



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Diversidad genética de las diferentes especies de
coronavirus en alpacas (*Vicugna pacos*) y llamas
(*Lama glama*) de comunidades campesinas en el
departamento de Cusco**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología

AUTOR

Luis Antonio LLANCO ALBORNOZ

ASESOR

Dr. Miguel Ángel ROJAS MONTES

Lima, Perú

2024



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

Llanco L. Diversidad genética de las diferentes especies de coronavirus en alpacas (Vicugna pacos) y llamas (Lama glama) de comunidades campesinas en el departamento de Cusco [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2024.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Luis Antonio Llanco Albornoz.
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10691349
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-2175-9406
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Miguel Angel Rojas Montes.
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	42290575
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-5029-3874
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Víctor Crispín Pérez.
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07363013
Miembro del jurado 1	

Nombres y apellidos	Miguel Angel Rojas Montes.
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	42290575
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Roberto Jhalver Vega Paulino.
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40556214

Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Luz Rocío Alguiar Bernaola.
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09578116
Datos de investigación	
Línea de investigación	1. Básica, producción y sanidad de camélidos sudamericanos
Grupo de investigación	Virología e Inmunología Veterinaria (GIVIVET).
Agencia de financiamiento	Programa Nacional de Investigación y Estudios Avanzados (PROCIENCIA) - CONCYTEC en el marco de la convocatoria de Proyecto Investigación Básica 2019-01, con número de contrato 355-2019-

	FONDECYT.
Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú. Departamento: Lima. Provincia: Lima. Distrito: San Borja. Calle: Av. Circunvalación 28. Latitud: 12° 4' 54" Longitud: 76° 59' 16"
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2024
URL de disciplinas OCDE	Biología celular, Microbiología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA

Siendo las **10:00 hrs. del 25 de junio de 2024** se reunieron en la Sala de Sesiones del Decanato de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado de tesis, presidido por el Dr. Víctor Crispín Pérez e integrado por los siguientes miembros: Dr. Miguel Ángel Rojas Montes (asesor), el Dr. Roberto Jhalver Vega Paulino y la Mg. Luz Rocio Alguiar Bernaola; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE CORONAVIRUS EN ALPACAS (VICUGNA PACOS) Y LLAMAS (LAMA GLAMA) DE COMUNIDADES CAMPESINAS EN EL DEPARTAMENTO DE CUSCO"**, presentado por el Bachiller en Medicina Veterinaria **Luis Antonio Llanco Albornoz**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Microbiología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado de la tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

Dieciocho (18) - muy Bueno

Luego el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Medicina Veterinaria **Luis Antonio Llanco Albornoz**, el Grado Académico de **Magíster en Microbiología**.

Siendo las 11:10 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 11:20 hrs. del 25 de junio de 2024

[Firma]
Dr. Víctor Crispín Pérez (P. P. D.E)
Presidente

[Firma]
Dr. Miguel Ángel Rojas Montes (P. Asoc. T.C.)
Miembro - Asesor

[Firma]
Dr. Roberto Jhalver Vega Paulino (P. Asoc. T.C.)
Miembro

[Firma]
Mg. Luz Rocio Alguiar Bernaola (P. Aux. T.C.)
Miembro

Observaciones:

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Dr. Miguel Angel Rojas Montes, en mi condición de asesor acreditado con el Dictamen N°00039-FFB-UPG-2021 de la tesis, cuyo título es: **DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE CORONAVIRUS EN ALPACAS (VICUGNA PACOS) Y LLAMAS (LAMA GLAMA) DE COMUNIDADES CAMPESINAS EN EL DEPARTAMENTO DE CUSCO**, presentado por el Bach. **Luis Antonio Llanco Albornoz** para optar el Grado Académico Magíster Microbiología CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Tesis, 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 **12%** 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 grado correspondiente.

Firma del Asesor



DNI: 42290575

Dr. Miguel Angel Rojas Montes

**UNMSM**Firmado digitalmente por ROJAS MONTES Miguel Angel FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 16.01.2024 15:18:58 -05:00

DEDICATORIA

A Denise, mi amada esposa, amiga, compañera y mamá de lo mejor que me ha pasado en la vida. Neguinha, “donde estés tú se acaba el camino, eres el principio y fin de todas las cosas”

A Luisita, mi gato felino, “dibujante de unicornios y arcoíris, bailarina, cantante y golera estrella, prueba irrefutable de lo infinito que es el amor, por ser el motivo que mi pecho se hinche de orgullo al sentir que algo hice bien”, por hacerme un mejor hombre. Todo mi amor y esfuerzos son para ti.

A mis padres, Angelito y Carmen, su ejemplo y amor guía todos mis pasos.

A mis hermanos y sobrinos, por su amor, apoyo y los momentos que compartimos. La familia, ustedes, es el lugar al que siempre volvemos porque sólo ahí somos felices.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr Miguel Rojas Montes, mi asesor y amigo. Gracias por la confianza depositada, consejos, asesoría y por tu amistad.

A los integrantes del laboratorio de Inmunología de la FMV-UNMSM. Gracias por el apoyo y facilidades prestadas.

Al Programa Nacional de Investigación y Estudios Avanzados (PROCIENCIA) - CONCYTEC en el marco de la convocatoria de Proyecto Investigación Básica 2019-01, con número de contrato 355-2019-FONDECYT, por la subvención del trabajo de tesis. Su invaluable apoyo financiero permitió hizo posible este estudio y el avance de la ciencia en nuestro país.

