el enlace de antígenos y anticuerpos; las pruebas de unión secundaria, que miden la interacción antígeno-anticuerpo in vitro y

las de unión terciaria, que miden el efecto real de los anticuerpos en un animal **(Tizard, 1996)**.

#### **2.2.16.5. Titulación de anticuerpos**

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

#### **2.2.16.6. Prueba de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA)**

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

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

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

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

La técnica ELISA es un método serológico sensible y que suministra las reacciones más rápidas y los títulos de anticuerpos más altos que otras pruebas. Carece de especificidad de cepa o de tipo, pero es valioso para analizar respuestas a la vacunación en condiciones de campo. Existen preparaciones comercializadas de ELISA que se basan en diferentes estrategias para la detección de anticuerpos contra VBI. Normalmente dichas pruebas se han evaluado y validado por el fabricante, por lo tanto, es importante para su uso seguir cuidadosamente las instrucciones que se especifican. Los enzimoimmunoensayos se utilizan ampliamente para identificar poblaciones

infectadas por VBI en pollos para carne mediante el reconocimiento de títulos elevados de anticuerpos. Si en la granja se vuelve a presentar la BI en la siguiente población de aves, se realizan intentos para aislar el virus y se establece su genotipo por secuenciación de RFLP o S1 (**Mockett y Darbyshire, 1981**).

- **Sensibilidad**

Como la capacidad de un test para detectar niveles bajos de anticuerpos o la proporción de animales infectados que dan resultado positivo en el test (**Mockett y Darbyshire, 1981**).

- **Especificidad**

Es la proporción de animales libres de la infección que dan un resultado negativo en el test o la capacidad de un test para proporcionar un resultado negativo cuando el animal no está infectado. (**Mockett y Darbyshire, 1981**).

- **ELISA indirecto para la cuantificación de anticuerpos**

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

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

- **ELISA competitivo**

Puede utilizarse para la determinación de anticuerpos o de antígenos.

- **ELISA directo para la detección de antígenos**

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

### **2.2.16.7. Serología ELISA en la avicultura**

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

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

Las pruebas serológicas persiguen los siguientes objetivos:

1. Establecer valores serológicos estándar para regiones o granjas, que sean factibles de utilizar como punto de referencia para realizar comparaciones.
2. Diagnosticar problemas de campo, evaluando los desafíos de campo e investigando los motivos de brotes de la enfermedad.
3. Dar seguimiento o monitorear los programas de vacunación es decir, cuantificar los anticuerpos maternos, determinar la edad apropiada para la vacunación, y evaluar las respuestas post vacúnales inducidas por las vacunas.
4. Evaluar la eficiencia de la aplicación de las vacunas vivas y saber si se está preparando bien el sistema inmune para una buena respuesta a los desafíos de campo.
5. Monitorear y comparar rutas de aplicación en la eficiencia y uniformidad de la parvada **(Solvay, 1992)**.

- **Interpretación de los resultados serológicos**

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

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

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

Los títulos mayores a 8000 en aves vacunadas una sola vez pueden ser interpretados como títulos muy altos y pueden resultar de una exposición a virus de campo **(Villegas, 1982)**.

#### **2.2.17. CONTROL**

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

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

La forma más efectiva de control, consiste en el aumento de la resistencia de las aves. Se utilizan vacunas con virus vivos o muertos, dependiendo de la edad y objetivos de la crianza, las vacunas más utilizadas en ponedoras son las vacunas con virus muertos. Sin embargo, en cualquiera de los casos debe precederse por una vacuna de virus vivo bien atenuado **(Comotto, 2000)**.

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



### **2.2.17.1. Vacunación**

La vacunación es simplemente el proceso por el cual se exponen individuos a un antígeno de un agente causante de una enfermedad para inmunizarlo contra el mismo. Una vez alcanzado este objetivo, los individuos se benefician de su inmunidad activa mientras que su progenie podrá beneficiarse a través de inmunidad maternal, conocida también como inmunidad pasiva. Como regla general solo deberán vacunarse aves en buen estado de salud **(Phil y Luckert, 2001)**.

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

Las vacunas son producto a base de microorganismos vivos o muertos que al ser aplicados al ave desarrollan inmunidad y en consecuencia confiere protección.

Las vacunas de uso en avicultura pueden ser divididas en dos grandes grupos:

- Vacunas vivas: las cuales deben ser administradas con ayuda de una serie de métodos.

- Vacunas inactivadas: las cuales se administran por inyección.

**(Banda, 2011)**.

Tanto la elección de una u otra o de la técnica a utilizarse depende de varios factores. Los más importantes son:

- ✓ El tipo de ave: los pollos de engorda se vacunan preferencialmente con vacunas vivas por su ciclo corto de vida.

- ✓ La edad de las aves: aves muy jóvenes no se deben vacunar por medio del agua de bebida.

- ✓ La enfermedad: la prevención contra el Síndrome de Caída de Postura se hace solo por medio de vacunas inactivadas.
- ✓ El tipo de vacuna: las vacunas contra la Enfermedad de Marek solo pueden ser administradas por inyección.
- ✓ Las condiciones locales: los costos laborales **(Banda, 2011)**.

- **Vacuna a virus vivo.**

- ✓ Produce una infección leve.
- ✓ Estimula la inmunidad humoral (producción de anticuerpos).
- ✓ Estimula inmunidad celular (destrucción de células).

Pueden ser aplicadas:

- Vía ocular
- Vía agua de bebida
- Vía spray
- Vía punción alar y/o inguinal **(Banda, 2011)**.

- **La vacunación vía ocular**

La vacunación ocular es el método de vacunación más preciso ya que cada ave recibe la dosis correspondiente de vacuna. Así se induce una inmunidad rápida y uniforme. Como es lógico, este método exige un mayor trabajo. Este método de vacunación es utilizado principalmente con vacunas contra la Bronquitis Infecciosa, la Laringotraqueitis Infecciosa, la Enfermedad de Newcastle e infecciones por Pneumovirus **(Banda, 2011)**.

- **La vacunación vía agua de bebida**

La vacunación en el agua de bebida aparenta ser el método de más fácil aplicación, lo que en realidad no es así. En primer lugar se debe controlar la calidad del agua a utilizarse. Se recomienda la adición de 2 g/litro de agua, de leche descremada

en polvo para mejorar la estabilidad de la vacuna o algún otro neutralizador del cloro. **(Aviagen, 2008).**

Una manera de controlar si la solución vacunal está bien distribuida a través de todas las salidas de agua es haciendo uso de colorantes que manchan el pico y la lengua de las aves, permitiendo así controlar la buena vacunación del grupo. No se recomienda la vacunación en el agua de bebida en zonas climáticas calientes cuando se utilicen bebederos de chupete (niple) ya que estos se calientan demasiado y habrá inactivación del virus vacunal. Concluyendo, siempre que no sea posible cumplir todos los requisitos para llevar a cabo una buena vacunación en el agua de bebida se deberá optar por un método alternativo de vacunación **(Banda, 2011).**

- **Vacuna a virus inactivado.**

- ✓ No reproduce la enfermedad
- ✓ Estimula la inmunidad humoral (producción de anticuerpos) **(Rodríguez, 2011).**

Las vacunas inactivadas son aplicadas de manera individual, teniendo diferentes puntos de aplicación: intramuscular (pecho y/o pierna) y sub cutáneo (pecho y/o cuello).

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

Las vacunaciones posteriores a la primera vacunación aumentan el espectro de protección en las aves, fundamentalmente cuando se usan cepas diferentes correspondientes al serotipo Massachusetts. En los países donde sólo se permite el uso de vacunas tipo Massachusetts, esta es la mejor forma de proporcionar algún tipo de

protección frente a cepas locales diferentes al serotipo Massachusetts (**Calnek et al., 1997**).

#### **2.2.18. CALENDARIO DE VACUNACIÓN**

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

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

Los programas de vacunación para los pollos de engorde incluyen una vacuna aplicada el primer día de vida en la planta de incubación (aspersión con gota gruesa). Si por alguna razón importante es necesario realizar una segunda vacunación, esta debe aplicarse preferentemente antes de las dos semanas de edad, pues más tarde las reacciones post vacunales pueden complicarse con otros agentes (**Villegas, 2012**).

#### **2.2.19. INMUNIDAD**

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

## **2.3. SISTEMA INMUNE AVIAR**

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

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

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

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

### **2.3.1. ÓRGANOS LINFOIDES PRIMARIOS**

#### **2.3.1.1 Timo**

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

Está dividido en corteza y medula, la corteza es rica en linfocitos. En las aves es un órgano multilobulado y posee 7 a 8 lóbulos a cada lado relacionado con la

inmunidad celular, se atrofia con la madurez sexual incluyéndose en la grasa cervical pero sigue siendo funcional **(Robin, 2006)**.

#### **2.3.1.2. Bolsa de Fabricio**

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

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

#### **2.3.1.3. Médula ósea**

Las zonas hematopoyéticas de la médula ósea contienen precursores de todas las células sanguíneas, así como macrófagos y linfocitos **(Sharma, 1999)**.

### **2.3.2. ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS**

#### **2.3.2.1. Bazo**

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

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

### **2.3.1.2. Tejidos linfoides asociados a mucosas**

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

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

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

### **2.3.2.3. Tonsilas cecales**

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

### **2.3.2.4. Placas de Peyer**

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

## **2.3.3. CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO IMPLICADAS EN LA RESPUESTA INMUNE**

### **2.3.3.1. Macrófagos**

Los macrófagos capturan y destruyen materias extrañas. Además secretan moléculas que amplifican la respuesta inmunitaria, controlan la inflamación, contribuyen directamente a la reparación del daño hístico mediante la eliminación del tejido que está en proceso de muerte y el tejido dañado, asisten el proceso de

restauración, transforman y presentan antígenos para la preparación de una respuesta inmunitaria **(Tizard, 1996)**.

#### **2.3.3.2. Neutrófilos**

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

#### **2.3.3.3. Eosinófilos**

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

#### **2.3.3.4. Basófilos**

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

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

#### **2.3.3.5. Células dendríticas**

Las células dendríticas captan, procesan y presentan antígenos a los linfocitos T en combinación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, las células dendríticas son vistas como el puente entre el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo **(Arnaiz-Villena et al., 1995)**.

