

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias de la Salud

**Estudio descriptivo de las técnicas de ELISA,
quimioluminiscencia y endoscopia para el sexaje de aves**

Gabriela Elizabeth Cabascango Zambrano

Medicina veterinaria

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Médico Veterinario

Quito, 19 de Mayo de 2023

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias de la Salud

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Estudio descriptivo de las técnicas de ELISA, quimioluminiscencia y
endoscopia para el sexaje de aves**

Gabriela Elizabeth Cabascango Zambrano

Nombre del profesor: Lenin Vinueza DMVZ, M.Sc

Quito, 19 de Mayo de 2023

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Gabriela Elizabeth Cabascango Zambrano

Código: 00206092

Cédula de identidad: 1719139816

Lugar y fecha: Quito, 19 de Mayo de 2023

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

Determinar y establecer el sexo en las aves silvestres tiene gran importancia para llevar a cabo estudios en aspectos como la ecología, la conservación de especies, conductas e historias de vida, defensa de territorios y otros que favorecen a la supervivencia de la especie así como los esquemas evolutivos de la misma, es por ello que actualmente es muy importante el conocimiento de las diversas técnicas utilizadas para identificar sexualmente a las aves. El propósito de la presente investigación ha sido describir las técnicas de ELISA, Quimioluminiscencia y endoscopia para la determinación sexual de aves silvestres en cautiverio, caracterizando los procedimientos utilizados en las técnicas. Se describen las técnicas de ELISA, Quimioluminiscencia y endoscopia para la determinación sexual de aves silvestres en cautiverio, adicionalmente se discute sobre la diversidad de criterios y variaciones en las metodologías utilizadas por los autores para determinar el sexo de las aves, sus ventajas y limitaciones. La endoscopía es la técnica más precisa en la identificación de los órganos sexuales, sin embargo por tratarse de un proceso invasivo y puede aumentar la tasa de mortalidad y poner en riesgo a las aves. Las técnicas inmunológicas, como ELISA y quimioluminiscencia, son útiles cuando la endoscopía no es factible o para detectar niveles bajos de hormonas sexuales. La prueba de ELISA es rápida y económica, pero puede presentar problemas de especificidad y sensibilidad. La quimioluminiscencia tiene alta especificidad y sensibilidad, pero requiere equipos costosos. Por ello, la elección de la técnica depende de las necesidades y objetivos del estudio.

Palabras clave: Diformismo sexual, aves, sexaje, ELISA, quimioluminiscencia, endoscopia.

ABSTRACT

Determining and establishing the sex in wild birds is of great importance for conducting studies on aspects such as ecology, species conservation, behavior and life histories, territory defense, and others that contribute to the species' survival and evolutionary patterns. Therefore, knowledge of the various techniques used for sex identification in birds is currently highly important. The purpose of this research has been to describe the techniques of ELISA, chemiluminescence, and endoscopy for the sexual determination of captive wild birds, characterizing the procedures used in these techniques. ELISA, chemiluminescence, and endoscopy techniques for the sexual determination of captive wild birds are described, and the diversity of criteria and variations in the methodologies used by authors to determine bird sex, along with their advantages and limitations, are discussed. Endoscopy is the most accurate technique for identifying the sexual organs; however, it is an invasive process that can increase mortality rates and put the birds at risk. Immunological techniques such as ELISA and chemiluminescence are useful when endoscopy is not feasible or for detecting low levels of sex hormones. The ELISA test is quick and cost-effective but may have issues with specificity and sensitivity. Chemiluminescence has high specificity and sensitivity but requires expensive equipment. Therefore, the choice of technique depends on the needs and objectives of the study.

Keywords: Sexual dimorphism, birds, sex determination, ELISA, chemiluminescence, endoscopy.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	10
METODOLOGÍA Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	14
RESULTADOS	16
Métodos ELISA	16
Método directo.	16
Método indirecto.	21
Método a través del análisis de las plumas.	22
Determinación del sexo por muestras fecales de aves por el método directo.....	25
Método endoscópico de sexado de aves	27
Quimioluminiscencia para la determinación sexual en aves	30
Materiales	32
DISCUSIÓN.....	36
Conclusiones.....	40
Referencias bibliográficas	41
Anexo A: Gráficos explicativos equipos, materiales e insumos método elisa	45
Anexo B: Equipos para el sexado de aves mediante endoscopia	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales e insumos para el método e quimioluminiscencia para sexado de aves .. 32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Equipos, materiales e insumos método ELISA	46
Figura 2. Equipos para el sexado de pollos por endoscopia.....	47

INTRODUCCIÓN

El dimorfismo sexual está referido a aquellas diferencias observables entre machos y hembras de la misma especie. En términos básicos, significa que un macho de una especie se distingue fácilmente de una hembra. En las aves esto suele significar diferencias de tamaño o de plumaje. También se puede notar en las diferencias de comportamiento y otros rasgos, donde los machos y las hembras muestran diferencias extremas en su plumaje, en el tamaño, entre otros. Sin embargo, esto suele ser difícil de discernir en las aves silvestres, especialmente si se ven a distancia o cuando solo hay un ave presente.

Para autores como Gómez, Palacios y De Sucre (2015), el dimorfismo sexual tanto en tamaño como en morfología se presenta en casi todas las aves, pero las diferencias alternan, por tanto, se ha propuesto que el dimorfismo sexual ha prosperado a través de la selección sexual o la diferenciación en la naturaleza del cuidado parental y en gran parte de las especies donde es evidente, el macho usualmente es más grande en tamaño que la hembra. La selección sexual involucra diferencias en el modo de reproducción como consecuencia de la competición intra-sexual por parejas, lo que sucede por la competencia o rivalidad entre los machos o por las hembras al escoger al macho.

Las aves silvestres que usualmente presentan dimorfismo sexual expresadas fenotípicamente en su morfología y tamaño suelen tener un índice elevado en el éxito de programas de reproducción, repoblación y liberación.

Se debe considerar que el dimorfismo sexual es aquellas diferencias fenotípicas, no relacionadas a los órganos sexuales entre aquellos individuos de una misma especie, pero de diferente sexo (Camargo, 2012). Estas características resultan útiles para que los veterinarios de centros de manejo de fauna logren formar una pareja reproductiva apta para los programas ya mencionados (Llerena, 2018).

Al mismo tiempo de las diferencias sexuales más indiscutibles, como las funciones reproductivas promovidas por los sistemas endocrinos concretos del sexo, se ha evidenciado que los sexos igualmente pueden diferir en sus fisiologías inmunológicas y oxidativas (Costantini, 2018; Klein & Flanagan, 2016). En virtud de que los sistemas fisiológicos están íntimamente vinculados tanto con la reproducción como con la supervivencia, el dimorfismo sexual fisiológicamente podría variar conjuntamente con las diferencias sexuales en los principales rasgos de la historia de vida, incluida la aptitud física o la demografía de las aves silvestres (Metcalf, Roth, & Graham, 2020; Nystrand & Dowling, 2020).

Sin embargo en las poblaciones adultas de casi el 50% de las especies de aves no se observa diferencia alguna entre los machos y hembras adultas o en todo caso, las diferencias morfológicas están en un nivel tal que descarta la determinación confiable del sexo. En muchas especies de aves, los machos y las hembras tienen una apariencia similar o presentan un dimorfismo sexual reducido. Esto significa que no hay características físicas distintivas que diferencien claramente a los machos de las hembras. En algunas aves, las diferencias sexuales no son visibles externamente, ya que las características que distinguen a los machos de las hembras se encuentran en órganos internos (Espinosa, Castro, & Cruz-Bernate, 2021).

Determinar y establecer el sexo en las aves silvestres, es preciso para llevar a cabo estudios en aspectos como la ecología, la conservación de especies, conductas e historias de vida, defensa de territorios, cuidado y modelaje conductual para las crías, defensa y lucha contra los diferentes tipos de depredadores, posible cópulas extra parejas, relación porcentual histórica de sexos, variedad de hábitats requeridos para la supervivencia de la especie así como los esquemas evolutivos de la misma (Espinosa, Castro, & Cruz-Bernate, 2021).