Contenido

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
LISTA DE CUADROS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I INTRODUCCIÓN	1
II REVISIÓN DE BIBLIOGRAFIA	3
2.1 Situación de los camélidos sudamericanos en el Perú	3
2.2 Principales enfermedades infecciosas en crías de alpacas	4
2.2.1 Complejo entérico neonatal.....	5
2.2.2 Procesos respiratorios agudos	5
2.3 Coronavirus	6
2.3.1 Aspectos históricos	6
2.3.2 Propiedades generales de los coronavirus	7
2.3.2.1 Morfología y estructura	7
2.3.2.2 Estructura y organización genómica	11
2.3.2.3 Ciclo de replicación	13
2.3.2.4 Taxonomía y clasificación.....	17
2.3.2.5 Epidemiología de la infección por Coronavirus	19
III MATERIALES Y METODOS	31
3.1 Lugar y tiempo de estudio	31
3.2 Muestras biológicas	31
3.3 Metodología.....	32
3.3.1 Procesamiento de las muestras	32
3.3.2 Controles positivos.....	33
3.3.3 Diseño de oligonucleótidos (primers/iniciadores)	33
3.3.4 Extracción de ARN viral	34
3.3.5 Producción de ADN complementario (ADNc) viral	34
3.3.6 Detección de coronavirus	35
3.3.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) – reacción de panRT-PCR	36
3.3.8 Reacción de PCR anidado para la detección de <i>Betacoronavirus</i> 1	36
3.3.9 Reacción RT-PCR para la identificación del subgénero <i>Embecovirus</i> (<i>Betacoronavirus</i> tipo 1)	37

3.3.10 Electroforesis en gel de Agarosa	37
3.3.11 Identificación del género de coronavirus de las muestras negativas a <i>Betacoronavirus 1</i>	37
3.3.12 Identificación de las especies de coronavirus por secuenciamiento del gen S	38
3.3.13 Amplificación del gen S	38
3.3.14 Secuenciamiento de los productos amplificados.....	39
3.3.15 Organización y análisis estadístico de los datos	39
3.3.16 Análisis de secuencias de nucleótidos	39
3.3.17 Procesamiento de la información o de datos	40
IV RESULTADOS.....	41
4.1 Detección de Coronavirus	41
4.2 Identificación del género y subgénero de CoV	42
4.3 Secuenciamiento y análisis filogenético de las muestras positivas a <i>Embecovirus</i>	45
4.4 Identificación de especies de coronavirus por secuenciamiento del gen S.....	47
V DISCUSIÓN	52
VI CONCLUSIONES.....	60
VII RECOMENDACIONES.....	61
VIII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	62

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Características de las muestras incluidas en este estudio.....	32
Cuadro 2. Iniciadores utilizados en las reacciones de RT- PCR y PCR anidado para la detección de CoV, β CoV y <i>Embecovirus</i>	35
Cuadro 3. Iniciadores específicos para la amplificación y secuenciamiento de la región hipervariable de la subunidad S1 del gen S.....	39
Cuadro 4. Distribución de la infección por coronavirus entre las alpacas y llamas de comunidades de la provincia de Canchis de Cuzco.....	42
Cuadro 5. Identificación del género y subgénero de CoV en muestras de heces y lavado pulmonar de alpacas y llamas de tres comunidades campesinas de la provincia de Canchis, departamento de Cuzco.....	45
Cuadro 6. 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.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de virión de <i>Embecovirus</i>	8
Figura 2. Organización genómica de los Coronavirus.....	13
Figura 3. Organización taxonómica actual del orden Nidovirales y de la familia Coronaviridae.....	18
Figura 4. Interacción entre la ACE2 y la proteína Spike del SARS-CoV-2.....	19
Figura 5. Principales especies de coronavirus de interés veterinario.....	28
Figura 6. Transmisión inter-especies de coronavirus zoonóticos.....	30
Figura 7. Detección por RT-PCR de pancoronavirus (CoV, gen RdRp).....	41
Figura 8. Detección por nested-PCR de <i>Betacoronavirus</i>	43
Figura 9. Detección por nested-PCR de <i>Embecovirus</i>	44
Figura 10. Dendograma construido a partir de la secuencia parcial del gen ORF1 que codifica la RdRp de cepas de CoV detectadas en alpacas neonatas de comunidades rurales de Cusco positivas a <i>Embecovirus</i>	47
Figura 11. Detección por nested-PCR del gen S.....	48
Figura 12: Dendograma construido a partir de la secuencia parcial del dominio S1 del gen que codifica la proteína S (Spike) de cepas de CoV detectadas en alpacas de comunidades rurales de Cusco.....	50
Figura 13. Distribución geográfica del murciélago <i>Desmodus rotundus</i> y sitios de detección de CoV en muestras de alpacas neonatas y de murciélagos en Perú.....	51

RESUMEN

El género Coronavirus (CoV) incluye especies que afectan al hombre y animales. Estos virus causan enfermedades respiratorias y hacen parte del Complejo diarreico neonatal de los camélidos sudamericanos, causando elevada mortalidad. El objetivo del presente estudio fue detectar y caracterizar molecularmente las diferentes estirpes de coronavirus que circulan en crías de alpacas y llamas de 3 comunidades campesinas del Cusco, para poder develar datos epidemiológicos y la diversidad genética viral en este nicho ecológico. Se colectó en total 112 muestras, 80 de heces y 32 de lavado pulmonar, de las cuales 100 fueron de alpacas y 12 de llamas. Se extrajo el ARN viral y luego, mediante RT-PCR y PCR anidada se amplificó una región conservada del gen ARN dependiente de la ARN polimerasa viral (RdRp), común a todos los géneros de CoV conocidos (PanCoV). Luego se identificó el género *Betacoronavirus*, subgénero *Embecovirus*, mediante RT-PCR anidada. Además, por RT-PCR, se amplificó el gen de la espícula (S) completa o parcial (región hipervariable, S1). Luego se secuenció los amplificados para determinar el género, subgénero y especie de coronavirus. 100 (89.3%) del total de muestras fueron CoV positivas, donde el 87.5% (70/80) y el 93.8 (30/32) fueron entéricas y respiratorias, respectivamente. Se detectó 98 mono infecciones y 2 coinfecciones (β - y α -CoV y β CoV y un CoV sin clasificar). El secuenciamiento del gen RdRp identificó 33 cepas del género β -CoV, subgénero *Embecovirus* y 2 α -CoV, subgénero Decacovirus. Además, 2 cepas mostraron estrecha relación con Megaderma BatCoV. El secuenciamiento del gen de la espícula (S) mostró un 98-100% de identidad con cepas de origen bovino (BCoV-Like). Se reporta una alta frecuencia de CoV, así como una alta diversidad genética de géneros y subgéneros infectantes en los que predominó el género β -CoV subgénero desconocido y en menor medida el subgénero *Embecovirus* especie BCoV-Like. Nuestros datos también sugieren un nuevo papel para los murciélagos en la diseminación y transmisión de CoV poco comunes a las alpacas criadas en las zonas rurales de la Provincia de Canchis, departamento del Cuzco.

