



ANEXO 1

FORMATO PARA LA PRESENTACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN  
CON EL FINANCIAMIENTO DEL FEDU

1. Título del proyecto

**SEROPREVALENCIA DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA EN  
VACUNOS DE LA RAZA BROWN SWISS EN EL DISTRITO DE MAÑAZO**

2. Área de Investigación

Área de investigación	Línea de Investigación	Disciplina OCDE
Ciencia Animal	Salud Animal	

3. Duración del proyecto (meses)

**12 meses**

4. Tipo de proyecto

Individual	<input type="radio"/>
Multidisciplinario	<input type="radio"/>
Director de tesis pregrado	<input type="radio"/>

4. Datos de los integrantes del proyecto

Apellidos y Nombres	Luque Mamani Natalio
Escuela Profesional	Medicina Veterinaria y Zootecnia
Celular	951592536
Correo Electrónico	nluque@unap.edu.pe

Apellidos y Nombres	Rojas Espinoza Rolando Daniel
Escuela Profesional	Medicina Veterinaria y Zootecnia
Celular	976666927
Correo Electrónico	rdrojas@unap.edu.pe

Apellidos y Nombres	Nubia Lilia Catacora Flores
Escuela Profesional	Medicina Veterinaria y Zootecnia
Celular	983117036
Correo Electrónico	nlcatacora@unap.edu.pe



## I. Título

### **TITULO: SEROPREVALENCIA DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA EN VACUNOS DE LA RAZA BROWN SWISS EN EL DISTRITO DE MAÑAZO**

## II. Resumen del Proyecto

El presente trabajo de investigación se llevará a cabo en el distrito de Mañazo-provincia de Puno de la región Puno a 3,890 msnm con el objetivo: Determinar la seroprevalencia de la Diarrea Viral Bovina, considerando las siguientes variables; sexo (machos y hembras), edad (menores de 2 años y mayores de 2 años), estado reproductivo (Vacías y preñadas) y estado productivo (en producción y en secas), para lo cual se tomarán muestras de sangre y obtener suero de 92 vacunos de la raza Brown swiss. Las muestras se evaluarán en el laboratorio de salud animal con sede en el CE. Chuquibambilla de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNA – Puno, mediante la prueba de ELISA (IDEXX BVDV para ab) indirecta y los datos obtenidos serán procesados por la prueba estadística de Chi-cuadrada

## III. Palabras claves (Keywords)

**ELISA, Seroprevalencia, Diarrea viral bovina, vacunos.**

## IV. Justificación del proyecto

La crianza de ganado Vacuno es una actividad socioeconómica para el poblador rural y asociaciones de productores agropecuarios en la región y en el país, siendo su población de 5´156,000 cabezas aproximadamente. La raza predominante es la criolla, representando el 63,9% del total de la distribución, seguida por la Brown Swiss con 17,6%, la población de ganado vacuno se concentra en la Sierra con 3´774,300 cabezas; La región Puno cuenta con 617,163 vacunos, la provincia de Puno tiene 111,899 vacunos (INIA, 2012).

El virus de la Diarrea viral bobina es una enfermedad infecciosa de mayor distribución en la población bovina, principalmente en cuencas lecheras donde alcanza prevalencias mayores al 50%, así podemos mencionar una seroprevalencia de 75.90 % para el virus de la DVB determinados en el distrito de Pomata de la región de Puno (Alvares, Q. 2019), de 64.84 % de seroprevalencia en el distrito de Umachiri (Apaza, C. 2020), la seroprevalencia de la DVB depende del tipo de ganado más en lechero, densidad poblacional, tipo de manejo, comercio de animales, manejo de pasturas, entre otros (Rivera, 2008), esta enfermedad está asociado a cuadros digestivos, con presencia de diarreas y erosiones en cavidad bucal, trastornos reproductivos (abortos, mortalidad embrionaria alteraciones congénitas e infertilidad) y signos respiratorios. (Hilbe *et al.*, 2007).

Esta enfermedad conlleva a pérdidas económicas desde el punto de vista productivas, dentro de ellos tenemos gastos de tratamiento y prevención con el uso de vacunas, por disminución de la producción láctea, en los trastornos reproductivos tenemos, la reducción en la tasa



de la concepción, causales de abortos, nacimientos con defectos congénitos, retardo del crecimiento y muerte, sumándole a esto, la infección de los fetos produciendo terneros persistentemente infectados (PI) donde los animales más jóvenes son más susceptibles y débiles que tienen un mayor riesgo de adquirir otras enfermedades como pueden morir por la enfermedad de las mucosas (House, 2003) por tal razón es muy importante realizar el presente estudio para contribuir mejor conocimiento de la seroprevalencia de esta enfermedad.