De acuerdo a Gutiérrez (2021), actualmente y a nivel mundial se evidencia un elevado desconocimiento sobre las diversas técnicas utilizadas para identificar sexualmente a las aves,

lo cual obstaculiza la comprensión sobre aspectos ecológicos y biológicos reproductivos de las especies. Por tanto, el sexaje es una medida importante para la realización de investigaciones referente a la “ecología, biología evolutiva, genética de poblaciones, identificación forense y conservación de especies amenazadas, en peligro de extinción, ya que la técnica asigna el género correcto que evita el emparejamiento de individuos del mismo sexo en programas de cría en cautiverio” (Gutiérrez, 2021, pág. 1), lo cual es altamente relevante al escoger individuos de una determinada especie para ser devueltos libres a su hábitat natural y repoblar tanto áreas geográficas endémicas de estas especies como aumentar el número de ejemplares y asegurar su subsistencia.

Gutiérrez (2021), refiere que estimaciones conservadoras estiman que cerca del 50% de aves adultas a nivel mundial, aun no se les ha determinado ni conocido el sexo, y se asume o cree que esta proporción se incrementa en las poblaciones juveniles. Esta representa una problemática a nivel global, debido a que a áreas de conocimiento muy específicas como la ecología de poblaciones y ecología de la conservación, el conocimiento que se tenga del sexo de las aves provee información tanto suficiente como competente para el desarrollo de proyectos de conservación en sitio a través de la reintroducción de individuos en circunstancias vulnerables, en evidente y claro peligro de extinción o amenazadas tanto por la actividad directa del hombre sobre su hábitat como de la caza indiscriminada con diferentes fines económicos, este repoblamiento se efectúa para el sostenimiento de un número apropiado de aves en poblaciones silvestres. Por ejemplo, en algunas aves rapaces, la única forma confiable de determinar el sexo es mediante técnicas como la endoscopia o la ecografía que permiten examinar los órganos reproductores internos.

Ante esta perspectiva, es importante adelantar estudios que permitan ampliar el portafolio de pruebas diagnósticas para la determinación adecuada, segura y confiable del sexo de aves

silvestres debido al dimorfismo sexual característico de muchas especies de aves en la vida silvestre.

En los centros de manejo y rescate, al igual que en los hospitales de fauna silvestre, cada uno de los pacientes que ingresan deben de ser sexados como parte del procedimiento de rutina. A raíz de que no todas las aves presentan dimorfismo sexual, se han creado diversos mecanismos de sexaje que van desde mediciones anatómicas, endoscopias, métodos varios e incluso identificación cromosómica o micro densitometría de los núcleos de células sanguíneas.

Para esto se han empleado variados protocolos de laboratorio como la hidrólisis enzimática, el radioinmunoensayo, la quimioluminiscencia, la cromatografía líquida de alta densidad o ELISA, entre otros (Pólit, 2022), los cuales han sido exitosos en temas como la identificación de sexo con precisión de individuos, variación estacional en aves incluso han logrado establecer rangos predictivos de actividad gonadal y la variación estacional de las aves (Bercovitz, et al., 1982). Existen estudios que han obtenido un diagnóstico acertado hasta del 92% en hembras y del 74% en machos de diversas especies empleando una única muestra fecal por individuo de estudio (Stavy, Gilbert, & Martin, 1979).

Por otra parte, los inmunoensayos quimioluminiscentes ayudan a la medición de la concentración de testosterona circulante total y en el caso del estradiol funciona de manera similar para su medición (García-Feria & Valdespino, 2015). Por esta razón, el uso de las diferentes técnicas se utilizan como métodos de determinación sexual en aves que no presentan un dimorfismo sexual.

Ante esta realidad se presenta el siguiente objetivo de la investigación:

Describir las técnicas de ELISA, quimioluminiscencia y endoscopia para la determinación sexual de aves silvestres en cautiverio.

Como objetivos específicos se plantea lo siguiente:

- Caracterizar los procedimientos utilizados en las técnicas de ELISA, Quimioluminiscencia y endoscopia para la determinación sexual de aves silvestres en cautiverio.
- Evidenciar desde la perspectiva teórica cuál de estas pruebas es la más factible de usar con resultados más asertivos

METODOLOGÍA Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El presente estudio se concibe desde el enfoque cualitativo, con diseño descriptivo y documental. En este sentido, se considera cualitativo porque pretende desde los fundamentos teóricos evaluar el desarrollo natural de los sucesos, sin manipulación de variables ni de la realidad, por tanto, se basa en la interpretación enfocada en la comprensión del significado de las acciones de seres vivos, de modo que el investigador va captando la realidad durante el desarrollo de su estudio (Hernández , Fernández , & Baptista , 2014).

El estudio se considera descriptivo porque procura la especificación de las “propiedades, características y perfiles de [...] procesos, objetos o cualquier fenómeno que se someta a análisis. Es decir, [...] pretenden medir o recoger información de manera independiente o conjunta sobre los conceptos o las variables a las que se refieren” (Hernández, et al., 2014, pág. 125). En este sentido, se pretende describir y caracterizar las técnicas de ELISA, Quimioluminiscencia y endoscopia para la determinación sexual de aves silvestres en cautiverio desde la perspectiva de la revisión de la literatura.

El diseño del estudio asume la perspectiva documental por cuanto se basa en la revisión analítica de la literatura referente al tema objeto de estudio, la cual será obtenida de fuentes

escritas, tanto de textos físicos como de artículos e investigaciones publicadas en bases de datos científicas, así como en la literatura gris proveniente de páginas de entes u organizaciones oficiales sobre la materia en estudio. En este sentido, la revisión analítica de la literatura radica en “un paso de investigación que consiste en detectar, consultar y obtener la bibliografía y otros materiales útiles para los propósitos del estudio, de los cuales se extrae y recopila información relevante y necesaria para el problema de investigación” (Hernández, et al., 2014, pág. 94).

RESULTADOS

En el presente apartado se presentará la información descriptiva obtenida de los diferentes autores con lo cual se podrá disponer de la información estructurada sobre los diferentes métodos que corresponden a ELISA, endoscopía y quimioluminiscencia.

Métodos ELISA

El método ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) para determinar el sexo de un ave es una técnica que se emplea para valorar los parámetros de los niveles de péptidos, proteínas, anticuerpos y hormonas, apoyada en el principio de unión antígeno-anticuerpo.

Existen algunas variaciones del método ELISA, mismas que se describen a continuación.

Método directo.

A continuación se presenta de forma estructurada y sintetizada la información proporcionada por los autores Orrantia-Borunda & Rivas-Cáceres (2006), R-Biopharm (2021), Yu, et al. (2008), Hidayat & Wulandar (2021) acerca del método directo ELISA, mediante la cual se puede observar los materiales, insumos y pasos para aplicar el método, como sigue:

Materiales e insumos

Para aplicar el método ELISA directo en la determinación sexual de las aves se requieren los siguientes materiales e insumos:

Materiales:

- Placa de microtitulación.
- Micropipetas automáticas y puntas de pipetas.
- Solución tampón de carbonato/bicarbonato (para recubrimiento).
- Solución tampón fosfato salino (PBS).

- Solución de bloqueo (por ejemplo, solución de leche desnatada al 5%).
- Lavador de placa automático o manual.
- Solución de lavado (por ejemplo, PBS + Tween-20).
- Reactivo sustrato cromogénico (por ejemplo, TMB o TMBZ).
- Solución de parada (por ejemplo, ácido sulfúrico 2N).

Insumos:

- Anticuerpos marcados específicos para la proteína del sexo opuesto de las aves.

Es importante mencionar que la lista de materiales e insumos puede variar dependiendo del kit comercial que se utilice o si se realizan los reactivos in-house, pero los componentes mencionados anteriormente son los básicos para realizar un ELISA directo de detección sexual en aves. Así mismo los tiempos y las temperaturas pueden variar según los protocolos específicos, por lo que es esencial seguir las instrucciones del fabricante o del protocolo validado que se esté utilizando (R-Biopharm, 2021).

Pasos para la aplicación del método

1. Primeramente, se obtiene la muestra de sangre mediante punción en una de las venas del ave, generalmente en la zona de la cresta, utilizando una aguja estéril y colocarla en un tubo de ensayo o recipiente adecuado para su transporte y procesamiento
2. Después de obtener la muestra de sangre, se procede a realizar una centrifugación para separar el suero del resto de los componentes de la sangre.
3. Se prepara la placa de ELISA. La placa está compuesta por múltiples pocillos o cavidades. Primero se deben agregar los antígenos a la placa. Estos antígenos se unirán a los anticuerpos en la muestra de suero si están presentes. Para ello se diluye el anticuerpo específico para la proteína del sexo opuesto de las aves en solución tampón

de carbonato/bicarbonato (pH 9.6) y recubrir la placa de microtitulación. Incubar la placa a 4°C durante la noche.

