



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Medicina Veterinaria**

**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria**

**Detección y caracterización molecular de los diferentes  
géneros de Coronavirus (CoV) que circulan en alpacas  
(*Vicugna pacos*) pertenecientes a comunidades  
localizadas en la provincia de Canchis - Departamento  
del Cuzco**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria

**AUTOR**

Dayana Amparo CASTILLA RAMIREZ

**ASESOR**

Dr. Miguel Angel ROJAS MONTES

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Castilla D. Detección y caracterización molecular de los diferentes géneros de Coronavirus (CoV) que circulan en alpacas (*Vicugna pacos*) pertenecientes a comunidades localizadas en la provincia de Canchis - Departamento del Cuzco [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2023.

---

## Metadatos complementarios

<b>Datos de autor</b>	
Nombres y apellidos	Dayana Amparo Castilla Ramirez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	44066664
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0009-0005-9524-1652">https://orcid.org/0009-0005-9524-1652</a>
<b>Datos de asesor</b>	
Nombres y apellidos	Miguel Angel Rojas Montes
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	42290575
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0001-5029-3874">https://orcid.org/0000-0001-5029-3874</a>
<b>Datos del jurado</b>	
<b>Presidente del jurado</b>	
Nombres y apellidos	Victor Raúl Leyva Vallejos
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	24675829
<b>Miembro del jurado 1</b>	
Nombres y apellidos	Alberto Gustavo Manchego Sayán
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	15619652
<b>Miembro del jurado 2</b>	
Nombres y apellidos	Dennis Alexander Navarro Mamani
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	70444236
<b>Datos de investigación</b>	

Línea de investigación	1. Básica, producción y sanidad de camélidos sudamericanos
Grupo de investigación	GIVIVET (Grupo de Investigación en Virología e inmunología Veterinaria)
Agencia de financiamiento	FONDECYT-CONCYTEC VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO N° de contrato 355-2019
Ubicación geográfica de la investigación	Laboratorio de Virología e Inmunología. Facultad de Medicina Veterinaria-UNMSM Latitud: 12° 08' 15'' Longitud: 76° 98' 77''
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2020
URL de disciplinas OCDE	Ciencia veterinaria <a href="http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01">http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01</a>



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
**Universidad del Perú, Decana de América**  
**Facultad de Medicina Veterinaria**  
**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL  
TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIA**

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **martes 05 de junio de 2023**, a las **12:00** horas., se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **0101-EPMV/FMV-2023**, integrado por los siguientes profesores:

<b>MV. PhD. Leyva Vallejos, Victor Raúl</b>	<b>Presidente del Jurado</b>
<b>MV. Dr Rojas Montes, Miguel Angel</b>	<b>Asesor de la Tesis</b>
<b>MV. Mg. Manchego Sayán, Alberto Gustavo</b>	<b>Miembro del Jurado</b>
<b>MV. Mg. Navarro Mamani, Dennis Alexander</b>	<b>Miembro del Jurado</b>

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **CASTILLA RAMIREZ DAYANA AMPARO** para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

**“DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS DIFERENTES GÉNEROS DE CORONAVIRUS (CoV) QUE CIRCULAN EN ALPACAS (*Vicugna pacos*) PERTENECIENTES A COMUNIDADES LOCALIZADAS EN LA PROVINCIA DE CANCHIS, DEPARTAMENTO DEL CUZCO”,**

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **Dieciocho (18)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIA** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las ....., concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:



Firmado digitalmente por LEYVA VALLEJOS Victor Raul FAU 20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 12.06.2023 15:42:04 -05:00

.....  
Leyva Vallejos, Victor Raúl: MV. PhD. Prof. Principal DE



Firmado digitalmente por ROJAS MONTES Miguel Angel FAU 20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 13.06.2023 09:50:26 -05:00

.....  
Rojas Montes, Miguel Angel: MV. Dr. Prof. Asociado TC



Firmado digitalmente por MANCHEGO SAYAN Alberto Gustavo FAU 20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 06.07.2023 23:22:57 -05:00

.....  
Manchego Sayán, Alberto Gustavo: MV. Mg. Prof. Principal DE



Firmado digitalmente por NAVARRO MAMANI Dennis Alexander FAU 20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 10.07.2023 14:37:26 -05:00

.....  
Navarro Mamani, Dennis Alexander: MVZ. Mg. Prof. Auxiliar DE



## CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Miguel Angel Rojas Montes en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Decanal N°0101-EPM/FMV-2023 de la tesis informe de investigación, cuyo título es **“DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS DIFERENTES GÉNEROS DE CORONAVIRUS (CoV) QUE CIRCULAN EN ALPACAS (*Vicugna pacos*) PERTENECIENTES A COMUNIDADES LOCALIZADAS EN LA PROVINCIA DE CANCHIS - DEPARTAMENTO DEL CUZCO”**, presentado por el bachiller Dayana Amparo Castilla Ramirez para optar el título de Médico Veterinario CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 10% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional**.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del título correspondiente.



UNMSM

Firmado digitalmente por ROJAS  
MONTES Miguel Angel FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 04.09.2023 15:49:14 -05:00



---

DNI: 42290575

Dr. Miguel Angel Rojas Montes

## DEDICATORIAS

*A mi madre, mi difunto padre y hermanos  
por brindarme su apoyo y entusiasmo para  
seguir adelante a pesar de las dificultades.*

*A mis profesores de la universidad que me formaron  
académicamente y me brindaron sus enseñanzas  
para culminar esta linda carrera.*

*A mis amigos de la universidad con  
los que compartí agradables  
momentos.*



## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios Padre quien me fortalece en cada prueba, brindándome salud y por darme la posibilidad de conocer a excelentes personas que serán amistades para toda la vida.

A mi director de tesis, el Dr. Miguel Angel Rojas Montes, por darme la confianza y oportunidad de realizar esta tesis, por sus enseñanzas y su dedicación en el desarrollo de esta tesis y por brindarme su valioso tiempo, su apoyo y su amistad en los momentos más difíciles de mi vida; le estaré siempre agradecida.

A FONDECYT-CONCYTEC y al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM (VRIP-UNMSM) por la subvención del trabajo de tesis a través del Proyecto de Ciencias Básicas-FONDECYT con N° de contrato 355-2019 y al PCONFIGI-2021 Proyecto N° A21080551 (Resolución Rectoral N° 05753-R-21), respectivamente. Sin su importante soporte financiero al desarrollo de la ciencia en nuestro país, no hubiera sido posible este estudio.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIAS -----	ii
AGRADECIMIENTOS -----	iii
ÍNDICE-----	iv
RESUMEN -----	vii
ABSTRACT-----	viii
LISTA DE CUADROS -----	ix
LISTA DE FIGURAS -----	x
LISTA DE ANEXOS -----	xi
I. INTRODUCCIÓN-----	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA-----	2
2.1. Distribución y población de la ganadería alpaquera-----	2
2.1.1. Comunidades alpaqueras -----	3
2.1.2. Tipos de unidades productivas -----	3
2.2. Influencia en la economía de la producción de alpacas-----	4
2.3. Enfermedades infecciosas en crías de alpacas -----	5
2.3.1. Complejo entérico neonatal -----	5
2.3.2. Procesos respiratorios agudos -----	6
2.4. Coronavirus -----	6
2.4.1. Taxonomía y clasificación -----	7
2.4.2. Morfología y estructura viral-----	11
2.4.2.1 Proteína Espícula (S)-----	11
2.4.2.2 Proteína de membrana (M)-----	13
2.4.2.3 Proteína de envoltura (E)-----	14
2.4.2.4 Proteína Hemaglutinina Esterasa (HE)-----	15
2.4.2.5 Proteína N-----	16
2.4.3. Estructura y organización genómica-----	17
2.4.4. Ciclo de replicación-----	17
2.4.4.1 Adhesión celular, entrada del virión y depósito del genoma-----	18
2.4.4.2 Traducción del Complejo replicasa transcriptasa-----	20

2.4.4.3	Síntesis, replicación y transcripción-----	21
2.4.4.4	Ensamblaje y liberación de viriones -----	22
2.4.5.	Epidemiología-----	23
2.4.5.1	Epidemiología de coronavirus en animales de ganado-----	23
2.4.5.2	Epidemiología de coronavirus aviares-----	25
2.4.5.3	Epidemiología de coronavirus con implicancia en salud pública	26
2.4.5.4	Ensamblaje y liberación de viriones -----	22
2.4.6.	Transmisión y patogénesis-----	27
2.4.6.1	Coronavirus porcinos-----	27
2.4.6.2	Coronavirus bovino-----	28
2.4.6.3	Coronavirus caninos-----	29
2.4.6.4	Coronavirus felinos -----	29
2.4.6.5	Coronavirus murinos -----	30
2.4.6.6	Coronavirus aviares -----	30
2.4.6.7	Coronavirus humanos -----	31
2.5.	Coronavirus en camélidos-----	31
III.	MATERIALES Y MÉTODOS -----	33
3.1.	Lugar y tiempo de estudio -----	33
3.2.	Muestras biológicas -----	33
3.3.	Metodología-----	34
3.3.1.	Procesamiento de las muestras-----	34
3.3.2.	Controles positivos-----	35
3.3.3.	Extracción de ARN viral-----	35
3.3.4.	Producción de ADN complementario (ADNc) viral y detección de CoV	36
3.3.5.	Reacción de PCR anidada para la detección de <i>Betacoronavirus</i> -----	37
3.3.6.	Reacción de PCR anidada para la identificación del subgénero <i>Embecovirus</i> ( <i>Betacoronavirus</i> tipo 1)-----	38
3.3.7.	Electroforesis en gel de Agarosa-----	38
3.3.8.	Identificación del género de coronavirus de las muestras negativas a <i>Betacoronavirus</i> y <i>Embecovirus</i> por PCR anidada-----	39
3.3.9.	Secuenciamiento de los productos amplificados-----	39
3.3.10.	Análisis de secuencias de nucleótidos-----	39
IV.	RESULTADOS -----	41

4.1. Detección e identificación de los géneros y subgéneros de Coronavirus -----	41
4.2. Secuenciamiento y análisis filogenético de las muestras positivas a <i>Embecovirus</i> -----	44
V.DISCUSIÓN -----	48
VI.CONCLUSIONES -----	53
VII.RECOMENDACIONES -----	54
VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	55
IX.ANEXOS -----	63

## RESUMEN

Los coronavirus (CoV) causan enfermedades respiratorias en humanos y animales. CoV forma parte del complejo diarreico neonatal en alpacas y llamas; la presencia de CoV en combinación con otras infecciones (virales, bacterianas y parasitarias) pueden agravar el cuadro clínico. El objetivo del presente estudio fue identificar los diferentes géneros de CoV que circulan en alpacas de tres comunidades localizadas en la provincia de Canchis, departamento del Cuzco. Se colectaron 68 muestras de heces con y sin signos de diarrea de alpacas de 1 a 5 semanas. La detección de CoV se realizó mediante la técnica RT-PCR y PCR anidada usando cebadores específicos para la amplificación de una región conservada del gen que codifica la ARN dependiente de la ARN polimerasa (RdRp) viral de todos los géneros de CoV. Para diferenciar al género *Betacoronavirus* ( $\beta$ CoV), se realizó una PCR anidada utilizando cebadores específicos. Las muestras positivas a  $\beta$ CoV fueron analizadas por PCR anidada con cebadores específicos para la identificación del subgénero *Embecovirus*. Las muestras positivas a CoV y que fueron negativas al género  $\beta$ CoV o al subgénero *Embecovirus* fueron sometidos al secuenciamiento de una región parcial de la RdRp para identificar el género del virus por análisis filogenético. El 86.8% (59/68) de muestras analizadas fueron positivas a CoV. El 93.2% (55/59) de las muestras positivas a CoV fueron  $\beta$ CoV. De estos, 15 (25.4%) pertenecen al subgénero *Embecovirus*. No se logró identificar el género para 4 (6.8%) muestras. Nuestros datos muestran una alta frecuencia de CoVs infectando alpacas en el área de estudio y a su vez una amplia variedad genética ya que hay más de un género y subgénero de CoV circulando en alpacas de 3 comunidades de Canchis, Cuzco.

**Palabras claves:** Alpaca, coronavirus, Betacoronavirus, diarrea, comunidades.

## ABSTRACT

Coronaviruses (CoV) cause respiratory diseases in humans and animals. CoV is part of the neonatal diarrheal complex in alpacas and llamas; the presence of CoV in combination with other infections (viral, bacterial and parasitic) can aggravate the clinical picture. The objective of this study was to identify the different genera of CoV circulating in alpacas from three communities located in the province of Canchis, department of Cuzco. 68 feces samples with and without signs of diarrhea were collected from alpacas from 1 to 5 weeks. CoV detection was performed using the RT-PCR and nested PCR technique using specific primers for the amplification of a conserved region of the gene that encodes viral RNA polymerase dependent RNA (RdRp) from all CoV genera. To differentiate the genus *Betacoronavirus* ( $\beta$ CoV), a nested PCR was performed using specific primers.  $\beta$ CoV-positive samples were analyzed by nested PCR with specific primers for the identification of the *Embecovirus* subgenus. Samples positive for CoV and negative for the genus  $\beta$ CoV or the subgenus *Embecovirus* underwent sequencing of a partial region of the RdRp to identify the genus of the virus by phylogenetic analysis. 86.8% (59/68) of samples analyzed were positive for CoV. 93.2% (55/59) of the CoV-positive samples were  $\beta$ CoV. It was not possible to identify the gender for 4 (6.8%) samples. Our data show a high frequency of CoVs infecting alpacas in the study area and, in turn, a wide genetic variety since there is more than one genus and subgenus of CoVs circulating in alpacas from 3 communities in Canchis, Cuzco.

**Key words:** Alpaca, coronavirus, Betacoronavirus, diarrhea, communities.

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Población de alpacas por departamento -----	2
<b>Cuadro 2.</b> Distrito y números de comunidades campesinas-----	3
<b>Cuadro 3.</b> Participación en la producción de fibra según tipo de productor -----	4
<b>Cuadro 4.</b> Clasificación de coronavirus -----	9
<b>Cuadro 5.</b> Receptores de coronavirus -----	20
<b>Cuadro 6.</b> Relación de las comunidades campesinas muestreadas, especie, período de colecta y número de muestras fecales de alpacas que serán analizados. -----	34
<b>Cuadro 7.</b> Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT- PCR y PCR anidado para la detección de CoV y BetaCoV.-----	37
<b>Cuadro 8.</b> Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR anidada para la detección de <i>Embecovirus</i> -----	38
<b>Cuadro 9.</b> Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-PCR para el secuenciamiento -----	39
<b>Cuadro 10.</b> Distribución de la infección por coronavirus entre las alpacas de tres comunidades de la provincia de Canchis de Cuzco -----	42
<b>Cuadro 11.</b> Resultado de la identificación del género <i>Betacoronavirus</i> y subgénero <i>Embecovirus</i> en alpacas de tres comunidades campesinas de la provincia de Canchis, departamento de Cuzco. -----	44
<b>Cuadro 12.</b> Distancia filogenética representada en el porcentaje de identidad de nucleótidos entre las secuencias de alpacas peruanas y el resto de las estirpes de coronavirus las cuales se agrupan en los 4 géneros del virus. -----	47

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Organización taxonómica actual del reino <i>Nidovirales</i> y de la familia <i>Coronaviridae</i> . -----	8
<b>Figura 2.</b> Esquematación de las partículas de los Coronavirus. -----	11
<b>Figura 3.</b> Representación de la proteína S. -----	13
<b>Figura 4.</b> Representación de la proteína M. -----	14
<b>Figura 5.</b> Representación de la proteína E. -----	15
<b>Figura 6.</b> Representación de la proteína HE. -----	16
<b>Figura 7.</b> Representación de la proteína N. -----	17
<b>Figura 8.</b> Estructura genómica de los Coronavirus. -----	18
<b>Figura 9.</b> Replicación de coronavirus y su mecanismo de fusión. -----	19
<b>Figura 10.</b> Replicación de coronavirus. -----	22
<b>Figura 11.</b> Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio mostrando los productos amplificados de la RT-PCR de pancoronavirus (280 pb). -----	41
<b>Figura 12.</b> Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio mostrando los productos amplificados de la nested-PCR de Betacoronavirus (227 pb). -----	43
<b>Figura 13.</b> Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio mostrando los productos amplificados de la nested-PCR de Betacoronavirus (227 pb). -----	43
<b>Figura 14.</b> Dendograma realizado en base a las secuencias parciales del gen ORF1 que codifica la RdRp de CoV, obtenidas de las muestras de alpacas neonatas positivas a <i>Embecovirus</i> . -----	46



## LISTA DE ANEXOS

**Anexo 1:** -----63

## I. INTRODUCCIÓN

Los coronavirus (CoV) son reconocidos como agentes patógenos causales de enfermedades diarreicas y respiratorias en muchas especies de ganado, aves de corral y animales de compañía. El género *Betacoronavirus* ( $\beta$ CoV) produce tanto enfermedades respiratorias y entéricas de gran importancia a nivel global, este género está subdividido en cinco subgéneros (*Embecovirus*, *Sarbecovirus*, *Merbecovirus*, *Hibecovirus* y *Nobecovirus*) y dependiendo de cada subgénero las especies virales tienden a tener menor o mayor potencial zoonótico. Las infecciones por CoV en alpacas neonatas representan una problemática importante ya que forma parte del complejo diarreico neonatal en esta especie. Los cuadros diarreicos donde se han identificado al CoV están asociados a una enteritis necrótica hemorrágica que lleva a una alta mortalidad y morbilidad en estos animales. Un primer estudio publicado por Rojas *et al.*, (2016), describió un brote de cuadros diarreicos en alpacas neonatas de la comunidad rural de Silli ubicado en la provincia de Canchis en la cual se reportó una frecuencia de 40% de animales con CoV. Es por ello que este estudio está enfocado en determinar a nivel molecular la frecuencia del virus, así como identificar los géneros de CoV que circulan en alpacas neonatas pertenecientes a tres comunidades campesinas (Silli, Quisini y Patacallasaya) que se encuentran ubicadas en los distritos de Maranganí y Sicuani, de la región de Canchis, departamento del Cuzco. Ya que, confirmando la presencia de este agente viral en estos animales, posteriormente podemos asociar su detección con las muestras provenientes de los cuadros entéricos y respiratorios observados y tener una idea general de la real importancia de este agente viral en el complejo diarreico neonatal. Un aporte realmente importante de este trabajo es la determinación del género viral de las muestras positivas a CoV, debido a que hasta el momento se han reportado dos géneros de CoV en alpacas, el primero siendo un *Betacoronavirus* filogenéticamente muy próximo al CoV bovino (BCoV, *Betacoronavirus tipo 1*) y un *Alfacoronavirus* ( $\alpha$ CoV) que al análisis filogenético es más próximo a un CoV respiratorio humano siendo que esta estirpe en particular aislada de una alpaca fue detectada en casos respiratorios de granjeros en EE.UU (Crossley *et al.*, 2010). Sin embargo aún no sabemos nada de la epidemiología molecular de este agente y la variabilidad genética que está presente en nuestro país más aún en ambientes tan propicios para el desarrollo de estirpes virales que rompan la barrera interespecies, esta es una característica del CoV sobre todo los géneros  $\beta$ CoV y  $\alpha$ CoV.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Distribución y población de la ganadería alpaquera

La alpaca tiene la particularidad de adaptarse a diversas zonas climáticas siendo los andes sudamericanos su habitat natural, Perú concentra la mayor población de alpacas en el mundo (71,7%) con un total de 3 685 516 y su crianza está distribuida principalmente en los departamentos de Puno, Cuzco y Arequipa (MIDAGRI, 2022) (Cuadro 1). La provincia de Canchis es el principal productor de alpacas en el departamento Cuzco con una población de 167 979 cabezas (INEI, 2012).

**Cuadro 1.** Población de alpacas por departamento

<b>Departamento</b>	<b>N° de cabezas</b>
Puno	1 459 903
Cusco	545 454
Arequipa	468 392
Huancavelica	308 586
Ayacucho	230 910
Apurímac	219 113
Pasco	145 687
Resto del país	307 471
<b>Total</b>	<b>3 685 516</b>

Fuente: MINAG 2021; INEI, 2012

### 2.1.1. Comunidades alpaqueras

Las comunidades campesinas son unidades que combinan funciones de regulación económica y social sobre sus integrantes, que comparten una propiedad y que interactúan como colectividad ante la sociedad mayor. Canchis comprende 106 comunidades campesinas distribuidas en sus 8 distritos (Cuadro 2) las cuales albergan un total de 2658 familias dedicadas a la crianza de alpacas (Ho, 2017).

**Cuadro 2.** Distrito y números de comunidades campesinas

<b>Distrito</b>	<b>N° de comunidades campesinas</b>
Sicuani	55
Checacupe	10
Combapata	10
Marangani	8
Pitumarca	8
San Pablo	9
San Pedro	5
Tinta	1
<b>Total</b>	<b>106</b>

Fuente: INEI 2007

### 2.1.2. Tipos de unidades productivas

Existen 3 tipos de productores alpaqueros clasificados según tamaño de explotación, forma de organización y nivel tecnológico y productivo en el manejo de sus hatos. (Ho, 2017).

#### *Pequeños productores*

Comprende el sector con mayor número de productores (90%) y agrupa a más del 80 % de la población de alpacas, cada productor cría alrededor de 100 alpacas; la crianza es de forma tradicional y mixta (incluye en el rebaño ovinos, llamas y vacas), generalmente no reciben asistencia técnica (Ho, 2017).

### ***Medianos productores***

Este sector representa el 5% de los productores, producen entre 100 y 250 alpacas y desempeñan algunas prácticas de manejo de pastura y del ganado (rotación de potreros y separación de crías, machos y hembras); dedican más tiempo a la ganadería de alpacas (Ho, 2017).

### ***Grandes productores***

Los productores ejecutan prácticas de mejoramiento genético del ganado, llevan registros, la disponibilidad de pastos naturales y cultivados es mejor comparado a los otros productores, alcanzando así un grado de especialidad en la producción alpaquera; este sector maneja hatos con más de 250 alpacas. El aporte en el número de unidades productivas no excede del 5% del total de productores (Ho, 2017).