## V. Antecedentes del proyecto

### **Antecedentes del vDVB.**

#### **Definición**

La Diarrea Viral Bovina (DVB), es una enfermedad de origen viral que afecta a los bovinos de todas las edades y sexo que puede presentar sintomatología muy variable dependiendo principalmente de las características de la cepa. se ha asociado a cuadros digestivos, con diarreas y erosiones en cavidad digestiva desde oral, trastornos reproductivos abortos, alteraciones congénitas e infertilidad y signos respiratorios. (Hilbe *et al.*, 2007).

#### **Agente Etiológico**

##### **Taxonomía**

El virus de la diarrea viral bovina (vDVB) pertenece al género Pestivirus y que James y Dubovi, (2011) lo describe como virus RNA de cadena simple, envueltos y esféricos; Los Pestivirus han sido reclasificados desde la familia Togaviridae a la familia Flaviviridae

##### **Características generales del virus de la diarrea viral bovina (vDVB)**

Morfológicamente, es una partícula esférica de 48 - 60 nanómetros (nm) de diámetro, constituido por una nucleocápside icosaédrica de 25 a 37 nm de diámetro de naturaleza proteica y una envoltura externa de naturaleza lipídica. En la envoltura compuesta por tres glicoproteínas y en la nucleocápside se localiza el ARN y la proteína de la cápside p 14/C (Kobrak y Weber, 1997).

La información genética está contenida en una molécula de ARN de cadena simple con polaridad positiva, el genoma está constituido de 12.0 a 12.5 Kilobases (Paton, 1995).

##### **Clasificación**

Tomando en cuenta la variabilidad genética, y su estrecha relación con otros grupos del género pestivirus y la utilización de anticuerpos monoclonales permitió dividir a los vDVB en genotipos. Por el efecto que produce el virus en cultivo celulares se les subdividió en dos biotipos, citopáticos y no citopáticos (Ridpath *et al.*, 2005).

##### **Genotipos**

Mediante estudios genéticos se han diferenciado dos genotipos dentro del vDVB, los cuales se han denominado genotipo I y II (Ridpath *et al.*, 2005). dentro del genotipo I se han diferenciado tres subgenotipos distintos denominados Ia, Ib e Ic (Sanjuan *et al.*, 1999).

##### **Epidemiología**

##### **Fuente de la infección**

La principal vía de infección del vDVB son los animales PI, cuya eficacia en la transmisión es en tan solo tres a cuatro meses son capaces de infectar al 90%



de los animales con los que conviven (Houe *et al.*, 1999). Los bovinos PI diseminan cantidades considerables de virus de por vida a través de secreciones y excreciones como descarga nasal, saliva, semen, orina, heces, lágrimas y leche (Brock *et al.*, 2000).

También los animales con infección aguda diseminan el virus por secreciones y excreciones, la cantidad del virus es mucho menor en relación a los animales PIEI, el virus ha sido aislado de otros rumiantes como ovinos, caprinos y algunos de vida silvestre, siendo estas especies, consideradas fuente potencial de transmisión del virus (Houe, 1995).

### **Métodos de transmisión**

#### **Transmisión Vertical**

La vía de transmisión vertical ocurre de una generación a otra, aquí ocurre la transmisión al feto a través del semen de toros con infección aguda o persistentemente infectados (PI). Mientras las hembras seronegativas pueden infectarse cuando son inseminadas con semen infectado y en caso de ocurrir el nacimiento de una cría PI, a pesar de la alta mortalidad entre los terneros PI algunos pueden llegar a adultos y reproducirse, entonces los terneros de madres PI son también PI, por lo que se forman líneas de animales PI y puede ocurrir en varias generaciones (Houe, 1995). Así mismo en transferencia de embriones, si la receptora o la hembra donante son PI puede ocurrir la transmisión vertical a través del lavado (Houe, 2003).

#### **Transmisión Horizontal**

De La transmisión horizontal puede ser de forma directa o indirecta. La transmisión directa, ocurre por contacto directo entre animales susceptibles y animales persistentemente infectados (PI), siendo esta la vía la más común de transmisión de la infección, como el contacto de nariz con nariz (Travén *et al.*, 1991), uso de comederos y bebederos, aunque no se descarta por medio de aerosoles. El semen es una fuente importante de transmisión horizontal para las vacas, con la eliminación del virus a través de este medio (McGowan *et al.*, 1993).

#### **Patogénesis**

Una vez ingresado al animal los virus de la diarrea viral bovina la replicación viral ocurre en las células epiteliales de la cavidad bucal, tonsilas y del tracto digestivo, células linfoides, como consecuencia el animal puede presentar múltiples expresiones clínicas (SanJuan *et al.*, 1999).