4. Se deben bloquear las cavidades con una solución de bloqueo con solución tampón fosfato salino (PBS) y agregar la solución de bloqueo (por ejemplo, solución de leche desnatada al 5% o albúmina sérica). para evitar que se unan otras proteínas no deseadas a la placa. Luego, se agrega la muestra de suero a los pocillos correspondientes y se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora para permitir que los anticuerpos se unan a los antígenos.
5. Una vez que se ha completado la incubación, se deben eliminar las muestras no unidas y se lavan los pocillos para eliminar cualquier otro material que no esté unido. Después de esto, se agrega un conjugado a la placa, que es un anticuerpo secundario que se une a los anticuerpos primarios en la muestra de suero. Este conjugado está etiquetado con una enzima que puede ser detectada mediante un sustrato.
6. Después de que se ha permitido que el conjugado se una a los anticuerpos primarios, se agrega un sustrato cromogénico (por ejemplo, TMB o TMBZ) a la placa de microtitulación. Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
7. La enzima en el conjugado cataliza una reacción química con el sustrato, produciendo una señal detectable. Agregar la solución de parada (por ejemplo, ácido sulfúrico 2N) a la placa de microtitulación para detener la reacción. Se debe leer la absorbancia a la longitud de onda adecuada en un espectrofotómetro. La intensidad de la señal es proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra.
8. Finalmente, se mide la señal producida utilizando un lector de placas que puede detectar la cantidad de señal en cada pocillo. La intensidad de la señal se compara con los

estándares de referencia para determinar la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra.

Algunas recomendaciones que se debe considerar son:

- Estos pasos son generales y que los protocolos específicos pueden variar dependiendo de las especificaciones del fabricante o del protocolo validado utilizado. Además, es necesario seguir las instrucciones cuidadosamente y tomar todas las medidas de seguridad necesarias durante la realización del ensayo.
- Es importante utilizar una curva de calibración para cada placa de microtitulación que se utilice.
- Control de calidad: Es importante incluir controles positivos y negativos en cada placa de microtitulación que se utilice. Los controles positivos y negativos son muestras que ya se sabe que contienen o no la proteína del sexo opuesto y se utilizan para verificar que el ensayo esté funcionando correctamente.
- Interpretación de los resultados: La interpretación de los resultados del ELISA puede variar dependiendo del protocolo utilizado. Es importante seguir las instrucciones del fabricante o del protocolo validado que se esté utilizando. Además, se recomienda que los resultados se interpreten en conjunto con otros datos, como la observación de características sexuales secundarias o el análisis histológico.
- Manipulación de las muestras: Es importante manipular las muestras con cuidado para evitar la contaminación y la degradación de la proteína del sexo opuesto. Es recomendable utilizar tubos y puntas estériles para la toma y el transporte de las muestras y evitar la exposición a altas temperaturas o ciclos de congelación y descongelación repetidos.

Análisis de los resultados de la aplicación del método

Al aplicar la técnica ELISA mediante el método directo, se obtiene información sobre la presencia o ausencia de la proteína del sexo opuesto en la muestra. El resultado del ensayo es una medida cuantitativa de la concentración de la proteína del sexo opuesto en la muestra. En el caso de la determinación sexual de aves, la proteína que se busca es específica para el sexo y se encuentra en mayor concentración en los machos o en las hembras, dependiendo de la proteína utilizada en el ensayo.

Para analizar la información obtenida, se utiliza un espectrofotómetro para medir la absorbancia de las muestras y se compara con la curva de calibración que se generó previamente. La curva de calibración es una serie de estándares que contienen diferentes concentraciones de la proteína del sexo opuesto, las cuales se midieron en el espectrofotómetro y se graficaron en un gráfico de absorbancia versus concentración. Al comparar la absorbancia de las muestras desconocidas con la curva de calibración, se puede determinar la concentración de la proteína del sexo opuesto en las muestras (R-Biopharm, 2021).

La interpretación de los resultados puede variar dependiendo del protocolo utilizado y de la proteína utilizada en el ensayo. En general, si la concentración de la proteína del sexo opuesto es mayor en la muestra, se puede inferir que se trata del sexo opuesto al que se esperaría por observación de características sexuales secundarias o por el análisis histológico. Por otro lado, si la concentración de la proteína del sexo opuesto es menor o no se detecta, se puede inferir que se trata del mismo sexo al que se esperaría por observación de características sexuales secundarias o por el análisis histológico.

Variaciones del método

Actualmente hay diferentes tipos de ELISA que son directo, indirecto, sándwich o competitivo. En la etapa de inmovilización, el antígeno puede unirse de manera directa o indirecta a la placa

con los anticuerpos que se han adherido al fondo del plato. Al mismo tiempo, el antígeno se detecta de manera directa con el anticuerpo primario que se ha unido a la enzima o el antígeno es detectado indirectamente con el anticuerpo secundario que se ha unido al anticuerpo primario y la enzima (Hidayat & Wulandar, 2021).

Método indirecto.

El método indirecto de ELISA utiliza los mismos materiales que el método directo, como placas de microtitulación, soluciones de lavado y buffer de bloqueo. Sin embargo, los insumos específicos utilizados en el método indirecto son diferentes a los del método directo.

Para el método indirecto, se necesitan los siguientes insumos adicionales de acuerdo a lo sostenido por Yu, et al., (2017), R-Biopharm (2021):

- **Anticuerpo primario:** el anticuerpo primario específico para la proteína de interés que se utilizará para detectar la proteína en la muestra.
- **Anticuerpo secundario:** el anticuerpo secundario conjugado a una enzima que se utilizará para detectar la unión del anticuerpo primario a la proteína de interés. El anticuerpo secundario debe ser específico para el anticuerpo primario utilizado.
- **Sustrato para la enzima:** una solución que, cuando se agrega a la muestra, se descompone en un producto colorimétrico o fluorescente detectable. El sustrato se utiliza para revelar la actividad de la enzima conjugada al anticuerpo secundario.

Es importante destacar que el anticuerpo secundario no debe reaccionar con la proteína de interés o con la especie en la que se ha producido el anticuerpo primario para evitar resultados falsos positivos o negativos.

En resumen, el método indirecto de ELISA requiere un anticuerpo secundario adicional conjugado a una enzima, así como un sustrato para la enzima. En el método indirecto de ELISA, se obtiene una señal detectable, que puede ser un cambio de color o de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de proteína de interés presente en la muestra original.

La intensidad de la señal se mide con un lector de placas ELISA y se compara con una curva estándar generada con muestras de control de concentraciones conocidas de la proteína de interés. A partir de esta curva estándar, se puede determinar la concentración de la proteína de interés en la muestra original.

Es importante mencionar que, en el método indirecto de ELISA, el uso de un anticuerpo secundario conjugado a una enzima aumenta la sensibilidad y la especificidad del ensayo, permitiendo la detección de concentraciones más bajas de proteína de interés en la muestra. Además, el uso de un anticuerpo secundario permite la amplificación de la señal, lo que puede ser útil cuando se trabaja con muestras limitadas.

Método a través del análisis de las plumas.

En un análisis sostenido por Yu, et al., (2017); R-Biopharm, (2021); y Hidayat & Wulandar (2021), en el método ELISA para la determinación sexual en plumas, se utilizan como variantes:

- Plumas de aves
- Anticuerpos primarios y secundarios específicos para la especie y el género de la pluma que se va a analizar
- Enzima conjugada a los anticuerpos secundarios (por ejemplo, peroxidasa de rábano)
- Sustrato cromogénico o fluorogénico

Y como insumos:

- Placa de agarosa de bajo punto de fusión
- Solución de lisis (por ejemplo, Tritón X-100)
- Solución de TE (Tris-EDTA)
- Proteína de calibración (por ejemplo, albúmina de suero bovino)

Los pasos principales utilizados en este caso son:

1. Preparación de las muestras de plumas: Las plumas se limpian con solución de lavado para remover la suciedad y otros contaminantes que puedan interferir con la prueba.
2. Extracción de la proteína: Las plumas se cortan en pequeños fragmentos y se colocan en una solución de lisis para extraer la proteína. La mezcla se incuba en un baño de agua caliente durante unos minutos para asegurar una completa lisis.
3. Centrifugación: La mezcla se centrifuga para separar los restos de la pluma y otros residuos de la proteína.
4. Preparación de las muestras: La proteína se diluye con solución amortiguadora y se agita en una placa para agitar para mezclarla bien.
5. Recubrimiento de la placa: Se agrega la solución de proteína diluida a una placa de poliestireno previamente recubierta con anticuerpos específicos para la especie y el género de la pluma que se está analizando. La placa se incuba durante varias horas o durante toda la noche para permitir que los anticuerpos se unan a la proteína.
6. Lavado: La placa se lava para eliminar cualquier proteína no unida.
7. Bloqueo: Se agrega solución bloqueadora para prevenir la unión de cualquier otro anticuerpo que no sea el conjugado.