## **2.2. Influencia en la economía de la producción de alpacas**

Las utilidades de la crianza de alpaca provienen en gran medida de la fibra, por el alto valor internacional que posee. La fibra de alpaca es considerada por la industria textil como una fibra especial con una importante demanda potencial, y por tratarse de un producto de lujo es menos susceptible al precio (Wang *et al.*, 2003). La textilera alpaquera representa un peso importante de 1,35% del valor total de las exportaciones del país, teniendo mayor participación en la producción de fibra los pequeños productores (ONUDI, 2006) (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Participación en la producción de fibra según tipo de productor

<b>Tipo de productor</b>	<b>Participación en la producción de fibra</b>	<b>Rendimiento por alpaca</b>
Pequeños productores	85%	3.5% libras/año
Medianos productores	10%	5.5% libras/año
Empresas privadas	5%	5.5% libras/año

Fuente: ONUDI 2006

### **2.3. Enfermedades infecciosas en crías de alpacas**

La alta mortalidad y morbilidad en crías de alpacas es una de las problemáticas en la producción de esta especie, lo cual impide el desarrollo económico de las actividades pecuarias en las zonas de los andes peruanos; cabe resaltar que la Provincia de Canchis reporta una tasa de 30.3% de mortalidad y 17.22 % de morbilidad. (Ameghino y De Martini, 1991; Ho, 2017). La principal causa de mortalidad en las crías de alpacas son las enfermedades infecciosas asociados a un inadecuado manejo sanitario y crianza rudimentaria con escasez tecnológica principalmente desarrollada por los productores de las comunidades (Martín *et al.*, 2010; Ho, 2017). El complejo entérico neonatal y los procesos respiratorios agudos son las más importantes cuando se asocia a mortalidad en crías de alpacas. Cabe resaltar que los cuadros diarreicos en estos animales neonatos son causados por coinfecciones de diferentes microorganismos patógenos como bacterias, parásitos y virus; debido a esto se le denomina complejo entérico neonatal. Los patógenos relacionados a este complejo entérico neonatal son el *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, Giardia, Eimerias, Criptosporidium, Rotavirus y CoV (Rosadio *et al.*, 2012; Rojas *et al.*, 2016).

#### **2.3.1. Complejo entérico neonatal**

La enterotoxemia es una patología de gran importancia, perjudica a Camélidos sudamericanos (CSA) durante las primeras semanas de vida (Bentancor *et al.*, 2009; Rosadio *et al.*, 2008). Según Pérez (2006) y Rosadio *et al.* (2008) se corrobora a *Clostridium perfringens* tipo A y C como agentes causales del proceso infeccioso. Esta bacteria se aloja de manera equilibrada en el intestino como parte del microbiota normal de la mayoría de animales incluido el hombre (Uzal y Songer, 2008). Por diversos factores ambientales y nutricionales en el manejo de estos animales, el entorno intestinal sufre alteraciones provocando la proliferación de *C. perfringens* y producción de toxinas (Uzal y Songer, 2008). Dicha proliferación intestinal se ve facilitada por coinfecciones con parásitos coccidios como *Eimeria macusaniensis* (Rosadio *et al.*, 2010). En un estudio de revisión de principales agentes causantes de morbilidad y mortalidad en alpacas neonatas relacionados a procesos entéricos, se concluye que agentes como *Giardia spp*, *E. coli*, *Eimeria spp* y CoV tienen participación en la producción de diarreas o son predisponentes de desencadenar la enterotoxemia (Rosadio *et al.* 2012).

Las infecciones por diarreas en crías de camélidos sudamericanos (alpacas y llamas) tiene una etiología multifactorial que se asocia a una alta morbilidad (Whitehead y Anderson, 2006). En un estudio realizado en cuatro granjas en Ohio, EE. UU., se observó a 287 crías de alpacas y llamas (período predestete) en la cual se reportó a la diarrea como causa más común de morbilidad afectando al 23% del total de las crías (Sharpe, 2009). Las diarreas neonatales involucran diversos patógenos, catalogados como los más comunes en camélidos sudamericanos, como bacterias (*E.coli*, *Clostridium perfringens*), parásitos (*Eimeria spp.*, *Cryptosporidium spp.*, y *Giardia spp.*) y virus (Rotavirus y CoV) (Cebra *et al.* 2003; Whitehead y Anderson, 2006; Rosadio *et al.* 2012). Diversos estudios en el altiplano andino peruano relacionan al CoV con cuadros de diarrea aguda ((López *et al.*, 2011; Luna *et al.*, 2015; Rojas *et al.*, 2016; Rocha *et al.*, 2018).

### **2.3.2. Procesos respiratorios agudos**

Las neumonías agudas se posicionan como segunda causa de mayor importancia en muerte de alpacas neonatas (Rosadio *et al.*, 2010). El agente etiológico puede incluir tanto virus como bacterias. Dwan *et al.* (2008) aislaron a la bacteria *Mannhemia haemolytica* de un absceso laríngeo en una alpaca neonata *post mortem*. En estudios posteriores se aislaron de tejidos pulmonares neumónicos de alpacas neonatas, a *M. haemolytica* y *Pasteurella multocida*; siendo esta última bacteria identificada con mayor frecuencia (Rosadio *et al.*, 2011).

Las alpacas y llamas están expuestas, según estudios de serología, a virus Parainfluenza tipo 3, virus de la diarrea bovina, Herpesvirus bovino tipo 1, virus respiratorio sincitial y virus Influenza tipo A (Rivera *et al.*, 1987; Rosadio *et al.*, 1993), además de *Mycoplasma spp.* (Hung *et al.*, 1991)

### **2.4. Coronavirus**

Los CoVs presentan una gran amplitud de huéspedes y son de distribución geográfica mundial tal como se explica en el cuadro de clasificación (Cuadro 4), pues estos virus se caracterizan por una alta tasa de mutación y recombinación logrando así la diferenciación de estos virus (Khbou *et al.*, 2020). Los CoVs se caracterizan por presentar un halo de picos, con una porción bulbar en su parte terminal, proyectadas desde su superficie (Masters, 2013; Couceiro *et al.*, 2015). Este halo de picos, revelado por microscopía electrónica, le otorgó a la partícula viral la apariencia

de corona solar; lo que motivó a adoptar dicho nombre a este grupo de virus (Brandão, 2004; Masters, 2013; Couceiro *et al.*, 2015).

Los primeros CoVs reportados en la historia tienen origen animal, siendo el virus de la bronquitis infecciosa (IBV), actualmente designado dentro del género *Gammacoronavirus* ( $\gamma$ CoV), el primer coronavirus descrito en gallinas en 1937. El segundo coronavirus fue aislado en 1946 a partir de ratones, describiéndose como virus hepatitis murina (MHV) actualmente designado dentro del género  $\beta$ CoV, subgénero *Embecovirus*. Se reporta en 1951 un tercer coronavirus (virus de la gastroenteritis transmisible, TGEV), actualmente designado dentro del género *Alfacoronavirus* ( $\alpha$ CoV), subgénero *Tegacovirus* (antiguamente denominado *Alphacoronavirus 1* ( $\alpha$ CoV-1) que afecta a cerdos. (Couceiro *et al.*, 2015; ICTV, 2021).

#### **2.4.1. Taxonomía y clasificación**

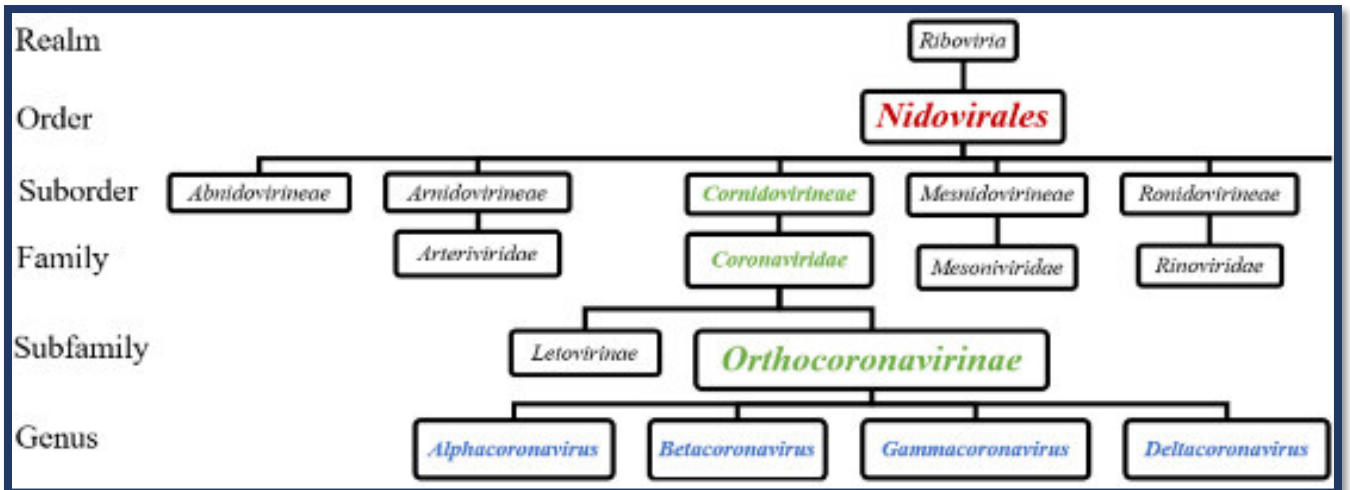
Los CoVs son virus ARN y a su vez son el grupo más amplio de virus que pertenecen al orden *Nidovirales*, este orden se diferencia de otros virus ARN por características como: a). Organización genómica general invariante con un gen de replicasa amplio, b). Expresión de la poliproteína replicasa - transcriptasa por medio de cambio de marco ribosómico. c). Actividades enzimáticas únicas contenidas en los productos de la proteína replicasa - transcriptasa. d). Expresión de genes a través de la transcripción de múltiples ARNs mensajeros anidados subgenómicos 3' (Masters, 2013, Cui, 2019).

El orden *Nidovirales* comprende las familias *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Mesoniviridae* y *Roniviridae* (Fenners, 2017). El Comité Internacional de Taxonomía del Virus (ICTV), a fines del año 2018 e inicio del 2019, cambió completamente la taxonomía de los virus ARN basándose en las relaciones filogenéticas y estructuras genómicas; se incluyeron nuevas familias y subfamilias, la familia *Coronaviridae* adoptó a las subfamilias *Letovirinae* y *Orthocoronavirinae*. (ICTV, 2019)

La subfamilia *Orthocoronavirinae* es subdividida en 4 géneros: *Alphacoronavirus* ( $\alpha$ CoV), *Betacoronavirus* ( $\beta$ CoV), *Gammacoronavirus* ( $\gamma$ CoV) y *Deltacoronavirus* ( $\delta$ CoV) (Woo *et al.*, 2012I;CTV, 2021) (Figura 1). El género  $\beta$ CoV produce enfermedades respiratorias y entéricas de gran importancia a nivel global,



este género se subdivide en 5 subgéneros: *Embecovirus* (antiguo Linaje A), *Sarbecovirus* (antiguo linaje B), *Merbecovirus* (antiguo Linaje C), *Nobecovirus* (antiguo Linaje D) e *Hibecovirus* (antiguo Linaje E) (ICTV, 2019, Fung y Liu, 2019).



**Figura 1.** Organización taxonómica actual del orden *Nidovirales* y de la familia *Coronaviridae* Fuente: ICTV, 2022, Couceiro *et al.*, 2015

**Cuadro 4.** Clasificación de coronavirus

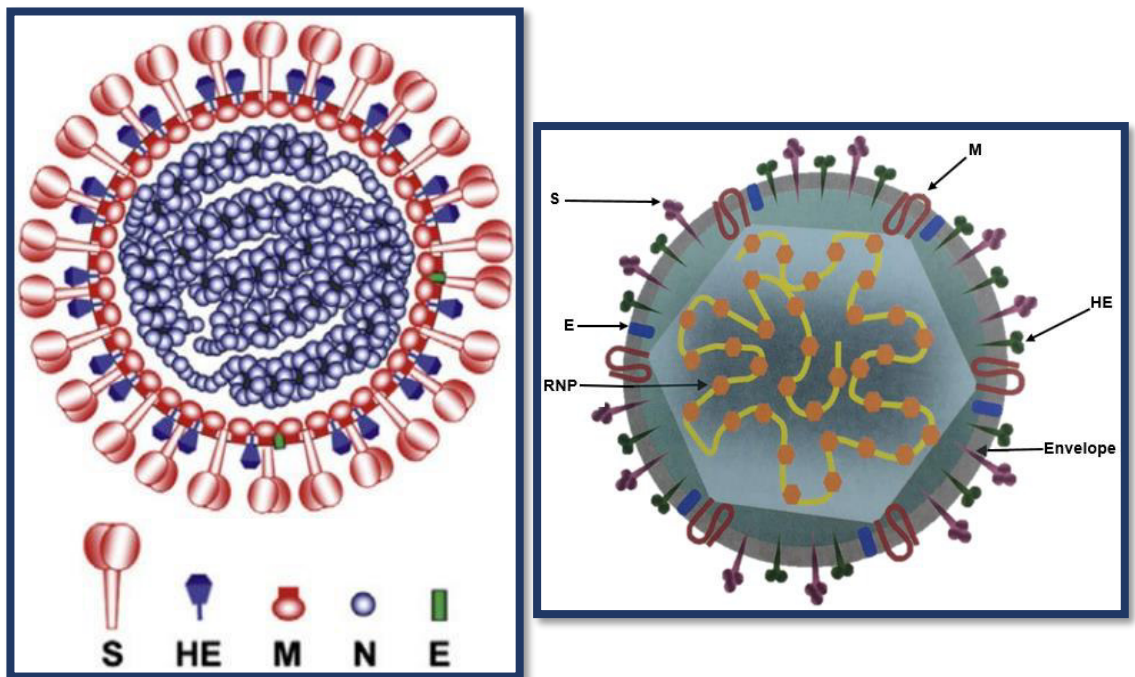
Género y Subgénero		Especie		Hospedero			
		Nombre	Abreviatura				
Alfacoronavirus	<i>Colacovirus</i>	Coronavirus del murciélago CDPHE15		BatCov-CDPHE15	Murciélago <i>Myotis lucifugus</i> (café)		
		Coronavirus del murciélago KHU10		BatCov-HKU10	Murciélago <i>Rousettus leschenaultii</i>		
	<i>Decacovirus</i>	Alphacoronavirus <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> -HuB-2013		BatRfAlphaCov-HuB-2013	Murciélago grande de herradura		
	<i>Duvinacovirus</i>	Coronavirus humano 229E		HCov-229E	Humano		
	<i>Luchacovirus</i>	Coronavirus de la rata Lucheng Rn		LRNV	Rata china		
	<i>Minacovirus</i>	Coronavirus del visón 1		MkCoV-1	Visón		
	<i>Minunacovirus</i>	Coronavirus del murciélago <i>Miniopterus</i> 1		BatMiCoV-1	Murciélago <i>Miniopterus magnater</i>		
		Coronavirus del murciélago <i>Miniopterus</i> HKU8		BatCoV-HKU8	Murciélago <i>Miniopterus pusillus</i>		
	<i>Myotacovirus</i>	Alphacoronavirus <i>Myotis ricketti</i> Sax-2011		BatMrAlphaCoV-Sax-2011	Murciélago <i>Myotis ricketti</i>		
	<i>Nyctacovirus</i>	Alphacoronavirus <i>Nyctalus velutinus</i> SC-2013		BatNvAlphaCoV-SC-2013	Murciélago <i>Nyctalus plancyi</i>		
		Coronavirus <i>Pipistrellus kuhlii</i> 3398		PkCoV-3398	Murciélago <i>Pipistrellus kuhlii</i>		
	<i>Pedacovirus</i>	Virus de la diarrea epidémica porcina		PEDV	Cerdo		
		Coronavirus del murciélago <i>Scotophilus</i> 512		BatCoV-512	Murciélago <i>Scotophilus kuhlii</i>		
	<i>Rhinacovirus</i>	Coronavirus del murciélago <i>Rhinolophus</i> HKU2		BatCoV-HKU2	Murciélago <i>Rhinolophus sinicus</i>		
	<i>Setracovirus</i>	Coronavirus humano NL63		HCov-NL63	Humano		
		Coronavirus del murciélago relacionado a NL63 strain BtKYNL63-9b		NL63-rBatCoV-9b	Murciélago tridente africano		
<i>Soracovirus</i>	Coronavirus <i>Sorex araneus</i> T14		SaCoV-T14	Musaraña bicolor			
<i>Sunacovirus</i>	Coronavirus <i>Suncus murinus</i> X74		SmCoV-X74	Musaraña casera			
<i>Tegacovirus</i> ( <i>Alphacoronavirus</i> 1)	Coronavirus canino 1		CCoV-1	Perro			
	Coronavirus canino 2		CCoV-2				
	Coronavirus felino		FCoV	Gato			
	Virus de la peritonitis infecciosa felina		FIPV				
	Virus de la gastroenteritis transmisible		TGEV	Cerdo			
Betacoronavirus	<i>Embecovirus</i> ( <i>Betacoronavirus</i> 1)	Coronavirus bovino		BCoV	Vaca		
		Coronavirus humano OC43		HCov-OC43	Humano		
		Coronavirus canino respiratorio		CRCoV	Perro		
		Coronavirus equino		ECoV	Caballo		
		Virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina		PHEV	Cerdo		
		Coronavirus de la rata china HKU24		CRCoV-HKU24	Rata china		
		Coronavirus humano HKU1		HCov-HKU1	Humano		
		Coronavirus murino	Virus de la hepatitis del ratón		MCoV	MHV	Ratón casero
			Coronavirus de la rata			RtCoV	Rata china
		Coronavirus <i>Myodes</i> 2JL14		MRufCoV-2JL14		Roedor <i>Myodes rufocanus</i>	

Betacoronavirus	<i>Hibecovirus</i>	Betacoronavirus del murciélago Hp Zhejiang-2013		BatHp-BetaCoV-Zh13	Murciélago de hoja redonda de Pratt	
	<i>Merbecovirus</i>	Coronavirus del erizo 1		HdCoV-1	Erizo común	
		Coronavirus del murciélago Pipistrellus HKU5		BatCoV-HKU5	Murciélago <i>Pipistrellus abramus</i>	
		Coronavirus relacionado a Síndrome Respiratorio del Medio Oriente		MERS-CoV	Camello, humano, <i>Pipistrellus kuhlii</i>	
		Coronavirus del murciélago <i>Tyonycteris</i> HKU4		BatCoV-HKU4	Murciélago <i>Tyonycteris pachypus</i>	
	<i>Nobecovirus</i>	Coronavirus del murciélago Eidolon C704		BatCoV-C704	Murciélago de cuello anaranjado	
		Coronavirus del murciélago Roussettus GCCDC1		BatCoV-GCCDC1	Murciélago <i>Roussettus leschenaultii</i>	
		Coronavirus del murciélago Roussettus HKU9		BatCoV-HKU9	Murciélago <i>Rhinolophus sinicus</i>	
	<i>Sarbecovirus</i>	Coronavirus <i>Rhinolophus sinicus</i>		BatRsCoV	Murciélago <i>Rhinolophus sinicus</i>	
		Coronavirus relacionado a Síndrome Respiratorio Agudo Severo		SARS-CoV	Humano, civeta, <i>Rhinolophus sinicus</i>	
		Coronavirus relacionado a Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2		SARS-CoV2	Wuhan-Hu-1	Humano
			PaCoV-1420		Pangolín malayo	
		RatG13	Murciélago herradura chino			
Deltacoronavirus	<i>Andecovirus</i>	Coronavirus del Wigeon HKU20		WiCoV-HKU20	Pato silbón europeo	
	<i>Buldecovirus</i>	Coronavirus HKU15		CoV-HKU15	Cerdo	
		Coronavirus del Bulbul HKU11		BuCoV-HKU11	Bulbul chino (ave paseriforme)	
		Coronavirus de la polla de agua común HKU21		CMCoV-HKU21	Gallineta de agua común	
		Coronavirus del Munia HKU13		MuCoV-HKU13	Munias culiblanco (ave paseriforme)	
		Coronavirus del ojo blanco HKU16		WECOV-HKU16	Ojiblanco oriental (ave paseriforme)	
<i>Herdecovirus</i>	Coronavirus de la garza nocturna HKU19		NHCoV-HKU19	Garza nocturna		
Gammacoronavirus	<i>Brangacovirus</i>	Coronavirus del ganso CB17		-	Ganso	
	<i>Cegacovirus</i>	Coronavirus de la ballena beluga SW1		BWCoV-SW1	<i>Delphinapterus leucas</i> (beluga)	
	<i>Igacovirus</i>	Coronavirus aviar	Virus de la bronquitis infecciosa	ACoV	IBV	Pollo
			Coronavirus del pavo		TCoV	Pavo salvaje
			Coronavirus del faisán		PhCoV	Faisán común
Coronavirus aviar 9203		ACoV-9203				
Coronavirus del pato 2714		DuckCoV		Patos australianos		

Fuente: Modificado de M.Yu. Shchelkanov *et al.*, 2020

## 2.4.2. Morfología y estructura viral

Los CoVs son virus grandes de 100 a 160nm de diámetro, están envueltos por una membrana lipídica y son moderadamente pleomórficos, aunque frecuentemente esféricos. La superficie del virus presenta proyecciones que constan de 2 tamaños (largos y cortos), los largos de 20 nm son peplómeros compuestos de trímeros que componen la proteína S y las cortas que son dímeros de 5nm de largo las cuales conforman la proteína Hemaglutinina esterasa (HE). Existen otras proteínas estructurales como la E y M que también forman parte de la envoltura viral y tienen relevancia en el ensamblaje del virus, y la proteína N que está incluida en la nucleocápside (Figura 2) (Fenners, 2017; Couceiro *et al.*, 2015).



**Figura 2.** Esquematación de las partículas de los Coronavirus. Fuente: Couceiro *et al.*, 2015; Fenner's, 2017

### 2.4.2.1. Proteína Espícula (S)

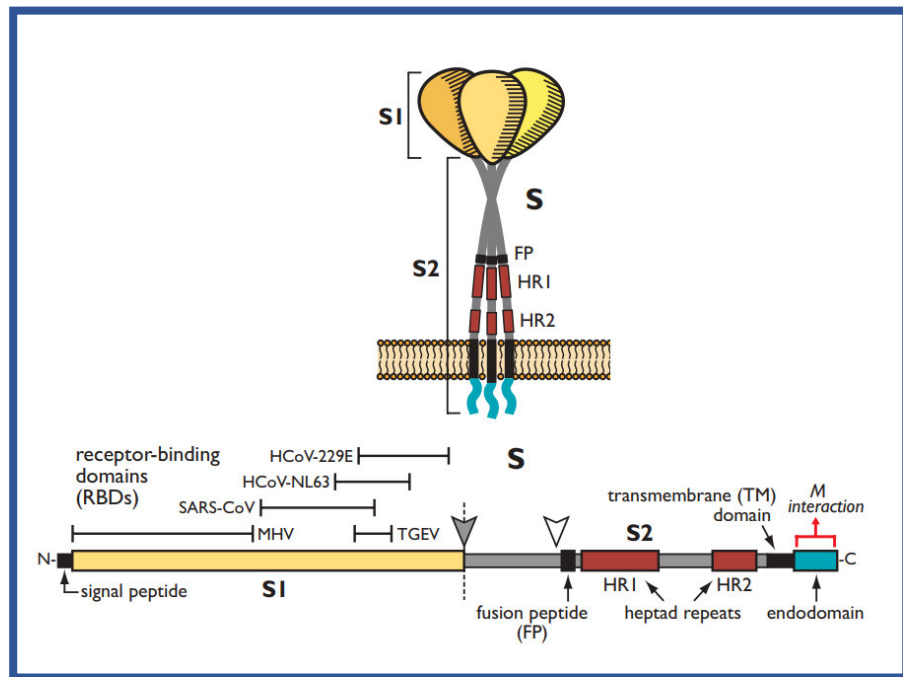
Es una proteína transmembrana trimérica y a su vez es la más grande de las proteínas estructurales de los CoVs; tiene como función mediar la entrada del CoV en las células huésped por ello es un determinante primordial del tropismo y patogénesis celular (Masters, 2006; Belouzard, 2012; Li, 2016). Los monómeros de

la proteína S están muy glicosilados con 21 a 35 sitios de N-glicosilación donde se adicionan carbohidratos, obteniendo un peso molecular de 200 KDa. (Belouzard, 2012, Masters, 2013). Estos monómeros se componen, cada uno, de un gran ectodominio N-terminal (se acompaña de una señal peptídica) y un pequeño endodominio C-terminal, este último alberga el segmento transmembrana y endodominio. De manera funcional los monómeros de la proteína S se dividen en 2 subunidades designadas como S1 y S2 (Figura 3) (Masters, 2013).