Mientras la infección transplacentaria del vDVB es muy frecuente; ya que el virus atraviesa la placenta con facilidad casi al100% de eficiencia y la infección del feto dependerá principalmente de la edad de gestación, del biotipo de la cepa infectante. Los efectos pueden ser muerte embrionaria, muerte fetal, aborto o momificación fetal, malformación congénita, nacimientos de animales débiles, terneros PI y nacimientos de terneros sanos (Baker, 1995). Los terneros PI son el resultado de la infección del feto entre los 120 a 125 días de gestación con una cepa NCP (Vanroose *et al.*, 1998).

#### **Diagnostico**

El diagnóstico de la diarrea viral bovina se determina en laboratorio mediante las técnicas de aislamiento viral, detección de antígenos, detección de ácido nucleico y detección de anticuerpos contra el virus, mientras los animales PI pueden ser identificados mediante de pruebas serológicas y pruebas de identificación viral en muestras de sangre (Duvobi, 2013)

#### **Aislamiento viral en cultivo celular**



El aislamiento viral puede realizarse a través de muestra de secreciones y tejidos fetales o sangre esta prueba tiene alta especificidad, muy costoso y laborioso, requiere muchos días obtener el resultado y es dependiente de cultivo de células. (Sandvik, 1999), además garantizar que las muestras celulares utilizadas, que pueden ser de riñón, pulmón o cornete nasal de feto bovino, sean libres del vDVB (Bolin, 1990)

### **Detección de antígeno virales**

#### **ELISA de captura de antígenos**

La prueba de ELISA es una técnica cuyo principio consiste en la captura de antígenos, está basada en la detección de antígenos a través de anticuerpos monoclonales (Mabs), estos Mabs utilizados Reconocen la p125, que debe ser capaz de detectar todas, las cepas del virus de la diarrea viral bovina, la prueba utiliza dos grupos de anticuerpos monoclonales, los cuales reconocen diferentes epítopes conservados en el polipéptido no estructural 125K/80K del virus, uno de ellos está pegado a los pocillos de la microplaca, los cuales capturan al antígeno viral de la muestra, el antígeno capturado es detectado por el otro Mabs conjugado con una peroxidasa, luego el cambio de color seguida de la adición del sustrato de la enzima identifica muestras positivas (Sandvik, 1999).

### **Detección de anticuerpos**

#### **Virus neutralización**

Esta prueba de virus neutralización es muy específica para detectar el vDVB, aceptada en todo el mundo como referencia para determinar anticuerpos contra el vDVB (Edwards, 1990), el fundamento de la prueba radica en la capacidad de los anticuerpos para neutralizar la citopatogenicidad o la capacidad del virus de la diarrea viral bovina de infectar a las células ya sea en vivo o in Vitro, esta prueba es cualitativa y permite detectar y titular anticuerpos, que permite evaluar la respuesta inmune luego de una vacunación y además determinar la antigüedad de una exposición, pero existen varias condiciones que pueden afectar el resultado de la prueba: el biotipo del virus, línea celular, y medio para el cultivo celular y de la performance de la prueba (Fredriksen *et al.*, 1999).

#### **Inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA)**

Esta prueba es muy utilizada debido a que se puede realizar en muestras de leche, plasma y suero, la ventaja es tener el resultado en pocas horas, y es posible su automatización (Sandvik, 1999). La prueba de ELISA pueden ser indirecta o de competición o de bloqueo utilizadas como pruebas tamiz que se utilizan en estudios epidemiológicos y en programas de erradicación de enfermedades (Kramps *et al.*, 1999), las placas de ELISA está preparado recubriendo los pocillos con las soluciones que contienen el antígeno, luego se incuban con anticuerpos marcados que indican la presencia de antígeno en la muestra analizada, en esta prueba es necesario incluir controles positivos y negativos, el sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno y uno secundario marcado contra el primario, la detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal de vida a la unión de dos o más anticuerpos secundario por cada primario (Williams *et al.*, 1999).

### **Detección del ácido nucleico viral**

Los estudios en biología molecular han contribuido al desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico altamente sensibles, estas técnicas de DNA recombinante se aplican para la detección rápida de ácidos nucleicos víricos. La reacción en cadena por la polimerasa (PCR), que es altamente sensible al virus de la diarrea viral bovina (Njaa *et al.*, 2000), este es el método más usado para la



amplificación selectiva in vitro de una región específico del genoma viral, estas moléculas pueden ser utilizadas como componente de un DNA recombinante o como sonda en un test de hibridación. El principio de esta técnica es que moléculas de ácido nucleico marcadas, conocidas como sondas, se unen específicamente a las secuencias complementarias del ácido nucleico de la muestra que se investiga el cDNA del vDVB. El diagnóstico por PCR del vDVB, se hace sobre órganos homogeneizados (enfermedad aguda) o suero (infección persistente). En el caso de la DVB, el RNA vírico debe ser purificado y transcrito a DNA complementario (cDNA), mediante una enzima transcriptasa reversa (Van Oirschot, 1999)

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, muestra la capacidad de monitorear el proceso de la reacción de PCR cuando esto ocurre, los datos son colectados durante el proceso de PCR y no al final, este método usa la técnica de PCR para la cuantificación de ADN y ARN, así mismo el PCR a tiempo real usa moléculas de un reportero fluorescente para monitorear la amplificación de productos durante cada ciclo de reacción, esta técnica tiene simplicidad, especificidad y sensibilidad junto con su determinación como técnica en el futuro y obtener nuevos conocimientos (Weller et al., 2000).