### **2.3.4. LINFOCITOS**

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



los linfocitos derivan de células madre hematopoyéticas existente en la medula ósea **(Tizard, 1996)**.

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

### **2.3.5. MOLECULAS DE SUPERFICIE DE LOS LINFOCITOS**

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

#### **2.3.5.1. Moléculas que integran el complejo receptor de antígeno**

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

### **2.3.6. LINFOCITOS T**

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

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

#### **2.3.6.1. Linfocitos T colaboradores (Th)**

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

- **Linfocitos Th1**

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

- **Linfocitos Th2**

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

#### **2.3.6.2. Linfocitos T citotóxicos (Tc)**

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

#### **2.3.7. LINFOCITOS B**

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

### **2.3.8. INMUNOGLOBULINAS O ANTICUERPOS**

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

Existen tres clases de anticuerpos que son producidos en el ave luego de la exposición a un microorganismo: IgM, IgG e IgA.

- **Ig M**

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

- **Ig G**

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

En serología la principal inmunoglobulina que se monitorea es la IgG y en un menor grado la IgM **(Sharma, 1997)**.

- **Ig A**

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

### **2.3.9. CELULAS ASESINAS NATURALES**

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

### **2.3.10. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD**

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

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

## **2.4. TIPOS DE INMUNIDAD**

### **2.4.1. Inmunidad Inespecífica o Innata**

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

### **2.4.2. Inmunidad específica o adquirida**

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

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

#### **2.4.3. Respuesta inmune mediada por células**

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

#### **2.4.4. Respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos**

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

#### **2.4.5. Inmunidad activa**

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

Esta puede ser:

- **Natural activa:** temporal y duradera, ocurre después de que el individuo sufre una infección.
- **Artificial activa:** variable en su duración, ocurre después de la inmunización con vacunas (**Morilla, 1989**).

#### **2.4.6. Inmunidad pasiva en aves**

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

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

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

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

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO**

El presente trabajo de investigación se realizó en la Unidad de Producción de Animales Menores (galpón de aves) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Hermilio Valdizan ubicado en Cayhuayna alta, Distrito de Pillco Marka, Departamento de Huánuco en los meses de julio y agosto. El análisis de las muestras se realizó en la Unidad de Centro de Diagnóstico de Sanidad Animal del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) – LIMA.

#### **3.2. MATERIALES**

##### **3.2.1. Alojamiento de las aves**

Las actividades realizadas previas a la recepción del pollo BB fueron las siguientes:

- Limpieza y desinfección del galpón.
- Tendido de material de cama (viruta) (Fig. 8 )
- Instalación del micro clima (Fig. 9)

Recepción del pollo BB, Fueron criados juntos hasta el sexto día de edad, día en que se separó en dos grupos experimentales y un grupo control. Los pollos recibieron el mismo tipo de alimento y agua ad libitum, el alimento de los pollos fue dividido en dos etapas: de 1- 21 días se dio alimento inicio (con 20% de proteína) y de 22 a 35 días crecimiento y acabado (con 18% de proteína) (Fig. 10 al 20).

##### **3.2.2. La población de animales**

La población de estudio fue de 150 pollos de la línea Cobb 500 entre hembras y machos.

### 3.2.3. La muestra

Para la obtención del tamaño de la muestra se utilizó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 * (S_1^2 + S_2^2)}{(X_1 - X_2)^2}$$

Donde las constantes son:

$$Z_{1-\alpha/2} = 1.96$$

$$Z_{1-\beta} = 0.84$$

$$S_1^2 = 6$$

$$S_2^2 = 6$$

$$d = X_1 - X_2 = 3$$

Remplazando datos:

$$n = \frac{(1.96 + 0.84)^2 * (6 + 6)}{3^2}$$

$$n = \frac{94.08}{9}$$

$$n = 10.45 = 11$$

El tamaño de muestra de acuerdo a la fórmula es de 10.45, pero por fines prácticos se trabajó con una muestra de 11 aves por cada grupo experimental (A y B) y 11 aves para el grupo control (C). Realizando dos evaluaciones por cada grupo de una población de 150 aves.



#### **3.2.4. Las vacunas**

Las vacunas a virus vivo que se usó fueron vacunas combinadas de New Castle, Bronquitis y Gumboro, cepa la sota para la enfermedad de New Castle, cepa Massachusetts para la enfermedad de Bronquitis Infecciosa y cepa D78 para la enfermedad de Gumboro, las vacunas que se utilizaron fueron del laboratorio LA FABRI SRL.

La vacuna liofilizada a virus vivo contra la Enfermedad de Bronquitis Infecciosa (BI), cepa Massachusetts, contiene al menos 3,0 log<sub>10</sub> cultivos de tejido de dosis infecciosa (TCID) 50 por dosis de ave.

### **3.3. METODOLÓGIA**

#### **3.3.1. Tipo de investigación**

- Aplicada, se busca conocer los títulos de anticuerpos producidos por las vías de vacunación.
- Experimental, con la intervención se desea saber la producción de títulos de anticuerpos.

#### **3.3.2. Nivel de investigación**

- Explicativo, ya que se describirá, analizará e interpretará los resultados de una población definitiva.
- Analítico, tiene dos variables y existe un grupo control.

### **3.4. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

- El diseño estadístico empleado para el análisis de los datos recolectados en la presente investigación corresponde al diseño completamente al azar (DCA), con igual número de repeticiones, y las unidades experimentales (pollos) son homogéneos.

- Cada vía de vacunación se ha considerado como un tratamiento y cada muestra de suero como una repetición.
- Se realizó el análisis de varianza ( $P \leq 0,05$ ), utilizando el siguiente modelo matemático aditivo lineal:

$$Y_{ij} = U + T_i + E_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ij}$  = Variable respuesta al efecto  $i$ -ésimo tratamiento

$U$  = Media general

$T_i$  = Efecto de la  $i$ -ésimo vacunación (1, 2, 3,..)

$E_{ij}$  = Error experimental

- Se efectuó la prueba de comparación de promedios de TUKEY ( $P \leq 0.05$ ) para las siguientes pruebas:
  - Para la Prueba de Elisa Indirecta 12 días post vacunación (a los 19 días de edad) y 12 días post revacunación (a los 32 días de edad).

**Cuadro 1. Distribución de las aves en grupos experimentales vacunales.**

EDAD (días)	GRUPOS EXPERIMENTALES		GRUPO CONTROL
	Grupo A (11 aves) Vacunados Vía ocular	Grupo B (11 aves) Vacunados Vía agua de bebida	Grupo C (11 aves) Sin vacunar
7	Vacunación contra BIA	Vacunación contra BIA	Sin vacunar
19	Extracción y Evaluación de las muestras	Extracción y Evaluación de las muestras	Extracción y Evaluación de las muestras
20	Revacunación contra BIA	Revacunación contra BIA	Sin revacunar
32	Extracción y Evaluación de las muestras	Extracción y Evaluación de las muestras	Extracción y Evaluación de las muestras

### **3.4.1. Las vacunaciones**

Al grupo A se vacunó por vía ocular a los 7 días de edad y se revacunó a los 20 días de edad, al grupo B se vacunó vía agua de bebida a los 7 días de edad y se revacunó a los 20 días de edad y el grupo C no se vacunó ya que se consideró como grupo control. Cabe mencionar que para ambas vías de vacunación se utilizó la cepa Massachusetts (Fig. 14, 15 y 18).

El día de vacunación (día 7 y 20) se suministró agua a los 2 grupos experimentales agua con un neutralizador de cloro (Cevamune), para evitar el bloqueo al virus vacunal y así obtener una mayor titulación de anticuerpos.

- **Preparación de la vacunación vía ocular**

La preparación de la vacuna consistió en romper el vacío del frasco mediante la inoculación de 3ml del diluyente, agitando suavemente hasta la completa suspensión del liofilizado. Se administró una gota de vacuna (0,03 ml) por ave, en el ojo, mediante un gotero estandarizado (30 ml para 1 000 dosis) (fig. 13).

- **Preparación de la vacunación vía agua de bebida**

Se suprime el agua de bebida 2 hrs. Antes de la vacunación. Se mide la cantidad de agua a usar. Como regla general se considera que se deben utilizar para 1000 aves, 1000 dosis diluidas en una cantidad de litros de agua, igual a la edad de las aves (350 ml a los 7 días de edad y 1lt a los 20 días de edad para 50 pollos), se añade el neutralizador de cloro (cevamune) y se espera 15min. Aprox. La preparación consistió en romper el vacío mediante la introducción del frasco en el agua estabilizada y se controla el tiempo de consumo (fig. 18).

- **Extracción de muestras de sangre**

- ✓ Se tomó 11 aves al azar de cada uno de los 3 grupos (2 experimentales y 1 grupo control)

- ✓ Se expuso el ala, para una adecuada visualización de la vena Braquial y limpieza del área.
- ✓ Se realizó la punción en la parte media de la vena, con aguja de 20 G X 1 ½''.
- ✓ Se permitió que la sangre fluya a través de la aguja y con la otra mano se colocó el tubo de ensayo, permitiendo el llenado.
- ✓ Se llenó aproximadamente 3 ml de sangre.
- ✓ Se inclinó a unos 45 ° permitiendo así que se forme el coagulo.
- ✓ Se trasladó a un ambiente fresco para que se libere el suero (tubo sin anticoagulante), esta liberación se produce en 3 horas aprox.
- ✓ El suero obtenido de los tubos de ensayo, se pasó a los viales.
- ✓ El volumen de suero adquirido fue de 0.8 – 1 ml. Por cada muestra.
- ✓ Estos fueron congelados y llevados al laboratorio en cadena de frío (fig. 21).

#### **3.4.2. Respuesta inmunológica Humoral**

Los títulos de anticuerpos contra la enfermedad de Bronquitis Infecciosa fueron determinados por la prueba de Elisa indirecta.

Las evaluaciones se realizaron a los 19 y 32 días de edad. Tomando muestras de 11 aves al azar por grupo para medir la inmunidad activa post vacunación y la inmunidad activa post revacunación respectivamente (Fig. 22).

#### **3.4.3. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA (prueba de ELISA indirecta)**

La temperatura del ambiente donde se realiza el procesamiento de la muestra debe ser de 18 – 26 °C.