La subunidad S1 es responsable de mediar la unión viral al receptor celular y se compone de 2 dominios, el dominio N-terminal (NTD) y el dominio C (Hulswit et al., 2016). Uno o ambos dominios, dependiendo de la especie de CoV, se pueden unir potencialmente a receptores proteicos y de azúcares, y funcionan como dominio de unión al receptor (RBD). El NTD de ciertos CoVs (BCoV y HCoV-OC43) puede unirse a carbohidratos como el 9-0 ácido acetil murámico por tanto el dominio C se une a receptores proteicos. Esta subunidad es muy variable, presenta una homología muy pobre entre los géneros de CoV y asiduamente diverge entre diversos aislados de un solo CoV (Belouzard, 2012).

La subunidad S2 se encarga de la fusión de membrana por ello contiene en su estructura al péptido de fusión, además de albergar 2 regiones de heptadas repetidas (cada heptada se compone de una cadena de 7 aminoácidos) denominadas HR1 y HR2, incluye también el dominio transmembrana que sería la región más conservada de la proteína S entre las especies de CoV de diferentes géneros (Hofmann *et al.*, 2006).

En los  $\gamma$ CoV, el IBV, y en algunos  $\beta$ CoV, como el MHV, BCoV y SARS CoV-2, se produce una escisión parcial o completa en el sitio de clivaje (entre S1 y S2) por una proteasa tipo furina. Mientras que en los  $\alpha$ CoV y algunos  $\beta$ CoV no se produce dicha escisión también se designan como dominios S1 y S2 como N-terminal y C-terminal respectivamente (Masters, 2013).



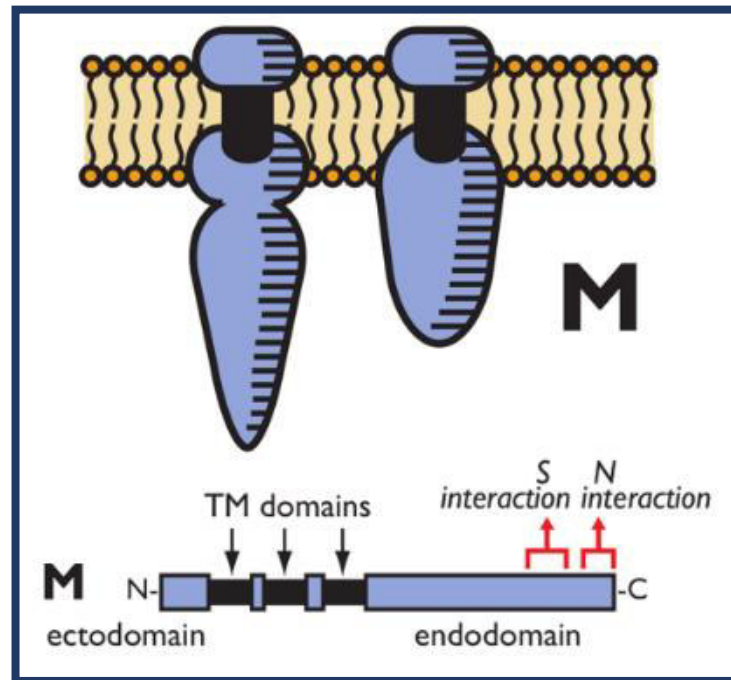
**Figura 3.** Representación de la proteína S. Fuente: Masters, 2013

#### 2.4.2.2. Proteína de membrana (M)

Es una proteína transmembrana altamente hidrofóbica y atraviesa 3 veces la envoltura viral (Couceiro *et al.*, 2015) brindándole la forma al virión, a su vez es la proteína estructural más abundante en los CoV (Masters, 2013). Tiene como rol el ensamblaje del virus y el empaquetamiento del ARN viral (Lubeck, 2013). El monómero de la proteína M es politópica y tiene un peso molecular de 25 a 30 KDa. Se compone de un ectodominio muy pequeño, 3 dominios transmembrana y un gran endodominio C-terminal (Figura 4) (Masters, 2013).

El ectodominio N-terminal representa la región menos conservada, y está glicosilada con O-glicosilación para los  $\beta$ CoV, excepto la cepa MHV-2 y SARS-CoV, que tienen carbohidratos ligados a N, así como también lo tiene el resto de géneros. La región que evidencia un alto grado de conservación es un segmento corto que se superpone al tercer dominio transmembrana y al inicio del endodominio. Estudios basados en microscopía crioelectrónica revelan que el extremo del endodominio se prolonga entre 6 a 8 nm en la partícula viral contactando con la nucleocápside, concordando con trabajos iniciales que muestran que el endodominio es muy resistente a las proteasas. (Masters, 2006,2013)

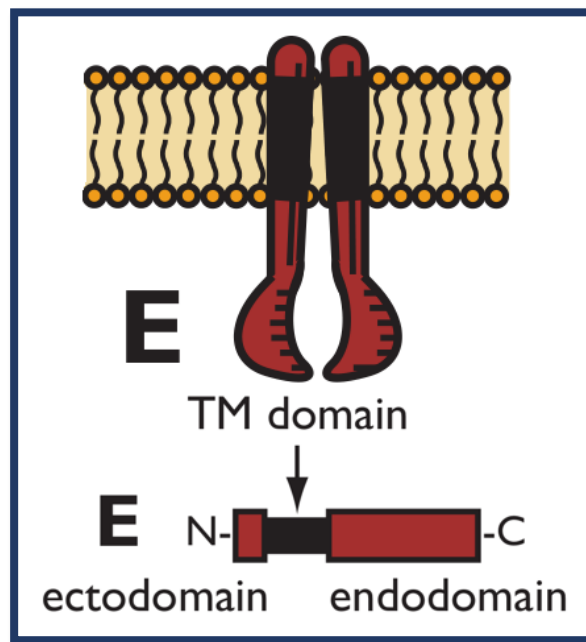
A diferencia de la proteína S, la proteína M, por lo general, no lleva una señal péptido amino-terminal; ya que el primer o tercer dominio transmembrana es suficiente como señal para la inserción y anclaje de la proteína como se da en los coronavirus IBV y MHV. Los  $\alpha$ CoV-1 contienen péptidos señal N-terminales escindibles en su proteína M de manera anómala pero no está dilucidado si estas señales se involucran para la inserción de la membrana (Masters, 2013).



**Figura 4.** Representación de la proteína M. Fuente: Masters, 2013

#### 2.4.2.3. Proteína de envoltura (E)

Es una proteína de membrana integral pequeña, con peso molecular de 8.4 a 12 KDa. Este polipéptido se encuentra en menor cantidad en los coronavirus, presenta en su secuencia un ectodominio hidrofílico corto N-terminal, un dominio hidrofóbico transmembrana y un largo endodominio hidrofílico C-terminal (Figura 5). Semejante a la proteína M, esta proteína tampoco tiene un péptido señal escindible; además, no es glicosilada. Su secuencia es altamente variable entre los géneros de CoV, y en algunos casos, entre miembros de un solo género (Masters, 2013).



**Figura 5.** Representación de la proteína E. Fuente: Masters, 2013

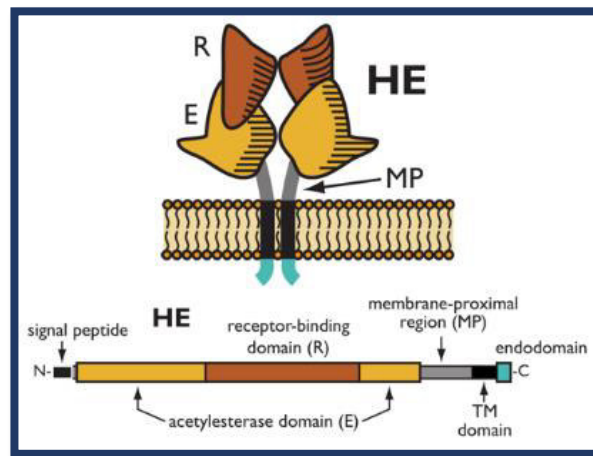
#### 2.4.2.4. Proteína Hemaglutinina Esterasa (HE)

Es una proteína estructural y a su vez la más caracterizada de las proteínas accesorias. Reconocida por primera vez como hemaglutinina HEV y BCoV (Callebaut y Pensaert, 1980). Está presente como un cuarto componente de la envoltura de la membrana de algunos betacoronavirus como MCoV, *Betacoronavirus 1*, HCoV-HKU1 y el reciente coronavirus SARS-CoV2. La proteína HE aparece como un sotobosque entre la proteína S formando una segunda agrupación de proyecciones cortas. (Masters, 2006, 2013).

El monómero HE tiene un peso molecular de 48 KDa. y se compone de un ectodominio N-terminal que acapara casi la totalidad de su secuencia, un endodominio C-terminal muy corto (Figura 6). Este monómero presenta una señal peptídica con lo cual se glicosila con N-glicosilación en diversos sitios obteniendo 17 KDa. adicionales. La proteína HE, como actividad hemaglutinina, es capaz de unirse a restos de ácido siálico presentes en las glicoproteínas y glicolípidos de la superficie celular; la otra actividad, acetilesterasa, tiene especificidad para ácidos siálicos 9-0 ó 4-0-acetilados. Posiblemente estas actividades facultan a la proteína HE para actuar como cofactor de la proteína S, colaborando así a la unión viral con



la célula hospedadora y agilizando el trayecto del virus por medio de la mucosa extracelular. (Master, 2013)



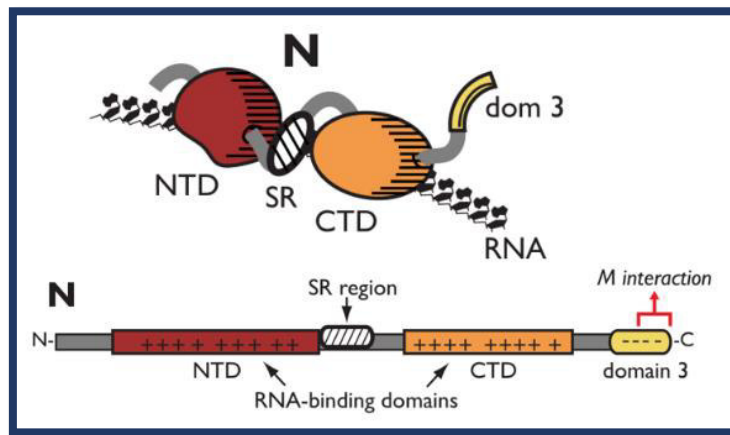
**Figura 6.** Representación de la proteína HE. Fuente: Masters, 2013

#### 2.4.2.5. Proteína N

Es una proteína estructural de la nucleocápside con peso molecular de 43 a 50 KDa. Esta proteína es fosforilada y es modificada en un número limitado de residuos de serina y treonina. Se ha vinculado el glucógeno quinasa-3 con la fosforilación de la región SR. Se han descrito 3 dominios, el NTD, el CTD y un dominio 3 (Figura 7) (Masters, 2006).

El NTD y el CTD están cargados positivamente con una gran cantidad de aminoácidos (lisina y arginina) y ocupan la mayor parte de la molécula. Entre estos dominios se halla una región muy desordenada denominada SR que sirve como enlazador. Estos dominios estructurales NTD y CTD tienen la capacidad de unirse al ARN genómico formando un complejo de ribonucleoproteína (RNP). Esta capacidad le atribuye a la proteína N una participación potencial en el proceso de la replicación viral; por ende, tiene implicancia en la transcripción de ARN subgenómico (ARNsg), basándose específicamente en la unión a la secuencia reguladora de la transcripción (TRS) (Masters, 2013).

El dominio 3 está cargado negativamente por un exceso de residuos ácidos, este dominio le proporciona a la proteína N la capacidad de unirse e interactuar con la proteína M.



**Figura 7.** Representación de la proteína N. Fuente: Masters, 2013

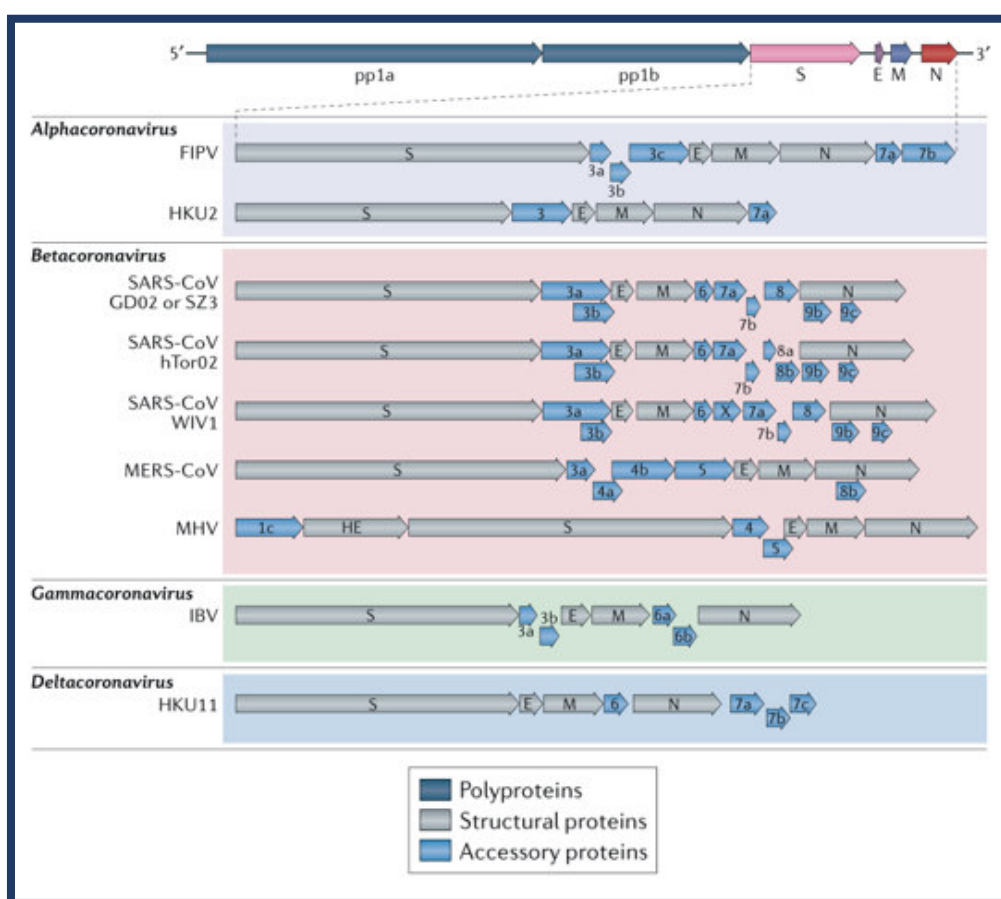
### 2.4.3. Estructura y organización genómica

Los coronavirus tienen un genoma ARN de cadena simple, lineal y de sentido positivo, compartiendo así el mismo sentido del ARN mensajero (ARNm) de las células eucariotas. Este genoma es el más grande dentro de los virus ARN constituyendo alrededor de 27 a 32 kb, tiene una estructura de capa terminal 5' y una cola poliadenilado 3' (Masters, 2013; Couceiro *et al.*, 2015; Fenner's, 2017).

La estructura del genoma se inicia con el extremo 5', el cual contiene un marco de lectura abierto (ORF) corto denominado secuencia líder (compuesto de 65 a 98 nucleótidos aproximadamente); que se continúa con una región no traducida (5'-UTR) y con el inicio del ORF 1ab (Brian y Baric, 2005). Finalizando el ORF 1ab le sigue los genes que codifican las proteínas estructurales S, E, M y N (algunos coronavirus, como MHV, también se halla el gen de la proteína HE); las cuales están contiguas al extremo. El extremo 3' aloja la otra región 3'-UTR en la que se ubica la cola poliadenilado3' (Figura 8) (Brian y Baric, 2005; Couceiro *et al.*, 2015).

A grandes rasgos se puede esquematizar el genoma de los coronavirus como 5'complejo transcriptasa-replicasa-S-M-E-N-3'; pues dependiendo del género y la especie pueden albergar muchos más ORFs, adicionando así, genes a su estructura. Las ORFs adicionales pueden ubicarse entre las regiones génicas ORF1, S, E, M, y N (Masters, 2006). Dispersos entre los genes que codifican las proteínas estructurales, próximo al extremo 3', se hallan 8 ORFs adicionales que se les denominan genes accesorios. Dichos genes pueden colarse en los intervalos intergénicos, pero nunca entre los genes E y M (Masters, 2013).

El ORF1ab (pp1a y pp1b) abarca las 2 terceras partes del genoma, sintetiza el complejo transcriptasa-replicasa y se divide en ORF1a y ORF1b. Ambos marcos de lectura sintetizan hasta 16 proteínas no estructurales (nsp), tal es el caso de los coronavirus humanos como el SARS-CoV-1; la cantidad de nsp varía según el género y especie viral. (Hilgenfeld y Peiris, 2013). La ORF1a se encarga de producir su proteasa y sintetiza nsp1 hasta nsp11, la ORF1b es la de mayor relevancia ya que sintetiza la ARN polimerasa viral dependiente de ARN (RdRp). Estas proteínas no estructurales están involucradas en la proteólisis de los productos del complejo transcriptasa-replicasa, la replicación del genoma viral y la síntesis de ARNsg. (Brian y Baric 2005; Sawicky *et al.*, 2007)



**Figura 8.** Estructura genómica de los Coronavirus. Fuente: Cui, 2019

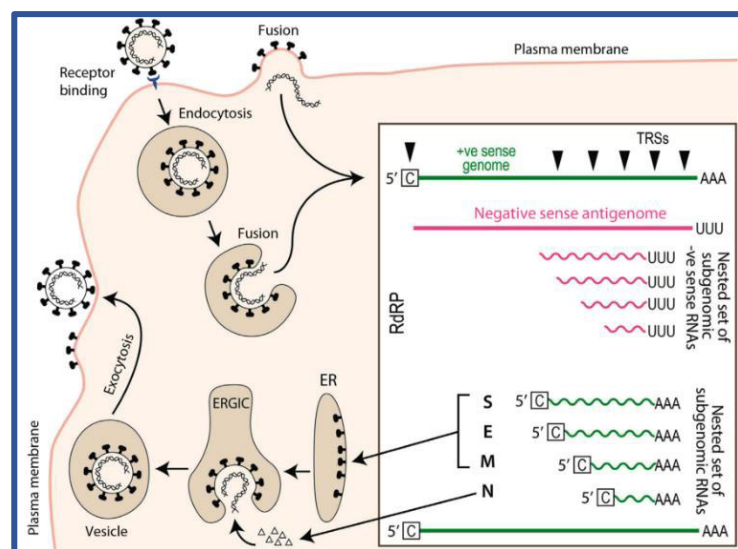
## 2.4.4. Ciclo de replicación

### 2.4.4.1. Adhesión celular, entrada del virión y depósito del genoma viral

El ciclo replicativo de los CoV se inicia con la entrada del virión a la célula huésped, ya sea por mecanismos de fusión o endocitosis (Figura 9). El primer paso

de este evento se da con la unión específica del virión al receptor de la célula huésped y como segundo paso la fusión de membranas viral y celular. La unión viral está mediada por la interacción de la proteína S y su receptor celular afín. Dicha interacción rige el tropismo tisular y a su vez es el determinante primordial para que el CoV infecte a una especie huésped, dándose así un rango de especies hospedadoras (Masters, 2013).

Diversos  $\alpha$ CoV usan como receptor a la aminopeptidasa N (APN) o también llamada CD13, mientras que el MERS-CoV y el SARS-CoV usan dipeptidil peptidasa 4 (DPP4) también llamada CD26 y la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) respectivamente. (De Wilde 2017, Fenner's, 2017). Los demás receptores celulares conocidos para otros coronavirus se muestran en el cuadro 5. Después de la interacción proteína S-receptor celular, se produce la escisión proteolítica de dicha proteína a través de proteasas extracelulares o endosomales como las catepsinas, proteasa transmembrana serina tipo 2 (TMPRSS2) y otras (Maier, 2015). La escisión exhibe un péptido de fusión el cual se inserta en la membrana que continua con la unión de HR1 y HR2, creando así un paquete estable y resistente a las proteasas (Bosch *et al.*, 2003). Este paquete confiere la mezcla de membranas viral y celular, dándose así la fusión de membranas y por consiguiente la deposición del genoma del virión al citoplasma. (Masters, 2013; Maier, 2015)



**Figura 9.** Replicación de coronavirus y su mecanismo de fusión (Fenner's 2017)

**Cuadro 5.** Receptores de coronavirus

Genero	Especie	S1-NTD	S1-CTD
<i>Alfacoronavirus</i>	TGEV	Acido N-glicolilneuraminico (Neu5Gc) y Acido N-acetilneuraminico (Neu5Ac)	APN
	PEDV	Neu5Ac	APN
	PRCV	*	APN
	HCoV-229E	*	APN
	HCoV-NL63	*	ACE2
<i>Betacoronavirus</i>	Especies del subgénero <i>Embecovirus</i>	Acido N-acetilneuraminico (Neu5,9Ac2)	*
	MERS-CoV	*	DPP4
	MHV	CEACAM1	*
	HKU1	Neu5,9Ac2	*
	HKU4	*	DPP4
	SARS-CoV 1, SARS-CoV2	*	ACE2
<i>Gammacoronavirus</i>	IBV	Neu5Gc	*
<i>Deltacoronavirus</i>	TGEV	*	APN

**Fuente: De Wilde, 2017 modificado.\* = No identificado**

#### 2.4.4.2. Traducción del Complejo Replicasa transcriptasa

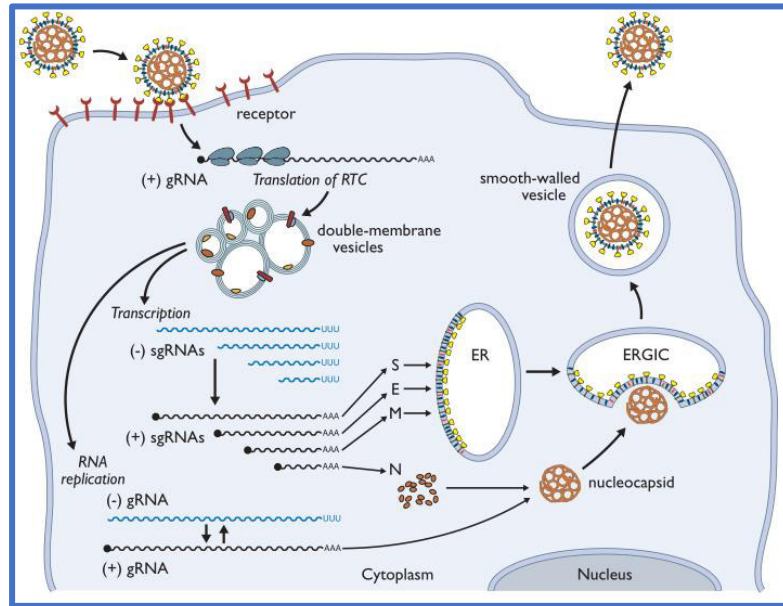
El genoma del virión sirve como ARNm para la síntesis de la RdRp. La ORF1a y ORF1b se traducen como una sola poliproteína, poliproteína 1a (pp1a) o poliproteína 1ab (pp1ab); más tarde, proteasas virales de dicha poliproteína escindirán a ella misma (Fenner's, 2017). La traducción de la pp1ab se realiza a través de un mecanismo de cambio de marco ribosómico (Masters, 2013). Este mecanismo, mediante un ribosoma de traducción, desplaza un nucleótido desde el marco de lectura ORF1a al marco de lectura ORF1b generándose un reposicionamiento; el cual está programado por dos elementos de ARN (la secuencia resbaladiza del heptanucleótido 5'-UUUAAAC-3' y la estructura de pseudonudo de ARN) (Perlman, 2015). Ambos elementos actúan para producir la poliproteína 1a (pp1a) y la

poliproteína 1b (pp1b). La pp1a y la pp1b se procesan autoproteolíticamente en productos maduros, que son las nsp1 hasta las nsp16. (Masters, 2013).