8. Adición de anticuerpos secundarios: Se agrega el anticuerpo secundario conjugado a una enzima específica que se une al anticuerpo primario unido a la proteína en la placa.
9. Lavado: La placa se lava para eliminar cualquier anticuerpo secundario no unido.
10. Adición del sustrato: Se agrega el sustrato cromogénico o fluorogénico que es transformado por la enzima conjugada en un producto coloreado o fluorescente.
11. Lectura de la placa: La placa se lee en un lector de microplacas ELISA para medir la cantidad de producto coloreado o fluorescente, lo que indica la presencia de proteína específica de la determinación sexual.

Resaltando resumidamente lo propuesto por los autores que han estudiado el método, una vez que se ha aplicado el método ELISA en las plumas y se han obtenido los resultados, la interpretación de los mismos dependerá del tipo de anticuerpo utilizado en la técnica.

En el caso del método directo, si se observa una reacción positiva en la muestra, es decir, si se produce una coloración en la pluma, se puede concluir que se ha detectado la presencia del antígeno específico para la determinación del sexo en la muestra. Si no se produce ninguna reacción, la muestra se considera negativa para la presencia del antígeno, mientras que en el caso del método indirecto, se debe realizar una lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro, que medirá la cantidad de anticuerpos secundarios unidos a los anticuerpos primarios presentes en la muestra. Si la absorbancia es alta, esto indica que hay una gran cantidad de anticuerpos secundarios unidos a los primarios, lo que a su vez indica que hay una alta cantidad de antígeno específico presente en la muestra. Si la absorbancia es baja, esto indica que hay una baja cantidad de antígeno presente en la muestra.

En general, los resultados se interpretan comparando la intensidad de la reacción o la absorbancia obtenida en la muestra con los valores de referencia previamente establecidos para

la técnica, lo que permitirá determinar si la muestra es positiva o negativa para la presencia del antígeno específico.

Determinación del sexo por muestras fecales de aves por el método directo.

En este proceso se utilizan todos los materiales, insumos, antígenos, anticuerpos y todo el instrumental para la determinación del sexo a través del plasma sanguíneo, pero con algunas variaciones procedimentales:

El procedimiento a seguir es el siguiente de acuerdo a los inventores que patentaron este proceso de la prueba ELISA para determinación del sexo de aves que corresponde a Orrantia-Borunda & Rivas-Cáceres, (2006) es:

1. Adicionar entre 0.5 y 1.0 g de heces fecales en 1 mL de agua destilada y agitarlo mecánicamente (con vortex) por un periodo de 5 minutos. La eficacia de la extracción mejora si se deja durante una noche completa.
2. Adicionar 5 a 10 mL de acetato etílico y agitar en vortex durante 5 minutos, pudiéndose usar igualmente dietiléter.
3. Ubicar los tubos de ensayo en hielo seco más etanol congelando la fase acuosa para luego continuar la fase orgánica a otro tubo.
4. Fijar el número de pocillos de la placa recubiertos requeridos para estándares, controles y sueros problema. Es recomendable efectuar las pruebas duplicadas para alcanzar una mejor precisión.
5. Disponer cerca de 5 y 10 μ , L de estándares, muestras y controles en los microporos apropiados.
6. Añadir cerca de 50 y 100 μ ,L de conjugado Testosterona-HRP en cada pocillo de la placa.

7. Adicionar cerca de 50 y 100 μ L de reactivo de conejo anti testosterona en cada micropozo. Mezcla muy suave y completamente durante 30 segundos. Ubicar las placas en una bolsa plástica.
8. Incubar a una temperatura de 37°C durante 90 minutos para el secado a través de la evaporación.
9. Limpiar lavando cinco veces bien con agua destilada o desionizada. El lavado no debe ser con agua corriente y de manera brusca
10. Añadir cerca de 50 y 100 μ L de TMB en cada pocillo para luego agitar durante 5 segundos.
11. Durante un periodo de 20 minutos debe procederse a la incubación a temperatura ambiente.
12. Detener la reacción adicionando entre 50 a 100 μ L de solución de paro, deteniendo así la reacción de la peroxidasa en cada pocillo. Esta solución se prepara con hidróxido de sodio al 1%, que, al favorecer un pH alto, cambia la conformación a la enzima, inactivándola debido a que ya no tiene un sitio activo para reconocer el sustrato específico, sobre el cual actuar.
13. Agitar suavemente por 39 segundos, cerciorándose que cada pocillo de color azul, cambie totalmente a color amarillo.
14. Proceder en un lapso de 15 minutos a la lectura de la absorbancia a 450nm.

Las diferentes variaciones de la técnica ELISA tienen sus propias ventajas y limitaciones. A continuación, se presentan las principales variaciones:

ELISA directo: En este método, los anticuerpos marcados se unen directamente a la proteína específica del sexo opuesto presente en la muestra de suero. Este método es más rápido y sencillo que el indirecto, pero puede tener una menor sensibilidad y especificidad. ELISA indirecto: En este método, se utilizan dos tipos de anticuerpos. Primero se agrega un anticuerpo

primario no marcado que se une a la proteína específica del sexo opuesto en la muestra de suero. Luego, se agrega un anticuerpo secundario marcado que se une al anticuerpo primario, lo que permite la detección de la proteína específica del sexo opuesto. Este método es más sensible y específico que el directo, pero es más complejo y requiere más tiempo. ELISA en plumas: En lugar de utilizar suero, se pueden utilizar plumas para determinar el sexo de las aves. En este caso, se extrae la proteína específica del sexo opuesto de la pluma y se utiliza en el ELISA. Este método es menos invasivo que la obtención de suero, pero puede ser menos sensible (McHugh & de Kloet, 2020; Olascoaga, 2011).

Método endoscópico de sexado de aves

Esta técnica requiere de un acto quirúrgico, evaluación preanestésica, introducción de un endoscopio al cuerpo del ave hasta identificar las gónadas para determinar el sexo del espécimen, igualmente se requiere de analgesia postoperatoria y cuidados intensivos de los pacientes, lo cual resulta algo invasivo para el ave. Del mismo modo, además de invasivas con algo de complejidad para su aplicación en el campo, se requiere instalaciones especiales para garantizar el éxito del procedimiento. A efectos de documentar esta técnica de sexado de aves en cautiverio, se han recurrido a diversas fuentes como Turcu, et al., (2020), Fernández-Morán (1996) y Otsuka, Miyashita, Shibata, & Sato (2016).

Los pasos a seguir son:

1. Se realiza la inducción en mascarilla con isoflurano al 5%, y mantenimiento con 2% isoflurano.
2. Una vez anestesiadas las aves se las coloca en posición decúbito lateral derecho con las alas extendidas dorsalmente. El miembro izquierdo se tira cranealmente, en tanto que el miembro derecho se mantiene en posición normal.