### **Control y Prevención**

Todo programa de prevención, control o erradicación de una enfermedad específica puede tomar distintas estrategias que varían de acuerdo con la situación en que se encuentra el hato, pero apoyadas en tres pilares fundamentales que son: las medidas de bioseguridad, identificación y remoción de los animales PI y vacunación contra la enfermedad en el hato (Ames y Baker, 1990).

Bioseguridad, se debe implementar medidas de bioseguridad que está dirigida a evitar el ingreso del vDVB, como su difusión dentro del hato, a través del control de todos los animales que se ingresan a la granja, los cuáles deben ser seronegativos al virus antes y después de la cuarentena, evitar el contacto directo o indirecto con otros hatos, evitar el servicio con semen sin certificación de ser libre de la enfermedad (Lindberg y Alenius. 1999).

Inmunización con vacunas de virus muertos o modificado, con el objetivo de prevenir la infección, así como para evitar las infecciones postnatales. Contar con el conocimiento de la epidemiología de la DVB y del conocimiento de las pruebas diagnósticas para la identificación de animales positivos (animales PI y animales con infección aguda), que son la fuente más importante de diseminación viral en hatos afectados (Sandvik, 1999).

### **Prevalencia**

#### **Prevalencia a nivel mundial**

Esta enfermedad tiene una distribución mundial y la infección tiende a ser endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas, en la mayoría de los estudios en los diferentes países alcanza niveles de 0,5 a 2% de bovinos persistentemente infectados (PI) y 60 a 80% de bovinos seropositivos (Lertora, 2003). Estudios realizados en diferentes países demuestran que la prevalencia del vDVB, está dentro del 40 - 90% (Kirkland, 1994). En los Estados Unidos se evaluaron 3,157 animales de 67 hatos aproximadamente el 50% de los hatos tenían infección por vDVB, mostrando 89% de animales positivo anticuerpos; en Suecia, evaluaron un total de 711 vaquillonas seleccionadas para inseminación artificial 41% de animales positivos anticuerpos (Houe, 1995).



Estudios de seroprevalencia realizados por (Barrientos, 2002) en la republica de Chile, determina para las diferentes regiones de 59,7%, 77,8%, 69,2% en ganado lechero y 86% en ganado de carne

#### **A nivel nacional**

En la provincia de Arequipa se encontró una prevalencia de la DVB en animales PI del 27.8% para el establo A y para el establo B, 0.16% (Morales et al., 2001), así mismo Manrique (2002). reporto que el 65% de vacas son positivas al virus de la diarrea viral bovina (vDVB), lo que significa que más de la mitad de los animales han sido expuestas al virus en algún momento de su vida.

Se determinó la prevalencia del virus de la diarrea viral bovina en muestras de leche de bovinos de las 3 provincias ubicados en el Valle del Mantaro, Junín. Para lo cual se colectaron muestras de leche y sangre, utilizando la prueba de ELISA indirecta y virus neutralización. El 72.4% (165/228) de los animales muestreados presentaron anticuerpos contra el virus en leche. La prevalencia del vDVB fue mayor en los animales de la provincia de concepción (86.3%), seguido por Jauja (83.3%) y Huancayo (41.3%). La alta prevalencia del vDVB en los animales de todos los hatos muestreados se confirma la mayor difusión del virus en la población bovina del Valle del Mantaro (contreras *et al.*, 2000).

En la cuenca lechera del distrito de Moquegua obtuvo una seroprevalencia general de 29.63%, en la variable edad menores de 2 años y mayores de 2 años 9.68% y 42% respectivamente, para la variable sexo fue de 25% y 29.87%, en la variable estado productivo en gestantes fue de 33.33% y en vacas vacias 45.45% (Suni, 2014).