El cambio de marco programado, al parecer, tiene como función establecer una proporción fija de productos de traducción para ensamblarlos en un complejo macromolecular y a su vez evitar la expresión de productos enzimáticos de ORF 1b hasta que los productos de ORF 1a hayan preparado un entorno adecuado para la síntesis de ARN. Las nsp procesadas se ensamblan para formar la replicasa de coronavirus conocida también como complejo replicasa transcriptasa (RTC). En la nsp3 se encuentran una o dos proteasas similares a la papaína, las cuales separan de manera relativa a nsp1, nsp2 y nsp3; otra proteasa tipo serina ubicada en la nsp5, que es la principal, ejecuta los once eventos de clivaje restantes. Se da inicio a la expresión de ORF 1b, la nsp12 procesada contiene a la RdRp y la nsp13 la helicasa que es crucial para la síntesis de ARN. Además, la ORF1b sintetiza su endonucleasa y exonucleasa, esta última enzima no tiene mayor implicancia en la replicación viral, pero se encarga de corregir los errores de la RdRp del coronavirus que es necesario para preservar la genética del virus. (Perlman, 2015; Masters 2015).

#### **2.4.4.3. Síntesis, replicación y transcripción**

La síntesis de RdRp produce ARN de sentido negativo (complementario) y copia el genoma desde el 3', luego de un determinado tiempo vuelve a copiarse en ARN genómico (ARNg) de sentido positivo (Figura 10). Debido a que la RdRp tiene actividad replicasa, es que se realiza la generación de ARN genómico de longitud completa. Además, la RdRp comparte otra actividad, transcriptasa, la cual genera ARNsg de sentido positivo a partir de la transcripción discontinua del ARN de hebra negativa. Los ARNsg de sentido positivo confieren la expresión de genes estructurales y accesorios para posteriormente ser traducidas. La hebra negativa contiene secuencias reguladoras de transcripción (TRS), ubicadas en cada marco de lectura abierto. La RdRp se detiene en cualquiera de las TSR y luego se transloca al final del genoma. La transcripción discontinua es distintiva del orden de los *Nidovirus*, por ello esta característica le brinda a los CoV un tipo de recombinación especial. (Masters, 2013; Perlman, 2015; Fenner's, 2017)



**Figura 10.** Replicación de coronavirus (Masters, 2013)

#### 2.4.4.4. Ensamblaje y liberación de viriones

Las proteínas estructurales virales S, E y M se traducen y se insertan inicialmente en el retículo endoplásmico (RE); posteriormente se movilizan hacia el retículo endoplásmico - compartimento intermedio de Golgi (ERGIC) (Figura 9 y 10). Los genomas virales encapsidados por la proteína N brotan en las membranas del ERGIC. La proteína M gobierna mayor parte de las interacciones proteicas precisas para el ensamblaje de viriones (Perlman, 2015). Se ha mencionado que la proteína E cumple un rol en la inducción de la curvatura de la membrana. Las interacciones de las proteínas N y M promueven a la condensación de la nucleocápside con los componentes de la envoltura para así, dar por completado el ensamblaje de los viriones. La proteína S es capturada por la proteína M para la incorporación del virión, ya que, para el ensamblaje de los viriones, la proteína S tiene función pasiva. En algunos coronavirus, la proteína S que no se ensambla en viriones se moviliza hacia la membrana plasmática para mediar la fusión entre células infectadas y células contiguas no infectadas. Esta fusión da como resultado células gigantes multinucleadas, lo que permite la propagación de la infección sin que el virus sea detectado o neutralizado. Finalmente, los viriones se transportan a la membrana plasmática en vesículas lisas y se liberan por exocitosis. (Masters, 2013; Perlman, 2015; Fenner's, 2017)

#### **2.4.5. Epidemiología**

Los CoV están descritos y distribuidos geográficamente a nivel mundial en una amplia variedad de aves y mamíferos, incluyendo al hombre. Provocan, en su mayoría, infecciones gastroentéricas y respiratorias, además de trastornos neurológicos y hepáticos. (Masters 2013; Khbou, 2020). Por lo general los géneros  $\alpha$ CoV,  $\beta$ CoV, tienen como hospederos a las especies mamíferas mientras que los géneros  $\gamma$ CoV y  $\delta$ CoV a las especies aviares. En cuanto a la fuente de origen de los CoV, se expone un modelo de evolución en la cual los murciélagos son la fuente genética de  $\alpha$ CoV y  $\beta$ CoV, así como las aves son la posible fuente de los  $\gamma$ CoV y  $\delta$ CoV (Woo *et al.*, 2012). Los CoV son responsables de causar enfermedades esporádicas y brotes estacionales en animales susceptibles lo que genera repercusiones negativas para la economía de los productores (Holmes, 1999). En humanos provocan enfermedades respiratorias leves como el resfrió común causado por HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 y HKU1, enfermedades respiratorias severas como el MERS y la epidemia del SARS (Cui, 2019). Se ha demostrado que los coronavirus pueden alcanzar un potencial pandémico, como el SARS-CoV2 causante de la enfermedad Covid-19 la cual provoca problemas respiratorios graves (Khbou, 2020).

Los CoV cuentan con mecanismos de variabilidad genética como las mutaciones, recombinaciones y la ganancia o pérdida de genes. Particularmente las recombinaciones permiten a los coronavirus adaptarse mejor a nuevos hospederos, facilitando así la transmisión interespecie y el salto de hospedadores. Un claro ejemplo de cruzar la barrera entre especies es el coronavirus bovino (BCoV) que pasó a una amplia variedad de rumiantes domésticos como la alpaca, rumiantes silvestres e incluso el hombre (Zhang *et al.*, 1994, Saif, 2010). Otros ejemplos son el SARS-CoV-1 que pasó de civetas de palma a seres humanos (Song *et al.*, 2004), el MERS-CoV de camellos al hombre (Drosten *et al.*, 2003) y el reciente coronavirus SARS-CoV-2 de pangolín a personas (Wacharapluesade, 2021).

##### **2.4.5.1. Epidemiología de coronavirus en animales de ganado**

Se han descrito a los CoVs de tipo bovino (BCoV) en diferentes rumiantes domésticos y silvestres (Amer, 2019). El BCoV, a nivel mundial, es causante de la disentería de invierno, una enfermedad entérica aguda esporádica en el ganado



vacuno adulto que prevalece en los meses de invierno. Si bien es cierto la mortalidad es baja, las pérdidas económicas apuntan a la alta morbilidad afectando la producción láctea. A su vez, el BCoV es uno de los principales agentes causantes de la diarrea neonatal en terneros de ganado de carne y lechero. Se menciona que la alta densidad animal sería el principal factor de riesgo de BCoV (Khbou, 2020).

En un estudio reciente, se detectaron anticuerpos anti-BCoV en el ganado ovino y caprino, se les asocia a diarreas e infecciones respiratorias en neonatos (Burimuah *et al.*, 2020); la infección de estos rumiantes por el BCoV se da por contacto estrecho con bovinos en un tipo de crianza mixta (Khbou, 2020). En Chile, se obtuvo una frecuencia de 6.1% de CoV en corderos muertos mientras que en cabritos nativos de Corea del Sur solo se detectó el 1% (Reinhardt *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2008).

Los CoV en dromedarios, MERS-CoV, es complicado de detectar ya que se presenta como infección asintomática en estos animales. En los países de África y Oriente Medio circulan cepas silvestres de MERS-CoV en dromedarios, con tasas elevadas de seroprevalencia de 71% (Egipto), 84% (Arabia Saudita) y 94% (Nigeria) (Reusken *et al.*, 2014; Ali *et al.*, 2017; Harrath y Abu Duhier, 2018).

Estudios epidemiológicos demuestran que los terneros de búfalos de agua en Egipto, albergan al CoV como segundo agente patógeno más frecuente causante de diarreas en esta especie animal con una prevalencia de 37.7 %. A fines del año 2006 e inicios del año 2007, en Italia, se reportó un brote de diarrea con una alta de mortalidad neonatal en una manada de búfalos de agua. En el contenido intestinal de las crías con diarrea grave se identificó CoV de tipo bovino. Luego se aisló una cepa que se denominaría CoV bubalino la cual presentó mucha similitud con los BCoV; planteándose así que el origen de los coronavirus bubalinos se daría a partir de la transmisión entre especies de una cepa de BCoV (Amer, 2019).

De manera similar al ganado doméstico, los bóvidos silvestres y otros ganados silvestres (en cautiverio o de vida libre) de diferentes partes del mundo como Corea del Sur y el Reino Unido, también se han asociado con diarrea inducida por coronavirus en crías y adultos (Amer, 2018). La mayoría de estos coronavirus

aislados comparten una estrecha relación filogenética BCoV a nivel del genoma mostrando un alto porcentaje (99.5%) de identidad nucleótidos (Chung, *et al.*, 2011).

En tanto a los CoVs de porcinos. El virus de la gastroenteritis transmisible porcina (TGEV) se ha detectados en casi todos los continentes y, como en la mayoría de los coronavirus, se manifiesta en invierno con alta morbilidad y mortalidad asociado a vómitos y diarrea profusa principalmente en lechones (Chen *et al.*, 2018). Debido a una mutación por delección en el gen de la proteína S del TGEV se origina el CoV respiratorio porcino (PRCoV) que se distribuye en la mayoría de los países europeos, asiáticos y los EE. UU. causando infecciones respiratorias que inducen signos leves o son subclínicos (Laude *et al.*, 1993; Caswell y Williams 2015). Existe otro CoV, como el virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina (PHEV), que circula de manera silenciosa en el ganado porcino de Europa, Asia y América, infectando a los animales después del reemplazo o destete. El virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) es enzoótico y es el agente causal más importante de diarrea porcina con una tasa de infección de 78.25%, las pérdidas económicas son devastadoras ya que se asocia a una alta mortalidad hasta del 100% en lechones recién nacidos (Zhou *et al.*, 2018). El único coronavirus en esta especie que pertenece al género  $\delta CoV$  es el  $\delta CoV$  porcino (PDCoV), el cual se comporta de forma endémica en una región de China. A partir del año 2014 se asocia este coronavirus a infecciones gastroentéricas (ya que años atrás era asintomático) llegando a obtener prevalencias de hasta 16.9% en Taiwán. (Marthaler *et al.*, 2014; Hsu *et al.*, 2018). El virus del síndrome de diarrea porcina (SADS-CoV) es otro virus con gran repercusión en la industria porcina asiática, particularmente en China, el cual se asocia a diarrea severa en lechones lactantes (Khbou, 2020).

#### **2.4.5.2. Epidemiología de coronavirus aviáres**

Los CoV aviáres se desenvuelven en los géneros  $\delta CoV$  y, principalmente,  $\gamma CoV$ ; siendo el virus de la bronquitis infecciosa (IBV) el más representativo del último género en mención y con distribución geográfica a nivel mundial. Es muy contagioso y afecta las vías respiratorias superiores de los pollos provocando tasas de mortalidad de hasta 82% y morbilidad del 100% estos valores varían dependiendo de factores de edad, sistema inmunológico y coinfecciones (Khbou, 2020). El coronavirus del pavo comparte el 85 a 90% de similitud secuencial con el IBV, pero

sus proteínas S son muy distintas; probablemente sea un CoV recombinante. Se detectado por primera vez en EE.UU. en 1951 y se asocia a enfermedades entéricas en todas las edades, siendo de mayor gravedad en las primeras semanas de vida (Fenner's, 2017).

Otros CoV similares a IBV se han detectado en aves domésticas (pavo, faisán y gallina de guinea); así como también en aves silvestres, principalmente del género Anseriformes, Columbiformes, Charadriiformes y Galliformes (Cavanagh, Jonassen *et al.*, 2005; Domanska-Blicharz *et al.*, 2014). Dos estudios de vigilancia epidemiológica en Hong Kong y en la provincia de Guang Dong en China, evidencian la presencia de coronavirus diferentes de IBV ( $\delta CoV$ ) en aves silvestres muertas (bubuls, tordos, munias, ojo blanco, gorrión, urraca, garza nocturna, pato silbón europeo, polla de agua común) (Woo, 2009, 2012). Investigaciones recientes en Australia reportaron la presencia de  $\delta CoV$  y  $\delta CoV$  en un 15.3% de aves silvestres migratorias y no migratorias como garzas, patos y aves playeras (Chamings, 2018).

#### **2.4.5.3. Epidemiología de coronavirus con implicancia en salud pública**

Los coronavirus poseen la capacidad de cruzar la barrera de especie y emerger en el ser humano provocando epidemias hace más de una década y actualmente una pandemia. La epidemia del SARS-CoV se originó en Guangdong, China, en el año 2003, causando alrededor de 1000 personas muertas (Chan-Yeun y Xu, 2003). Involucró a diversos animales silvestres, además de la civeta de palma, como el perro mapache y el tejón chino. Está demostrado que los murciélagos del género *Rhinolophidae* son el reservorio natural del SARS-CoV-1 y que las civetas serían un hospedador intermediario (Guang *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2016). Además de la epidemia del SARS-CoV-1 otro CoV, MERS-CoV, causó la muerte de 900 personas aproximadamente en cuatro continentes durante los años 2012 (año en el que se inició la epidemia) al 2019 (Su *et al.*, 2016). El MERS-CoV tiene como huésped natural a los dromedarios. Se ha detectado MERS-CoV también en ovinos, caprinos y burros criados cerca de dromedario seropositivos (Reusken *et al.*, 2013). El estrecho contacto entre dromedarios infectados y humanos aumenta la transmisión zoonótica continua. (De Wit *et al.*, 2016). El consumo de leche cruda de camellos infectados por MERS-CoV sería el factor principal para la transmisión a humanos (Reusken, Farag *et al.*, 2014). Actualmente la población mundial afronta la pandemia

de Covid-19 causada por el CoV SARS-CoV-2, el cual ha cobrado alrededor de 1.6 millones de vidas e infectado a más de 75 millones de personas. Estudios recientes evidencian que el murciélago *Rhinolophus acuminatus* y el pangolín tienen participación en esta pandemia (Wacharapluesadee *et al*, 2021). Se han notificado a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) infecciones por SARS-CoV-2 en animales domésticos (perro, gato) sin cuadro clínico y en animales silvestres en cautiverio (tigres, leones) con signos compatibles a Covid-19 (OIE, 2020). Reportes en los Países Bajos, Dinamarca, España y EE.UU. muestran infecciones por SARS-CoV-2 en granjas de visones presentando cuadro clínico de problemas respiratorios y mortalidad solo en Dinamarca (Khbou, 2020). Según Qiu (2020), a través de estudios de análisis filogenético asociado al receptor ACE2, ha propuesto la predicción de que animales de ganado (vaca, búfalo, cabra, oveja y cerdo) y otras especies silvestres podrían ser posibles hospedadores intermediarios del SARS-CoV-2.

#### **2.4.6. Transmisión y patogénesis**

Habitualmente los CoV se transmiten por infección fecal oral, secreciones respiratorias y aerosoles, propagándose a hospederos susceptibles. El virus en una fase inicial se replica en células epiteliales del tracto entérico o respiratorio causando un cuadro clínico local o también puede diseminarse generando un cuadro clínico sistémico agravando la enfermedad (Masters, 2013; Fenner, 2017).

##### **2.4.6.1. Coronavirus porcinos**

El TGEV se propaga entre granjas con la inserción de cerdos que excretan el virus o por fómites contaminados. El virus ingresa por ingestión, transmisión oro-fecal, se replica en los enterocitos y tiene un periodo de incubación de 18 a 72 horas. La destrucción de los enterocitos se traduce en una mala absorción y digestión. Posteriormente se manifiestan los signos como vómitos, diarrea acuosa, pérdida de peso y deshidratación en el caso de lechones. En los adultos a menudo la infección es asintomática, pero pueden presentar diarrea acuosa transitoria y vómito inusual (Fenner's, 2017).

El PEDV infecta a lechones produciendo diarrea acuosa y a veces vómitos en lechones. Por lo general en adultos la infección es asintomática, en ocasiones presenta diarrea (Fenner's, 2017).

El PRCoV se transmite por gotitas y aerosoles respiratorios, se replica en amígdalas, epitelio de la mucosa nasal y neumocitos de tipo I y II de alveolos pulmonares. Se desencadena una respuesta inflamatoria con necrosis manifestándose como una neumonía broncointersticial (Fenner's, 2017).

El HEV se transmite por aerosoles respiratorios, se replica en células de la mucosa nasal, amígdalas, pulmón e intestino delgado lo que genera vómitos repetidos después de ingerir alimentos, depresión, pérdida de peso corporal progresivo. Luego el virus se disemina hacia los nervios periféricos llegando al sistema nervioso central, manifestándose signos como opistótonos, postura de perro sentado, movimiento de remar, parálisis o convulsiones ((Fenner's, 2017; Khbou *et al.*, 2020).

El Deltacoronavirus porcino (HKU15) presenta signos similares a los relacionados con el PEDV, incluyendo diarrea acuosa en hembras y muerte en lechones (Fenner's, 2017).

#### **2.4.6.2. Coronavirus bovino**

La transmisión se da más frecuentemente por vía fecal-oral que por vía respiratoria. Estudios demuestran que el BCoV tiene participación primordial como agente patógeno causal de la diarrea neonatal en terneros durante el primer mes de vida, siendo la enfermedad mortal más común. La diseminación concurrente por vía fecal y nasal persiste hasta 10 días postinfección de los terneros. La replicación ocurre en las células del epitelio de la vellosidad del intestino delgado, luego se extiende al intestino grueso provocando mala digestión y absorción manifestando así las diarreas que progresan más adelante a insuficiencia circulatoria y muerte (Fenner's, 2017).

Otra enfermedad en la que el BCoV está implicado es la Disentería de invierno. El virus destruye las células maduras de absorción que recubren las vellosidades intestinales y la superficie de la mucosa del intestino grueso; esta alteración genera hemorragia intestinal marcada y necrosis extensa de las células de las criptas de la mucosa del intestino grueso. El animal se caracteriza por presentar diarrea explosiva sanguinolenta, fiebre, depresión, disminución de la producción láctea y signos respiratorios frecuentes (Natsuaki *et al.*, 2007).

El BCoV se relaciona con la enfermedad de fiebre del embarque ya que la diseminación nasal y fecal de BCoV puede darse poco después de que el ganado sea

transportado a los corrales de engorde y este evento predispone a estos animales a infecciones secundarias, que provocan bronconeumonía fibrinosa grave (característico de la fiebre del embarque), siendo a menudo fatal (Fenner's, 2017).

#### **2.4.6.3. Coronavirus caninos**

El CoV respiratorio canino (CRCoV) en el año 2003 se asoció a Traqueobronquitis infecciosa canina, una enfermedad estacional que se presenta comúnmente en los meses de otoño e invierno. Se transmite por aerosol entre perros susceptibles en las perreras, ocasiona disnea, inapetencia y neumonía llegando a ser mortal (Fenner's, 2017).

Existen 2 serotipos de CoV canino (CCoV) entérico (I y II), la infección por este coronavirus es común en perros de todo el mundo. Generalmente causa destrucción de enterocitos similar a los coronavirus entéricos de otras especies ya mencionadas anteriormente. Aparentemente cepas pantotrópicas de CCoV causa pirexia, diarrea, anorexia, depresión, vómitos, además de ataxia y convulsiones (Fenner's, 2017).

#### **2.4.6.4. Coronavirus felinos**

Se ha identificado 2 serotipos (I y II) para los CoV felinos (FCoV). Los coronavirus del serotipo I son los que circulan mayormente mientras que los del serotipo II son más raros. Ambos serotipos pueden causar Peritonitis infecciosa felina (PIF). La transmisión por lo usual es oro-fecal y se encuentra mayormente en lugares con alta densidad animal. La PIF en etapas iniciales manifiesta anorexia, fiebre crónica, malestar y pérdida de peso y en algunos casos, problemas oculares y/o neurológicos. Debido a una infección persistente del intestino con excreción fecal crónica se generan mutaciones de FCoV entéricos, dando como resultado el VFIP. Este virus tiene la capacidad de replicarse en macrófagos y monocitos, pero la infección esta modulada por una respuesta inmune celular eficiente que mantiene bajo control la replicación del virus en los macrófagos y monocitos infectados. El animal puede estar saludable, pero en caso de estrés o inmunosupresión se convierte susceptible al desarrollo de PIF. La PIF se caracteriza por la presencia de focos de inflamación piogranulomatosa en varios órganos. (Hartmann, 2005; Fenner's, 2017)

#### **2.4.6.5. Coronavirus murinos**

Los CoV murinos tienen un amplio tropismo tisular. La transmisión se da de manera oro-fecal, por contacto directo, aerosoles y fómites. Se ha informado de transmisión vertical en infecciones experimentales y también puede transmitirse mediante trasplantes de tumores (Fenner's, 2017). El MHV infectan selectivamente los enterocitos, con diseminación a otros tejidos. Los enterocitos sufren efectos citolíticos que se traduce a necrosis epitelial segmentaria, vellosidades atenuadas y erosión de mucosa (Fenner's, 2017). En ratones adultos se presenta hiperplasia de la mucosa manifestando mala absorción y el aumento de la secreción mucosa de líquidos y electrolitos. La manifestación del cuadro clínico por deshidratación se limita a ratones lactantes causando la muerte después de 1 ó 2 días postinfección. Los adultos son asintomáticos y las crías jóvenes presentan heces mal formadas e hinchadas. Cepas politrópicas se replican inicialmente en el epitelio respiratorio nasal. La diseminación habitualmente se da por vía hematogena a la vasculatura pulmonar y con viremia secundaria a otros órganos (hígado, tejido hematopoyético y tejidos linfoides). Las cepas neurotrópicas pueden extenderse desde el epitelio olfatorio hasta los tractos olfatorios del cerebro sin diseminación a otros órganos (Fenner's, 2017).