- **Prueba de ELISA indirecta.**

Se utilizó un kit de ELISA indirecta del laboratorio IDEXX. La prueba de ELISA indirecta es una de las más utilizadas y precisas para determinar la respuesta humoral a las vacunaciones con virus vivos o muertos, así como para detectar evidencias de retos por virus de campo, esta prueba se realizó en la Unidad de centro de Diagnóstico de Sanidad Animal, SENASA – LIMA.

- **Reactivos**

1. Placa tapizada con antígeno de BI del laboratorio IDEXX.
2. Control positivo – suero de pollo anti – BI diluido, conservado con ácido de sodio.
3. Control negativo – suero de pollo diluido, no reactivo en BI, conservado con ácido de sodio.
4. Conjugado – conjugado (de cabra) anti pollo: HRPO, conservado con gentamicina y Kathon.
5. Diluyente de la muestra – conservado con ácido de sodio.
6. Sustrato TMB.
7. Solución de frenado.

**Cuadro 2. Grupos y rangos de los títulos de anticuerpos  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  mínimos y máximos, establecidos para la interpretación de titulaciones serológicas contra bronquitis infecciosa aviar mediante la técnica de ELISA indirecta.**

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

**Fuente: Laboratorio IDEXX, (2016).**

- **Preparación de la muestra**

Se diluyó las muestras 1:500 con el diluyente antes de efectuar la prueba (diluir 1  $\mu\text{l}$  de la muestra con 500  $\mu\text{l}$  de diluyente). No se diluye los controles.

Se cambió las puntas de las pipetas cada vez que se tomó una muestra, se mezcló bien las muestras antes de añadirlas a la placa tapizada con antígeno de BI.

- **Procedimientos de la prueba**

Dejar que todos los reactivos adquieran 18 – 26°C antes de usarlos. Los reactivos deberán mezclarse invirtiéndolos o agitándolos suavemente.

1. Obtener la placa (o placas) tapizadas con antígeno y anote la posición de las muestras.
2. Dispensar 100  $\mu\text{l}$  de control negativo (CN) no diluido en los pocillos por duplicado.
3. Dispensar 100  $\mu\text{l}$  de control positivo (CP) no diluido en los pocillos por duplicado.
4. Dispensar 100  $\mu\text{l}$  de muestra diluida en los pocillos correspondientes. Las muestras pueden analizarse por duplicado pero el análisis en un solo pocillo es también aceptable.
5. Incubar durante 30 minutos ( $\pm 2$  min.) a 18 – 26 °C.
6. Eliminar el contenido líquido de cada pocillo y lavar cada pocillo con aproximadamente 350  $\mu\text{l}$  de agua destilada o desionizada 3 -5 veces. Evitar que las placas se sequen entre los lavados y antes de añadir el reactivo siguiente. Después del lavado final, eliminar el fluido de lavado residual de cada placa golpeándola sobre material absorbente.
7. Dispensar 100  $\mu\text{l}$  de conjugado a cada pocillo.
8. Incubar durante 30 minutos ( $\pm 2$  min.) a 18 – 26 °C.
9. Repetir el paso 6.
10. Dispensar 100  $\mu\text{l}$  de substrato TMB en cada pocillo.
11. Incubar durante 15 minutos ( $\pm 1$  min.) a 18 – 26 °C.
12. Dispensar 100  $\mu\text{l}$  de la solución de frenado en cada pocillo.
13. Medir y anotar los valores de absorbancia que se mide en un espectrofotómetro del lector de ELISA, siendo la densidad óptica directamente proporcional al color y a la concentración de anticuerpos en el suero.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. RESPUESTA INMUNOLOGICA HUMORAL

Los títulos de anticuerpos contra la enfermedad de Bronquitis Infecciosa obtenidos mediante la Prueba de ELISA Indirecta realizado en el Laboratorio de Patología Aviar SENASA – LIMA, a los 12 días post vacunación (19 días de edad) se observa que no hay una diferencia significativa ( $P \geq 0,05$ ) en los grupos A y B, con una titulación de anticuerpos similares, sin embargo si hay diferencia significativa ( $P \geq 0,05$ ) entre los grupos A y C, y entre los grupos B y C. Numéricamente los Títulos más altos lo presentaron los pollos del grupo A (vía ocular) con una media de  $1451 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , frente a los pollos del grupo B (vía agua de bebida) con  $1325 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  y el grupo C (Control) con  $494 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . por lo tanto, Se observa una respuesta homogénea a la vacunación y de que el proceso de inmunización se llevó a cabo de la manera correcta (Cuadro 3).

**Ristow, (2010).** Afirma que es importante la validación de la respuesta serológica general de los animales de muestra por lo que se debe calcular la media aritmética ( $\bar{x}$ ) que mide la uniformidad de los títulos de anticuerpos detectados, por lo que es un indicativo de la efectividad de un programa de vacunación.

**Sainsbury, (2002).** Menciona que para lograr el máximo potencial de las vacunas, es necesario inyectar a cada ave una dosis completa. Quien además considera que los niveles de títulos de anticuerpos mayores a  $1000 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  ya son protectivos.



**Cuadro 3. Título de anticuerpos  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  a los 12 días post vacunación, 19 días de edad. Prueba de ELISA Indirecta.**

<b>Nº de muestras</b>	<b>A: vía ocular</b>	<b>B: vía agua de bebida</b>	<b>C: Control</b>
1	729	876	639
2	1800	1615	565
3	1450	1045	830
4	999	688	508
5	1025	994	237
6	1999	1700	773
7	1600	2021	459
8	2027	1555	605
9	1665	1300	523
10	1780	1990	91
11	885	788	205
<b><math>\bar{x}</math></b>	<b>1451<sup>a</sup></b>	<b>1325<sup>a</sup></b>	<b>494<sup>b</sup></b>
<b>EE</b>	<b>133.6</b>	<b>137.5</b>	<b>66.9</b>
<b>Ds</b>	<b>443</b>	<b>456</b>	<b>222</b>
<b>Li</b>	<b>729</b>	<b>688</b>	<b>91</b>
<b>Ls</b>	<b>2319</b>	<b>2218</b>	<b>929</b>

- ★ **Letras iguales: no existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).**
- ★ **Letras diferentes: existe diferencia significativa.**

**Ds** : Desviación estándar

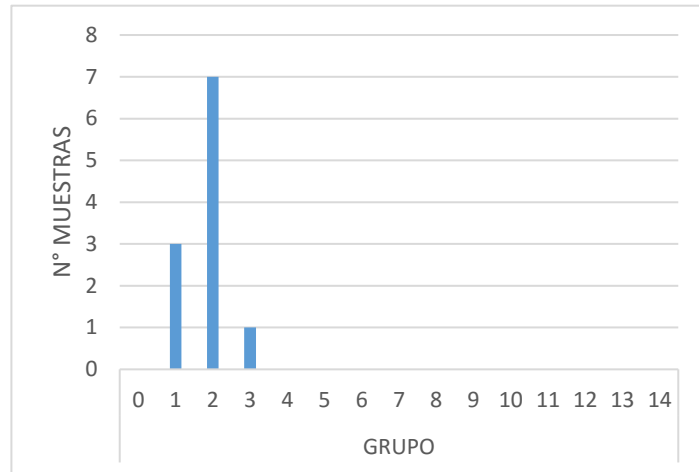
$\bar{x}$  : Promedio de título de anticuerpos.

**EE** : Error estándar :  $EE = \frac{Ds}{\sqrt{n}}$

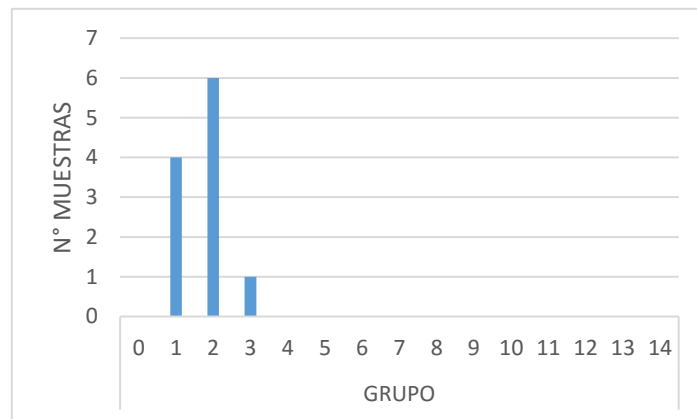
**Li - Ls** : límite inferior y superior :  $\bar{x} \pm 1.96(Ds)$

Las aves del grupo A y B tienen una mayor cantidad de anticuerpos contra la enfermedad de bronquitis infecciosa, debido a que fueron expuestos a un virus vacunal, cada barra en el histograma representa la cantidad de aves con títulos de anticuerpos dentro de un rango, es por ello que no es muy importante leer los títulos individuales, sino como están agrupados. Estos valores se encuentran dentro del rango establecido por el laboratorio IDEXX para el kit de ELISA indirecta, mostrando la uniformidad de la vacunación vía ocular y agua de bebida; por lo tanto las

vacunaciones vía ocular y agua de bebida confieren una titulación de anticuerpos aceptable para la protección frente a un desafío de campo por bronquitis infecciosa. (fig. 1 y 2).



**Figura 1. Título de anticuerpos de la primo vacunación vía ocular a los 19 días de edad.**

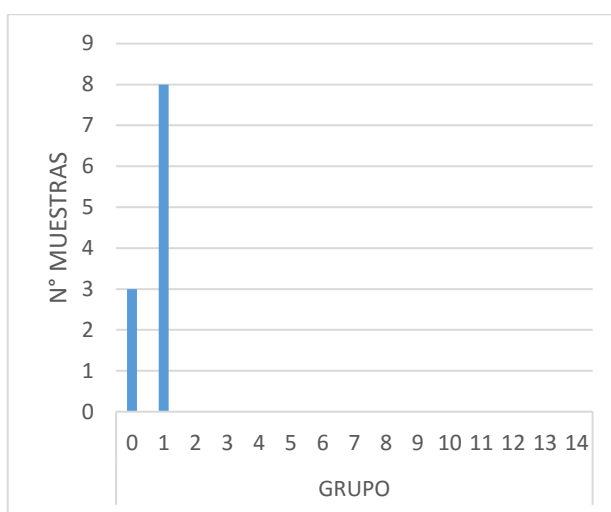


**Figura 2. Título de anticuerpos de la primo vacunación vía agua de bebida a los 19 días de edad.**

En el grupo control (C) los cuales no fueron vacunados; se encontraron anticuerpos contra la enfermedad de bronquitis infecciosa pero en una cantidad mínima según el rango establecido por el laboratorio IDEXX para el kit de ELISA indirecta, incluso 4 muestras encontrándose fuera del rango aceptable; Estos títulos

de anticuerpos son debido a las transferencias maternas. Por lo tanto estos títulos de anticuerpos pueden ofrecer una respuesta baja frente a un desafío de campo por bronquitis infecciosa (fig. 3).