Palabras claves: Alpaca, coronavirus, *Betacoronavirus*, *Embecovirus*, *Alfacoronavirus*, BatCoV.

ABSTRACT

The genus Coronavirus (CoV) includes species that affect humans and animals. These viruses cause respiratory diseases and are part of the Neonatal Diarrheal Complex of South American camelids, causing high mortality. The objective of this study was to detect and molecularly characterize the different strains of coronaviruses that circulate in baby alpacas and llamas from 3 peasant communities in Cusco, in order to reveal epidemiological data and viral genetic diversity in this ecological niche. A total of 112 samples were collected, 80 from feces and 32 from lung lavage, of which 100 were from alpacas and 12 from llamas. Viral RNA was extracted and then, by RT-PCR and nested PCR, a conserved region of the viral RNA polymerase-dependent RNA gene (RdRp), common to all known CoV genera (PanCoV), was amplified. The genus *Betacoronavirus*, subgenus *Embecovirus*, was then identified by nested RT-PCR. In addition, by RT-PCR, the complete or partial spike (S) gene (hypervariable region, S1) was amplified. The amplified samples were then sequenced to determine the genus, subgenus and species of coronavirus. 100 (89.3%) of the total samples were CoV positive, where 87.5% (70/80) and 93.8 (30/32) were enteric and respiratory, respectively. A total of 98 mono-infections and 2 coinfections (β - and α -CoV and β CoV and an unclassified CoV) were detected. Sequencing of the RdRp gene identified 33 strains of the β -CoV genus, *Embecovirus* subgenus, and 2 α -CoV, Decacovirus subgenus. In addition, 2 strains showed a close relationship with Megaderma BatCoV. Sequencing of the spike (S) gene showed 98-100% identity with strains of bovine origin (BCoV-Like). A high frequency of CoV is reported, as well as a high genetic diversity of infecting genera and subgenres in which the genus β -CoV, unknown subgenre, predominated, and to a lesser extent the *Embecovirus* subgenus, BCoV-Like species. Our data also suggest a new role for bats in the dissemination and transmission of rare CoVs to alpacas reared in rural areas of Canchis Province, Cuzco Department.

Keywords: Alpaca, coronavirus, *Betacoronavirus*, *Embecovirus*, *Alphacoronavirus*, BatCoV.

I INTRODUCCIÓN

La alpaca (*Vicugna pacos*) es un animal adaptado a las condiciones desafiantes de nuestra serranía, como la baja concentración de oxígeno y temperatura extrema, pero que además aprovecha eficientemente los escasos y altamente lignificados pastos naturales (Quispe, 2011; Vilá, 2012). Por esto, su crianza es una actividad económica crucial para el poblador altoandino, permitiendo la producción de fibra, de alto valor económico en los mercados internacionales por su finura (Méndez, 2008). La mayoría de los criadores de alpacas son pequeños (poseen menos de 100 animales), realizan una crianza extensiva y debido a su situación económica desfavorable y falta de capacitación en aspectos sanitarios, sufren importantes pérdidas económicas en las etapas iniciales de la producción (CONACS, 2005; INEI, 2013; MINAG, 2021).

Las enfermedades de origen infeccioso afectan a las alpacas desde temprana edad, reduciendo la rentabilidad de esta industria (Ameghino y De Martini, 1991; FAO, 2005), pudiendo la mortalidad neonatal alcanzar hasta un 30% (MINAG, 2021), principalmente por enfermedades respiratorias y entéricas, en buena parte debido a la falla de la transferencia pasiva de anticuerpos calostrales (Pinn *et al.*, 2013; Weaver *et al.*, 2000).

Entre los principales patógenos involucrados en brotes mortales que afectan a las alpacas destacan *Streptococcus pneumoniae*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* (Carhuapoma *et al.*, 2023); coronavirus (CoV), orthoreovirus de mamíferos (MRV) y rotavirus A (RVA) (Castilla *et al.*, 2021); RVA y CoV (López *et al.*, 2011); CoV (Luna *et al.*, 2015) y RVA (Rojas *et al.* (2017). Todos estos patógenos pueden reducir severamente el tamaño de la manada, afectar los programas de mejoramiento genético y los parámetros zootécnicos, perjudicando a las industrias relacionadas con la fibra de alpaca (Fowler, 2010).