#### **2.4.6.6. Coronavirus aviares**

El IBV se transmite por aerosol y vía oro-fecal para luego replicarse en células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio. El periodo de incubación es de 18 a 48 horas. La viremia propaga el virus a muchos órganos. Las lesiones más frecuentes son el engrosamiento de la mucosa en el tracto respiratorio con exudado seroso o catarral en fosas nasales, tráquea, bronquios y alveolos. En ponedoras se produce yema libre en cavidad abdominal. Pollos de 14 semanas de edad las cepas virulentas producen enfermedad respiratoria severa con cuadro clínico de jadeo, tos, estertores traqueales, estornudos, exudado nasal, ojos húmedos, disnea y en ocasiones senos nasales inflamados. Las cepas menos virulentas desarrollan cuadro clínico leve. Algunas cepas afectan al riñón y provocan nefritis intersticial. La infección también afecta el tracto intestinal con daños leves y en hembras jóvenes provoca hipoplasia permanente del oviducto que más adelante se refleja en baja producción y calidad de huevos (Masters, 2013).

#### **2.4.6.7. Coronavirus humanos**

La infección natural de los coronavirus humanos se propaga, como muchos otros virus respiratorios por aerosol o fómites en las membranas mucosas del tracto respiratorio. La infección primaria en los coronavirus causantes de resfrió común ocurre en células epiteliales ciliadas en la nasofaringe creando la exacerbación de quimiocinas y citocinas. Estudios han demostrado que la infección no induce una inmunidad protectora estable (Masters, 2013).

La infección por SARS-CoV, a diferencia de los coronavirus de resfrió común, genera un cuadro grave de neumonía intersticial en el 30% de individuos. Inicialmente los individuos afectados presentaron fiebre, malestar general, mialgias escalofríos y tos seca. Los problemas respiratorios se acompañan de afecciones gastrointestinales como diarrea acuosa (Su *et al.*, 2016).

El MERS-CoV es un coronavirus politrópico, se transmite por aerosol o por consumo de leche de camello no pasteurizada. Parece ser que el MERS-CoV tiene transmisión humana-humana limitada, mayormente se transmite en los centros de atención médica y el desarrollo de la gravedad de la enfermedad se asocia a comorbilidades (Su *et al.*, 2016; Fenner's, 2017). Las manifestaciones clínicas varían desde neumonía asintomática hasta neumonía grave con disnea aguda, shock septicémico e insuficiencia renal y muerte. Un tercio de individuos afectados desarrollan vómitos y diarreas (Su *et al.*, 2016).

Como en el resto de CoV, el reciente coronavirus SARS-CoV2, se transmite con el contacto directo con gotas respiratorias por medio de la mucosa oral, nasal y ocular. Existe la posibilidad de transmisión vertical y oro-fecal, ya que aún se están haciendo investigaciones (de León, 2020). La unión del virus a su receptor celular (ACE2) en los neumocitos tipo II conlleva a la cascada inflamatoria en el tracto respiratorio inferior. Se reportó que el 98 % de personas afectadas manifiesta fiebre, 76% tos, 55% disnea inspiratoria. Las complicaciones de la enfermedad conllevan a insuficiencia respiratoria, shock séptico y/o fallo multiorgánico (OMS, 2020)

#### **2.5. Coronavirus en camélidos**

Los COV en alpacas y llamas se detectaron con mayor frecuencia en heces diarreicas de crías de hasta 7 meses de edad en Oregon, EE.UU., y son descritos como



patógenos potenciales (Cebra *et al.*, 2003). Posteriormente la secuencia genómica de este CoV reveló una estrecha similitud (99.5%) con cepas de BCoV, planteándose un origen ancestral común entre ambos CoV (Jin, 2007). En alpacas adultas la diarrea por coronavirus es poco común, reportándose la detección de un  $\beta$ CoV en una alpaca hembra de 4 años en EE.UU. (Genova *et al.*, 2008). En el 2012, Crossley y colaboradores describió la secuenciación del genoma completo de un CoV de alpaca aislado en el año 2007, asociado a enfermedad respiratoria aguda. Se halló una similitud nucleotídica de 92.2% con un  $\alpha$ CoV (HCoV-229E), que por lo general en alpacas se identificaban como  $\beta$ CoV en estudios anteriores. Estudios en Perú también describen la presencia de CoV en crías de alpacas relacionadas o no a diarreas. Uno de ellos realizado en el Centro Experimental La Raya-Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC) detectó 5 de 14 muestras fecales positivas a coronavirus, mediante la aplicación de pruebas inmunocromatográficas rápidas, estas muestras estaban relacionadas con diarrea aguda, (López *et al.*, 2011). Otro estudio desarrollado en los Altos Andes Peruanos detectó coronavirus en 11 de 60 muestras fecales y con análisis de secuencia genómica se identificó un  $\beta$ CoV similar al BCoV (Luna *et al.*, 2015). Existen pocos estudios basados en la detección molecular de coronavirus en alpacas pertenecientes a comunidades campesinas. Uno de estos estudios describe en el año 2010 en la comunidad de Silli, Cusco, la presencia de coronavirus en el 40% de muestras de lavado intestinal de alpacas neonatas muertas en un brote de diarrea (Rojas *et al.*, 2016). Posteriormente, en el año 2014, se reportó la presencia de coronavirus en el 27% de muestra fecales diarreicas y no diarreicas de alpacas provenientes de la comunidad de Silli, Instituto de Investigaciones Tropicales y de Altura de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (IVITA - UNMSM) y del Centro Experimental La Raya de la UNSAAC) (Rocha *et al.*, 2018

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar y tiempo de estudio**

El estudio se inició en el año 2020. Se utilizó muestras de heces conservadas en congelación, colectadas en el año 2015, provenientes de alpacas neonatas de las comunidades campesinas de Pataccalasaya (distrito de Sicuani), Quisini y Silli (ambos del distrito de Marangani), provincia de Canchis, departamento de Cuzco. Las muestras fecales colectadas se procesaron y analizaron en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología (sección Inmunología) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

#### **3.2. Muestras biológicas**

Se trabajaron con 68 muestras de heces de alpacas neonatas de 1 a 5 semanas de edad sin tomar en cuenta el sexo o cuadro clínico (Cuadro 6). El tamaño muestral comprende a toda la población de alpacas nacidas entre el 21 de diciembre del 2014 hasta el 28 de enero del 2015 para la comunidad de Silly, entre el 28 de diciembre del 2014 hasta el 3 de febrero del 2015 para la comunidad de Quisini y para la comunidad de Pataccalasaya entre el 20 de diciembre del 2014 hasta el 31 de enero del 2015. Las muestras fecales se obtuvieron directamente del recto de los animales con y sin cuadros clínicos de diarrea. Cabe mencionar que para la toma de muestras de las comunidades de Quisini (compuestas por 301 familias) y Pataccalasaya (compuestas por 108 familias) se muestrearon animales pertenecientes a una de las familias que componen cada comunidad, en cambio en la comunidad de Silly (compuesta por 305 pobladores) por su grado de organización y accesibilidad que presenta para los estudios académicos provenientes de IVITA-Marangani, se

colectaron muestras de todos los animales pertenecientes a dicha comunidad que nacieron durante el tiempo del muestreo. Es importante también mencionar que los meses de colecta coinciden con el periodo de parición de las alpacas (fines de diciembre hasta mediados de marzo), que, a su vez, coincide con la mayor incidencia de cuadros diarreicos y respiratorios de estos animales. Las muestras obtenidas se llevaron al Laboratorio de diagnóstico Microbiológico de IVITA-Marangani (Cuzco-Perú) donde se mantuvieron a -20°C hasta el final de la colecta. Posteriormente las muestras se trasladaron al Laboratorio de Microbiología y Parasitología (Sección Inmunología) de la FMV-UNMSM (Lima-Perú) y se preservaron a -80°C hasta su procesamiento.

**Cuadro 6.** Relación de las comunidades campesinas muestreadas, especie, período de colecta y número de muestras fecales de alpacas que serán analizados.

<b>Especie</b>	<b>Comunidad campesina (distrito)</b>	<b>Nº. de muestras</b>	<b>Fecha de Colecta</b>
Alpacas	Silly (Marangani) Latitud sur: 14°21'12"S, oeste 71°10'17"W	33	28-01-2015
Alpacas	Quisini (Marangani) Latitud sur: 14°39'72"S, oeste 71°10'89"W	23	03-02-2015
Alpacas	Pataccalasaya (Sicuaní) Latitud sur: 14°16'9.5"S, oeste 71°9'39.1"W	12	31-01-2015
<b>Total</b>		<b>68</b>	

### 3.3. Metodología

#### 3.3.1. Procesamiento de las muestras

El procesamiento se inició con el descongelado de las muestras fecales luego pasaron por un proceso de clarificación y filtración. Tal proceso requirió la preparación de suspensiones fecales al 10% en PBS (tampón salino fosfato) a un pH de 7.2 y se sometieron a centrifugación por 5 minutos a 2500x g; posteriormente el sobrenadante fue filtrado con filtros de 0.22 µm de diámetro para eliminar contaminantes de mayor tamaño como bacterias, parásitos y hongos que podrían estar en las heces. El sobrenadante fecal clarificado fue utilizado para la extracción del ARN viral.

### **3.3.2. Controles positivos**

Para la estandarización de la RT-PCR se utilizaron como controles positivos dos estirpes de CoV de alpacas (AlpCoV) aislados en cultivo celular (AlpCoV-SA44 y AlpCoV-HSN), estas estirpes son del género  $\beta$ CoV y sus secuencias de nucleótidos están depositadas en el GenBank con los números de acceso KX266949 y KX266944, respectivamente. Como controles positivos para la estandarización de la RT-PCR de pancoronavirus se incluyó una vacuna de bronquitis infecciosa aviar ( $\gamma$ CoV) y el virus de la diarrea epidémica porcina ( $\alpha$ CoV) proveniente del laboratorio de virología de la FMV-UNMSM.

### **3.3.3. Extracción de ARN viral**

Se realizó la extracción de ARN viral utilizando Trizol® LS (Tiocianato de guanidina - fenol) (Life technologies/Invitrogen/Ambion, Carlsbad, CA, USA) siguiendo el protocolo del producto. La extracción de ARN viral se obtuvo adicionando 900  $\mu$ l de Trizol® LS en un vial de 1.5 ml con 300  $\mu$ l del sobrenadante fecal clarificado del procesamiento, inmediatamente los viales fueron homogeneizados varias veces y luego incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Después se añadió 240  $\mu$ l de cloroformo y se llevó a vortex. La mistura obtenida fue incubada a temperatura ambiente por 5 minutos y luego centrifugada a 12000x g por 15 minutos a 4°C. Se obtuvo la separación de tres fases de las cuales se tomó la fase superior acuosa (contiene el ARN genómico) y se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 ml en el cual se adicionó 600  $\mu$ l de alcohol isopropílico y se llevó a vortex para incubar en hielo por 10 minutos. Culminada la incubación se centrifugó a 12000x g por 10 minutos a 4°C (producirá la precipitación de ARN genómico). Seguidamente se desechó el sobrenadante y se añadió al pellet del tubo, 1 ml de etanol al 75% luego se llevó a vortex y se centrifugó a 12000x g por 5 minutos a 4°C. Al término del proceso de centrifugación se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet al medio ambiente por 10 minutos. Para concluir con la extracción se resuspendió el ARN con 30  $\mu$ l de agua libre de nucleasas y se incubó a 60°C por 15 minutos. Terminada la incubación se conservó a -70°C hasta su utilización (se recomienda cuantificar el ARN).

### 3.3.4. Producción de ADN complementario (ADNc) viral y detección de CoV

La síntesis de ADNc se realizó empleando el cebador reverso del protocolo pancoronavirus (Cor-RV). (Cuadro 7) Los cebadores del protocolo pancoronavirus (Cor-FV y Cor-RV) amplifican una región conservada del gen ORF1b que codifica la polimerasa viral, dando como resultado un producto de 251 pb (Moës et al., 2005), los primers se muestran en el Cuadro 7. Para obtener el ADNc se adicionó 5 µL del ARN extraído en un tubo de PCR, luego se incubó a 95°C por 5 minutos. Después de este periodo, se enfrió la suspensión a 4°C por 5 minutos y se añadió 5 µL de la siguiente mistura: 1.4 µL de agua libre de nucleasas, 0,5 µL de la mistura de desoxinucleótidos trifosfatados [dNTP] (conteniendo 10 mM de desoxiadenosina trifosfato [dATP], desoxitimina trifosfato [dTTP], desoxicitidina trifosfato [dCTP] y desoxiguanosina trifosfato [dGTP]; concentración final 0.5 mM), 2 µL de tampón de enzima a 5X; 0.6 µL de solución de cloruro de magnesio (50 mM; concentración final 3 mM); 0.4 µL de la solución de oligonucleótidos específicos (20 µM; concentración final de 0.4 µM) y 0.2 µL de la enzima transcriptasa reversa (*ImProm-II Reverse Transcriptase*, Promega, Madison, Estados Unidos). La reacción se produjo en un termociclador (*Veriti 96 wells* - Applied Biosystems, Foster City, California - Estados Unidos), con una temperatura inicial de 25°C por 5 minutos seguido de una temperatura de 42°C por 1 hora. Los ADNc obtenidos serán sometidos a la reacción de *panPCR* como será descrito a continuación.

Para la detección de CoV se empleó la metodología de *panRT-PCR*, utilizando oligonucleótidos específicos para la amplificación de una porción del gen de la polimerasa (RdRp – ORF1b) de todas las especies de CoV, siguiendo el protocolo descrito por Moës *et al.*, (2005). En seguida las mismas muestras serán sometidas a una reacción de PCR anidado utilizando oligonucleótidos específicos para identificar a todos los βCoV siguiendo el protocolo desarrollado en este trabajo (**Cuadro 7**).

**Cuadro 7.** Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT- PCR y PCR anidado para la detección de CoV y βCoV.

Gen	Oligos	Función	Secuencia (5'-3')	Virus	Producto de PCR	Referencia
ORF 1b	Cor-FW	panRT-PCR	ACWCARHTVAAYYTNAARTAYGC	Todos los CoV	251 ó 280 pb*	Moës <i>et al.</i> , 2005
	Cor-RV		TCRCAYTTDGGRTARTCCCA			
ORF 1b	βCoV.F	panPCR anidado	ATTAGTGCWAAGAATAGAGCYCGCAC	Todos los βCoV	227pb	En este estudio
	βCoV.F		TCACAYTTWGGRTARTCCCADCCCA			

Oligonucleótidos degenerados: N= A/G, W= A/T, Y= C/T, V= A/C/G, N= aNy base, \*pb = pares de bases

Para la reacción de PCR se adicionó a los 5 µL de ADNc, 20 µL de la siguiente mistura para PCR: 13 µL de agua libre de nucleasas, 4 µL de tampón de la enzima concentrada en 5X; 0,75 µL de solución de cloruro de magnesio (50 mM; concentración final 3 mM); 0,6 µL de la mistura de dNTPs (10 mM; concentración final 0,2 mM); 1,5 µL de la solución conteniendo los 2 oligonucleótidos Cor-Fv y Cor-Rv (20 µM; concentración final 0,6 µM de cada iniciador) y 0.2 µL de la enzima *Taq* polimerase (Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS). El ADNc se adicionó al master Mix para PCR y fue sometido a un termociclador (Veriti 96 wells - Applied Biosystems, Foster City, California - Estados Unidos), con el siguiente ciclo: desnaturación a 95°C/5 min, 50 ciclos de 94°C/40 seg, 48°C/1 min y 72°C/ 1 min, seguido de una extensión final de 72°C/ 5 minutos y estocado a 4°C /∞.

### 3.3.5. Reacción de PCR anidada para la detección de *Betacoronavirus*

En la PCR anidada fueron mezclados 5 µL del producto de la primera PCR y 20 µL de la siguiente mistura de PCR: 13,35 µL de agua libre de nucleasas, 4 µL de tampón de la enzima concentrada en 5X; 0,75 µL de solución de cloruro de magnesio (50 mM; concentración final 3 mM); 0,5 µL de la mistura de dNTPs (10 mM; concentración final 0,2 mM); 1,2 µL de la solución conteniendo los 2 oligonucleótidos βCoV.F y βCoV.R (20 µM; concentración final 0,4 µM de cada iniciador) y 0.2 µL de la enzima *Taq* polimerase (Ludwig Biotec) (Rojas, 2020), cuadro1. Las reacciones fueron sometidas a un termociclador (Veriti 96 wells), en el cual fue establecido el siguiente ciclo: desnaturación a 95°C/3 min, 35 ciclos de 94°C/40 seg, 57°C/1 min y 72°C/ 40 seg, seguido de una extensión final de 72°C/ 10 minutos y estocado a 4°C/ ∞.

### 3.3.6. Reacción PCR anidada para la identificación del subgénero *Embecovirus* (*Betacoronavirus* tipo 1)

Las muestras positivas a  $\beta$ CoV fueron sometidas a una PCR anidada utilizando 5  $\mu$ L del DNAc de las muestras indicadas y 20  $\mu$ L de la siguiente mistura de PCR: 13,35  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, 4  $\mu$ L de tampón de la enzima concentrada en 5X; 0,75  $\mu$ L de solución de cloruro de magnesio (50 mM; concentración final 3 mM); 0,5  $\mu$ L de la mistura de dNTPs (10 mM; concentración final 0,2 mM); 1,2  $\mu$ L de la solución conteniendo los 2 oligonucleótidos CV2U.F y CV2L.R (20  $\mu$ M; concentración final 0,6  $\mu$ M de cada iniciador) y 0.2  $\mu$ L de la enzima *Taq polimerase* (Ludwig Biotec) (Brandão et al., 2004), (Cuadro 8). Las reacciones fueron sometidas a un termociclador (Veriti 96 wells), en el cual se estableció el siguiente ciclo: desnaturalización a 95°C/3 min, 35 ciclos de 94°C/40 seg, 54°C/1 min e 72°C/ 1 min, seguido de una extensión final de 72°C/ 5 minutos y estocado a 4°C/  $\infty$ .

**Cuadro 8.** Oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR anidada para la detección de *Embecovirus* (*Betacoronavirus* tipo 1)

Gen	Oligos	Función	Secuencia (5'- 3')	Virus	Producto de PCR	Referencia
ORF1b	CV2U.F	PCR anidada	TACTATGACTGGCAGAATGTTTCA	<i>Embecovirus</i> (Betacoronavirus tipo 1)**	136pb*	Brandão, 2004
	CV2L.R		AACATCTTTAATAAGGCGRCGTAA			

\*\**Betacoronavirus* tipo 1= Los oligos usados fueron descritos para la detección de *Betacoronavirus* tipo 1 (antigua nomenclatura del ICTV para denominar al subgénero *Embecovirus*); \*pb=Pares de bases.

### 3.3.7. Electroforesis en gel de Agarosa

El análisis de los resultados de las reacciones de *pan*RT-PCR y PCR anidado se realizaron por electroforesis en gel de agarosa. Al gel de agarosa de 1.5% en TBE 0.5X (Tris 0.089M; ácido bórico 0.0089 M; EDTA 0.025M, pH 8,3) se le adicionó 5  $\mu$ L de bromuro de etidio (0,5  $\mu$ g/  $\mu$ L), aplicándosele 5  $\mu$ L del producto de PCR y seguidamente se procedió a la electroforesis a 120V por 1 hora con tampón TBE 0,5X. Culminado el tiempo, el gel fue visualizado en un transiluminador con luz UV (ultravioleta) y fotografiado con cámara digital. El tamaño del fragmento amplificado será estimado por comparación con un patrón de tamaño molecular 100 pb (Promega)

### 3.3.8. Identificación del género de CoV de las muestras negativas a *Betacoronavirus* y *Embecovirus* por PCR anidada

Para la identificación de los géneros de coronavirus negativos a  $\beta$ CoV y al subgénero *Embecovirus* se realizó mediante secuenciamiento y análisis filogenético de un producto de 668 pb de una región parcial del gen ORF1b, para ello se utilizaron un nuevo set de primer de pancoronavirus diseñados por Hu *et al.*, 2018 (Cuadro 9). Para realizar este análisis se intentó aislar en cultivo celular dichas muestras, pero al no conseguir su aislamiento, se seleccionaron las muestras positivas con mayor carga viral, determinado por la intensidad del fragmento amplificado en la primera reacción de *panRT-PCR* de 251 ó 280 pb visualizado en el gel de agarosa, una vez seleccionado los productos se enviaron a secuenciar.

**Cuadro 9.** Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-PCR para el secuenciamiento

Gen	Oligos	Función	Secuencia (5'- 3')	Virus	Producto de PCR	Referencia
ORF1b	panCoV.F2	panRT-PCR	AARTTYTAYGGHGGYTGG	Todos	668pb*	Hu <i>et al.</i> , 2018
	panCoV.R1		GARCARAATTCATGHGGDCC	CoV		

Oligonucleótidos degenerados: N= A/G, W= A/T, Y= C/T, V= A/C/G, N= aNy base.; \*pb = pares de bases

### 3.3.9. Secuenciamiento de los productos amplificados

Los productos amplificados se sometieron al secuenciamiento utilizando los iniciadores de las reacciones de RT y PCR, descrito en el cuadro 7 y 9, para determinar el género. Esta etapa del trabajo se realizó por la reconocida Plataforma de secuenciamiento genómico Macrogen Inc. (Seúl, Corea) utilizando el método de Sanger.

### 3.3.10. Análisis de secuencias de nucleótidos

Las secuencias de nucleótidos obtenidos se editaron y analizaron, utilizando los programas BLAST [[www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)], Chromas [Technelysium Pty Ltd] y Editseq, SeqMan y MegAlign del paquete bioinformático Lasergene [DNASTAR Inc., Madison, WI – EE.UU.], para luego ser alineadas con secuencias correspondientes obtenidas del GenBank. El análisis filogenético se realizó utilizando el programa Mega X. La distancia filogenética se corrigió utilizando el modelo Kimura-2 parámetros. El dendograma fue construido por el



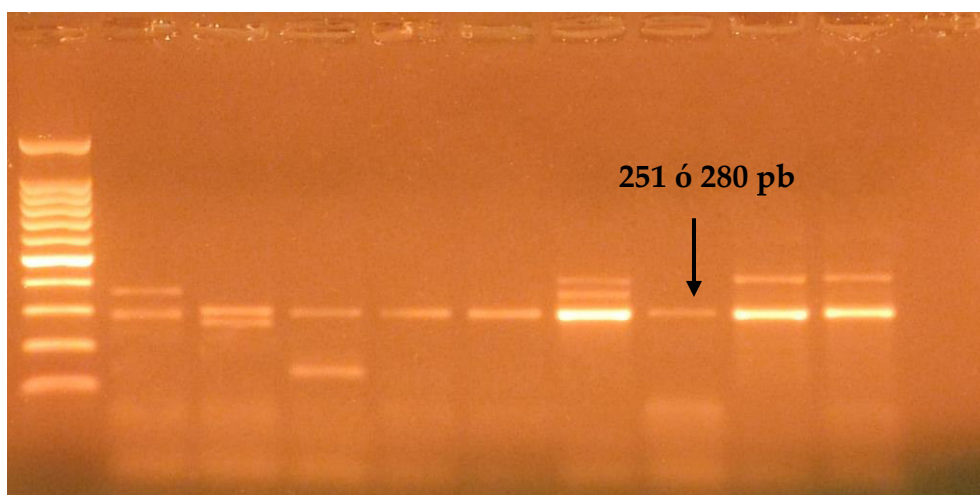
método de Neighbor-Joining. La significancia estadística fue estimada por el análisis de bootstrap con 1000 repeticiones.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Detección e identificación de los géneros y subgéneros de Coronavirus

La presencia del virus fue determinada por la detección de una banda de 251 a 280 pb en el gel de agarosa en una corrida electroforética de un producto de RT-PCR que amplifica una región conservada de 251 ó 280 pb (Figura 11) del gen RdRp presente en los 4 géneros de CoV. De las 68 muestras fecales de alpacas pertenecientes a las 3 comunidades en estudio, se observó una tasa de infección a CoV de 86.8% (59/68) (Cuadro 10). Al analizar individualmente cada comunidad podemos evidenciar que Silly, Quisini y Pataccalasaya, mostraron un 87.9% (29/33), 91.3% (21/23) y 75% (9/12) de positividad al virus, respectivamente; presentando así una alta tasa de infección a CoV.