**Ristow, (2010)**, menciona que es importante evaluar la eficiencia de la aplicación de las vacunas vivas, para saber si se está preparando de manera adecuada el sistema inmune para una buena respuesta a los desafíos de campo.



**Figura 3. Título de anticuerpos de la primera evaluación del grupo (C) sin vacunar a los 19 días de edad.**

Los títulos de anticuerpos obtenidos a los 12 días post revacunación (32 días de edad), revacunados por las mismas vías (ocular y agua de bebida) a los dos grupos experimentales se observa que no hay una diferencia significativa ( $P \geq 0,05$ ) entre los grupos A y B, pero si hay diferencia significativa ( $P \geq 0,05$ ) entre los grupos A y C, y entre los grupos B y C. Numéricamente los Títulos más altos lo presentaron los pollos del grupo A (vía ocular) con una media de  $4080 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , frente a los pollos del grupo B (vía agua de bebida) con  $3568 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  y el grupo C (Control) con  $130 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .(cuadro 4).

**Cuadro 4. Título de anticuerpos µg/ µl a los 12 días post revacunación, 32 días de edad. Prueba de ELISA Indirecta.**

Nº de muestras	A: vía ocular	B: vía agua de bebida	C: Control
1	3800	3380	93
2	5777	4025	172
3	3980	2800	111
4	4093	3778	198
5	2555	4045	97
6	5600	2998	162
7	4025	5015	127
8	2200	3070	89
9	3775	2128	63
10	3999	3991	136
11	5080	4026	180
$\bar{X}$	<b>4080<sup>a</sup></b>	<b>3568<sup>a</sup></b>	<b>130<sup>b</sup></b>
<b>EE</b>	<b>22.3</b>	<b>20.53</b>	<b>26.3</b>
<b>Ds</b>	<b>1060</b>	<b>753</b>	<b>42</b>
<b>Li</b>	<b>2002</b>	<b>2092</b>	<b>47</b>
<b>Ls</b>	<b>6157</b>	<b>5043</b>	<b>212</b>

- ❖ **Letras iguales: no existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).**
- ❖ **Letras diferentes: existe diferencia significativa.**

**Ds** : Desviación estándar

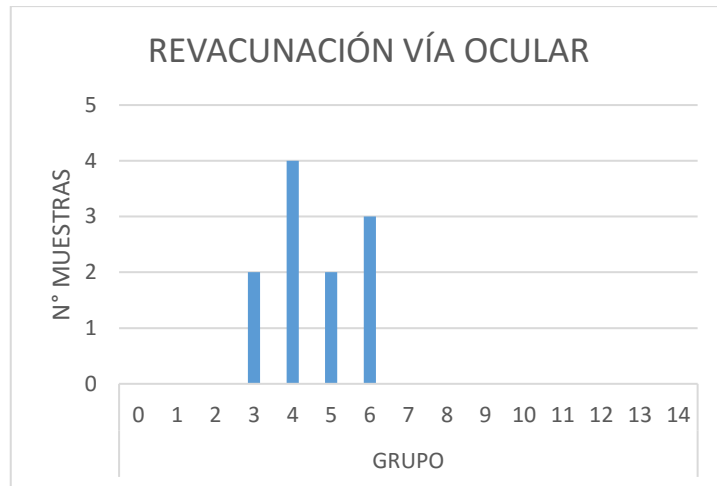
$\bar{X}$  : Promedio de título de anticuerpos.

**EE** : Error estándar :  $EE = \frac{Ds}{\sqrt{n}}$

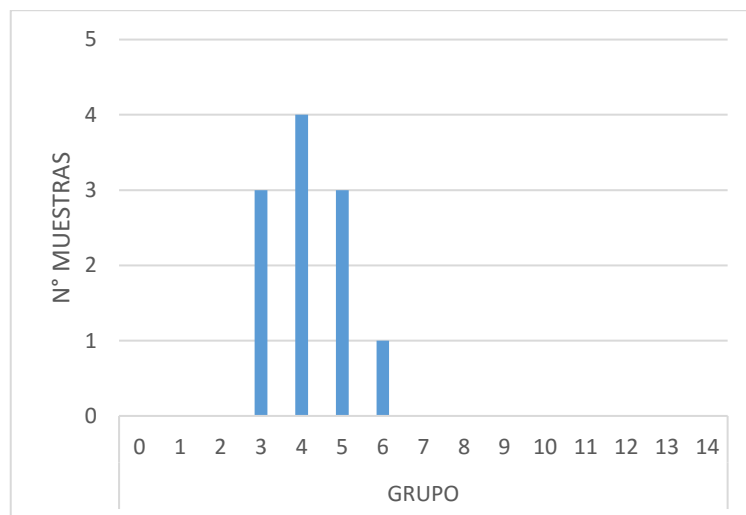
**Li - Ls** : límite inferior y superior :  $\bar{X} \pm 1.96(Ds)$

A los 32 días de edad, 12 días post revacunación se puede observar un aumento en los títulos de anticuerpos del grupo A y B, contra la enfermedad de bronquitis infecciosa, debido a que fueron expuestos nuevamente a un virus vacunal, estos valores se encuentran dentro del rango establecido por el LABOTARIO IDEXX para el kit de ELISA indirecta, mostrando la uniformidad de la vacunación vía ocular y agua de

bebida ; confiriendo una titulación de anticuerpos óptimos para una buena respuesta inmunitaria frente a un desafío de campo por bronquitis infecciosa. (fig. 4 y 5).



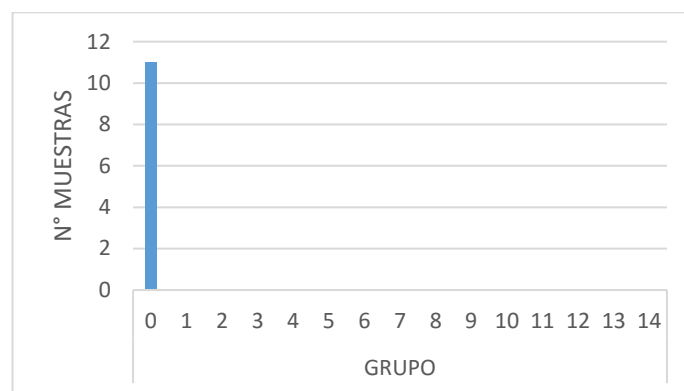
**Figura 4. Título de anticuerpo de la revacunación vía ocular a los 32 días de edad.**



**Figura 5. Título de anticuerpos de la revacunación vía agua de bebida a los 32 días de edad.**

El grupo control (C) se observa una disminución de anticuerpos contra la enfermedad de bronquitis infecciosa, producto del catabolismo de las mismas ya que

no fueron vacunadas; estos títulos de anticuerpos no se encuentra dentro del rango establecido por el LABORATORIO para el kit de ELISA indirecta; no puede ofrecer una respuesta inmunitaria frente a una desafío de campo, lo que coincide con **Cuello., et al. (2004)** que afirma que este comportamiento de los títulos de anticuerpos se relaciona directamente con el comportamiento normal del catabolismo de los anticuerpos, los títulos disminuyen porque las aves no se encuentran expuestas al agente viral. (fig. 6).



**Figura 6. Título de anticuerpos de la segunda evaluación del grupo (C) sin vacunar a los 32 días de edad.**

Los promedios aritméticos obtenidos mediante la prueba de ELISA Indirecta en los dos muestreos (19 y 32 días de edad), el cual refleja un aumento en el número de anticuerpos  $\mu\text{g/ml}$  de suero en los grupos vacunados (grupo A y B), mientras en el grupo sin vacunar (grupo C) una disminución en el número de anticuerpos. (Cuadro 5).

Nuestros resultados nos indican que las dos vías de vacunación (vía ocular y vía agua de bebida), confieren una producción de anticuerpos similares, pero no en comparación con el grupo control, observándose que existe diferencia significativa ( $P \geq 0,05$ ) de titulación de anticuerpos con el grupo control, en la primo vacunación y en la revacunación.

**Cuadro 5. Título de anticuerpos obtenidos µg/µl en la 1ra. Y 2da. Evaluación (A y B grupos experimentales y C grupo control).**

N° de muestras	A: vía ocular		B: vía agua de bebida		C: Control	
	1ra Eval.	2da Eval.	1ra Eval.	2da Eval.	1ra Eval.	2da Eval.
1	729	3800	876	3380	639	93
2	1800	5777	1615	4025	565	172
3	1450	3980	1045	2800	830	111
4	999	4093	688	3778	508	198
5	1025	2555	994	4045	237	97
6	1999	5600	1700	2998	773	162
7	1600	4025	2021	5015	459	127
8	2027	2200	1555	3070	605	89
9	1665	3775	1300	2128	523	63
10	1780	3999	1990	3991	91	136
11	885	5080	788	4026	205	180
$\bar{X}$	<b>1451<sup>a</sup></b>	<b>4080<sup>a</sup></b>	<b>1325<sup>a</sup></b>	<b>3568<sup>a</sup></b>	<b>494<sup>b</sup></b>	<b>130<sup>b</sup></b>
EE	<b>133.6</b>	<b>22.3</b>	<b>137.5</b>	<b>20.5</b>	<b>66.9</b>	<b>26.3</b>
Ds	<b>443</b>	<b>1060</b>	<b>456</b>	<b>753</b>	<b>222</b>	<b>42</b>
Li	<b>729</b>	<b>2002</b>	<b>688</b>	<b>2092</b>	<b>91</b>	<b>47</b>
Ls	<b>2319</b>	<b>6157</b>	<b>2218</b>	<b>5043</b>	<b>929</b>	<b>212</b>

**1ra. Evaluación: Letras iguales: no existe diferencia significativa.**

**2da. Evaluación: Letras diferentes: existe diferencia significativa.**

**Ds** : Desviación estándar

$\bar{X}$  : Promedio de título de anticuerpos.