En la Comunidad de Huisacollana del Distrito de Yauri, Provincia de Espinar – Cusco, se determinó la seroprevalencia general para vDVB de 58.8%, según estado productivo 58.8% para vacas en secas y 71.2% para vacas en lactación, según sexo 50.0% para machos y 60.2% para hembras, y según clase animal 27.8%, 66.7%, 57.1%, 68.1% 57.1%, 33.3% y 66.7% para terneras, vaquillas, vaquillonas, vacas, terneros, toretes y toros respectivamente. (Huacasi, B. 2018)

#### **A nivel regional**

En la provincia de Melgar de un total de 337 muestras de suero, muestreados al azar, encontraron una seroprevalencia general para el vDVB de  $47 \pm 0.05\%$  (Quispe, 2008),

En el fundo Cauranhuyo del Distrito de Huacullani de la provincia de Chucuito a se determinó la seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina, para lo cual se evaluaron 92 animales entre jóvenes y adultos, la condición reproductiva (vacías y gestantes). encontrando una prevalencia general de 23.91%, para la variable edad fue de 12.50% para los animales jóvenes y de 27.94% para los animales adultos; referente a la condición gestación, se obtuvo el 21.74% para los animales gestantes y el 24.64% para las vacias (Ramos D., 2016).

#### **VI. Hipótesis del trabajo**

Ha = Existe casos positivos al análisis serológico del virus de la Diarrea Viral Bovina el distrito de Mañazo

#### **VII. Objetivo general**

Determinar la seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina (vDVB) en vacunos de la raza Brown Swiss en el distrito de Mañazo.



### VIII. Objetivos específicos

- Determinar la seroprevalencia del virus de la diarrea viral Bovina según sexo (machos y hembras).
- Determinar la seroprevalencia del virus de la diarrea viral Bovina por edad (menores de 2 años y mayores de 2 años).
- Determinar la seroprevalencia del virus de la Diarrea Viral Bovina según estado reproductivo (preñadas y vacías).

### IX. Metodología de investigación

#### **Lugar de estudio.**

El presente trabajo de investigación se realizará en el distrito de Mañazo, Provincia de Puno y de la región de Puno Ubicado a una altura de 3890 msnm. Las muestras de sangre serán tomadas en el distrito de Mañazo y el suero sanguíneo se analizarán en el laboratorio de salud animal con sede en el CE. Chuquibambilla de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNA – Puno.

#### **Materiales**

##### **Animales**

El número de muestra se determinó por conveniencia, por lo tanto los animales para el presente estudio será de la raza Brown Swiss en número de 92 animales, en un promedio de 14 a 16 vacunos para cada grupo, que se seleccionaran para la toma de muestras de sangre según sexo (machos y hembras), edad (menores de 2 años y mayores de 2 años), estado fisiológico (preñadas y vacías) y estado productivo (en producción y en secas).

##### **Método de diagnóstico.**

Se realizará mediante la prueba (kit) ELISA para la detección de anticuerpos contra Diarrea Viral Bovina, en muestras individuales de suero.

#### **Procedimiento de la prueba**

Dejar que todos los reactivos alcancen la temperatura 18 a 26 °C y asegurar de que los reactivos estén bien mezclados realizando una inversión suave del frasco.

Se debe preparar una hoja de datos para identificar los pocillos individuales para cada muestra y control. Los Controles positivo y negativo por duplicado.

Se retira la cubierta adhesiva de plástico y se procede a añadir:

Tomar las placas tapizadas y marcar la posición de las muestras

Añadir 100 µl de diluyente de muestra a cada pocillo

Añadir 25 µl de control negativo (CN) en dos pocillos

Añadir 25 µl de control positivo (CP) en dos pocillos

Añadir 25 µl de las muestras en los pocillos restantes

Homogenizar el contenido de los pocillos

Eliminar el contenido de líquidos de cada pocillo y lavar cada pocillo con aproximadamente 300 µl de solución de lavado por 5 veces

Dispensar 100 µl de conjugado a cada pocillo

Incubar durante 30 minutos ( ± 2 minutos) a 18 a 26 °C

Repetir el lavado

Dispensar 100 µl de sustrato TMB n° µl 12 en cada pocillo

Incubar durante 10 minutos ( ± 1 minutos) a 18 a 26 °C



Dispensar 100 µl de solución de frenado nº 3 en cada pocillo  
Hacer la lectura de las absorbancias a 450nm

### Obtención de las muestras

Previo y durante la colección de muestras se registró e identificó a los animales según sexo y categoría a lo que pertenece.

Las muestras fueron colectadas en el mes de noviembre del 2017 por punción venosa (yugular) en tubos al vacío sin anticoagulante a 91 vacunos, aproximadamente de 5 a 8 ml y seguidamente se llevó las muestras a un cuarto facilitado por los productores, donde se centrifugó a 3500 rpm por un lapso de 5 minutos, con el fin de separar el suero sanguíneo, para luego aislarlo en viales de 2ml y finalmente se trasladaron las muestras a una temperatura de 5-8 °C al CIP. Chuquibambilla (laboratorio de salud animal), conservados a -20°C hasta el momento de su análisis.

### Detección de anticuerpos contra vDVB.

La detección de los anticuerpos contra el vDVB se realizó mediante la prueba ELISA indirecta y utilizando placas descartables de 98 hoyos, según la técnica descrita por la FAO, (2006) en el laboratorio de salud animal.