PM      1      2      3      4      5      6      7      C+    C+    C-



**Figura 11.** Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio mostrando los productos amplificados de la RT-PCR de pancoronavirus (280 pb). PM: 100 pb del marcador de peso molecular; carriles 1 a 7: muestras de heces; C+: control positivo; C-: control negativo.

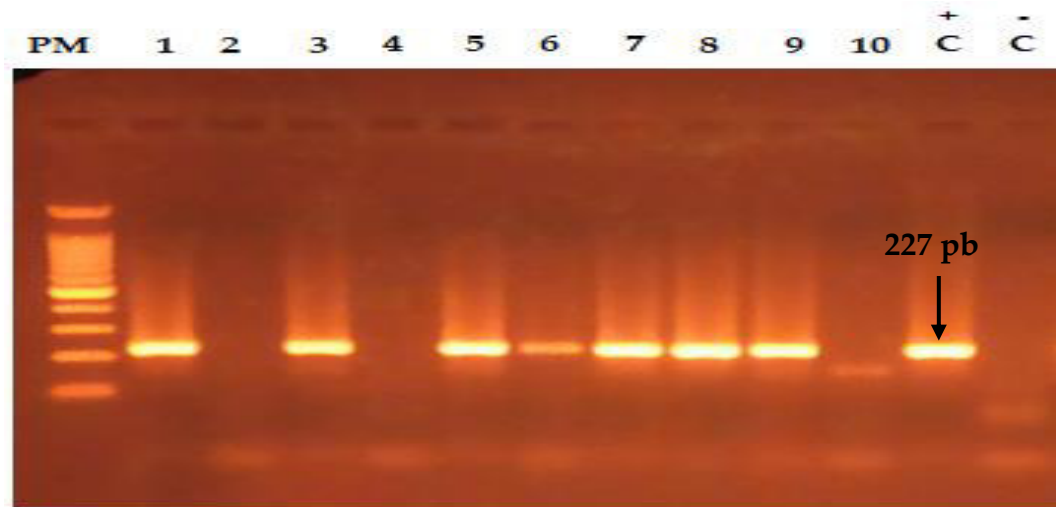
**Cuadro 10.** Distribución de la infección por coronavirus entre las alpacas de tres comunidades de la provincia de Canchis de Cuzco

Comunidad/Distrito	Coordenadas geográficas altitud	Especie hospedera	Nº de muestras	Nº de muestras de coronavirus	
				Positivos (%)	Negativos (%)
Silly/Marangani	14°21'12" S, 71°10'17" W, 3800 msnm <sup>±</sup>	Alpaca	33	29 (87.9%)	4 (12.1%)
Quisini/Marangani	14°39'72" S, 71°10'89" W, 4300 msnm <sup>±</sup>	Alpaca	23	21 (91.3%)	2 (8.7%)
Pataccalabaya/Sicuani	14°16'9.5" S, 71°9'39.1" W, 4700 msnm <sup>±</sup>	Alpaca	12	9 (75%)	3 (25%)
<b>Total</b>			<b>68</b>	<b>59 (86.8%)</b>	<b>9 (13.2%)</b>

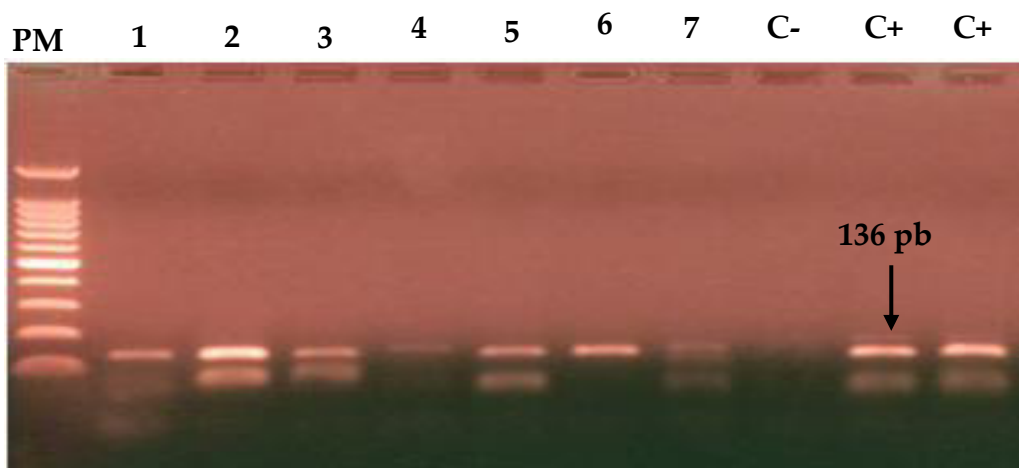
msnm<sup>±</sup>: metros sobre el nivel del mar

Las 59 muestras positivas a CoV en la primera reacción fueron sometidos a un Nested-PCR para la identificación del género  $\beta$ CoV, esta reacción amplifica un producto de 227 pb (Figura 12) utilizando primers diseñados en este estudio con la capacidad de amplificar una región muy conservada de cualquier  $\beta$ CoV reportado hasta la fecha. Como resultado conseguimos identificar que el 93.2% (55/59) de las muestras eran positivas a  $\beta$ CoV y un 6.8% (4/59) de las muestras no hemos podido determinar a que género de CoV pertenecen. La frecuencia de  $\beta$ CoV en la comunidad de Silli es de un 93,1% (27/29), en la comunidad de Quisini es de 90.4% (19/21) y en la comunidad de Pataccalabaya está presente en un 100% de las alpacas.

Para la identificación del subgénero viral al que pertenecen las 59 muestras positivas a  $\beta$ CoV, se realizó una PCR anidada a partir del primer amplicon utilizando los cebadores CV2U.F y CV2L.R que amplifican 136 pb de una región altamente conservada de RdRp de los Coronavirus del subgénero *Embecovirus* (Figura 13). Se determinó que el 25.4% (15/59) de muestras positivas son del subgénero *Embecovirus*, las cepas pertenecientes a este subgénero viral están presentes en las comunidades de Silly, Quisini y Pataccalabaya con frecuencia de 34.5% (10/29), 19% (4/21) y 11.1% (1/9), respectivamente (Cuadro 11). No se consiguió identificar otro subgénero de  $\beta$ CoV.



**Figura 12.** Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio mostrando los productos amplificados de la PCR anidada de *Betacoronavirus* (227 pb).  
 PM: 100 pb del marcador de peso molecular; carriles 1 al 10: muestras de heces; C+: control positivo; C-: control negativo.



**Figura 13.** Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio mostrando los productos amplificados de la PCR anidada de *Embecovirus* (136 pb).  
 PM: 100 pb del marcador de peso molecular de ADN; carriles 1 al 7: muestras de heces; C+: control positivo; C-: control negativo.

**Cuadro 11.** Resultado de la identificación del género *Betacoronavirus* y subgénero *Embecovirus* en alpacas de tres comunidades campesinas de la provincia de Canchis, departamento de Cuzco.

Comunidad/Distrito	Especie hospedera	N° de muestras	Genero/subgénero de coronavirus		
			$\beta$ CoV /EmbeCoV	$\beta$ CoV /no identificado	Género/Subgénero no identificado
Silly/Marangani	Alpaca	29	10 (34.5%)	17 (58.6%)	2 (6.9%)
Quisini/Marangani	Alpaca	21	4 (19%)	15 (71.4%)	2 (9.5%)
Pataccalasaya/Sicuani	Alpaca	9	1 (11.1%)	8 (88.9%)	0
<b>Total</b>		<b>59</b>	<b>15 (25.4%)</b>	<b>40 (67.8%)</b>	<b>4 (6.8%)</b>

$\beta$ CoV: género *Betacoronavirus*; EmbeCoV: subgénero *Embecovirus*.

Las 4 muestras negativas a  $\beta$ CoV fueron sometidos a otra RT-PCR de pancoronavirus descrita por Hu *et al.* (2018), sin éxito; de la misma manera se intentó aislar los virus en cultivo celular utilizando la línea celular Vero-76 que pertenecen al Laboratorio de Virología de la FMV-UNMSM, pero no tuvimos éxito. El mismo procedimiento se intentó en las 40 muestras negativas al subgénero *Embecovirus*, pero no se obtuvo éxito para la identificación de los otros subgéneros de  $\beta$ CoV.

#### 4.2. Secuenciamiento y análisis filogenético de las muestras positivas a *Embecovirus*

De las 15 muestras positivas a *Embecovirus*, se seleccionaron 8 muestras con cantidad adecuada del producto amplificado para realizar la secuenciación por método Sanger para confirmar nuestros datos, obteniendo las 8 muestras secuenciadas con éxito.

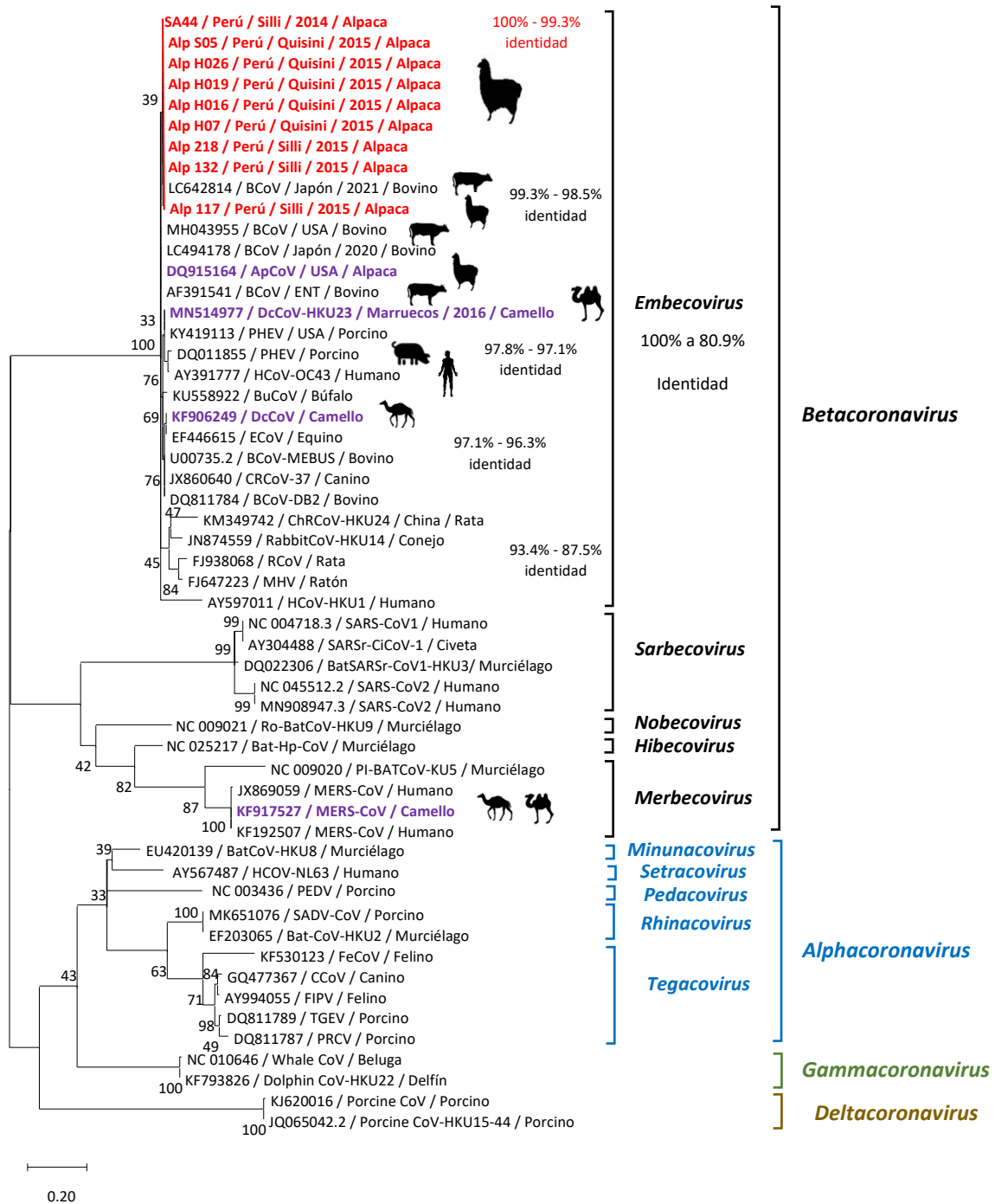
El análisis filogenético reveló que las 8 secuencias obtenidas de alpacas de este estudio tienen una relación filogenética entre ellas de 100% a 99.3% de identidad de nucleótidos, en el dendrograma las muestras en color rojo son de nuestro estudio y las secuencias en morado son de diferentes especies de coronavirus reportados en camélidos de diferentes partes del mundo (Figura 14).

Nuestras secuencias al ser comparadas con otros *Embecovirus* tienen una relación filogenética en un rango de 100% a 80.9% de identidad de nucleótidos. Las secuencias de alpacas de este estudio tienen una relación filogenética de 66.2% a 65.4%, 69.9%, 63.2% y 58.1% de identidad de nucleótidos con los subgéneros

*Sarbecovirus*, *Nobecovirus*, *Hibecovirus* y *Merbecovirus*, respectivamente (Cuadro 12).

Al comparar las secuencias de alpacas de este estudio con las secuencias de las cepas de  $\beta$ CoV del subgénero *Embecovirus* de bovinos (BCoV) (MH043955, LC494178 y AF391541), porcinos ((PHEV) (KY419113 y DQ011855)), equino (EF446615), conejo (HKU14), rata (RCoV) y humano (HKU1) se obtuvo una identidad de nucleótidos de 99.3% a 98.5%, 97.8% a 97.1%, 97.1% a 96.3%, 93.4% a 87.5% y 80.9 %, respectivamente. Nuestras 8 secuencias de CoV de alpacas están depositadas en el Genbank con los siguientes números de acceso QN873869 al QN873876 (secuencias aún no liberadas en el Genbank, serán liberados en Junio del 2023) (Anexo 1).

Las muestras positivas a las reacciones de pancoronavirus y panbetacoronavirus que fueron negativos al subgénero *Embecovirus*, no se consiguieron secuenciar sus productos por el método de Sanger por presentar mucho ruido en la cromatografía.



**Figura 14.** Dendrograma realizado en base a las secuencias parciales del gen ORF1 que codifica la RdRp de CoV, obtenidas de las muestras de alpacas neonatas positivas a *Embecovirus*. Información de las secuencias (anexo 1).

**Cuadro 12.** . Distancia filogenética representada en el porcentaje de identidad de nucleótidos entre las secuencias de alpacas peruanas y el resto de las estirpes de coronavirus las cuales se agrupan en los 4 géneros del virus.

Porcentaje de identidad																																			Estirpes		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	1	2	
1		66.2	89.0	64.0	97.1	62.5	96.3	66.2	93.4	92.6	61.8	91.9	63.2	97.1	58.8	66.2	64.7	96.3	59.6	62.5	88.2	98.5	97.1	97.1	62.5	98.5	68.4	64.0	66.9	61.8	68.4	64.0	62.5	97.1	97.8	AY391777	
2			66.2	76.5	66.2	75.7	66.2	81.6	64.0	62.5	77.2	63.2	66.9	66.2	64.0	77.2	69.1	66.2	64.7	66.2	62.5	66.2	66.2	66.2	75.7	66.2	66.2	66.2	76.5	68.4	64.0	62.5	61.8	64.7	65.4	2	AY567487
3				66.2	89.0	66.2	88.2	64.0	87.5	85.3	64.7	83.8	62.5	89.0	57.4	64.7	63.2	88.2	58.1	61.8	80.9	89.0	89.0	89.0	66.2	89.0	68.4	64.7	67.6	64.0	65.4	62.5	61.8	87.5	88.2	3	AY597011
4					64.0	80.9	64.0	74.3	64.7	63.2	95.6	62.5	68.4	64.0	67.6	83.8	67.6	64.0	68.4	67.6	61.8	63.2	64.0	64.0	80.9	63.2	70.6	72.1	72.8	66.2	66.9	68.4	63.2	64.0	4	DO811789	
5						63.2	97.8	66.9	93.4	92.6	62.5	93.4	63.2	98.5	57.4	64.0	65.4	97.8	58.1	62.5	89.7	98.5	100.0	100.0	63.2	98.5	66.2	63.2	65.4	60.3	69.1	64.7	63.2	98.5	99.3	5	DO915164
6							63.2	75.0	64.0	63.2	80.9	63.2	65.4	63.2	64.7	76.5	71.3	63.2	65.4	64.7	61.0	62.5	63.2	63.2	100.0	62.5	69.1	73.5	68.4	64.0	65.4	70.6	69.1	62.5	63.2	6	EP203065
7								68.4	91.2	91.9	62.5	91.2	61.0	99.3	58.8	65.4	66.2	100.0	59.6	60.3	87.5	97.8	97.8	97.8	63.2	97.8	66.2	64.7	66.9	61.8	67.6	65.4	63.2	96.3	97.1	7	EP446615
8									64.7	63.2	75.0	66.2	65.4	68.4	60.3	77.2	77.2	68.4	61.0	64.7	66.9	67.6	66.9	66.9	75.0	67.6	64.0	75.7	63.2	65.4	66.2	76.5	68.4	66.2	66.9	8	EP420139
9										96.3	61.0	93.4	62.5	91.9	58.1	62.5	64.0	91.2	58.8	61.8	89.0	93.4	93.4	93.4	64.0	93.4	67.6	64.0	64.7	61.0	66.9	63.2	62.5	93.4	94.1	9	EP647223
10											61.8	91.2	61.0	92.6	60.3	63.2	64.0	91.9	61.0	61.8	87.5	92.6	92.6	92.6	63.2	92.6	66.2	61.8	64.7	61.0	68.4	63.2	64.7	92.6	93.4	10	EP938068
11												60.3	66.9	62.5	69.1	84.6	67.2	62.5	69.9	67.6	61.0	61.8	62.5	62.5	80.9	61.8	69.1	66.9	71.3	65.4	68.4	66.9	69.9	61.8	62.5	11	GG477367
12													61.0	91.9	58.8	64.7	66.2	91.2	59.6	60.3	89.7	93.4	93.4	93.4	63.2	93.4	65.4	63.2	62.5	58.8	67.6	65.4	64.7	93.4	94.1	12	JN874559
13														61.8	61.0	68.4	64.0	61.0	61.8	99.3	59.6	62.5	63.2	63.2	65.4	62.5	64.0	59.6	59.6	63.2	58.1	63.2	66.9	62.5	63.2	13	JQ065042.2
14															58.8	65.4	65.4	99.3	59.6	61.0	88.2	98.5	98.5	98.5	63.2	98.5	66.2	64.7	66.9	61.8	67.6	64.7	63.2	97.1	97.8	14	JX860640
15																65.4	58.8	58.8	99.3	61.8	55.9	58.1	57.4	57.4	64.7	58.1	67.6	67.6	71.3	80.9	70.6	58.1	77.2	56.6	57.4	15	JX869059
16																	71.3	65.4	66.2	67.6	62.5	64.7	64.0	64.0	76.5	64.7	68.4	69.9	68.4	69.1	64.0	70.6	70.6	63.2	64.0	16	KF530123
17																		59.6	63.2	64.0	65.4	65.4	65.4	71.3	65.4	59.6	71.3	62.5	61.0	67.6	99.3	69.9	65.4	66.2	17	KF793826	
18																			59.6	60.3	87.5	97.8	97.8	63.2	63.2	66.2	64.7	66.9	61.8	67.6	65.4	63.2	96.3	97.1	18	KF906249	
19																				62.5	56.6	58.8	58.1	58.1	65.4	58.8	68.4	68.4	70.6	81.6	71.3	58.8	77.9	57.4	58.1	19	KF917527
20																					58.8	61.8	62.5	62.5	64.7	61.8	64.7	58.8	58.8	62.5	58.8	62.5	67.6	61.8	62.5	20	KJ620016
21																						89.7	89.7	89.7	61.0	89.7	63.2	64.7	62.5	58.8	66.9	63.2	61.8	89.7	90.4	21	KM349742
22																							66.9	64.0	66.2	61.0	69.1	64.7	62.5	98.5	99.3	22	KY419113				
23																								100.0	63.2	98.5	66.2	63.2	65.4	60.3	69.1	64.7	63.2	98.5	99.3	23	LC494178
24																									63.2	98.5	66.2	63.2	65.4	60.3	69.1	64.7	63.2	98.5	99.3	24	MH043955
25																										62.5	69.1	73.5	68.4	64.0	65.4	70.6	69.1	62.5	63.2	25	MK651076
26																											66.9	64.0	66.2	61.0	69.1	64.7	62.5	98.5	99.3	26	MN514977
27																																				27	MN908947.3
28																																				28	NC_003436
29																																				29	NC_004718.3
30																																				30	NC_009020
31																																				31	NC_009021
32																																				32	NC_010646
33																																				33	NC_025217
34																																				34	ALP_117
35																																				35	ALP_S05

Los códigos de acceso del Genbank de las estirpes de color **rojo** son de nuestro estudio, en **morado** de diferentes especies de coronavirus reportados en camélidos en diversas partes del mundo, todos ellos junto a los de color **negro** son del género *Betacoronavirus*; de **celeste** del género *Alfacoronavirus*; de **verde** del género *Gammacoronavirus* y de **marrón** del género *Deltacoronavirus*.