3. El área de interés se representa por una forma triangular delimitada cranealmente por la última costilla, caudalmente por el músculo flexor crural medial y ventralmente por el paralelo que pasa a nivel del esternón.
4. Posteriormente se prepara la zona del flanco izquierdo a través de depilación y antisepsia con clorhexidina.
5. Se realiza una incisión de la piel de unos 2-3 mm caudal a la última costilla y ventral del músculo flexor crural medial.
6. Con la ayuda de pinzas de Pean curvas, se punzan los músculos abdominales para entrar en el saco aéreo torácico caudal. A través de este orificio, se inserta perpendicularmente un telescopio de 2,7 mm, penetrando el saco aéreo torácico caudal. La penetración en el saco aéreo torácico caudal se confirma a través de la identificación del pulmón (central), el saco aéreo torácico craneal (izquierda), el saco aéreo abdominal (derecha), el hígado y el proventrículo (ventral), las costillas y los músculos intercostales (dorsal).
7. A continuación, el telescopio se orienta caudalmente. La penetración en el saco de aire abdominal izquierdo se logra perforando la membrana con la punta del telescopio. A este nivel se identifica la tríada riñón-gónada-glándula suprarrenal. Las gónadas se encuentran en el polo craneal del riñón (a veces, la glándula suprarrenal está cubierta por el testículo sexualmente activo agrandado en volumen).
8. Se sutura la piel con material de sutura absorbible de polifilamento.

Los instrumentos elementales requeridos para realizar endoscopías en aves son los siguientes:

- Fuente de luz (150 w)
- Cable de fibra óptica

- Endoscopio. El más usado es un artroscopio de medicina humana que debe incluir la cánula y el trocar especialmente diseñados para la introducción del endoscopio a través de las cavidades de las aves.
- Fuente de luz Wolf 5006 con posibilidad de flash sincronizado
- Artroscopios:
 - 1,9 mm de diámetro y 120 mm de longitud
 - 2,7 mm de diámetro y 100 mm de longitud
 - 4 mm de diámetro y 170 mm de longitud
 - 10 mm de diámetro y 310 mm de longitud
- Cámara CCD CR-2001 Microcam
- Video
- Adaptador fotografía Wolf
- Pinzas biopsias
- Hisopo para la toma de muestras
- Material esterilización (Fernández-Morán, 1996, pág. 177)

Algunas aclaraciones sobre el procedimiento se mencionan a continuación:

Se debe seleccionar el material propicio para determinar el sexo del ave. La luz es proporcionada por un cable de fibra óptica integrado de múltiples fibras tejidas que transmiten la luz internamente por reflexión. La flexibilidad de este cable favorece la libertad de movimientos al endoscopista separando la luz del origen del calor. Para la endoscopia, el endoscopio más fino es el de 1,9 mm de diámetro exterior, el cual suministra una óptima calidad visual. Es un instrumento propio para aves con un peso por debajo de los 100 y para áreas de pequeñas proporciones como el oviducto. El endoscopio de 2,7 mm se usa para aves cuyo peso oscile entre 50 gr y los 4 kg. Por otra parte, el de 4-5 mm se recomienda para aves

que superen los 4 kg. Respecto al ángulo de visión de la lente, se sugiere las que posean un ángulo de 30°, pues mejoran la visibilidad y reducen el traumatismo durante las laparoscopias (Fernández-Morán, 1996).

Algunas variaciones quirúrgicas para este abordaje en aves son:

- Abordaje lateral izquierdo a nivel de la fosa paralumbar, siendo el sistema tradicionalmente utilizado para la ejecución del sexaje por laparoscopia.
- Abordaje de las cavidades peritoneales ventrales hepáticas.
- Abordaje directo de la cavidad peritoneal intestinal (Fernández-Morán, 1996).

Algunas recomendaciones importantes son:

Realizar la analgesia posoperatoria acto seguido de la endoscopia. Se puede utilizar antiinflamatorios no esteroideos, como el meloxicam.

Previo a la intervención por laparoscopia, los especímenes deben ser privados de su alimentación habitual al menos tres horas lo cual dependerá tanto del tipo como del tamaño del ave.

Al recuperarse el ave de la anestesia, lo cual sucede en un lapso habitual de 5 minutos, puede ofrecérsele ofrecer agua y alimentos, si no se ha observado ninguna enfermedad infecciosa al realizarse la laparoscopia y si el procedimiento se efectuó en buenas condiciones de asepsia no es preciso la administración de antibióticos (Fernández-Morán, 1996).

Quimioluminiscencia para la determinación sexual en aves

La técnica de quimioluminiscencia es una técnica inmunológica que se basa en la detección de la señal lumínica generada por la reacción química entre una hormona sexual específica y anticuerpos conjugados con luciferasa. Esta técnica se utiliza para determinar la concentración

de hormonas sexuales en la sangre de las aves, lo que permite la identificación del sexo de las mismas.

La Quimioluminiscencia está enmarcada dentro del contexto del inmunoanálisis, el cual se concibe como pruebas de laboratorio sustentada en la química a través de la cual se manifiesta la presencia de una determinada sustancia, o en su defecto en qué cantidad está presente, en una muestra de sangre u otros líquidos corporales usando una reacción inmunológica. Este análisis es elevadamente sensible y específico debido al uso de reactivos anticuerpos y antígenos purificados. Uno de los usos del inmunoanálisis es el de la medición de niveles hormonales (hormonas tiroideas o estrógenos). Usa como marcador una sustancia quimioluminiscente, en otras palabras, una sustancia que genera luz al ser excitada por la energía química. Las emisiones de luz son medidas a través de un detector de luz (SALUDEMIA, 2023).

A efecto de resumir los materiales, insumos y pasos para determinar el sexo de aves a través de una muestra de sangre a través de la técnica de Quimioluminiscencia, se analizan los aportes realizados por Chean-Ping, Yan-Ming, Rean-Tsz, Kuo-Tai, & Mu-Chiou (2007), Petite & Kegelmeyer (2009), García-Feria & Valdespino (2015).

El proceso de la técnica de quimioluminiscencia se presenta a continuación con sus insumos, materiales, equipos y pasos respectivos:

Materiales e insumos

Tabla 1. Materiales e insumos para el método e quimioluminiscencia para el sexado de aves

Materiales	Insumos
Placas de microtitulación con pocillos de 96 pozos	Anticuerpos específicos para la especie de ave a analizar (anti-ZW o anti-ZZ)
Lector de placas de Quimioluminiscenci	Solución amortiguadora de fosfato salino (PBS)
Pipetas de diferentes volúmenes (p. ej. 10-100 μ L, 100-1000 μ L)	Reactivos de bloqueo de la placa (leche en polvo o BSA)
Micropipetas automáticas de diferentes volúmenes (p. ej. 10-100 μ L, 100-1000 μ L)	Solución de dilución del suero o plasma de la muestra
Baño de agua (con capacidad para 37°C)	Conjugado marcado con enzima (peroxidasa de rábano picante)
Baño de agua (con capacidad para 56°C)	Solución sustrato (luminol)
Agitador orbital	Solución de paro de reacción (ácido sulfúrico o ácido cítrico)
Tubos de ensayo	Solución de lavado (PBS-Tween)

Fuentes: Chean-Ping, Yan-Ming, Rean-Tsz, Kuo-Tai, & Mu-Chiou (2007), Petite & Kegelmeyer (2009), García-Feria & Valdespino (2015).

Elaboración: La autora

Algunas recomendaciones: Es importante asegurarse de que los insumos sean específicos para la especie de ave que se va a analizar.

Los principales equipos que se requieren son:

- Luminómetro: instrumento de medición para medir la intensidad de la luz emitida durante la reacción química.
- Microcentrífuga: se utiliza para centrifugar las muestras y eliminar cualquier impureza.

- Pipetas: se utilizan para la medición y transferencia precisa de las muestras y reactivos.
- Agitador o mezclador: se utiliza para mezclar los reactivos y muestras de manera uniforme.
- Dispositivo de lavado: se utiliza para eliminar cualquier residuo que pueda interferir en la reacción química.
- Estándares: se utilizan para calibrar el luminómetro y para determinar la cantidad de proteína diana en la muestra.

Pasos para aplicar la técnica de quimioluminiscencia

- Recolectar las muestras: para realizar la técnica se necesitan muestras de suero o plasma de las aves. Las muestras pueden obtenerse por punción venosa u otro método apropiado.
- Preparar los reactivos: se deben preparar los reactivos de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En general, se necesitan los siguientes reactivos: anticuerpos específicos para el sexo de interés (marcados con una enzima o un reactivo de quimioluminiscencia), tampón de lavado, tampón de reacción, solución de sustrato y solución de paro.
- Preparar la placa de reacción: se colocan los anticuerpos específicos para el sexo de interés en una placa de reacción, la cual se debe incubarse a una temperatura y tiempo específico.
- Agregar las muestras: se agregan las muestras de suero o plasma a la placa de reacción y se incuba a una temperatura y tiempo específico.
- Lavar la placa de reacción: se lava la placa de reacción para eliminar cualquier material no específico que pueda interferir con la reacción.