Los coronavirus (CoV) se destacan por infectar a una amplia gama de huéspedes, incluidos los humanos y los animales domésticos y silvestres, causando infecciones respiratorias o entéricas que suelen variar en su gravedad (Ahmer, 2018). Esta familia viral, con genoma de ARN monocatenario de sentido positivo, presenta una alta diversidad genética y se clasifica en cuatro géneros virales conocidos como *Alphacoronavirus* (α -CoV), *Betacoronavirus* (β -CoV), *Deltacoronavirus* (δ -CoV) y *Gammacoronavirus* (γ -CoV), que a su vez se dividen en subgéneros (que varían en su

potencial zoonótico) y especies que exhiben una predilección por saltar las barreras entre huéspedes debido a su diversidad genética inherentemente basada en una alta frecuencia de recombinación homóloga y a la acumulación de mutaciones puntuales, con potenciales efectos devastadores para la salud pública y la producción animal comercial (Cui *et al.*, 2019; ICTV, 2023).

Mientras en América del Sur los CoV afectando alpacas tienen como origen más probable el coronavirus tipo bovino (BCoV) y han sido clasificados como β -CoV, subgénero *Embecovirus* (Lopez *et al.*, 2011; Luna *et al.*, 2015; Rojas *et al.*, 2016; Rocha *et al.*, 2018), en América del Norte además de este género se ha detectado α -CoV (subgénero *Duvinacovirus*), más próximo a un CoV respiratorio humano (Cebra *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2007; Crossley *et al.*, 2012; Génova *et al.*, 2008). En nuestro país, el primer estudio sobre CoV en alpacas neonatas con diarrea reportó una frecuencia de 40% (Rojas *et al.*, 2016), mostrando la importancia de este patógeno.

Interesantemente, Bergner *et al.* (2018; 2020) identificaron una gran diversidad de especies de CoV, principalmente de los géneros α -CoV y β -CoV, además de otros coronavirus aún no clasificados, en murciélagos hematófagos capturados en ambientes próximos a las zonas de cría de alpacas en nuestro país. Las implicancias de estos hallazgos aún no han sido esclarecidas.

Por todo lo anterior, el objetivo del presente estudio fue identificar el género y subgénero de coronavirus (CoV) presentes en alpacas recién nacidas en Cuzco, la segunda región productora de alpacas en Perú en un intento por comprender mejor la epidemiología molecular de este virus.

II REVISIÓN DE BIBLIOGRAFIA

2.1 Situación de los camélidos sudamericanos en el Perú

Perú es el principal productor de camélidos sudamericanos contando más de 5 millones de cabezas entre las 4 especies: alpaca, llama, vicuña y guanaco. Los Andes son el hábitat natural de estos animales donde destaca la crianza de la alpaca, de la cual Perú posee un total de 3 685 516 cabezas, que representa más del 85% de la población mundial de este animal. Respecto a las llamas, la otra especie doméstica, Perú es el segundo productor, por detrás de Bolivia, con casi el 33% de la población mundial. En el sur de nuestro país se concentra la crianza de estos animales, principalmente en los departamentos de Puno, Cuzco y Arequipa (FAO, 2005; INEI, 2013; MIDAGRI, 2022). En el departamento de Cuzco, la provincia de Canchis, con una población de 167 979 animales, es el principal productor de alpacas(INEI, 2012).

Hace más de un siglo es reconocida legalmente la existencia y personería jurídica de las comunidades campesinas, anteriormente llamadas “comunidades de indígenas”, definidas como organizaciones de interés público, integradas por familias que habitan, controlan y están vinculadas ancestralmente a determinados territorios. Aproximadamente el 90 % de las comunidades campesinas en el Perú se ubican en la sierra (MIDAGRI, 2019).

Cuzco comprende el 16% del total de comunidades campesinas del Perú, siendo sólo superado por Puno, con casi el 24%. La provincia de Canchis incluye aproximadamente 106 comunidades campesinas distribuidas en sus 8 distritos las cuales albergan poco más de 2658 familias dedicadas a la crianza de alpacas y llamas (INEI, 2012; Ho, 2017).

Los productores alpaqueros se clasifican según el tamaño de la explotación, forma de organización, nivel tecnológico, productivo y manejo de sus hatos en pequeños productores (90% de los productores y 80% de la población de alpacas, con alrededor de 100 animales por productor, quienes no reciben asistencia técnica y donde el rebaño incluye a ovinos, vacas y llamas); productores medianos (que representan el 5%, poseen entre 100 y 250 alpacas y adoptan algunas prácticas de manejo como la rotación de potreros y separación de crías, invirtiendo un tiempo mayor a esta actividad; grandes

productores (representan no más del 5 % productores, llevan registros que utilizan en el mejoramiento genético y control sanitario, cuentan con una mayor disponibilidad y calidad de pastos naturales y cultivados que los otros productores y sus rebaños superan las 250 alpacas) (CONACS, 2005; Ho, 2017).

Aunque la carne, piel y cuero aportan a la subsistencia de buena parte de las comunidades campesinas, debido al uso comercial, turístico y artesanal (FAO, 2005), sin dudas, la fibra es el producto que genera mayores utilidades al productor alpaquero, debido a su alto valor internacional ya que es considerada como un producto de lujo debido a su finura (Wang *et al.*, 2003). En general, la textilería alpaquera representa casi el 1,5% del valor total de las exportaciones del país, donde los pequeños productores participan mayoritariamente en la producción de la fibra con el 85% del total (ONUDI, 2006). Lamentablemente, los criadores de alpacas están entre los que registran menores ingresos en nuestro país (FAO, 2005).

Por su parte, las llamas son utilizadas principalmente como fuente de carne y como acémilas y su número no es tan significativo como el de las alpacas debido a la preferencia del poblador andino por los bovinos y ovejas como fuente de lana y proteína (INEI, 2013; MIDAGRI, 2022).

Como la crianza de estos animales se da entre los 3800-5000 msnm, en muchos casos esta actividad es la principal o única fuente de proteína y trabajo para buena parte de la población rural que vive en esta región (Bustinza *et al.*, 1988).