## V. DISCUSIÓN

Los estudios de investigación publicados respecto a infecciones virales entéricas, que involucran a los CoVs, en camélidos sudamericanos del Perú, son pocos (López *et al.*, 2011; Luna, 2012; Lucas *et al.*, 2016; Rojas *et al.*, 2016); pese a que los CoVs son considerados como uno de los patógenos potenciales causantes de dichas infecciones (Cebra *et al.*, 2003). Los estudios referentes a las características moleculares de los CoVs que infectan a alpacas peruanas son aún más escasos, estos estudios mayormente se desarrollaron en centros de investigación con sistemas de producción semi-intensivos y con un adecuado manejo nutricional y sanitario (Luna, 2012; Luna *et al.*, 2015; Rocha *et al.*, 2018). Nuestro trabajo de investigación se orientó a el levantamiento de información de este virus en animales de comunidades rurales que comprenden el sector con mayor número de productores de esta especie y son responsables de más del 80 % de la población alpaquera, los cuales tienen sistemas de producción extensos que utilizan áreas pantanosas regadas por arroyos o ríos y a su vez con pobre capacitación en manejo de salud. (Ho, 2017). Los camélidos sudamericanos habitan a más de 3800 metros sobre el nivel del mar con condiciones climáticas extremas y escaso forraje para especies de animales que no son propias de la zona geográfica; sin embargo, es posible observar crianza mínima de ganado tradicional como los bovinos, ovinos, equinos y porcinos. Los factores climáticos, la escasez de alimento, el manejo inadecuado y la falta de programas sanitarios coloca a las alpacas y llamas neonatas como especies susceptibles a enfermedades infecciosas relacionados a agentes patógenos que también infectan a bovinos y ovinos; tales enfermedades, en

especial, las entéricas y neumónicas causan una alta morbilidad y mortalidad, lo que se traduce en pérdidas económicas para las comunidades rurales afectando directamente su sustento (Whitehead y Anderson 2006; Luna, 2012; Rosadio *et al.*, 2012; Rojas *et al.*, 2016).

Nuestro estudio demuestra y reafirma una amplia circulación de CoV en alpacas neonatas con una tasa de infección muy superior a la antes reportada en la sierra sur del país con 86.8% (59/68) de positividad, cabe especificar que las muestras provienen de 3 comunidades campesinas de la región de Canchis, departamento del Cusco (Cuadro 10). En investigaciones anteriores realizadas en zonas andinas del altiplano peruano han reportado la circulación de CoV con una frecuencia de 53.3% en comunidades rurales de Junín con sistema extensivo (Lucas *et al.*, 2016) y en centros de investigación con sistema semi-intensivo se detectó CoV en el 26.8 % en alpacas (IVITA-Maranganí, Cusco) (Rocha *et al.*, 2018); la variación de la frecuencia de CoV en estos estudios, probablemente se refleja en el tipo de muestreo (animales con o sin signos clínicos, edad de los animales), diferentes métodos de diagnóstico utilizados (ELISA, inmunocromatografía rápida y RT-PCR), el sistema de producción empleado y las condiciones sanitarias de cada lugar (Cebra *et al.*, 2003; Whitehead y Anderson 2006; Rojas *et al.* 2016).

Al analizar los resultados por comunidad (Cuadro 10), observamos que la alta frecuencia encontrada en cada comunidad es muy similar entre ellas, así tenemos que Quisini (91.3% [21/23], Silli (87.9% [29/33]), Pataccalasaya (75% [9/12]) evidencian que la infección por CoV está muy extendida en los rebaños de alpacas de la región de Canchis. Las muestras que trabajamos fueron de animales con y sin signos clínicos de diarrea y casi el 100 % de animales fueron positivos, esto se puede explicar por el tipo de muestreo que se realizó, ya que las comunidades fueron visitadas una única vez entre los meses de enero y febrero donde fueron muestreados a todos los animales de 1 a 5 semanas de edad de nacidos hasta la fecha de colecta sin importar que presenten o no cuadros clínicos de diarrea, lastimosamente los campesinos no tienen registro de los animales enfermos que se recuperaron (registros de morbilidad), solo llevan la contabilidad de la mortalidad, que nos ayudaría a entender el resultado. Pero si comparamos con la característica de los CoVs bovinos (BCoVs) observamos que en terneros se puede detectar ARN de virus en heces hasta el día 35 y en secreción nasal hasta el día 28 (Oma

*et al.*, 2016) esto puede explicar el porqué en animales aparentemente sanos podemos detectar el ARN del virus usando el anidado de panbetacoronavirus, esto resalta la importancia de los animales asintomáticos como reservorios de la enfermedad, lo que ayuda a la diseminación del virus.

Estudios que tuvieron como objetivo identificar que géneros, subgéneros y/o especies de CoV que infectan a las alpacas peruanas, han reportado hasta el momento solo el género  $\beta$ CoV, subgénero *Embecovirus*, especie Coronavirus Bovino-like (BCoV-like) (Luna *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2018). Debemos tener en consideración que en EE.UU. fueron secuenciados los genomas de un  $\beta$ CoV (*Embecovirus*, BCoV-like) y un  $\alpha$ CoV (*Duvinacovirus*, HCoV-229E-like) de 2 alpacas criadas en dicho país (Jin *et al.*, 2007; Crossley *et al.*, 2012).

Los estudios de caracterización parcial de los CoVs en alpacas, lo inicia Luna en el (2012) identificando secuencias de CoV del subgénero *Embecovirus* (antiguamente denominado  $\beta$ CoV linaje A, dentro del cual estaban los *Betacoronavirus* tipo 1) en el 100% de muestras de heces diarreicas de alpacas positivas a CoV (66.7%; 10/15) del centro experimental, La Raya, Puno. Años después Luna y colaboradores (2015) secuenció nuevamente el subgénero *Embecovirus* (*Betacoronavirus* tipo 1) en el 100% de muestras fecales de crías de alpacas positivas a CoV (18.3% [11/60]) de seis fincas del departamento de Puno. En nuestro estudio el porcentaje de positividad de CoV fue mayor con un 86.8% (59/68); confirmando la presencia del género  $\beta$ CoV en el 93.2% (55/59) de las muestras; e identificando el subgénero *Embecovirus* solo en el 27.3% (15/55) de los animales (Cuadro 11). Observamos que la comunidad de Silli presentaba la mayor infección por *Embecovirus* con un 34.5% (10/29), seguida de Quisini con 19% (4/21) y por último Patacallasaya con 11.1% (1/9) (Cuadro 11), esto puede deberse a la distribución geográfica de estas comunidades ya que Silli, Quisini y Patacallasaya se encuentran a 3800, 4300 y 4700 msnm, respectivamente (Cuadro 10), lo que hace que en Silli y Quisini pueda observarse más ganado bovino y ovino que en Patacallasaya donde no se observó la presencia de bovinos, pero si de pocos ovinos; dándose una relación inversamente proporcional, a menos altitud mayor presencia de ganadería mixta lo que puede explicar la mayor frecuencia de *Embecovirus* en comunidades de menor altitud a comparación de Patacallasaya.

Al realizar el análisis filogenético de nuestras secuencias positivas al subgénero *Embecovirus*, observamos que hay relación filogenética muy alta entre ellas independientemente de la comunidad de donde se aisló, al compararlo con otras secuencias de diferentes especies de CoV pertenecientes a los 4 géneros ( $\alpha$ CoV,  $\beta$ CoV,  $\gamma$ CoV y  $\delta$ CoV) confirmamos que son  $\beta$ CoV del subgénero *Embecovirus*. La distancia filogenética calculada al compararla con otras especies de CoV dentro de esse subgénero presenta un rango de 99.3% a 80.9% de identidad de nucleótidos (Figura 14, Cuadro 12). Debemos resaltar que el valor de corte (cut-off) para ser considerado dentro de un subgénero de  $\beta$ CoV es 70% de identidad de nucleótidos (Cuadro 12). Las especies de CoV más cercanas a nuestras cepas al evaluar la secuencia parcial del gen NSP12 (RdRp, región parcial ORF1b) fueron CoVs bovinos (BCoV) (número de acceso del Genbank: MH043955, LC44178 y AF391541) con 99.3% a 98.5% de identidad de nucleótidos, sugiriendo que los *Embecovirus* que circulan en alpacas posiblemente provienen de hospederos bovinos que infectaron a alpacas en los andes peruanos. Los mismos resultados fueron encontrados por Luna *et al.*, (2015) y Rocha *et al.*, (2018).

Sin embargo, lo que más llama la atención en nuestro trabajo es que de las 59 muestras positivas a CoV, el 93.2% (55/59) son del género  $\beta$ CoV pero a diferencia de los estudios realizados por Luna y colaboradores en los años 2012 y 2015, así como de Rocha en el 2018; donde encontraron que el 100% de los CoVs identificados fueron del subgénero *Embecovirus*, nosotros obtuvimos que solo el 25.4% (15/59) fueron confirmados como  $\beta$ CoV subgénero *Embecovirus*, mientras que el 67.8% (40/59) no conseguimos identificar el subgénero de  $\beta$ CoV presente y 6.8% (4/59) de nuestras muestras no se pudo identificar el género de CoV circulante. Confirmando que el subgénero predominante dejó de ser *Embecovirus*, así dejamos en evidencia que en estos animales circula una gran diversidad genética de diferentes géneros y subgéneros de CoV, sugiriendo que esto se debe a la coinfección de diferentes estirpes de CoV infectando a alpacas neonatas en estas comunidades campesinas. Como dato adicional, debemos tener en cuenta que en la actualidad tenemos 5 subgéneros conocidos de  $\beta$ CoV como son *Embecovirus*, *Merbecovirus*, *Sarbecovirus*, *Hibecovirus* y *Nobecovirus* (Figura 14) (ICTV, 2022) lo que indicaría que para estudios posteriores deberemos usar oligonucleótidos específicos para cada subgénero viral para poder identificar el subgénero y después la especie de CoV.

No conseguimos cromatografías de calidad por el alto ruido presente en las secuencias para poder identificar que otro género y subgénero están presentes en nuestras muestras, y esto se debe en gran medida a que utilizamos muestras de campo con coinfecciones con diferentes géneros y subgéneros de CoV y el uso de oligonucleótidos con más de 12 nucleótidos degenerados (Cuadro 7 y 9) para conseguir secuenciar dichas muestras (Moës *et al.*, 2005, Hu *et al.*, 2018). Estos oligos diseñados por Moës *et al.*, (2005) y Hu *et al.*, (2018), para la detección de los 4 géneros de CoV (pancoronavirus) son excelentes para el diagnóstico del virus en muestras de campo y en cultivo celular, pero para su uso para secuenciamiento es más exitoso cuando no hay coinfecciones con el mismo virus, siendo que su mayor éxito en el secuenciamiento por Sanger es en CoV aislado en cultivo celular. De la misma manera los oligos degenerados diseñados en este estudio para la identificación de todos los CoV del género  $\beta$ CoV (Cuadro 7), fue un éxito aumentado la frecuencia de positividad al usarlo como nested-PCR a la primera reacción del pancoronavirus, pero nuevamente su uso en el secuenciamiento fue limitado para las muestras sin coinfecciones, teniendo que ser ayudado para el éxito en el secuenciamiento de los oligos específicos para identificar al subgénero *Embecovirus* diseñados por Brandão *et al.*, (2004) (Cuadro 8).

Los estudios de CoVs se han intensificado para comprender mejor los mecanismos de evolución, transmisión y diseminación que derivan en los grandes saltos interespecies evidenciándose recombinaciones entre diferentes géneros y subgéneros de CoVs. Se han evidenciado en camellos la presencia de recombinaciones entre  $\beta$ CoV del mismo subgénero o entre los diferentes subgéneros de  $\beta$ CoV, reportando recombinaciones entre diferentes CoVs del subgénero *Embecovirus* y entre los subgéneros *Embecovirus* y *Merbecovirus* en camellos (Sabir *et al.*, 2016; So *et al.*, 2019). Las recombinaciones en camélidos más ressaltante hasta la fecha la describe So y colaboradores (2019) en el cual han caracterizado genomas completos de CoVs de dromedarios HKU23 (DcCoV-HKU23) de Nigeria, Marruecos y Etiopía e identificaron diferentes posiciones genómicas que indican eventos de recombinación entre otros  $\beta$ CoV del subgénero *Embecovirus* y *Merbecovirus*. La información que presentamos es solo el inicio de los estudios de epidemiología molecular de este virus en camélidos sudamericanos, que tiene como fin el poder identificar los géneros, subgéneros y especies de CoV que afectan a estas especies de animales así como el potencial zoonótico que tienen estas especies de CoV.

## VI. CONCLUSIONES

1. Existe una alta tasa de infecciones por CoV (86.8%) en alpacas neonatas provenientes de 3 comunidades campesinas (Silly, Quisini y Pataccalasaya), localizadas en la provincia de Canchis departamento del Cuzco.
2. Más de un género y subgénero de CoV circula en las alpacas en estudio, siendo el género viral predominante los  $\beta$ CoV con 93.2% (55/59) y dentro de este género viral se identificó el subgénero *Embecovirus* solo en el 25.4% (15/59) de muestras analizadas.

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Ampliar los estudios en epidemiología molecular de CoVs (identificaciones de especies) en alpacas criadas por comunidades campesinas, ya que los datos obtenidos nos ayudarán a desarrollar mejores programas sanitarios a nivel de salud animal, así como brindar una visión de prevención en salud pública debido al potencial zoonótico que representa este virus.
2. Se sugiere una amplia variabilidad genética de CoV circulando en alpacas criadas en este nicho ecológico particular.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Ali et al., 2017.** Systematic, active surveillance for Middle East respiratory syndrome coronavirus in camels in Egypt. *Emerging. Microbes and Infections*, 6:1, 1-7.
2. **Ameghino E, De Martini J. 1991.** Mortalidad de crías de alpacas. *Bol Div IVITA*. Lima. P 71-80.
3. **Amer HM. 2018.** Bovine-Like coronavirus in domestic and wild ruminants. *An. Heal. Res Rev.* 19, 113-124.
4. **Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR. 2012.** Mechanisms of Coronavirus Cell Entry Mediated by the Viral Spike Protein. *Viruses* 4, 1011-1033.
5. **Bentancor AB, Halperin P, Flores M, Iribarren F. 2009.** Antibody response to the épsilon toxin of clostridium perfringens following vaccination of Lama glama crías. *J Infect Dev Ctries.* 3:624-627.
6. **Bosch BJ, Van der Zee R, De Haan CAM, Rottier PJM. 2003.** The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: Structural and Functional characterization of the fusion core complex. *J Virol.* 77:8801-8811.
7. **Brandão PE. 2004.** Coronavírus bovino (BCoV): Ocorrência, diversidade molecular e padronização de PCR para diagnóstico a partir de amostras fecais de bezerros com e sem diarreia criados em municípios dos estados de São Paulo e Minas Gerais, Brasil. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, Sao Paulo SP, p. 90, 2004.



8. **Brian DA, Baric RS. 2005.** Coronavirus Genome Structure and Replication. CTMI 287:1-30.
9. **Burimuah et al., 2020.** Sero-prevalence, cross-species infection and serological determinants of prevalence of Bovine Coronavirus in Cattle, Sheep and Goats in Ghana. Vet. M. 0378-1135.
10. **Caswell JL, Williams KJ. 2016.** Respiratory System in Kennedy J, Palmer's. 2016. Pathology of Domestic Animals: Volumen 2. 6th edición. 465-591
11. **Cavanagh D. 2005.** Coronaviruses in poultry and other birds. Av Pat. 34:6, 439-448.
12. **Cebra CK, Mattson DE, Baker RJ, Sonn RJ, Dearing PL. 2003.** Potential pathogens in feces from unweaned llamas and alpacas with diarrhea. J Am Vet. Med Assoc 223(12):1806-1808.
13. **Chamings A, Nelson TM, Vibin J, Wille M, Klaassen M, Alexandersen S. 2018.** Deteccion and characterisation of coronavirus in migratory and non-migratory Australian wild birds. Scientific Reports. 8:5980.
14. **Chan-Yeung M, Xu RH. 2003.** SARS: Epidemiology. Respiriology.8(s1). S9-S14.
15. **Chen et al., 2018.** Metagenomic análisis of the RNA fraction of the fecla birome indicates high diversity in pigs infected by porcine endemic diarrhea virus in the United States. J. Virol. 15:95.
16. **Chung JE, Kim HR, Bae YC, Lee OS, Oem JK. 2011.** Detection and characterization of bovine-like coronaviruses from four species of zoo ruminants. Vet. Mic. 148:396-401.
17. **Couceiro JN, Mendes GS, Silva RC. 2015.** Viroses respiratórias. Virologia Humana, 3ra ed. P.302-349.
18. **Crosley BM, Mock RE, Callison SA, Hietala SK. 2012.** Identification and characterization of a novel alpaca respiratory coronavirus most closely related to the human coronavirus 229E. Viruses, 4(12):3689-3700.
19. **Cui J, Li F, Li Shi Z. 2019.** Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Nature reviews. Nature Riviews. Vol 17.
20. **De León J, Pareja A, Aguilar P, Enriquez Y, Quiroz C, Valencia E. 2020.** SARS-CoV-2 y sistema inmune: una batalla de titanes. Horiz. Med. 20(2):e1209.
21. **De Wilde AH, Snijder EJ, Kikkert M, van Hemert MJ. 2017.** Host Factors in Coronaviruses Replication. Current Topics in Microb and Immunol. 419:1-42.

22. **De Wit E, Van Doremalen N, Falzarano D, Mounster VJ. 2016.** SARS and MERS: Recent insights into emerging coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*. 14(8), 523-534.
23. **Domanska-Blicharz K, Jacukowicz A, Lisowska A, Krzysztof W, Minta Z. 2014.** Detection and molecular characterization of infectious bronchitis-like viruses in wild bird populations, *Avian Pathology*. 43:5, 406-413.
24. **Drosten et al., 2003.** Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N. Engl. Med.* 348:1967-76.
25. **Dwan LW, Thompson H, Taylor DJ, Philbey AW. 2008.** Laryngeal abscessation due to Mannheimia haemolytica in an alpaca (*Vicugna pacos*) cria. *Vet Rec.* 163:124-125.
26. **Farag et al., 2015.** High proportion of MERS-CoV shedding dromedaries at slaughterhouse with a potential epidemiological link to human cases, Qatar 2014. *Infection Ecology and Epidemiology*, 5:28305.
27. **Fenner's 2017.** Coronaviridae. *Veterinary Virology*. doi:10.1016.
28. **Fung TS, Liu DX. 2019.** Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction. *Annu. Rev. Microbiol.* 73, 529-557.
29. **Genova SG, Streeter RN, Simpson KM, Kapil S. 2008.** Detection of an antigenic group 2 coronavirus in an adult alpaca with enteritis. *Clin. Vaccine. Immunol.* 15(10): 1629-1632.
30. **Guan al., 2003.** Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in Southern China. *Science*, 302(5643).276-278.
31. **Harrath R, Duhier FM. 2018.** Sero-prevalence of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) specific antibodies in dromedary camels in Tabuk. *J. Med. Virol.* 90(8): 1285-1289.
32. **Hartmann K. 2005.** Feline Infectious Peritonitis. *Vet Clin Small Anim.* 35: 39-79.
33. **Hilgenfeld R, Peiris M. 2013.** From SARS to MERS: 10 years of research on highly pathogenic human coronaviruses. *Ant. Res.* 100: 286-295.
34. **Ho R. 2017.** Agricultura familiar y desarrollo alpaquero en el sur del Perú: Auditoria técnica de experiencias de Soluciones Prácticas. *Soluciones Prácticas 2017*. [Internet], [20 octubre 2020]. Disponible en: <https://answers.practicalaction.org/our-resources/download/60695>.

35. **Hofmann et al., 2006.** Highly conserved regions within the spike proteins of human coronaviruses 229E and NL63 determine recognition of their respective cellular receptors. *J Virol.* 80(17):8639-8652.
36. **Holmes 1999.** Coronaviruses (Coronaviridae). Academic Press. P 298.
37. **Hsu TH et al., 2018.** Deteccion, sequence analysis, and antibody prevalence of porcine deltacoronavirus in Taiwan. *Archives of Virology*, 163(11).3113-3117.
38. **Hu H, Jung K, Wang Q, Saif L, Vlasova A. 2018.** Development of a one-step RT-PCR assay for detection of pancoronaviruses ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -coronaviruses) using newly designed degenerate primers for porcine and avian fecal samples. *J virol meth.* 0166-0934.
39. **Hulswit RJG, de Hann CAM, Bosch BJ. 2016.** Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes. *Adv. in Virus Res.* Vol 96.
40. **Hung AL, Alvarado A, Lopez T, Perales R, Li O, Garcia E. 1991.** Detection of antibodies to micoplasmas in South American Camelids. *Res. Vet. Sci.* 51:250-253.
41. **[ICTV] International Committee on Taxonomy of Viruses. 2019.** [Internet], [18 agosto 2019]. Disponible en: <https://ictv.global/taxonomy>
42. **[ICTV] International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus taxonomy 2021.** [Internet], [20 diciembre 2021]. Disponible en: <https://ictv.global/taxonomy>
43. **[INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2007.** Censos Nacionales 2007. [Internet], [25 noviembre 2021]. Disponible: <http://censos.inei.gob.pe/Censos2007/IndDem#>
44. **Jin et al., 2007.** Analysis of the genome sequence of an alpaca coronavirus. *Virology* 365:198-203.
45. **Khbou MK, Jedidi MD, Zaafouri FB. 2020.** Coronaviruses in farm animals: Epidemiology and public health implications. *Vet Med Sci.* 00:1-26.
46. **Kimura M. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution* 16:111-120.
47. **Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018.** MEGA X: Molecular evolutionary genetics análisis across computing platforms. *Molecular biology and evolution* 35:1547-1549.

48. **Laude H, Van Reeth K, Pensaert. 1993.** Porcine respiratory coronavirus: molecular features and virus-host interactions. *Vet. Res.* 24 pp.125-150.
49. **Li F, 2016.** Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike. *Annu. Rev. Virol.* 3(1):237-261.
50. **López W, Chamorro M, Garmendia AE. 2011.** Detección rápida de Rotavirus y Coronavirus en crías de alpaca (*Vicugna pacos*) con diarrea en la región del Cuzco, Perú. *Rev. Inv. Vet.* 22(4):407-411.
51. **Lucas et al., 2016.** Patógenos Involucrados en Casos Fatales de Diarrea en Crías de Alpacas de la Sierra Central del Perú. *Rev. Investig. Vet. Perú.* 27, 169-175.
52. **Luna LR. 2012.** Caracterización molecular de Coronavirus (CoV) detectados en crías de alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis de Maestro en Ciencias Veterinarias. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. p.58.
53. **Luna et al., 2015.** Betacoronavirus 1 in alpacas (*Vicugna pacos*) in the high peruvian andes. *Small Rumin. Res.* 133:7-9.
54. **Maier HJ, Bickerton E, Britton P. 2015.** Coronaviruses. *Methods and Protocols.* Humana Press.285 p.
55. **Marthaler D, Jiang Y, Collins J, Rossow K. 2014.** Complete genoma sequence of strain SDCV/USA/Illinois121/2014, a porcine deltacoronavirus from the United States. *Genome Announc.* 2(2):e00218-14.
56. **Martín C, Pinto CE, Cid MD. 2010.** Camélidos sudamericanos: Estado sanitario de sus crías. *Rev. Complutense Cienc. Vet.* 4(1): 37-50.
57. **Masters P. 2006.** The molecular biology of Coronaviruses. *Adv Virus Res.* 66:193-292.
58. **Masters P, Perlman S. 2013.** Coronaviridae. *Fields Virology*, 6th ed., vol I. p. 825-858.
59. **[MIDAGRI] Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. 2022.** [Internet], [17 julio 2022]. Disponible en: <https://www.midagri.gob.pe/portal/495-dn-alpaca/11180-p-alpaca>
60. **Moës et al., 2005.** A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract Infections in Belgium. *BMC Infect. Dis.* 5:6.
61. **Natsuaki et al., 2007.** Fatal Winter dysentery with severe anemia in an adult cow. *Journal of Veterinary Medical Sciences* 69, 957-960.