- Agregar la solución de sustrato: se agrega la solución de sustrato a la placa de reacción y se incuba a una temperatura y tiempo específico.
- Detener la reacción: se agrega la solución de paro a la placa de reacción para detener la reacción.
- Leer la placa de reacción: se lee la placa de reacción en un espectrofotómetro de quimioluminiscencia para medir la cantidad de luz emitida en cada pozo. La cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de anticuerpos unidos al antígeno y, por lo tanto, a la cantidad de antígeno presente en la muestra.
- Analizar los resultados: los resultados se analizan comparando las lecturas de luz de las muestras desconocidas con las de las muestras de control. Las muestras que emiten más luz que los controles de sexo opuesto se consideran positivas para el sexo de interés.

Con la técnica de quimioluminiscencia, se obtiene una medida de la intensidad de la luz emitida por la muestra después de la reacción enzimática, que es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. Esta medida de intensidad se obtiene mediante el uso de un luminómetro. Para analizar la información obtenida, se utiliza un software específico para el luminómetro que se encarga de la calibración y el análisis de los datos. Este software compara la señal de luz emitida por la muestra con la señal de luz emitida por las muestras de control, y con base en la diferencia entre ellas, se determina el resultado de la prueba. Si la intensidad de la luz emitida por la muestra es mayor que la intensidad de la luz emitida por las muestras de control, se considera que la muestra es positiva para el antígeno en cuestión. Si la intensidad de la luz es menor o igual a la intensidad de las muestras de control, se considera que la muestra es negativa para el antígeno.

En general, la elección de la variante adecuada dependerá de los requisitos específicos del estudio y de la disponibilidad de los reactivos y equipos necesarios. Hay varias variantes de la técnica de quimioluminiscencia, entre las cuales se incluyen:

- **Método de Inmunoensayo Quimioluminiscente (CLIA):** Este es el método más común de quimioluminiscencia utilizado para la determinación de hormonas, proteínas y otros marcadores biológicos. Se basa en la unión específica de un anticuerpo a su antígeno, seguido de la adición de un conjugado marcado con un reactivo luminiscente. El complejo inmunoconjugado se detecta mediante un espectrómetro de luminiscencia.
- **Ensayo de inmunoabsorción ligado a la quimioluminiscencia (LIA):** Este método utiliza anticuerpos específicos que se unen a un antígeno en una matriz sólida, como una placa de microtitulación, seguido de la adición de un conjugado marcado con un reactivo luminiscente. El complejo inmunoconjugado se detecta mediante un espectrómetro de luminiscencia.
- **Ensayo de inmunoabsorción de fase sólida quimioluminiscente (CLISA):** Este método utiliza una matriz sólida, como una placa de microtitulación, que está recubierta con un anticuerpo específico. Se agrega la muestra de interés, seguida de la adición de un conjugado marcado con un reactivo luminiscente. El complejo inmunoconjugado se detecta mediante un espectrómetro de luminiscencia.
- **Ensayo de hibridación de ácidos nucleicos quimioluminiscente (CLNH):** Este método utiliza sondas de ácido nucleico específicas para detectar secuencias de ADN o ARN específicas. Las sondas se marcan con un reactivo luminiscente y se unen específicamente a la secuencia de ADN o ARN de interés. El complejo de sonda y ácido nucleico se detecta mediante un espectrómetro de luminiscencia.

- Ensayo de quimioluminiscencia electroquimioluminiscencia (ECL): Este método utiliza un electrodo para generar una reacción química que produce luz, que se detecta mediante un espectrómetro de luminiscencia. Se utiliza en la determinación de proteínas y otros marcadores biológicos.

DISCUSIÓN

El propósito de la presente investigación ha sido describir las técnicas de ELISA, quimioluminiscencia y endoscopia para la determinación sexual de aves silvestres en cautiverio, caracterizando los procedimientos utilizados en las técnicas mencionadas cumpliéndose el objetivo.

Se ha podido observar que existe una diversidad de criterios de acuerdo a los autores Orrantia-Borunda & Rivas-Cáceres (2006), R-Biopharm (2021), Hidayat & Wulandar (2021), puesto que presentan variantes en las diferentes metodologías y de cada una se presentan diferencias. Se debe resaltar luego de la investigación no se puede establecer que existan técnicas con ventajas absolutas, pues cada técnica tiene sus propias ventajas y limitaciones, y la elección de la técnica adecuada dependerá de las necesidades y objetivos específicos del estudio.

En términos de sensibilidad, ELISA y quimioluminiscencia tienen una alta sensibilidad y pueden detectar niveles bajos de hormonas sexuales en la sangre o en las plumas. Por otro lado, la endoscopia puede proporcionar una identificación precisa del sexo en las aves, pero no es tan sensible como las técnicas inmunológicas para detectar niveles bajos de hormonas.

En cuanto a la especificidad, todas las técnicas son altamente específicas y no detectarán hormonas sexuales no relacionadas. Sin embargo, puede haber algunas diferencias en la

especificidad de cada técnica debido a la especificidad de los anticuerpos utilizados en ELISA y quimioluminiscencia.

En cuanto a la facilidad de uso y la disponibilidad, la endoscopía puede ser más difícil y costosa de realizar en comparación con las técnicas inmunológicas. Además, la endoscopía requiere de cierto nivel de habilidad y entrenamiento, mientras que los kits comerciales de ELISA y quimioluminiscencia están ampliamente disponibles y son fáciles de usar.

En general, para la determinación del sexo en aves, la endoscopía sigue siendo la técnica de elección debido a su alta precisión en la identificación de los órganos sexuales. Sin embargo, las técnicas inmunológicas como ELISA y quimioluminiscencia son útiles en situaciones en las que la endoscopía no es factible o para detectar niveles bajos de hormonas sexuales en la sangre o en las plumas.

Al analizar cada una de las técnicas, se puede resumir que la técnica ELISA es una prueba rápida, sencilla y económica que ha sido ampliamente utilizada en la determinación sexual de las aves. Sin embargo, puede presentar problemas de especificidad y sensibilidad, especialmente cuando se utilizan anticuerpos de origen no aviar. Por lo tanto, se recomienda el uso de anticuerpos aviares específicos para aumentar la precisión y la confiabilidad de los resultados. Es importante tener en cuenta que la interpretación de los resultados debe realizarse en conjunto con otros datos y que existen algunos casos en los que la técnica ELISA no es tan precisa como otros métodos de determinación sexual, como el análisis histológico o la observación de características sexuales secundarias (Orrantia-Borunda & Rivas-Cáceres, 2006).

Cada variante del ELISA tiene sus propias ventajas y limitaciones, y la elección de la variante a utilizar dependerá de las necesidades específicas del estudio. En general, la técnica ELISA

es una herramienta muy útil en la determinación sexual de las aves y se ha utilizado con éxito en una amplia variedad de especies aviares (Ankley, et al., 1998).

Es importante mencionar que en el método ELISA los pasos específicos pueden variar dependiendo del protocolo utilizado por cada laboratorio o investigador. Algunas variaciones comunes incluyen el pretratamiento de la muestra para reducir la interferencia y mejorar la sensibilidad de la prueba. Esto puede incluir la adición de agentes bloqueantes o el uso de diluyentes especiales. También se consideran el uso de anticuerpos monoclonales en lugar de policlonales, ya que son más específicos y reducen la reactividad cruzada. Algunos autores sugieren el uso de otras enzimas, como la fosfatasa alcalina, que puede ser más sensible en algunos casos. Sugieren un tiempo de incubación más largo para aumentar la sensibilidad de la prueba, pero esto también puede aumentar la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la reactividad cruzada. En general, estas variaciones son menores y no cambian significativamente el procedimiento básico del ELISA. La elección de la variante dependerá del propósito de la prueba y las preferencias del laboratorio.

La quimioluminiscencia por su parte es una técnica que tiene una significativa especificidad y sensibilidad en virtud de que a través de ella se puede establecer una reacción “antígeno/anticuerpo del orden de los picogramos y con un mínimo de desnaturalización” (García & Martrín, 2007, pág. 60). Sin embargo, su principal limitación es la necesidad de equipos especializados y costosos, así como de reactivos específicos (Vieira, et al., 2021).