2.2 Principales enfermedades infecciosas en crías de alpacas y llamas

La mortalidad neonatal en alpacas puede alcanzar el 30% (MIDAGRI, 2021) siendo las enfermedades infecciosas y parasitarias la principal causa de esta. Frecuentemente coexisten virus y bacterias en infecciones mixtas, originando brotes que reducen la producción, el progreso genético y el beneficio de esta actividad (FAO, 2005). El inadecuado manejo sanitario, higiene de los corrales, poca disponibilidad de vacunas y fallas en la transferencia pasiva de anticuerpos calostrales son factores que contribuyen significativamente a estos cuadros (Martín *et al.*, 2010; Moreno *et al.*, 2021; Pinn *et al.*, 2013; Weaver *et al.*, 2000).

2.2.1 Complejo entérico neonatal

Diversos autores han identificado, en procesos entéricos agudos, asociados a mortalidad en crías de alpacas, patógenos como coronavirus (CoV), mammalian orthoreovirus (MRV) y rotavirus A (RVA) (Castilla *et al.*, 2021); CoV y *Salmonella* spp (Cebra *et al.*, 2003); *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Giardia*, *Eimerias* y *Cryptosporidium* (Rosadio *et al.*, 2012; Rojas *et al.*, 2016); RVA y CoV (Lopez *et al.*, 2011); RVA (Rojas *et al.*, 2017); CoV (Luna *et al.*, 2015).

La diarrea neonatal se caracteriza por durar entre 3-8 días, no presentar fiebre, causar deshidratación, acidosis, pérdida de peso, postración y caquexia. También causa retardo en el crecimiento en los animales que se recuperan (Alva y Calderón, 1987; Whitehead *et al.*, 2006). De naturaleza etiológica multifactorial, Whitehead y Anderson (2006) reconocen a coronavirus, *E. coli*, *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. y coccidia los como principales agentes relacionados a la diarrea.

La enterotoxemia, causada por *Clostridium perfringens* tipo A y C (Pérez, 2006; Rosadio *et al.* (2008) es otra patología importante durante las primeras semanas de vida, debido a la ocurrencia de brotes de elevada mortalidad (Bentancor *et al.*, 2009; Rosadio *et al.*, 2008). Aunque *C. perfringens* hace parte de la microbiota residente de la alpaca, así como del hombre y otros animales (Uzal y Songer, 2008), bajo ciertas condiciones ambientales y nutricionales, aún no plenamente establecidas, el intestino sufre un proceso de disbiosis y proliferación de cepas patogénicas de esta bacteria, que al producir varias de sus potentes toxinas conduce a un cuadro toxémico que rápidamente se puede volver letal (Uzal y Songer, 2008). Recientes estudios atribuyen a *Eimeria macusaniensis* un papel en la patogénesis de esta enfermedad (Rosadio *et al.*, 2010).

2.2.2 Procesos respiratorios agudos

Los factores climáticos estresantes (humedad, nevadas y el cambio brusco de temperatura, por ejemplo), así como la época lluviosa, que coincide con la campaña de parición en el país juegan un papel importante en la aparición de neumonías agudas (Cirilo *et al.*, 2012), segunda causa de muerte de alpacas neonatas (Rosadio *et al.*, 2010).

Iniciales estudios serológicos en animales sufriendo de cuadros respiratorios mostraron la exposición a los virus Parainfluenza tipo 3, virus respiratorio sincitial y virus

Influenza tipo A (Rivera *et al.*, 1987; Rosadio *et al.*, 1993) sugiriendo un papel en estos procesos.

Posteriormente, *Streptococcus pneumoniae*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* (Carhuapoma *et al.*, 2023); virus Parainfluenza tipo 3 (PI-3), virus respiratorio sincitial bovino (BRSV), *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* (Cirilo *et al.*, 2012; Rosadio *et al.*, 2011); *Mannheimia haemolytica* (Dwan *et al.*, 2008) y Cov (Luna *et al.*, 2015) fueron identificados en cuadros de neumonía neonatal aguda,

Las lesiones histopatológicas que causan estos agentes y su probable interacción fueron estudiadas por Cirilo *et al* (2012) quienes sugieren un papel inicial de los virus en el desarrollo de estos cuadros, permitiendo la colonización bacteriana y un agravamiento de las lesiones.

2.3 Coronavirus

2.3.1 Aspectos históricos

Respecto al origen del nombre Coronavirus, se atribuye a los primeros estudios realizados con microscopía electrónica, que mostraron un halo proyecciones desde su superficie, con una porción bulbar en su parte terminal, parecida a la corona solar (Brandão, 2004; Masters, 2013; Couceiro *et al.*, 2015).

Los análisis basados en la secuencia de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) situaron al ancestro más reciente de los 4 géneros de Coronavirus en aproximadamente 10 100 años (media de 1.3×10^{-4} substituciones nucleotídicas por sitio por año) (Woo *et al.*, 2012). Sin embargo, otro estudio, analizando 5 regiones genómicas, amplió este a un período entre los 293-58 millones de años atrás, sugiriendo que estos virus han evolucionado coinfectando a aves y/o murciélagos, sus más probables huéspedes naturales (Wertheim *et al.*, 2013).

Esta temprana coevolución podría explicar, en parte, la diversificación de los géneros CoV entre mamíferos (α y β CoV) y aves (γ y δ CoV) y por qué los murciélagos son reservorio de múltiples especies de CoV, bien adaptados a estos virus, sin mostrar sintomatología aparente (Wertheim *et al.*, 2013).