**EE** : Error estándar :  $EE = \frac{Ds}{\sqrt{n}}$

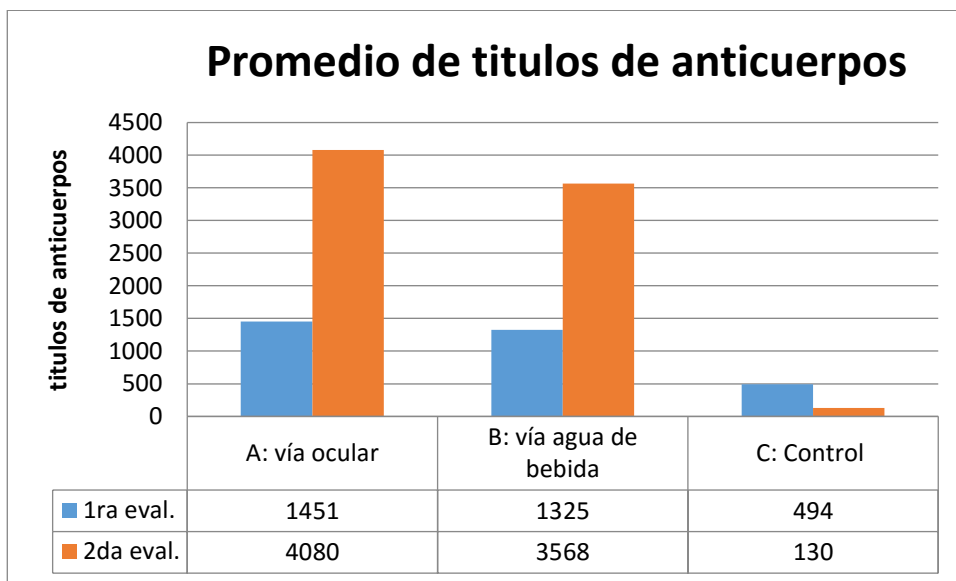
**Li - Ls** : límite inferior y superior :  $\bar{x} \pm 1.96(Ds)$

Los títulos de anticuerpos obtenidos en el Grupo A y B, se ajustan a lo mencionado por **Tizard (2000)**, quien manifiesta que a la primera vacunación se muestran títulos no muy altos y duraderos.

Los títulos de anticuerpos obtenidos en la revacunación en el Grupo A y B, se ajustan a lo mencionado por **Tizard (2000)**, quien afirma que a la segunda vacunación se muestran títulos de anticuerpos altos y duraderos, ya que hay una

memoria inmunológica para reconocer el antígeno y mayor producción de anticuerpos.

Los niveles de anticuerpos obtenidos en el Grupo Control en la segunda evaluación son relativamente bajos con relación a la primera evaluación, estos resultados se ajustan a lo mencionado por **Tizard (2000)**, quien afirma que los anticuerpos maternos disminuyen a la mitad cada 5 a 7 días, según avanza la edad del ave.



**Figura 7. Títulos promedios de la vacunación y revacunación vía ocular y vía agua de bebida.**



## V. CONCLUSIONES

1. La vacunación Vía ocular y vía agua de bebida estimularon la producción de anticuerpos contra la enfermedad de Bronquitis Infecciosa en pollos broilers.
2. La vacunación vía ocular estadísticamente confiere una similar producción de anticuerpos con respecto a la vacunación vía agua de bebida.
3. Los dos grupos vacunados presentaron una titulación de anticuerpos similares en la primera, como en la segunda evaluación.
4. Con la revacunación realizada a los 20 días de edad, se logró un aumento notable en el título de anticuerpos en los dos grupos vacunados.

## VI. RECOMENDACIONES

- Dado que la Enfermedad de Bronquitis Infecciosa, en nuestro país constituye un riesgo que puede afectar a los productores avícolas, se recomienda realizar un buen programa de vacunación de acuerdo a la zona.
- Utilizar vacunas de laboratorios reconocidos, que garanticen una vacuna de calidad.
- Realizar una evaluación serológica y el grado de protección conferido por diferentes Cepas contra la enfermedad de Bronquitis Infecciosa.
- Realizar un estudio en donde se pueda comparar la vacunación vía oral, vía ocular y vía spray.
- Continuar con el estudio, pero sometiéndolo a un desafío de campo, para así poder determinar cuál de las vías de vacunación brinda una mayor protección contra la enfermedad de Bronquitis Infecciosa.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

ACEVEDO, A. (2010). Bronquitis infecciosa aviar. Diagnóstico y control. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504. Vol. 11, N ° 03.

ALEXANDER D.J., GOUGH R.E. & PATTISON M. (1978). Un estudio a largo plazo de la patogénesis de la infección de aves con tres cepas de virus de la bronquitis infecciosa aviar. Res. Veterinario. Pág. 24, 228 - 233.

APA (ASOCIACIÓN PERUANA DE AVICULTURA). 2013. Publicada 18 de junio. Lima, Perú. Pág. 1-2.

ARNAIZ-VILLENA, A; REGUEIRO, JR; LÓPEZ, C. (1995). Inmunología aviar. 2da ed. Pág. 55. Editorial Complutense S.A. Madrid. España.

AVIAGEN. (2008). GUÍA DE MANEJO ROSS, Septiembre. Pág. 1-3. Estados Unidos.

BANDA A. (2011). Enfermedad Bolsa de Fabricio, Enfermedad de Gumboro, Enfermedades inmunodepresoras en aves, Programa vacunal Gumboro. Lima, Perú.

CAVANAGH, D., DAVIS, P.J., DARBYSHIRE, J.H., PETERS, R.W. (1986). El virus de Coronavirus IBV: La glicoproteína S2 de retención de virus pero no S1 es incapaz de inducir un anticuerpo de neutralización de virus o de inhibición de la hemaglutinación o inducir la protección traqueal del pollo. J. Gen. Virol. 1986, vol. 67: pág. 1435-1442.

CAVANAGH D., MAWDITT K., BRITTON P. y NAYLOR C.J. (1999). Estudios de campo longitudinales del virus de la bronquitis infecciosa y del neumovirus aviar en pollos de engorde utilizando reacciones en cadena de la polimerasa específicas del tipo. Avian Pathol. Pág. 28, 593 - 605.

CAVANAGH, D. (2003). Desarrollo de una vacuna contra el síndrome respiratorio agudo severo: experiencias de vacunación contra la bronquitis infecciosa aviar coronavirus. Patología Aviar. 2003, vol.32: pág. 567-582

CALNEK, BW; BARNES, H; BEARD, C; MC DOUGLAD, L. (1997). Camiones A Lemus Gamboa y A Martínez Haro. Enfermedades de las aves México: Editorial El Manual Moderno.

CLARKE J.K., MCFERRAN J.B. & GAY F.W. (1972). Utilización de células alantoides para la detección del virus de la bronquitis infecciosa aviar. Arco. Gesamte Virusforsch. Pág. 36, 62 - 70.

CUELLO, S; NODA, J; PAG; PERERA, C (2004). Bronquitis infecciosa aviar. Cinética de anticuerpos post vacunas en reproductoras y su transferencia a la progenie. 2da ed. Editorial El Manual Moderno. México.

COWEN, B; Y HITCHNER, S.B. (1975). Estudios de estabilidad de pH con cepas de virus de la bronquitis infecciosa aviar (Coronavirus). J. Virol. 1975, vol. 15: pág. 430-432.

COMOTTO, GE. (2000). Enfermedades de las aves. 1ra ed. Pág. 1-95. Editorial, Lima. Perú.

DAWSON, P; Y GOUGH, R. (1971). Variación antigénica en cepas de virus de la bronquitis infecciosa aviar. Editorial Arco. Pág. 30, 32 – 39.

EHEVARRÍA, R; Y GUANOCHANG, JC. (1996). Titulación de anticuerpos contra Newcastle y Bronquitis infecciosa en dos razas de reproductoras para broiler tanto en la madre como en la descendencia en tres etapas diferentes. Tesis de médico en medicina veterinaria. Universidad central del Ecuador. Ecuador.

FENNER, F.; MURPHY, F; WHITE, D (1993). Virología veterinaria. 2da ed. Pág. 225 – 315. Universidad de Georgia. Facultad de Medicina Veterinaria de Georgia. Estados unidos.

GÓMEZ-LUCÍA, E.; BLANCO, M.; DOMENECH, A, (2006). Manual de inmunología Veterinaria. 2da ed.: editorial; Zaragoza. Madrid. España.

GUTIÉRREZ, JE. (2010). Inmunología Veterinaria. Editorial Texas: El Manual Moderno. Pág. 11. México.

IVITA (Instituto Veterinario de Investigación en Trópico y Altura). 1998. REVISTA DE INVESTIGACIÓN PECUARIA. (Perú). Pág. 81 - 84.

JORDANIA, F; PATTISON, M (1998). Enfermedades de las aves Camiones AF Martínez Haro y A Lemus Gamboa. 3 ed. México: El manual Moderno.

KING, D.J. (1984). Observaciones sobre la preparación y estabilidad del antígeno de hemaglutinación del virus de la bronquitis infecciosa del virus propagado en embriones de pollo y cultivos de células de riñón de pollo. Avian Dis., vol. 28: pág. 504-513.

LAI, M. Y CAVANAGH, D. (1997). La biología molecular del coronavirus. Advances in Virus Research, vol. 48: pág. 1-100

MARTINS, N.R., MOCKETT, A.P., BARRETT, A.D., COOK, J.K. (1991) Respuestas en el suero de pollo a vacunas vivas e inactivadas de virus de la bronquitis infecciosa. Vol. 35. Nuevo Jersey, Estados Unidos.

MARTINS, N.R., MOCKETT, A.P., BARRETT, A.D., COOK, J.K. (1991). IgM en vacunas de virus de la bronquitis infecciosa viva y vacuna inactivada de suero de pollo. Avian Dis. vol. 35: pág. 470-475.