Aunque la técnica de quimioluminiscencia es bastante estandarizada, existen algunas variaciones en los pasos a seguir según los diferentes autores y laboratorios entre las que se encuentran la preparación de la muestra donde se integra un paso previo a la incubación de la muestra con los anticuerpos, como una etapa de lisis celular o una extracción de ADN para obtener una mayor cantidad de material genético. Otras variaciones están en la concentración

de los anticuerpos; el tiempo de incubación de la muestra con los anticuerpos; la detección de la señal de quimioluminiscencia, algunos protocolos recomiendan el uso de diferentes detectores, como fotómetros, luminómetros o cámaras de imagen. En esta técnica al igual que en otras los materiales e insumos pueden variar dependiendo del kit comercial que se utilice y de las especificaciones del laboratorio (De Kloet, Davis, & de Kloet, 2022; García-Feria & Valdespino, 2015).

La endoscopia por su parte es una técnica invasiva en la que se introduce el endoscopio en el abdomen del ave con la finalidad de tener un campo de visión óptimo para discernir si el paciente presenta testículos u ovarios, logrando así ser este el Golden estándar en determinación sexual de aves que no presentan dimorfismo sexual. Sin embargo esta técnica resulta ser muy invasivas y son procedimientos que, aunque se realicen bajo anestesia resultan en una manipulación del animal y por ende el aumento de la tasa de mortalidad de estos (Gutierrez, 2021; García & Martinez, 2007).

CONCLUSIONES

La investigación presentó retos importantes, uno de ellos fue la obtención de suficientes fuentes de información que presenten los diferentes métodos y técnicas que se buscaban estudiar, puesto que algunos autores presentaban generalidades, en otros casos estudios que se han realizado y en otros se mostraba la técnica de una manera poco explicativa y descriptiva, por lo cual se requirió de la búsqueda de las diferentes fuentes para lograr estructurar la información y sintetizarla para presentar la misma de forma descriptiva y ordenada en la presente investigación.

Por otra parte existe limitada información acerca del tema de los métodos presentados y algunos estudios se exhiben solamente en revistas indexadas pero con artículos pagados con altos costos cada uno, por ello la complejidad y a su vez la importancia de presentar esta investigación que recopila y sintetiza la información de forma descriptiva, para entregar como información de valor a los investigadores y técnicos de campo.

En cumplimiento de los objetivos se ha logrado finalmente describir las técnicas de ELISA, quimioluminiscencia y endoscopia para la determinación sexual de aves silvestres en cautiverio, caracterizando los procedimientos utilizados en las técnicas mencionadas y poniendo en evidencia desde la perspectiva teórica las ventajas y factibilidad de las diferentes pruebas y sus resultados.

Por tanto se puede concluir que la presente ha sido una experiencia altamente enriquecedora y a su vez de valor, puesto que la sistematización y estructuración de la investigación ha favorecido a los conocimientos de la autora y a su vez facilita a la investigación de nuevos estudios y aplicaciones prácticas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Camargo, O. (2012). Dimorfismo sexual y desviación en la proporción de los sexos en embriones preimplantatorios. . *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 7(1), 101-115.
Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid.
- Chean-Ping, W., Yan-Ming, H., Rean-Tsz, W., Kuo-Tai, Y., & Mu-Chiou, H. (2007). A novel sex-specific DNA marker in Columbidae birds. *Theriogenology*, 67(2), 328-333.
- Costantini, D. (2018). Meta-analysis reveals that reproductive strategies are associated with sexual differences in oxidative balance across vertebrates. *Current Zoology*, 64, 1–11. DOI: 10.1093/cz/zox002.
- Espinosa, C., Castro, I., & Cruz, L. (2021 a). Dimorfismo sexual críptico en *Sicalis flaveola* (Aves: Thraupidae) en el trópico. *Boletín Científico Historia Natural*, 25(1), 55-70.
- Espinosa, C., Castro, I., & Cruz-Bernate, L. (2021). Dimorfismo sexual críptico en *Sicalis flaveola* (Aves: Thraupidae) en el trópico. *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. U. de Caldas*, 25(1), 55-70. DOI: 10.17151/bccm.2021.25.1.4.
- Fernández-Morán, J. (1996). ENDOSCOPIA EN AVES. TÉCNICA y APLICACIONES. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales (Avepa) Vol. 16, n.º 3.*, 176-184.
Disponible en:
<https://ddd.uab.cat/pub/clivetpeqani/11307064v16n3/11307064v16n3p176.pdf>.
- García, C., & Martrínez, I. (2007). VENTAJAS DEL MÉTODO DE QUIMIOLUMINISCENCIA FRENTE AL. *Visión Científica 1(2)*, 60-68. Disponible en: <http://www.revistasbolivianas.ciencia.bo/pdf/vc/v1n2/v01n2a10.pdf>.
- García-Feria, L., & Valdespino, C. (2015). Evaluación de esteroides sexuales fecales del pavón cornudo (*Oreophasis derbianus*, Aves Cracidae) en cautiverio. *Acta Zoológica*

Mexicana (n. s.), 31(1), 1-9. Disponible en:

<https://www.scielo.org.mx/pdf/azm/v31n1/v31n1a1.pdf>.

García-Feria, L., & Valdespino, C. (2015). Evaluation of fecal sex steroids in captive horned guan (*Oreophasis derbianus*, Aves: Cracidae). *Acta Zool. Mex [online]*: 31(1), , 1-9.

Disponible en <https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0065->

17372015000100001&script=sci_abstract&tlng=en.

Gómez , S., Palacios, E., & De Sucre, A. (2015). Dimorfismo sexual en tamaño y marca frontal en el chorlo nevado (*Charadrius nivosus*). *Huitzil, Revista Mexicana de*

Ornitología: 16(1), enero-junio, 21-27. Disponible en:

<https://www.scielo.org.mx/pdf/huitzil/v16n1/v16n1a4.pdf>.

Gutiérrez, G. (2021). *Determinación del sexo en dos especies de aves silvestres de los Andes*

Ecuatoriales: el Zambullidor Plateado (Podiceps occipitalis) y la Focha Andina

(Fulica ardesiaca) utilizando la técnica de la reacción de la cadena de la polimerasa

(PCR). Quito: Universidad Central del Ecuador. Disponible en:

<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/24393/1/UCE-FMVZ->

GUTIERREZ%20GLORIA.pdf.

Hernández , R., Fernández , C., & Baptista , M. (2014). *Metodología de la Investigación*.

(Sexta Edición ed.). México D.F. : McGRAW-HILL / INTERAMERICANA

EDITORES, S.A. DE C.V. .

Hidayat, R., & Wulandar, P. (2021). Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Technique Guideline. *ioscientia Medicina: Journal of Biomedicine & Translational*

Research. 5(5), 447-453. DOI: <https://doi.org/10.32539/bsm.v5i5.228>.

Klein, S., & Flanagan, K. (2016). Sex differences in immune responses. . *Nature Reviews*

Immunology, 16, 626– 638. DOI: 10.1038/nri.2016.90.

- Llerena, C. (2018). *Caracteres morfométricos implicados en la determinación del sexo en aves sin dicromatismo sexual (Orden Passeriformes) presentes en Arequipa*. Universidad Nacional de San Agustín. Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/6895/Billqucm.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- McHugh, J., & de Kloet, S. (2020). The Detection of Bornavirus in Birds, Mammals and Snakes by Sandwich ELISA of Bornaviral Matrix Protein. *Archives of Veterinary Science and Medicine* 3, 83-108. Disponible en: <https://fortuneonline.org/articles/the-detection-of-bornavirus-in-birds-mammals-and-snakes-by-sandwich-elisa-of-bornaviral-matrix-protein.pdf>.
- Metcalf, C., Roth, O., & Graham, A. (2020). Why leveraging sex differences in immune trade-offs may illuminate the evolution of senescence. *Functional Ecology*, 34,, 129–140. DOI: 10.1111/1365-2435.13458.
- Nystrand, M., & Dowling, D. (2020). Effects of immune challenge on expression of life-history and immune trait expression in sexually reproducing metazoans—a meta-analysis. *BMC Biology*, 18(135), 1-17. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00856-7>.
- Olascoaga, A. (2011). *Caracterización del perfil de testosterona facial en el Zacatuche (Romerolagus diazi) mantenido en cautiverio*. México, DF.: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Orrantia-Borunda, E., & Rivas-Cáceres. (2006). *DETERMINACION DE SEXOS POR HORMONAS ESTEROIDES EN AVES, REPTILES Y MAMIFEROS*. Ciudad Juárez-México. Disponible en: <https://patents.google.com/patent/WO2006135222A1/es>: Organización Mundial de la Propiedad Intelectual-.