Los primeras sospechas de infecciones por coronavirus se reportaron en el área de la medicina veterinaria, siendo, por orden de detección, el virus de la bronquitis infecciosa

(IBV), el primer coronavirus descrito en gallinas en 1937, clasificado actualmente como parte del género *Gammacoronavirus* (γ CoV). Luego, en 1946, se aisló en ratones el virus de la hepatitis murina (MHV), designado dentro del género β CoV, subgénero *Embecovirus*. Posteriormente, en 1951, el virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV), fue reportado en cerdos. Este último ha sido designado dentro del género *Alfacoronavirus* (α CoV), subgénero *Tegacovirus* (Couceiro *et al.*, 2015; ICTV, 2021).

Los CoVs se distribuyen mundialmente e infectan a diversos huéspedes debido, entre otras razones, a su alta tasa de mutación y recombinación, que facilita la diferenciación y adaptación de estos virus (Khbou *et al.*, 2020).

2.3.2 Propiedades generales de los coronavirus

2.3.2.1 Morfología y estructura

Los CoVs miden entre 100 y 160 nm de diámetro, poseen una envoltura lipídica, que en los *Orthocoronavirinae* es casi el doble de ancho que cualquier típica membrana biológica, y son moderadamente pleomórficos, aunque frecuentemente esféricos (Fenners, 2017; Couceiro *et al.*, 2015). Las partículas virales son sensibles a los solventes lipídicos, detergentes, formaldehído, agentes oxidantes, radiación UV y el calor. (Bedell *et al.*, 2016, Patterson *et al.*, 2020).

La superficie viral de los *Orthocoronavirinae* presenta proyecciones largas, de 20 nm, que son peplómeros compuestos de trímeros que componen la proteína S. Además, los *Embecovirus* (β CoV) muestran proyecciones más cortas, dímeros de 5 nm de largo que conforman la proteína Hemaglutinina esterasa (HE) (Hurdiss *et al.*, 2020; ICTV, 2023).

Las proteínas estructurales E y M hacen parte de la envoltura viral y tienen relevancia en el ensamblaje del virus mientras la proteína N está incluida en la nucleocápside (Figura 2) (Fenners, 2017; Couceiro *et al.*, 2015).

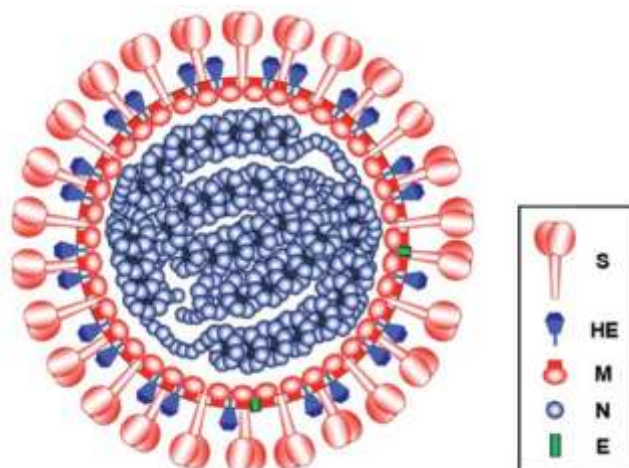


Figura 1. Representación esquemática del virión de *Embecovirus*.

En naranja la envoltura; en azul el nucleocápside. S: proteína Spike; HE: Hemaglutinina; M: proteína M; N: proteína N; E: proteína E. Fuente: Bárcena *et al.*, 2009.

Proteína Espícula (S)

Esta proteína tiene como función mediar la entrada de la partícula viral en las células del huésped, al participar en la interacción con el receptor celular y facilitar la fusión con la membrana celular, siendo por ello clave en la patogénesis y el principal determinante del tropismo celular. Esta proteína transmembrana trimérica es la mayor de las proteínas estructurales de los CoVs (Belouzard, 2012; Li, 2016; Alsaadi *et al.*, 2019). Los monómeros de la proteína S poseen 21 a 35 sitios de N-glicosilación, llegando a alcanzar un peso molecular de 200 KDa. (Belouzard, 2012, Masters, 2013). Estos monómeros incluyen un gran ectodominio N-terminal (se acompaña de una señal peptídica) y un pequeño endodominio C-terminal, que aloja el segmento transmembrana y endodominio. Los monómeros de la proteína S se dividen en 2 subunidades designadas como S1 y S2 cumpliendo funciones diferenciadas (Figura 3) (Masters, 2013).

La subunidad S1 facilita 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). Dependiendo de la especie de CoV, uno o ambos dominios se unen 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 dejando al dominio C unirse a receptores proteicos. La subunidad S1 es muy variable, carece de homología entre los

géneros de CoV y frecuentemente diverge entre diversos aislados de un solo CoV (Belouzard, 2012).

La subunidad S2 es responsable de la fusión de membrana, contiendo en su estructura al péptido responsable por esta función, además de albergar 2 regiones repetidas 7 aminoácidos (heptadas) denominadas HR1 y HR2. Además, esta subunidad contiene un dominio transmembrana, región altamente conservada entre las especies de CoV de diferentes géneros (Hofmann *et al.*, 2006).

Es interesante notar que mientras que en el MHV, BCoV y SARS CoV-2 (β CoV) y el IBV (γ CoV) se produce una escisión parcial o completa entre S1 y S2, conocido como sitio de clivaje por una proteasa tipo furina, en los α CoV y algunos otros β CoV no se produce dicha escisión se designan a los dominios S1 y S2 como N-terminal y C-terminal, respectivamente (Masters, 2013).

Proteína de membrana (M)

Esta glicoproteína de membrana tiene como rol el ensamblaje del virus y el empaquetamiento del ARN viral (Lubeck, 2013). Es una proteína altamente hidrofóbica, transmembrana, que por su característica de atravesar 3 veces la envoltura viral se clasifica como N^{exo}C^{endo} (Couceiro *et al.*, 2015), le da forma al virión. Esta es la proteína estructural más abundante en los CoV (Masters, 2013). El monómero de la proteína M presenta muchas y variadas formas (politópica), tiene un peso molecular de 25 a 30 KDa y 3 regiones: un ectodominio N-terminal muy pequeño, 3 dominios transmembrana y un endodominio C-terminal largo (Figura 4) (Masters, 2013).