MOCKETT A.P.A. & DARBYSHIRE J.H. (1981). Estudios comparativos con un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para anticuerpos contra el virus de la bronquitis infecciosa aviar. Avian Pathol., pág. 10, 1 - 10.

MORENO, C. R. (1994). La bronquitis infecciosa de las aves y métodos de Genética Molecular utilizada para su diagnóstico.

MORILLA, A. (1989). Inmunología Veterinaria. 2ed. Pág. 25–200. México: Editorial Diana.

OTSUKI, K., YAMAMOTO, H Y TSUBOKURA, M. (1979). Estudios sobre el virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV) I. Resistencia de IBV a tratamientos químicos y físicos. Arco. Virol; vol. 60: pág. 25-32.

PEI, J., SEKELICK, M.J., MARCUS, P.I., CHOI, I.S., COLLISSON, E.W. (2001). El interferón tipo I del pollo inhibe la replicación del virus infeccioso y la enfermedad respiratoria asociada. Inmunología aviar. Pág. 25. Toronto. Canada.

PERALTA, E; Y FRÍAS, M (1987). Manual sobre la técnica inmunoenzimática ELISA. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. 3ra edición. Pág. 23. Editorial; La Habana. Cuba.

PHIL, D, Y LUCKERT, D. (2001). El rol de los anticuerpos maternos en el control de la Enfermedad de Gumboro. New Jersey.

ROJO, E. (1984). Curso de especialización en la producción animal: Enfermedades de las aves. 2da ed. Pág. 45. Editorial Trillas. México.

RODRÍGUEZ, J.F. (2011).Tipos de vacunas contra las enfermedades de las aves. Editorial. Trillas. 2da ed. Pág. 30-33. México.

RIVES, D (1992). Salud avícola. Entendiendo a la serología en la Industria Avícola. Bogotá; Colombia. Pág. 5-7.

SAINSBURY, D. (2002). Salud y manejo de aves de corral. 4ta ed. Buenos aires: editorial Inter Médica. Pág. 23- 50.

SOLVAY, A. (1992). Memorias del III Seminario Latinoamericano de Sanidad Avícola: El Sistema Inmunológico Aviar. Bogotá. Colombia.

SHARMA, JM. (1997). Estructura y función del sistema inmune aviar. 3ra ed. México. Pág. 30-35.

PANISELLO, T. Y GINER, A. (2010). Pfizer Salud Avícola. Virus de la bronquitis infecciosa aviar "un enemigo cambiante". Pág. 23 - 24.

TIZARD, I. (1996). Inmunología Veterinaria. Trad. MC Aiza 5ta edición. México: Me Graw Hill Interamericana.

VARGAS, O. (2003). PRONACA Memorias VI Seminario de Actualización Avícola Ecuador: Importancia del Laboratorio de Diagnóstico en la Avicultura. Pág. 11.

VILLEGAS, P. (1996). Memorias VII Seminario Internacional de Patología Aviar. Camiones G Zavala y S Leal. Facultad de Medicina Veterinaria de Georgia, Universidad de Georgia. Estados unidos.

VILLEGAS, P. (1982). Técnicas en virología histopatología y micoplasmas aviares. Centro de Educación Continua, Facultad de Medicina Veterinaria de Georgia. Universidad de Georgia, Estados unidos. Pág. 10-50.

VILLEGAS, P. (2012). Virus infecciosa aviar, Centro de Diagnóstico e Investigación de Enfermedades Aviares, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Georgia, Georgia, Estados Unidos. Pág. 11-23.

## VIII. WEBGRAFÍA

BERMÚDEZ, S. (2006). Patología Aviar (en línea). Consultado 22 nov. 2016. Disponible en: <http://patologiaaviaruptc.blogspot.com/2006/11/el-sistema-inmune-aviar.html>.

RAMIREZ, A (2008). Sistema inmune de las aves (en línea). Disponible en: [http://www.avicultura.com.mx/uploads/tem/articulo\\_Sistema\\_inmune\\_del\\_pollo.pdf](http://www.avicultura.com.mx/uploads/tem/articulo_Sistema_inmune_del_pollo.pdf)

RISTOW, E. (2010). Consideraciones para la interpretación de resultados serológicos a través de la metodología ELISA en avicultura. (En línea). Perú. Disponible en: [http://www.microclin.com/archivos/interpretación\\_de\\_exámenes\\_serologicos\\_ELISA\\_D\\_L\\_E\\_Ristow.pdf](http://www.microclin.com/archivos/interpretación_de_exámenes_serologicos_ELISA_D_L_E_Ristow.pdf).

ROBIN, O (2006). Sistema inmune aviar: Estrategia de protección de las aves y importancia de su buen funcionamiento (en línea). Disponible en: [http://www.wpsa-acc.es/acca\\_docs/dr.\\_oscar\\_robin.pdf](http://www.wpsa-acc.es/acca_docs/dr._oscar_robin.pdf).

## IX. ANEXOS

**CUADRO 6. Hoja de informe de vacunación vía ocular.**

GRANJA: FMV Y Z – UNHEVAL

GRUPO: A

Galpón	1	1
Fecha	16/07/16	29/07/16
Nº Aves	50	50
Edad	7 días	20 días
Dosis/ave	1 gota/ ave	1 gota/ ave
Cant. Diluyente	2.5 ml	2.5 ml
Hora inicio	8:17 am	8:34 am
Hora final	8:38 am	9:01 am
Lote	027/14	027/14
Fecha Exp.	NOV/17	NOV/17
100	1	1
200		
500		
Dosis	100	100
Vacío	Ok	Ok



**CUADRO 7. Hoja de informe de vacunación vía agua de bebida.**

<b>GRANJA: FMV Y Z - UNHEVAL</b>		<b>GRUPO: B</b>
Galpón	1	1
Fecha	16/07/16	29/07/16
N° Aves	50	50
Edad	7 días	20 días
Cant. Agua	400 ml	1000 ml
Estabilizador de cloro	½ pastilla	½ pastilla
Hora inicio	8:00 am	8:13 am
Hora final	8:50 am	9:10 am
Lote	027/14	027/14
Fecha Exp.	NOV/17	NOV/17
100	1	1
200		
500		
1000		
Dosis	100	100
Vacío	Ok	Ok

**Cuadro 8. Análisis de varianza de los títulos promedios de los dos Grupos Experimentales y Grupo control a los 12 días post vacunación (19 días de edad)**

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Fc. Calculada	Ft. Requerida
Tratamiento	2	5944336.78	2972168.32	17.87	3.32
Error	30	4898494.73	166316.41		
Total	32	10933831.73			

**Cuadro 9. Prueba de Tukey de los títulos promedios de los dos grupos experimentales y Grupo control a los 12 días post vacunación (19 días de edad).**

Test: Tukey Alfa: 0,05			
Tratamiento	Numero	Medias	Tukey
T1	11	1451	A
T2	11	1325	A
Control	11	494	B

**Cuadro 10. Análisis de varianza de los títulos promedios de los dos grupos experimentales y Grupo control a los 12 días post revacunación (32 días de edad).**

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Fc. Calculada	Ft. Requerida
Tratamiento	2	101537392.5	50768696.25	82.37	3.32
Error	30	18490264.4	616342.1467		
Total	32	120027657			

**Cuadro 11. Prueba de Tukey de los títulos promedios de los dos grupos experimentales y Grupo control a los 12 días post revacunación (32 días de edad).**

Test: Tukey Alfa: 0,05			
Tratamiento	Numero	Medias	Tukey
T1	11	4080	A
T2	11	3568	A
Control	11	130	B



Figura 8. Fotografía de la viruta seca utilizado como material de cama para los pollos.



Figura 9. Fotografía de la instalación del microclima para la recepción del pollo BB.



Figura 10. Recepción del Pollito BB.



Figura 11. Fotografía del termómetro, para monitorear la temperatura del ambiente.



Figura 12. Medición del cloro previo a la vacunación vía ocular (cloro = 1.5 y pH= 7.6, ambos con medición ideal)



Figura 13. Reconstitución de la vacuna liofilizada, para la vacunación vía ocular.



Figura 14. Vacunación vía ocular (a los 7 días de edad).



Figura 15. Vacunación vía ocular (a los 20 días de edad).



Figura 16. Medición del cloro previo a la vacunación vía agua de bebida (cloro = 1.5 y pH= 7.6).



Figura 17. Reconstitución de la vacuna liofilizada para su aplicación vía agua de bebida.



Figura 18. Vacunación vía agua de bebida a los 20 días de edad.

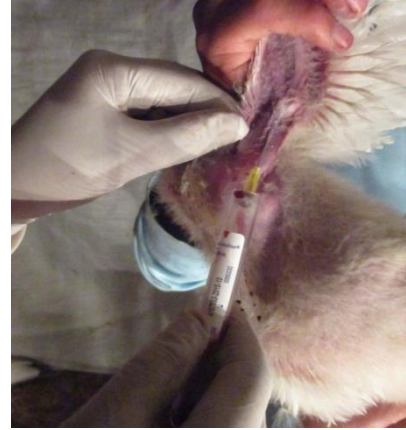


Figura 19 y 20. Colección de la muestra con tubos al vacío.