- Otsuka, M., Miyashita, O., Shibata, M., & Sato, F. (2016). A novel method for sexing day-old chicks using endoscope system. *Poultry Science*, *95*(11), 2685-2689.
- Petitte, J., & Kegelmeyer, E. (2009). Rapid sex determination of chick embryos using the polymerase chain reaction. *Animal Biotechnology*, *6*, 119-130.
- Pólit, R. (2022). *Caracterización del sexo en aves psitácidas del género amazona en cautiverio a través de la medición de esteroides sexuales en heces por la técnica de ELISA. Trabajo de fin de carrera para optar al grado de médico veterinario*. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- R-Biopharm. (2021). *Good ELISA Practice Manual*. Darmstadt, Germany: R-Biopharm. Disponible en: https://staging.r-biopharm.com/wp-content/uploads/2021/03/good_elisa_practice_manual_en_2020-06.pdf.
- SALUDEMIA. (2023). *Pruebas médicas*. Recuperado el 2 de Mayo de 2023, de Inmunoanálisis: <https://www.saludemia.com/-/prueba-inmunoanalisis>
- Stavy, M., Gilbert, D., & Martin, R. (1979). Routine determination of sex in monomorphic bird species using faecal steroid analysis. *International Zoo Yearbook*, *19*(1), 209–214. DOI:10.1111/j.1748-1090.1979.tb00566.x.
- Turcu, M., Bel, L., Collarile, T., & Pusta, D. (2020). Comparative Evaluation Of Two Techniques Of Sex Determination In Lovebirds (Agapornis Spp.). *Bulletin UASVM Veterinary Medicine* *77*(2), 106-114. DOI: 10.15835/buasvmcn-vm:2020.0030.
- Yu, J., Bao, E., Yan, J., & Lei, L. (2008). Expression and localization of Hsps in the heart and blood vessel of heat-stressed broilers. *NAtional Library of Medicine*, *13*(3), 327-335.

ANEXO A: GRÁFICOS EXPLICATIVOS EQUIPOS, MATERIALES E INSUMOS MÉTODO ELISA

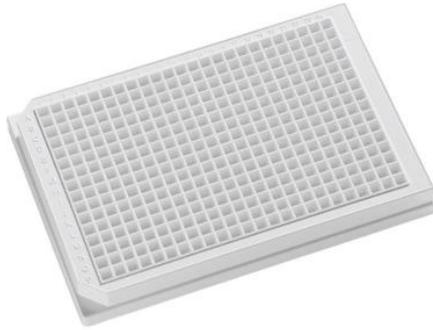


Figure 1. ELISA plate.



Figure 2. ELISA antibody.



Figure 3. Standard ELISA.

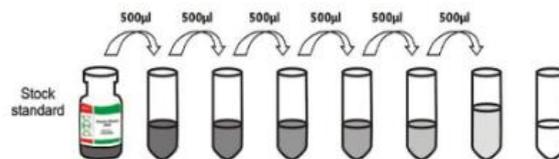


Figure 4. Making serial concentration standard.



Figure 5. Changes in color intensity on ELISA plate.



Figure 6. ELISA reader

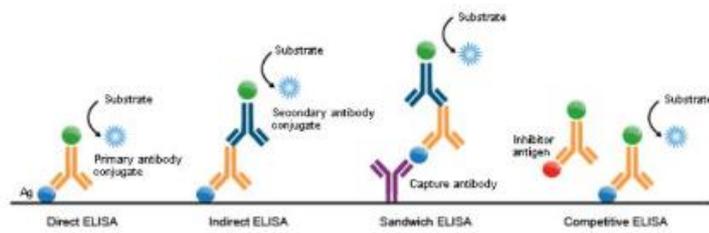


Figure 7. ELISA types.

Figura 1. Equipos, materiales e insumos método ELISA

Fuente: Hidayat & Wulandar (2021)

ANEXO B: EQUIPOS PARA EL SEXADO DE AVES MEDIANTE ENDOSCOPIA

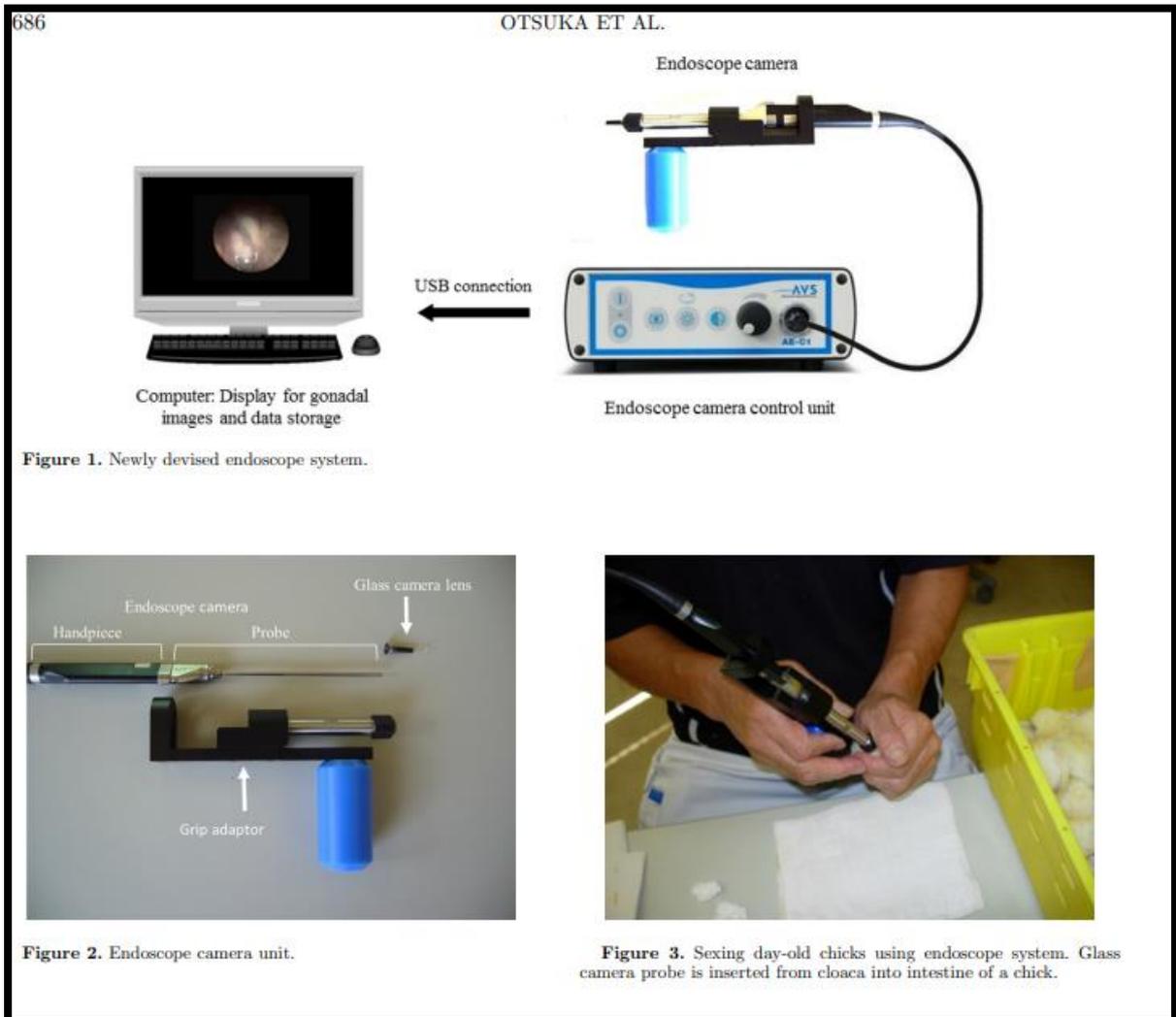


Figura 2. Equipos para el sexado de pollos por endoscopia
Fuente:(Otsuka, Miyashita, Shibata, & Sato, 2016)