### Análisis Serológico

#### Prueba de Elisa para el virus de la diarrea viral bovina

Fundamento.

Se basa en el antígeno inmovilizado del virus de la diarrea viral bovina (vDVB) sobre una fase sólida, mediante anticuerpo que directa o indirecta producen una reacción y cuyo producto, es un colorante que es medido por el espectrofotómetro.

Interpretación de resultados.

- ✓ Cálculos de control.

$$CNx = \frac{CN1 A(450) + CN2 A(450)}{2}$$

- ✓ Criterio de validación.

$$CNx \geq 0.800$$

$$CP: CNx \leq 0.20$$

- ✓ Cálculo para muestra.

$$\frac{M}{N} \% = 100x \frac{Muestra A(450)}{CNx}$$

- ✓ Interpretación en muestra de suero

Negativo	Dudoso	Positivo
M/N ≥ 50%	40% < M/N < 50%	M/N ≤ 50%

### Análisis de datos

#### Estimación de la prevalencia.

Para estimar la Seroprevalencia de la Diarrea Viral Bovina Bovina se realiza mediante la siguiente fórmula.

$$P = \frac{N^{\circ} \text{ de Muestras Positivas}}{N^{\circ} \text{ Total DE Muestreo}} \times 100$$

#### Método estadístico.

Por ser una investigación cuantitativa con variables o valores numéricos. Para el análisis estadístico se utilizará la prueba de Chi Cuadrada para las variables



sexo, edad y estado reproductivo y productivo de los vacunos; para lo cual se utilizará la siguiente fórmula.

$$X_c^2 = \frac{\sum(O_i - E_j)^2}{E_j}$$

Dónde:

$X_c^2$  = Ji - Cuadrado calculado.

$O_i$  = Valores observados de Diarrea Viral Bovina.

$E_j$  = Valores esperados de Diarrea Viral Bovina.

$\Sigma$  = Sumatoria = Valor calculado de ji-cuadrado.

## X. Referencias

- Álvarez, Y. (2019). Seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina (DVB) en vacunos Brown Swiss en la cuenca lechera del distrito de Pomata tesis para optar el título profesional de médico veterinario y zootecnista UNA –Puno, Peru.
- Ames, T. Y A. Baker, (1990). Management practices and vaccination program that help control BVD virus infection. In: Symposium on BVD. Vet Med Get: 15-24.
- Apaza, D. (2020). Seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina (DVB) en vacunos Brown Swiss en el distrito de Umachiri tesis para optar el título profesional de médico veterinario y zootecnista UNA –Puno, Peru.
- Baker, J. (1995). The Clinical Manifestation of Bovine Viral Diarrhea infection. In BVD virus. Vet Clin North Am Food Anim Practice 11(3): 425-445.
- Barrientos, C. (2002). Presencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus de diarrea viral bovina (VDVB) en sueros bovinos de 4 predios de la IX Región. Tesis, Universidad de Temuco- Chile.
- Bolin S. (1990). Control of bovine virus diarrhoea virus. Rev Sci Tech 9 (1): 163-71.
- Brock, K., and C.C. Chase (2000). Development of a fetal challenge method for the evaluation of bovine viral diarrhea virus vaccines. Veterinary Microbiol 77(1-2): 209-14.
- Contreras, O., K. Stahl, C. Arana, H. Rivera, (2000). Anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina en muestras de leche de bovinos del valle de Mantaro (Jauja, Concepción y Huancayo) Rev. inv. Perú 12(2): 167 -122.
- Fredriksen, B., T. Sandvik, T. Loken y S.A. Odegaard (1999). Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhea virus. Vet Record 144:111-114.
- Hilbe M., E. Stalder, M. Peterhans, Haessig M. Nussbaumer, C. Egli, Schelp, K Zlinszky and F. Ehrensperger (2007). Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhea virus infection in calves. J Vet Diagn. Invest. 19:28-34.
- Houe, H., (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV). Vet Microbiol, 64 (2-3): 89-107.
- Houe, H. (1995). Epidemiology of bovine viral diarrhea Virus. Vet Clin North Am Food Animal Practice 11(3):521-547.