62. **[OIE] Organización mundial de Sanidad Animal. 2020. World Animal Health Information System (WAHIS).** [Internet], [15 diciembre 2021]. Disponible en: [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home/indexcontent/newlang/en](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home/indexcontent/newlang/en)
63. **Oma VS, Traven M, Alenius S, Myrmet M, Stokstad M. 2016.** Bovine coronavirus in naturally and experimentally exposed calves, viral shedding and the potential for transmisión. *Virol J* 13:100.
64. **[ONUDI] Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial. 2006.** Producción de fibra de camélidos sudamericano en áreas altoandinas de Bolivia, Ecuador y Perú. [Internet], [25 noviembre 2022]. Disponible en: <https://repositorio.promperu.gob.pe/handle/123456789/1456>
65. **Pérez D. 2006.** Genotificación y subtificación de *Clostridium perfringens* aislados de crías de alpacas muertas por enterotoxemia. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 91 p.
66. **Reinhardt G, Zamora J, Tadich N, Polette M, Aguilar M, Riedemann S, Palisson J. 1995.** Diagnosis of coronavirus in sheep in Valdivia province, Xth Region. Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria* 27, 129-132.
67. **Reusken et al., 2013.** Middle East respiratory síndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study. *Lancet Infect Dis.* 13:859-66.
68. **Reusken et al., 2014.** Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) RNA and neutralising antibodies in milk collected according to local customs from dromedary camels. *Euro Surveill* 19(23):20829.
69. **Rivera H, Madewell BR, Ameghino E. 1987.** Serologic survey of viral antibodies in the Peruvian alpaca (*Lama pacos*). *Am J Vet Res.* 48:189-191.
70. **Rocha CB, Fornells LAAMG, Rojas M, Libetal M, Manchego A, Pezo D, Santos N. 2018.** Molecular Epidemiology of Coronavirus in Faces of Brazilian Calves and Peruvian Camelid Herds. *J. Infect. Dev.* 12: 37-42.
71. **Rojas M, Manchego A, Rocha C, Fornells L, Silva R, Gabriella S. 2016.** Outbreak of diarrhea among preweaning alpacas (*Vicugna pacos*) in the southern Peruvian highland. *J Infect Dev Ctries* 10(3): 269-274.
72. **Rosadio RH, Rivera H, Manchego A. 1993.** Prevalence of neutralising antibodies to bovine herpesvirus-1 in Peruvian livestock. *Vet Rec.* 132:611-612.

73. **Rosadio et al., 2010.** *Eimeria macusaniensis* associated lesions in neonate alpacas dying from enterotoxemia. *Vet Parasitol.* 168:116-120.
74. **Rosadio R, Cirilo E, Manchego A, Rivera H. 2011.** Respiratory syncytial and parainfluenza type 3 viruses coexisting with *Pasteurella multocida* and *Mannheimia hemolítica* in acute pneumonias of neonatal alpacas *Small Ruminant Res* doi:10.1016.
75. **Rosadio R, Maturrano L, Pérez D, Luna L. 2012.** El complejo entérico neonatal en alpacas andinas. *Rev Inv Vet Perú* 23 (3): 261-271.
76. **Saif LJ. 2010.** Bovine Respiratory Coronavirus. *Vet. Clin. Food Anim.* 26:349-364.
77. **Sawicki SG, Sawicki DL, Siddell SG. 2007.** A contemporary view of Coronavirus transcription. *J. Virol.* 81(1):20-29.
78. **Sharpe MS, Lord LK, Wittum TE, Anderson DE. 2009.** Pre-weaning morbidity and mortality of llamas and alpacas. *Aust Vet J.* 87:56-60.
79. **Shchelkanov M, Popova A, Dedkov V, Maleev V. 2020.** Historia del estudio y clasificación moderna de los coronavirus (*nidovirales: coronaviridae*). *Russian Journal of Infection and Immunity.* Vol. 10, nº 2, pp.221-246.
80. **Song et al., 2004.** Synthesis and characterization of a native, oligomeric form of recombinant severe acute respiratory síndrome coronavirus spike glycoprotein. *J. Virol.* 78:10328-10335.
81. **So RTY et al., 2019.** Diversity of Dromedary Camel Coronavirus HKU23 in African Camels Revealed Multiple Recombination Events among Closely Related Betacoronaviruses of the Subgenus Embecovirus. *J. of Virol.* Vol 93 e01236-19.
82. **Su et al., 2016.** Epidemiology, Genetic, Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology* Vol. 24 N°6.
83. **Uzal FA, Songer JG. 2008.** Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal Infections in sheep and goats. *J Vet Diagn Invest* 20:253-265.
84. **Wacharapluesadee et al., 2021.** Evidence for SARS-CoV2 related coronaviruses circulating in bats and pangolins in Southeast Asia. *Nat. Commun.* 12:972.

85. **Wang X, Wang L, Liu X. 2003.** The Quality and Processing Performance of alpaca Fibres. A report for the Rural Industries research and Development Corporation. RIRDC. 132 p.
86. **Whitehead CE, Anderson DE. 2006.** Neonatal diarrhea in llamas and alpacas. *Small Ruminant Res.* 61:207-215.
87. **Woo et al., 2009.** Comparative análisis of complete genoma sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. *J. Virol.* 83(2):908-17.
88. **Woo et al., 2012.** Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J. Virol.* 86(7):3995-4008.
89. **Yang et al., 2008.** Serosurveillance of viral diseases in Korean native goats (*Capra hircus*). *J. Vet. Med Sci.* 70,997-979.
90. **Yibei X. 2013.** Structural and Functional Studies on Coronavirus. Thesis of doctoral degree. Shaoyang: Univ. of Lübeck. 101 p.
91. **Zhang XM, Herbest W, Kousoulas KG, Storz J. 1994.** Biological and genetic characterization of a hemagglutinating coronavirus isolated from a diarrhoeic child. *J. Med. Virol.* 44:152-161.
92. **Zhou et al., 2018.** Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nat.* 556:255-258.

## IX. ANEXOS

LOCUS Seq1 136 bp mRNA linear VRL 28-JUN-2022

DEFINITION Alpaca coronavirus isolate S05.

ACCESSION Seq1

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE Alpaca coronavirus

ORGANISM Alpaca coronavirus

Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Pisuviricota; Pisoniviricetes; Nidovirales; Coronidovirineae; Coronaviridae; Orthocoronavirinae; Betacoronavirus; unclassified Betacoronavirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 136)

AUTHORS Castilla,D., Llanco,L., Navarro,D., Manchego,A., Lazaro,C., santos,N. and Rojas,M.

TITLE Detection and molecular characterization of the different genera of Coronavirus (CoV) that circulate in alpacas (Vicugna pacos) belonging to communities located in the province of Canchis - Department of Cuzco in Peru

JOURNAL unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 136)

AUTHORS Castilla,D., Llanco,L., Navarro,D., Manchego,A., Lazaro,C., santos,N. and Rojas,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-JUN-2022) Inmunologia y virologia veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Avenida circunvalacion cdra 28, San Borja, Lima, Lima 51, Peru

COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:mrojasmontes@gmail.com

Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:8



##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

```
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..136
                        /organism="Alpaca coronavirus"
                        /mol_type="mRNA"
                        /isolate="S05"
                        /isolation_source="stool"
                        /host="vicugna pacos"
                        /db_xref="taxon:1770168"
                        /country="Peru"
                        /altitude="3918 m."
                        /collection_date="03-Feb-2015"
     gene              <1..>136
                        /gene="ORF1ab"
     CDS                <5..136
                        /gene="ORF1ab"
                        /codon_start=1
                        /product="ORF1ab protein"
                        /translation="MTGRMFHQKCLKSIAATRGPVVIGTT
                        KFYGGWDDMLRRLIKDV
                        "
```

```
BASE COUNT          37 a   22 c   32 g   45 t
```

ORIGIN

```
1 tactatgact ggcagaatgt tcatcaaaa gtgtttgaaa agtatagcag ctacacgtgg
61 tgttcctggt gttataggca ccactaaatt ttatggcggc tgggatgata tgttacgccg
121 ccttattaa gatggt
```

//

```
LOCUS                Seq2                136 bp   mRNA   linear   VRL 28-JUN-2022
```

DEFINITION Alpaca coronavirus isolate H07.

ACCESSION Seq2

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE Alpaca coronavirus

ORGANISM Alpaca coronavirus

Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Pisuviricota; Pisoniviricetes; Nidovirales; Cornidovirineae; Coronaviridae; Orthocoronavirinae; Betacoronavirus; unclassified Betacoronavirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 136)

AUTHORS Castilla,D., Llanco,L., Navarro,D., Manchego,A., Lazaro,C., santos,N. and Rojas,M.

TITLE Detection and molecular characterization of the different genera of Coronavirus (CoV) that circulate in alpacas (Vicugna pacos) belonging to communities located in the province of Canchis - Department of Cuzco in Peru

JOURNAL unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 136)

AUTHORS Castilla,D., Llanco,L., Navarro,D., Manchego,A., Lazaro,C., santos,N. and Rojas,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-JUN-2022) Inmunologia y virologia veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Avenida circunvalación cdra 28, San Borja, Lima, Lima 51, Peru

COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:mrojasmontes@gmail.com

Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:8

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

```

FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..136
                     /organism="Alpaca coronavirus"
                     /mol_type="mRNA"
                     /isolate="H07"
                     /isolation_source="stool"
                     /host="vicugna pacos"
                     /db_xref="taxon:1770168"
                     /country="Peru"
                     /altitude="3918 m."
                     /collection_date="03-Feb-2015"
     gene             <1..>136
                     /gene="ORF1ab"
     CDS              <5..136
                     /gene="ORF1ab"
                     /codon_start=1
                     /product="ORF1ab protein"
                     /translation="MTGRMFHQKCLKSIAATRGPVIVIGTT
KFYGGWDDMLRRLIKDV
"
BASE COUNT          37 a   22 c   32 g   45 t
ORIGIN
      1 tactatgact ggcagaatgt ttcacaaaa gtgtttgaaa agtatagcag ctacacgtgg
     61 tgttcctggt gttataggca ccactaaatt ttatggcggc tgggatgata tgttacgccg
    121 ccttataaa gatggt
//
LOCUS                Seq3                136 bp   mRNA   linear   VRL 28-JUN-2022
DEFINITION           Alpaca coronavirus isolate H16.
ACCESSION            Seq3
VERSION

```

KEYWORDS .

SOURCE Alpaca coronavirus

ORGANISM Alpaca coronavirus

Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Pisuviricota; Pisoniviricetes; Nidovirales; Coronidovirineae; Coronaviridae; Orthocoronavirinae; Betacoronavirus; unclassified Betacoronavirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 136)

AUTHORS Castilla,D., Llanco,L., Navarro,D., Manchego,A., Lazaro,C., santos,N. and Rojas,M.

TITLE Detection and molecular characterization of the different genera of Coronavirus (CoV) that circulate in alpacas (Vicugna pacos) belonging to communities located in the province of Canchis - Department of Cuzco in Peru

JOURNAL unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 136)

AUTHORS Castilla,D., Llanco,L., Navarro,D., Manchego,A., Lazaro,C., santos,N. and Rojas,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-JUN-2022) Inmunologia y virologia veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Avenida circunvalación cdra 28, San Borja, Lima, Lima 51, Peru

COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:mrojasmontes@gmail.com

Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:8

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..136

/organism="Alpaca coronavirus"

```

/mol_type="mRNA"
/isolate="H16"
/isolation_source="stool"
/host="vicugna pacos"
/db_xref="taxon:1770168"
/country="Peru"
/altitude="3918 m."
/collection_date="03-Feb-2015"
gene      <1..>136
          /gene="ORF1ab"
CDS       <5..136
          /gene="ORF1ab"
          /codon_start=1
          /product="ORF1ab protein"
          /translation="MTGRMFHQKCLKSIAATRGPVVIGTT
          KFYGGWDDMLRRLIKDV
          "
BASE COUNT      37 a   22 c   32 g   45 t
ORIGIN
          1 tactatgact ggcagaatgt tcatcaaaa gtgttgaaa agtatagcag ctacacgtgg
          61 tgttctggtt gttataggca ccactaaatt ttatggcggc tgggatgata tgttacgccg
          121 ccttattaa gatggt
//
LOCUS          Seq4          136 bp  mRNA  linear  VRL 28-JUN-2022
DEFINITION    Alpaca coronavirus isolate H19.
ACCESSION    Seq4
VERSION
KEYWORDS      .
SOURCE        Alpaca coronavirus
ORGANISM      Alpaca coronavirus

```

Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Pisuviricota; Pisoniviricetes; Nidovirales; Cornidovirineae; Coronaviridae; Orthocoronavirinae; Betacoronavirus; unclassified Betacoronavirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 136)

AUTHORS Castilla,D., Llanco,L., Navarro,D., Manchego,A., Lazaro,C., santos,N. and Rojas,M.

TITLE Detection and molecular characterization of the different genera of Coronavirus (CoV) that circulate in alpacas (Vicugna pacos) belonging to communities located in the province of Canchis - Department of Cuzco in Peru

JOURNAL unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 136)

AUTHORS Castilla,D., Llanco,L., Navarro,D., Manchego,A., Lazaro,C., santos,N. and Rojas,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-JUN-2022) Inmunologia y virologia veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Avenida circunvalación cdra 28, San Borja, Lima, Lima 51, Peru

COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:mrojasmontes@gmail.com  
Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:8

##Assembly-Data-START##  
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing  
##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..136

/organism="Alpaca coronavirus"

/mol\_type="mRNA"

/isolate="H19"

/isolation\_source="stool"

```

/host="vicugna pacos"
/db_xref="taxon:1770168"
/country="Peru"
/altitude="3918 m."
/collection_date="03-Feb-2015"
gene      <1..>136
          /gene="ORF1ab"
CDS       <5..136
          /gene="ORF1ab"
          /codon_start=1
          /product="ORF1ab protein"
          translation="MTGRMFHQKCLKSIAATRGPVIVIGTT
          KFYGGWDDMLRRLIKDV
          "
BASE COUNT      37 a   22 c   32 g   45 t
ORIGIN
      1 tactatgact ggcagaatgt tcatcaaaa gtgtttgaaa agtatagcag ctacacgtgg
      61 tttcctgtt gttataggca ccactaaatt ttatggcggc tgggatgata ttttacgccg
      121 ccttattaa gatgtt
//
LOCUS      Seq5              136 bp  mRNA  linear  VRL 28-JUN-2022
DEFINITION Alpaca coronavirus isolate H26.
ACCESSION  Seq5
VERSION
KEYWORDS   .
SOURCE     Alpaca coronavirus
ORGANISM   Alpaca coronavirus
           Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Pisuviricota; Pisoniviricetes;
           Nidovirales; Coronidovirineae; Coronaviridae; Orthocoronavirinae;
           Betacoronavirus; unclassified Betacoronavirus.

```

REFERENCE 1 (bases 1 to 136)

AUTHORS Castilla,D., Llanco,L., Navarro,D., Manchego,A., Lazaro,C., santos,N. and Rojas,M.

TITLE Detection and molecular characterization of the different genera of Coronavirus (CoV) that circulate in alpacas (Vicugna pacos) belonging to communities located in the province of Canchis - Department of Cuzco in Peru

JOURNAL unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 136)

AUTHORS Castilla,D., Llanco,L., Navarro,D., Manchego,A., Lazaro,C., santos,N. and Rojas,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-JUN-2022) Inmunologia y virologia veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Avenida circunvalación cdra 28, San Borja, Lima, Lima 51, Peru

COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:mrojasmontes@gmail.com  
Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:8

##Assembly-Data-START##  
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing  
##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..136  
/organism="Alpaca coronavirus"  
/mol\_type="mRNA"  
/isolate="H26"  
/isolation\_source="stool"  
/host="vicugna pacos"  
/db\_xref="taxon:1770168"  
/country="Peru"



```

                                /altitude="3918 m."
                                /collection_date="03-Feb-2015"
gene      <1..>136
                                /gene="ORF1ab"
CDS       <5..136
                                /gene="ORF1ab"
                                /codon_start=1
                                /product="ORF1ab protein"
                                /translation="MTGRMFHQKCLKSIAATRGPVVIGTT
                                KFYGGWDDMLRRLIKDV
                                "
BASE COUNT      37 a   22 c   32 g   45 t
ORIGIN
          1 tactatgact ggcagaatgt tcatcaaaa gtgttgaaa agtatagcag ctacacgtgg
          61 tgttcctggt gttataggca ccactaaatt ttatggcggc tgggatgata tgttacgccg
          121 ccttattaa gatgtt
//
LOCUS       Seq6                136 bp   mRNA   linear   VRL 28-JUN-2022
DEFINITION  Alpaca coronavirus isolate 117.
ACCESSION  Seq6
VERSION
KEYWORDS
SOURCE      Alpaca coronavirus
  ORGANISM  Alpaca coronavirus
            Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Pisuviricota; Pisoniviricetes;
            Nidovirales; Cornidovirineae; Coronaviridae; Orthocoronavirinae;
            Betacoronavirus; unclassified Betacoronavirus.
REFERENCE  1 (bases 1 to 136)
AUTHORS     Castilla,D., Llanco,L., Navarro,D., Manchego,A., Lazaro,C.,
            santos,N. and Rojas,M.

```

TITLE Detection and molecular characterization of the different genera of Coronavirus (CoV) that circulate in alpacas (Vicugna pacos) belonging to communities located in the province of Canchis - Department of Cuzco in Peru

JOURNAL unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 136)

AUTHORS Castilla,D., Llanco,L., Navarro,D., Manchego,A., Lazaro,C., santos,N. and Rojas,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-JUN-2022) Inmunologia y virologia veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Avenida circunvalación cdra 28, San Borja, Lima, Lima 51, Peru

COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:mrojasmontes@gmail.com  
Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:8

##Assembly-Data-START##  
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing  
##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..136  
/organism="Alpaca coronavirus"  
/mol\_type="mRNA"  
/isolate="117"  
/isolation\_source="stool"  
/host="vicugna pacos"  
/db\_xref="taxon:1770168"  
/country="Peru"  
/altitude="4350 m."  
/collection\_date="01-Feb-2015"

gene <1..>136

```

                /gene="ORF1ab"
CDS             <5..136
                /gene="ORF1ab"
                /codon_start=1
                /product="ORF1ab protein"
                /translation="MTGRMFHQKCLKSVAATRGPVVIGT
                TKFYGGWDDMLRRLIKDV
                "
BASE COUNT     36 a   22 c   33 g   45 t
ORIGIN
                1 tactatgact ggcagaatgt tcatcaaaa gtgtttgaaa agtgtagcag ctacacgtgg
                61 tgttcctggt gttataggca ccactaaatt ttatggcggc tgggatgata tgttacgccg
                121 ccttattaa gatggt
//
LOCUS           Seq7             136 bp   mRNA   linear   VRL 28-JUN-2022
DEFINITION     Alpaca coronavirus isolate 132.
ACCESSION     Seq7
VERSION
KEYWORDS       .
SOURCE         Alpaca coronavirus
ORGANISM       Alpaca coronavirus
                Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Pisuviricota; Pisoniviricetes;
                Nidovirales; Cornidovirineae; Coronaviridae; Orthocoronavirinae;
                Betacoronavirus; unclassified Betacoronavirus.
REFERENCE     1 (bases 1 to 136)
AUTHORS       Castilla,D., Llanco,L., Navarro,D., Manchego,A., Lazaro,C.,
                santos,N. and Rojas,M.
TITLE         Detection and molecular characterization of the different genera
                of Coronavirus (CoV) that circulate in alpacas (Vicugna pacos)
                belonging to communities located in the province of Canchis -

```

Department of Cuzco in Peru

JOURNAL unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 136)

AUTHORS Castilla,D., Llanco,L., Navarro,D., Manchego,A., Lazaro,C.,  
santos,N. and Rojas,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-JUN-2022) Inmunologia y virologia veterinaria,  
Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Avenida  
circunvalación cdra 28, San Borja, Lima, Lima 51, Peru

COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:mrojasmontes@gmail.com  
Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:8

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..136

/organism="Alpaca coronavirus"

/mol\_type="mRNA"

/isolate="132"

/isolation\_source="stool"

/host="vicugna pacos"

/db\_xref="taxon:1770168"

/country="Peru"

/altitude="4350 m."

/collection\_date="01-Feb-2015"

gene <1..>136

/gene="ORF1ab"

CDS <5..136

/gene="ORF1ab"

```

/codon_start=1
/product="ORF1ab protein"
/translation="MTGRMFHQKCLKSIAATRGPVVIGTT
KFYGGWDDMLRRLIKDV
"
BASE COUNT      37 a   22 c   32 g   45 t
ORIGIN
      1 tactatgact ggcagaatgt tcatcaaaa gtgttgaaa agtatagcag ctacacgtgg
     61 tgttcctggt gttataggca ccactaaatt ttatggcggc tgggatgata tgttacgccg
    121 ccttattaa gatggt
//
LOCUS           Seq8             136 bp   mRNA   linear   VRL 28-JUN-2022
DEFINITION     Alpaca coronavirus isolate 218.
ACCESSION     Seq8
VERSION
KEYWORDS       .
SOURCE        Alpaca coronavirus
ORGANISM      Alpaca coronavirus
               Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Pisuviricota; Pisoniviricetes;
               Nidovirales; Cornidovirineae; Coronaviridae; Orthocoronavirinae;
               Betacoronavirus; unclassified Betacoronavirus.
REFERENCE     1 (bases 1 to 136)
AUTHORS       Castilla,D., Llanco,L., Navarro,D., Manchego,A., Lazaro,C.,
               santos,N. and Rojas,M.
TITLE         Detection and molecular characterization of the different genera
               of Coronavirus (CoV) that circulate in alpacas (Vicugna pacos)
               belonging to communities located in the province of Canchis -
               Department of Cuzco in Peru
JOURNAL       unpublished
REFERENCE     2 (bases 1 to 136)

```

AUTHORS Castilla,D., Llanco,L., Navarro,D., Manchego,A., Lazaro,C., santos,N. and Rojas,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-JUN-2022) Inmunologia y virologia veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Avenida circunvalacion cdra 28, San Borja, Lima, Lima 51, Peru

COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:mrojasmontes@gmail.com  
Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:8

##Assembly-Data-START##  
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing  
##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..136  
/organism="Alpaca coronavirus"  
/mol\_type="mRNA"  
/isolate="218"  
/isolation\_source="stool"  
/host="vicugna pacos"  
/db\_xref="taxon:1770168"  
/country="Peru"  
/altitude="4350 m."  
/collection\_date="01-Feb-2015"

gene <1..>136  
/gene="ORF1ab"

CDS <5..136  
/gene="ORF1ab"  
/codon\_start=1  
/product="ORF1ab protein"

/translation="MTGRMFHQKCLKSIAATRGPVIVIGTT  
KFYGGWDDMLRRLIKDV

"

BASE COUNT        37 a   22 c   32 g   45 t

ORIGIN

1 tactatgact ggcagaatgt tcatcaaaa gtgttgaaa agtatagcag ctacacgtgg  
61 tgttcctggt gttataggca ccactaaatt ttatggcggc tgggatgata tgttacgccg  
121 ccttattaa gatgtt

//