El ectodominio es una región poco conservada y presenta una O-glicosilación (cuando se añade una molécula de azúcar a un átomo de oxígeno presente en un residuo aminoacídico de una proteína) en los β CoV, excepto en el MHV-2 y SARS-CoV, donde la glicosilación ocurre a través de un átomo de Nitrógeno. La siguiente región transmembrana presenta un alto grado de conservación, es corta y se encuentra entre las otras 2 regiones. Finalmente, la tercera región, de endodominio, es resistente a la acción de proteasas y se prolonga hasta contactar la nucleocápside formando una red similar a una matriz, que explicaría el notable grosor de la envoltura de los Orthocoronavirus. (Masters, 2006,2013)

Interesantemente, el primer o tercer dominio transmembrana sirven como señal para la inserción y anclaje de la proteína M por lo que no es necesario que esta cuente con una señal péptido amino-terminal (como sí lo presenta la proteína S). Esto se ha observado en los β coronavirus IBV y MHV. Por otra parte, los α CoV-1 contienen péptidos señal N-terminales escindibles en su proteína M pero no es claro si estas tienen algún papel en la inserción en la membrana (Masters, 2013).

Proteína de envoltura (E)

Esta es una pequeña proteína pentamérica de membrana, con peso molecular que varía entre los 8.4 y 12 KDa que se encuentra en menor cantidad en los coronavirus. Esta proteína integral presenta un ectodominio hidrofílico corto N-terminal, un dominio hidrofóbico transmembrana y un largo endodominio hidrofílico C-terminal (Figura 5). De secuencia altamente variable entre los géneros de CoV, e inclusive entre miembros de un solo género, tampoco tiene un péptido señal escindible y no es glicosilada. A esta proteína se le atribuye actividades de canal iónico y/o permeabilización de membrana, un papel en el ensamblaje y la morfogénesis del virión y además se le ha identificado como un factor de virulencia para algunos virus, incluido el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) (Masters, 2013; Alsaadi *et al.*, 2020).

Proteína Hemaglutinina Esterasa (HE)

La proteína estructural HE, que aparece como una segunda agrupación de proyecciones cortas alrededor de la proteína S (Masters, 2006, 2013), es probablemente la proteína más caracterizada de las proteínas accesorias debido a su actividad biológica (Callebaut y Pensaert, 1980). Algunos autores consideran a la proteína HE como un cuarto componente, adicional, de la envoltura de la membrana de algunos β coronavirus, *Embecovirus*, como MCoV, HCoV-HKU1 y el SARS-CoV2.

El monómero HE tiene un peso molecular de 48 KDa y presenta un ectodominio N-terminal, que ocupa casi la totalidad de su secuencia, y un endodominio C-terminal muy corto (Figura 6). A su vez presenta una señal peptídica para su N-glicosilación en diversos sitios que aumentan su peso en alrededor de 17 KDa. Parte de la actividad de la proteína HE se relaciona a la unión con el ácido siálico presente en las glicoproteínas y

glicolípidos de la superficie celular (principalmente de superficies mucosas) mientras que su otra actividad, acetilesterasa, es específica para ácidos siálicos 9-0 ó 4-0-acetilados. Estas actividades parecen permitir que la proteína HE actúe como cofactor de la proteína S, contribuyendo en los pasos iniciales de la interacción virus-célula además de facilitar el ingreso del virus a través de la mucosa extracelular. (Master, 2013)

Proteína N

Esta proteína, con peso molecular de 43 a 50 KDa, hace parte de la estructura de la nucleocápside, se encuentra fosforilada en su región SR (probablemente por la enzima glucógeno quinasa-3) y modificada en un número limitado de residuos de serina y treonina. Se ha observado que tienen 3 dominios: el NTD, el CTD y un dominio 3 (Figura 7) (Masters, 2006).

Los dominios NTD y CTD, cargados positivamente por la presencia de múltiples lisina y arginina, ocupan la mayor parte de la molécula ubicándose entre ellos la región SR, que sirve como enlace. Los dominios NTD y CTD pueden unirse al ARN genómico para formar un complejo de ribonucleoproteína (RNP), específicamente a la secuencia reguladora de la transcripción (TRS), otorgando a la proteína N la capacidad de participar en el proceso de síntesis y replicación viral, siendo importante para la transcripción de ARN subgenómico (ARNsg) (Masters, 2013).

Además de su papel en la encapsidación del genoma, muestra actividad de chaperona de ARN y actúa como un antagonista del interferón tipo I (Zúñiga *et al.*, 2010)

Por otra parte, el dominio 3, cargado negativamente por la presencia de residuos ácidos, proporciona a la proteína N la capacidad de interactuar con la proteína M.

2.3.2.2 Estructura y organización genómica

El genoma de los coronavirus se caracteriza por tener un tamaño de entre 27 a 32 kb, ser de ARN, cadena simple, lineal, de sentido positivo y policistrónico. Posee una estructura cubierta terminal 5' y una cola poliadenilada 3' (Masters, 2013; Couceiro *et al.*, 2015; Fenner's, 2017).

La replicación del genoma viral ocurre a través de la formación de un ARN antígenómico, generado por transcripción continua, que se inicia en el extremo 5' y que tiene un marco de lectura abierto (ORF) corto denominado secuencia líder (con 65 a 98 nucleótidos aproximadamente); luego se continua con una región no traducida (5'-UTR) y con el inicio del ORF 1ab (Brian y Baric, 2005). A continuación de este ORF continúan los genes que codifican las proteínas estructurales S, E, M y N, aunque algunos miembros del género *Betacoronavirus*-subgénero *Embecovirus*, también se puede encontrar el gen HE. El extremo 3' contiene la otra región 3'-UTR, que es continuada por una cola poliadenilada (Figura 8) (Brian y Baric, 2005; Couceiro *et al.*, 2015). En resumen, la replicación del genoma viral se da a partir de ARNm genómicos y subgenómicos cubiertos y poliadenilados.