- Houe, H. (2003). Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* 31: 137-143.
- Huacasi, B. (2018). Seroprevalencia de rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y diarrea viral bovina (DVB) en vacunos Brown Swiss de la comunidad de Huisacollana del distrito de Yauri- Espinar - Cusco, tesis para optar el título de médico veterinario y zootecnista UNA –Puno, Peru.
- Kirkland, P.D., S. Macintosh and Moyle, (1994), the outcome of widespread use of seaman from a bull persistently infected with pestivirus. *Vet. Rec.* 135:527-529.
- Kobrak, A. y E.L. Weber. (1997). Bovine diarrhea virus: and update. *Rev Argent Microbiol* 29(1):47-61
- Kramps J.A., C.Maanen, G.Van de Wetering y G. Stendas. (1999). A simple, rapid and reliable enzyme linked immunosorbent assay for detection of bovine virus diarrhea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. *Vet Microbiol* 64:135-144.
- Lindberg, A. Y A. Alenius. (1999). Principles for eradication of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) infection in cattle populations. *Vet Microbiol* 64: 197-222.
- Njaa. B.; E. Clarck: E. Jansen; J. Ellis; D. Haines. (2000). Diagnosis of Persistent Bovine Viral Diarrhea Virus infection of Immunohistochemical Staining of Formalin – Fixed Skin Biopsy Specimens. *J. Vet Diagn Invest* 12:393-399.
- Mcgowan, M.R., P.D. Kirkland, B.J. Rodwell, D.R. Kerr, Y C.L. Carroll (1993). A field investigation of the effects of bovine viral diarrhea virus around the time of insemination on the reproductive performance of cattle. *Theriogenology* 39: pág. 443–449.
- Manrique G., (2002). Aborto viral. *Medicina A de la Producción. LABVETSUR* Año 1 No 1, Julio 2002.
- Morales, S., A. Benito, H. Rivera. (2001). Terneros persistentemente infectados con el virus de la diarrea viral bovina en dos hatos lecheros de la provincia de Arequipa. *Rev. Acad. Peru. Cienc. Vet.* 3: 8-13.
- Quiñones, j. (2006). Seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina (DVB), en la estación experimental ILLPA INIA Puno, tesis para optar el título de médico veterinario y zootecnista UNA –Puno, Peru.
- Quispe, R. (2008). Prevalencia de diarrea viral bovina en la provincia de Melgar-Puno. *Tesis Med. Vet.- UNA, Puno.*
- Ramos, D. (2016). Seroprevalencia de anticuerpos al virus de la diarrea viral bovina en el distrito de Huacullani – Puno. *Tesis Med. Vet.- UNA, Puno.*
- Ridpath, J. (2005). BVDV genotypes and biotibes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals* 31:127-131.
- \*Sandvik, T. (1999). Laboratoy diagnostic investigations for bovine viral diarrhea virus infections in cattle. *Vet Microbiol.* 64:123-134.
- Sanjuan M.I., C. García y J. Corrales. (1999). Etiopatogenia de la diarrea viral bovina: aspectos de interés. En: E. Yus y M.L. Sanjuán. Eds. *Diarrea virica bovina: Consejo General de Medicos Veterinarios de España.* 24:9-24.
- Suni, L. (2014). Seroprevalencia de la diarrea viral bovina en la Cuenca lechera del distrito de Moquehua. *Tesis Med. Vet.- UNA, Puno.*
- Travén, M., S. Alenius, C. Fossum, Y B. Larsson. (1991). Primary bovine viral diarrhea virus infection in calves following direct contact with a



- persistently viraemic calf. J. Vet. Med. 38:435-462.
- Williams D.J., Y H.C. Davison, (1999). Evaluation of a commercial ELISA for detecting seruni, antibody to Neospore caninum in cattle. Vet. Rec; 154:571 - 575
- Van Oirschot, J.T., C.J. Bruschkne y P.A. Van Rijn (1999). Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea. Vet Microbiol 64:169-183.
- Vanroose, G., H. Nauwinck; A. Soom; E. Vanopdenbosch; A. de Kruif (1998). Replication of Cytopathic and Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus in zone – Free and Zone – Intact in Vitro – Produced Bovine Embryos and the Effect on Embryo Quality, Biology of reproduction. 58:857-866

#### **XI. Uso de los resultados y contribuciones del proyecto**

El uso de los resultados y contribuciones del proyecto Los resultados del presente trabajo de investigación es de mucha utilidad para el diagnóstico de la presencia de la Diarrea Viral Bovina, que afectan negativamente a la reproducción y producción de vacunos de esta manera informar a los profesionales y técnicos que manejan la ganadería vacuna sobre los signos clínicos que ocasiona esta enfermedad y en lo académico en la formación de estudiantes en Medicina Veterinaria, considerando que serán herramientas importantes en el diagnóstico de enfermedades clínicas y subclínicas, y su diferenciación.

#### **XII. Impactos esperados**

##### **i. Impactos en Ciencia y Tecnología**

El impacto a determinar al realizar el estudio de la seroprevalencia de la Diarrea Viral Bovina en el distrito de Mañazo, es para poder implementar programas de prevención y control de esta enfermedad infecciosa, así para implementar programas de vacunación y erradicación de la enfermedad, que tienen que ver con el avance de la ciencia y tecnología, así como los alimentos que se consumen, los productos que se compran, los medicamentos que se utilizan por tanto la investigación que se propone, tiende a incrementar la producción y productividad en la crianza de vacunos con la aplicación de los resultados (conocimiento) logrados con el presente trabajo de investigación en al altiplano.