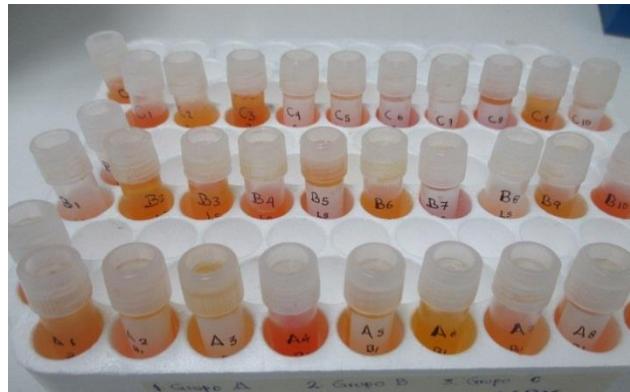
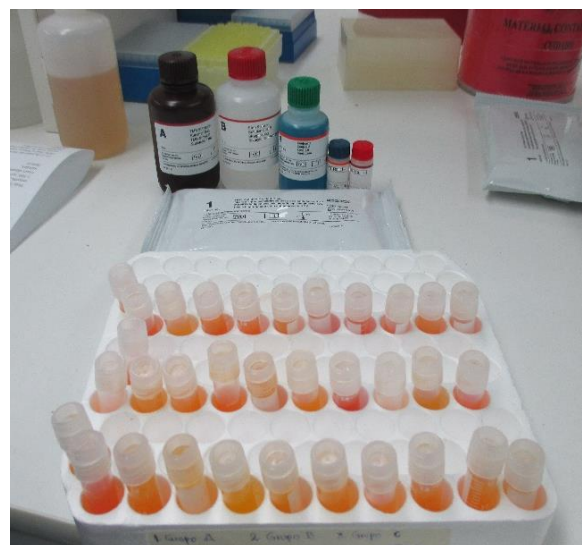
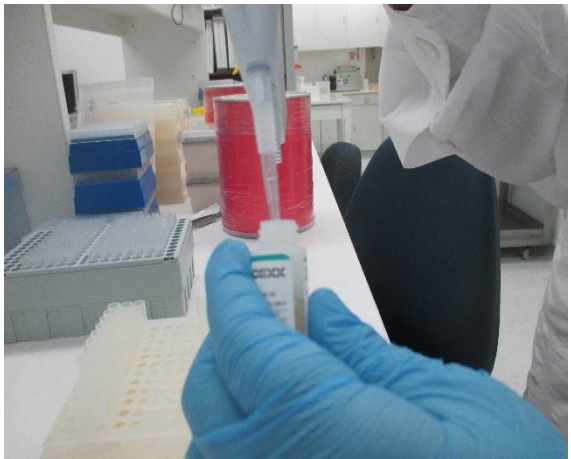
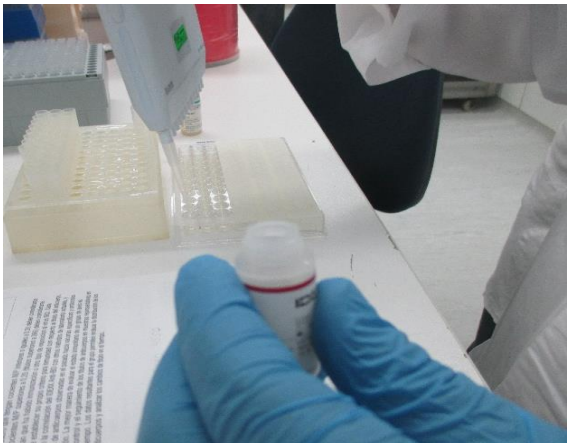
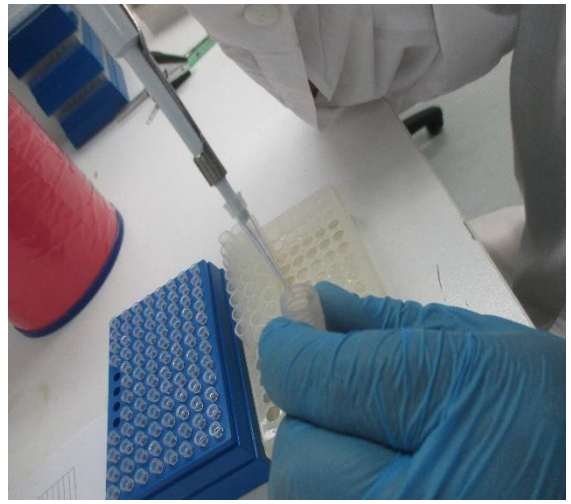
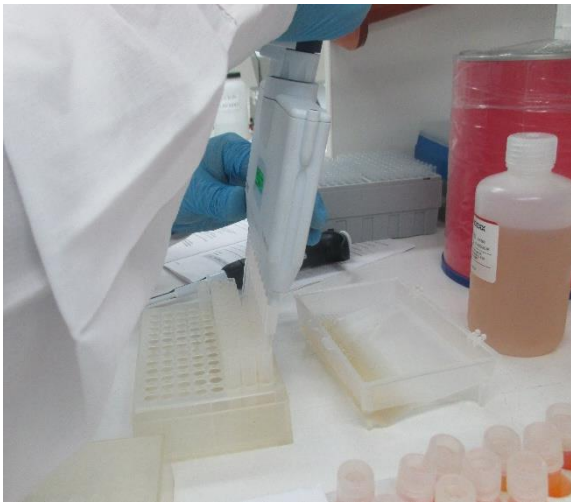
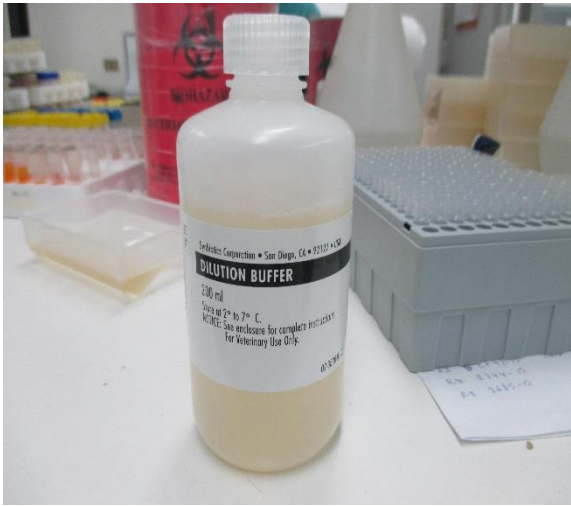
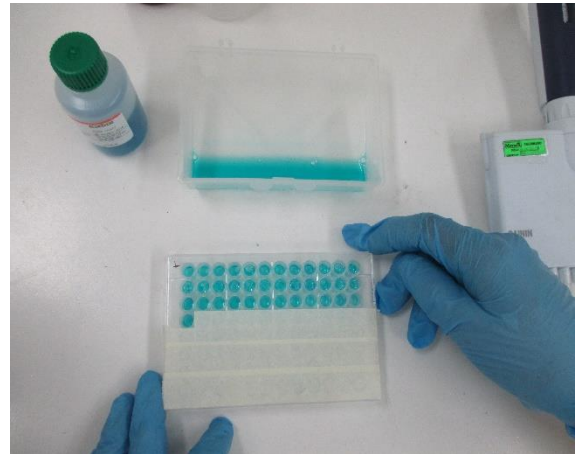


Figura 21. Sueros que fueron procesados en la Unidad de Centro de Diagnóstico de Sanidad Animal, SENASA – LIMA.









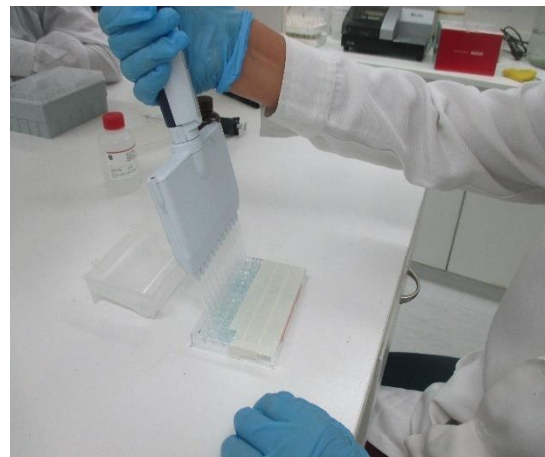
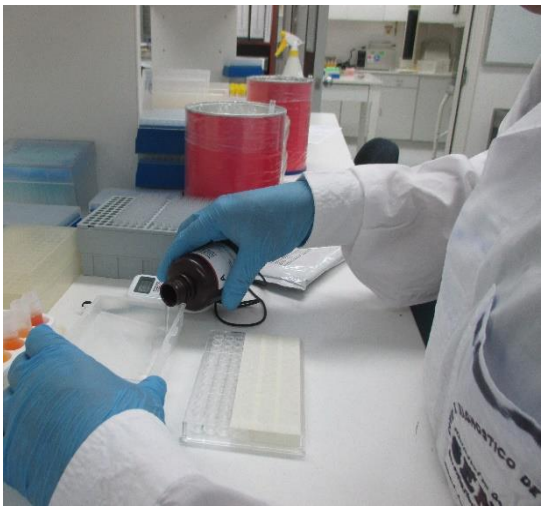
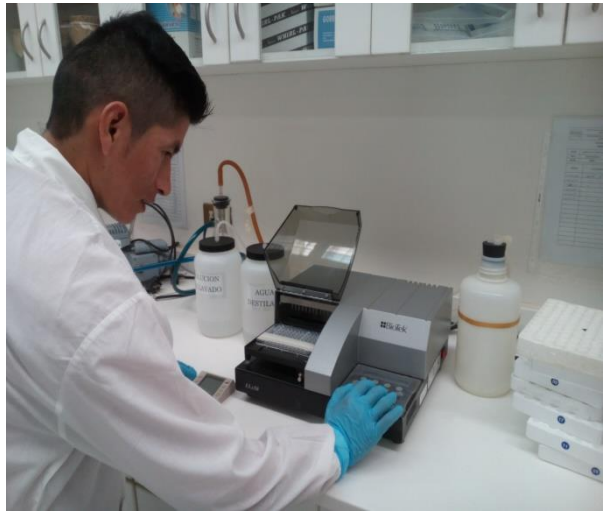


Figura 22. Imágenes de procedimiento de la ejecución de la Prueba de ELISA.

## **NOTA BIOGRÁFICA**

### **DATOS PERSONALES**

Apellido Paterno : Estela  
Apellido Materno : Cotrina  
Nombres : Wilson Jhon  
Fecha de Nacimiento : 28 de marzo de 1986, Padre Abad – Ucayali.