##### **ii. Impactos económicos**

La crianza del ganado vacuno en el Perú y la región de puno, constituye una actividad de mucha importancia en la estructura económica y social dentro del sector agropecuario, ya que contribuye a mejorar los ingresos económicos de los criadores de vacunos en el altiplano y además debemos tener una producción libre de enfermedades infecciosas que sin duda pueden mejorar el ingreso de las familias dedicadas a estas crianzas. ya que genera una gran cantidad de subproductos sobre todo la producción de leche.



### iii. Impactos sociales

La crianza de vacunos productoras de leche en la Región de Puno ha aumentado considerablemente en los últimos años y también el número de familias involucradas en la cadena productiva, por lo que repercute en la generación de empleo, además el consumo de proteínas de origen animal de las poblaciones vulnerables a desnutrición y contribuyendo a garantizar la seguridad alimentaria.

### iv. Impactos ambientales

Con la ejecución del proyecto de la seroprevalencia de la Diarrea Viral Bovina, al determinar animales positivos se evitará la contaminación de campos de pastoreo, fuentes de agua y otros, de esta manera evitar la transmisión de dicha enfermedad infecciosa que trae problemas en la salud de los animales

## XIII. Recursos necesarios

### 13.1. Materiales para la obtención de muestras.

#### 13.1.1. Muestra.

La muestra está constituida por 92 vacunos de la cuenca lechera de distrito de Mañazo, provincia de Puno de la Región de Puno.

#### 13.1.2. Materiales para la toma de muestras de sangre

- Aguja vacutainer N° 21G. x 1 pulgadas.
- Frascos colectores de suero sanguíneo (viales criogénicos) x 2mL
- Tubos vacutainer de 7mL
- Algodón.
- Alcohol yodado al 3%
- Lapiceros de tinta indeleble.
- Micropipetas de 100 µl
- Guantes.

#### 13.1.3. Materiales para el envío de muestras

- Cajas térmicas (tecnopor).
- Geles.
- Plástico y papel.

#### 13.1.4. Otros Materiales

- Jabón carbólico.
- Cámara fotográfica.
- Sogas.
- Mocheta.
- Formatos.

#### 13.1.5. Materiales para la prueba de ELISA.

##### 13.1.5.1. Reactivos.

- 1 Placa tapizado con antígeno Diarrea Viral Bovina
- 2 Control negativo
- 3 Control positivo
- 4 Conjugado.
- 5 Diluyente de la muestra.
- A Substrato TMB n.º12.



- B Solución de frenado n.º3
- C Solución de lavado concentrada (10X).

### 13.5.2. Equipos

- Estufa incubadora a 37°C
- Refrigeradora convencional
- Congeladora a -20°C
- Potenciómetro.
- Contómetro de tiempo.
- Lector de placas de ELISA
- Vortex
- Micropipeta canal simple 20 a 200 µl.
- Micropipeta canal simple 100 a 1000 µl
- Micropipeta multicanal 50 a 300 µl.

#### XIV. Localización del proyecto (indicar donde se llevará a cabo el proyecto)

El presente estudio se realizará para la toma de muestras de sangre en la cuenca lechera de distrito de Mañazo, de la provincia de Puno, región Puno, que se encuentra ubicado a una altitud de 3980 msnm y el análisis de laboratorio se realizará en el laboratorio de salud animal del CE Chuquibambilla

#### XV. Cronograma de actividades

ACTIVIDAD	MESES											
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Presentación de proyecto	X											
Revisión de literatura		X	X	X	X							
Toma de muestras de sangre						X	X					
Análisis de laboratorio								X	X			
Redacción del trabajo										X	X	
Presentación del informe final												X



XVI. Presupuesto

DESCRIPCION	Unidad de medida	Costo Unitario S/	Cantidad	Costo total S/
Material de campo				
Caja de Tecnopor	Unidad	15.00	01	15.00
Agujas vacutainer	Ciento	0.30	100	30.00
Tubos vacutainer	Ciento	0.50	100	50.00
Viales	Ciento	0.20	100	20.00
Alcohol yodado	Litro	20.00	1	20.00
Algodón	Kilo	18.00	1/2	9.00
Libreta de campo	Unidad	3.00	1	3.00
Sogas	Metros	3.00	10	30.00
Material de laboratorio				
Tips	Ciento	0.20	100	20.00
Papel toalla	Unidad	4.00	03	12.00
Kits de ELISA para DVB	Kits	960.00	96 reac	960.00
Pasajes y viáticos	Días	80.00	5	400.00
TOTAL				1569.00