### **EDUCACION**

Primaria : Escuela Primaria De Menores “Esteban Pavletich”  
(1993-1998)  
Secundaria : Colegio Nacional Industrial “Hermilio Valdizan” (1999-  
2003)  
Superior : Universidad Nacional Hermilio Valdizán.  
: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.  
: E.A.P. Medicina Veterinaria  
Grado obtenido : Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2014



## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En la ciudad de Huánuco, Distrito de Pillco Marca, a los veintinueve días del mes de junio del 2017, siendo las once horas, de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos se reunieron en el Auditorio de la Facultad, los Miembros integrantes del Jurado examinador para proceder a la Evaluación de Sustentación de Tesis Titulada: "TITULO DE ANTICUERPOS CONTRA BRONQUITIS INFECCIOSA EN BROILERS VACUNADOS CON LA CEPA MASSACHUSETTS VÍA OCULAR Y AGUA DE BEBIDA"; del Bachiller Wilson Jhon ESTELA COTRINA, para OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO, estando integrado por los siguientes miembros:


- Mg. Augusto BAZÁN GARCÍA Presidente
- Mg. Ernestina ARIZA AVILA Secretaria
- Mg. Walter Richard TASAYCO ALCÁNTARA Vocal

Finalizado el acto de sustentación, los miembros del Jurado procedieron a la calificación, cuyo resultado fue *Aprobada*, con la nota de *Dieciséis (16)*, con el calificativo de: *Bueno*

Con lo que se dio por finalizado el proceso de Evaluación de Sustentación de Tesis. Siendo a horas *12:20 m*, en fe de la cual firmamos.

  
Mg. Augusto Bazán García  
PRESIDENTE

  
Mg. Ernestina ARIZA AVILA  
SECRETARIA

  
Mg. Walter Richard Tasayco Alcántara  
VOCAL

## AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN DE TESIS ELECTRÓNICAS DE PREGRADO

### 1. IDENTIFICACIÓN PERSONAL (especificar los datos de los autores de la tesis)

Apellidos y Nombres: ESTELA COTRINA, WILSON JHON

DNI: 43559892 Correo electrónico: WJESTELACOTRINA@gmail.com

Teléfonos: Casa \_\_\_\_\_ Celular 930732050 Oficina \_\_\_\_\_

Apellidos y Nombres: \_\_\_\_\_

DNI: \_\_\_\_\_ Correo electrónico: \_\_\_\_\_

Teléfonos: Casa \_\_\_\_\_ Celular \_\_\_\_\_ Oficina \_\_\_\_\_

Apellidos y Nombres: \_\_\_\_\_

DNI: \_\_\_\_\_ Correo electrónico: \_\_\_\_\_

Teléfonos: Casa \_\_\_\_\_ Celular \_\_\_\_\_ Oficina \_\_\_\_\_

### 2. IDENTIFICACIÓN DE LA TESIS

<b>Pregrado</b>	
Facultad de:	<u>MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA</u>
E. P. :	<u>MEDICINA VETERINARIA</u>

Título Profesional obtenido:

\_\_\_\_\_

Título de la tesis:

TITULO DE ANTICUERPOS CONTRA BRONQUITIS INFECCIOSA EN BROILERS  
VACUNADOS CON LA CEPA MASSACHUSETTS VÍA OCULAR Y AGUA DE BEBIDA

Tipo de acceso que autoriza(n) el (los) autor(es):

Marcar "X"	Categoría de Acceso	Descripción del Acceso
<input checked="" type="checkbox"/>	PÚBLICO	Es público y accesible al documento a texto completo por cualquier tipo de usuario que consulta el repositorio.
<input type="checkbox"/>	RESTRINGIDO	Solo permite el acceso al registro del metadato con información básica, más no al texto completo

Al elegir la opción "Público", a través de la presente autorizo o autorizamos de manera gratuita al Repositorio Institucional – UNHEVAL, a publicar la versión electrónica de esta tesis en el Portal Web [repositorio.unheval.edu.pe](http://repositorio.unheval.edu.pe), por un plazo indefinido, consintiendo que con dicha autorización cualquier tercero podrá acceder a dichas páginas de manera gratuita, pudiendo revisarla, imprimirla o grabarla, siempre y cuando se respete la autoría y sea citada correctamente.

En caso haya(n) marcado la opción "Restringido", por favor detallar las razones por las que se eligió este tipo de acceso:

---

---

Asimismo, pedimos indicar el período de tiempo en que la tesis tendría el tipo de acceso restringido:

- 1 año
- 2 años
- 3 años
- 4 años

Luego del período señalado por usted(es), automáticamente la tesis pasará a ser de acceso público.

Fecha de firma: 12 de octubre del 2018

Firma del autor y/o autores:





"Año de la consolidación del Mar de Grau"



UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZÁN – HUÁNUCO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

RESOLUCIÓN N° 055-2016-FMVZ/D

Huánuco, 27 de Abril del 2016

Visto, la solicitud presentada por el estudiante **WILSON JHON ESTELA COTRINA**, quién pide la designación de la Comisión Revisora Adhoc para la revisión de su Proyecto de Tesis Titulado: **"TITULACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA BRONQUITIS INFECCIOSA EN POLLOS BROILERS VACUNADOS VIA OCULAR Y AGUA DE BEBIDA"**

**CONSIDERANDO:**

Que mediante Resolución N° 0002-2016-UNHEVAL-RI, de fecha 07.MAR.16, se aprueba encargar interinamente el cargo de Decano al M.Sc. Julio Cesar Díaz Zegarra, a partir del 07 de marzo de 2016 hasta la elección del Decano respectivamente, de acuerdo a lo establecido por la Ley Universitaria N° 30220 y en la Guía de Adecuación de Gobierno de las Universidades Publicas aprobada mediante Resolución del Consejo Directivo N° 002-2015-SUNEDU/CD de fecha 20 de julio de 2015;

Que, con Resolución N° 034-2013-FMVZ/CF del 07.JUN.2013, se autoriza al Decano de la Facultad designar una Comisión Revisora Adhoc, para cada Proyecto de Tesis una vez aprobado el Proyecto de Tesis, dicha comisión se encarga de supervisar el desarrollo del Proyecto hasta su culminación y posteriormente ésta comisión se convierte en el Jurado Examinador para la Sustentación de la Tesis;

Que, para el presente Proyecto de Tesis el Decano se designa a la Comisión Revisora Adhoc, conformada por los siguientes docentes: **Mg. Augusto Bazán García** (Presidente); **Mg. Ernestina Ariza Avila** (Secretaria) y **M.V .Anselmo Canchez Gonzàles** (Vocal).

Que estando dentro de las atribuciones conferidas al Decano de Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia;

**SE RESUELVE:**

1° **DESIGNAR** a la Comisión Revisora Adhoc, del Proyecto de Tesis Titulado: **"TITULACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA BRONQUITIS INFECCIOSA EN POLLOS BROILERS VACUNADOS VIA OCULAR Y AGUA DE BEBIDA"**, presentado por el estudiante: **WILSON JHON ESTELA COTRINA** , conformada por los siguientes docentes:

<b>Mg. Augusto Bazán García</b>	Presidente
<b>Mg. Ernestina Ariza Avila</b>	Secretaria
<b>M.V .Anselmo Canchez Gonzàles</b>	Vocal.

2° **DESIGNAR** al M.Sc. **Rosel Apaestegui Livaque**, como asesor de tesis.

3° **FIJAR** en un plazo de quince días calendarios a partir de la fecha, para que los miembros de la Comisión emitan el dictamen e informe conjunto debidamente sustentado por escrito, acerca del Proyecto de Tesis.

4° **DAR A CONOCER** esta Resolución al interesado.

Regístrese, comuníquese, archívese.





DECANATO

RESOLUCIÓN N° 080-2016-FMVZ/D

Huánuco, 20 de Mayo del 2016

Vista la carta No 6-2016 001-2016/JCL, presentado por la Comisión adhoc de Revisión del Proyecto de Tesis, dando a conocer la Aprobación de Proyecto de Tesis Titulado: "TITULO DE ANTICUERPOS CONTRA BRONQUITIS INFECCIOSA EN BROILERS VACUNADOS CON LA CEPA MASSACHUSETTS VIA OCULAR Y AGUA DE BEBIDA", a cargo del Bachiller. WILSON JHON ESTELA COTRINA.

**CONSIDERANDO:**

Que, con la Resolución N° 014-2007-UNHEVAL-CU, de fecha 17.ENE.08, se aprueba el Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Hermilio Valdizán de Huánuco, y en cumplimiento a los artículos 14, 15 y 16 del CAPITULO IV de la Modalidad de Tesis y optando por el inciso a) Presentación, Sustentación y aprobación de Tesis;

Que, mediante Resolución N° 055-2016-FMVZ/D, de fecha 27 de Abril del 2016 se designa a la Comisión Revisora Adhoc del Proyecto de Tesis Titulado: "TITULACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA BRONQUITIS INFECCIOSA EN POLLOS BROILERS VACUNADOS VIA OCULAR Y AGUA DE BEBIDA", sin embargo mediante carta No 6-2016 001-2016/JCL, presentado por la Comisión adhoc de Revisión del Proyecto de Tesis, manifiesta que debe modificarse el título debiendo ser: "TITULO DE ANTICUERPOS CONTRA BRONQUITIS INFECCIOSA EN BROILERS VACUNADOS CON LA CEPA MASSACHUSETTS VIA OCULAR Y AGUA DE BEBIDA", manifestando asimismo que ha cumplido con levantar las observaciones encontrándose apto para su ejecución.

Que estando dentro de las atribuciones conferidas al Decano de Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia;

**SE RESUELVE:**

- 1° **APROBAR**, la modificación de título sugerida por la comisión Adhoc de revisión del Proyecto de tesis, debiendo ser "TITULO DE ANTICUERPOS CONTRA BRONQUITIS INFECCIOSA EN BROILERS VACUNADOS CON LA CEPA MASSACHUSETTS VIA OCULAR Y AGUA DE BEBIDA.
- 2° **APROBAR**, el Proyecto de Tesis y su esquema de su desarrollo Titulado: "TITULO DE ANTICUERPOS CONTRA BRONQUITIS INFECCIOSA EN BROILERS VACUNADOS CON LA CEPA MASSACHUSETTS VIA OCULAR Y AGUA DE BEBIDA.: presentado por el Bach. WILSON JHON ESTELA COTRINA; encontrándose expedito para su ejecución.
- 3° **REGISTRAR** el referido Proyecto de Tesis en el Libro de Proyecto de Tesis de la Facultad, y en el Instituto de Investigación de la Facultad.
- 4° **AUTORIZAR** al Tesista para que desarrolle su Proyecto de Tesis en un plazo máximo de un año.

Regístrese, comuníquese, archívese.



M.Sc. Julio C. Diaz Zegarra  
DECANO