En general el genoma de los coronavirus se esquematiza como 5'complejo transcriptasa-replicasa-S-M-E-N-3', aunque dependiendo del género y la especie pueden albergar muchos más ORFs, adicionando más 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 denominan como "genes accesorios". Estos últimos pueden ubicarse entre los intervalos intergénicos, pero nunca entre los genes E y M (Masters, 2013).

El ORF1ab (pp1a y pp1b) abarca la mayor parte del genoma (2/3), sintetiza el complejo transcriptasa-replicasa y se divide en ORF1a y ORF1b. Ambos marcos de lectura sintetizan hasta 16 proteínas no estructurales (nsp), como en el coronavirus humano (SARS-CoV-1). Las nsp varían en número según el género y especie viral. (Hilgenfeld y Peiris, 2013). La ORF1a se encarga de producir su propia proteasa y sintetizar las nsp1-11; 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. Por otra parte, la ORF1b sintetiza la ARN polimerasa viral dependiente de ARN (RdRp) (Brian y Baric 2005; Sawicky *et al.*, 2007).

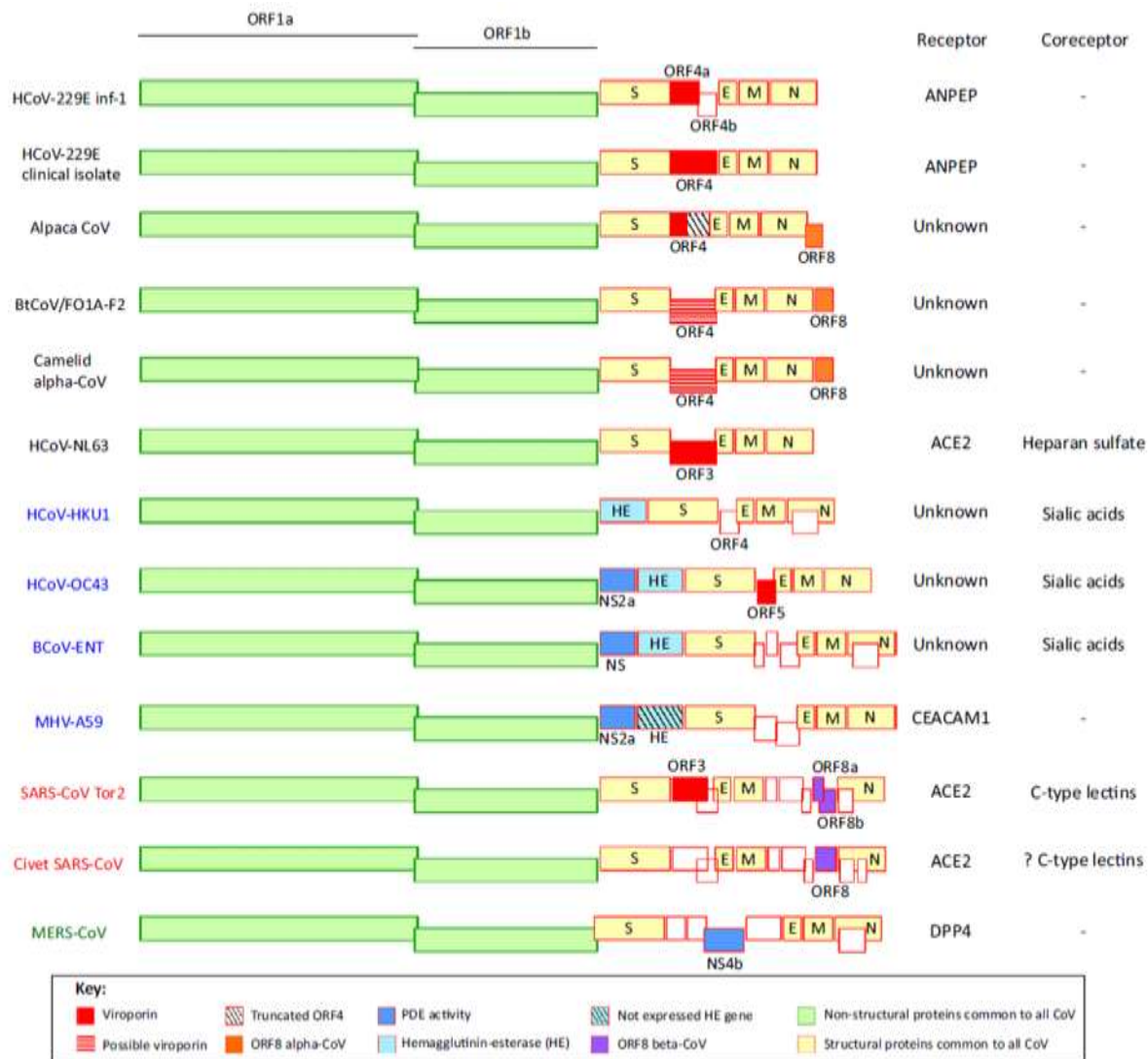


Figura 2. Organización genómica de los Coronavirus. Fuente: Santos *et al.*, 2018

2.3.2.3 Ciclo de replicación

Adhesión celular, entrada del virión y depósito del genoma viral

Con la entrada del virión a la célula huésped, por fusión o endocitosis, comienza el ciclo replicativo viral (Figura 9). Este paso inicial depende de la unión específica del virión al receptor de la célula huésped, seguido de la fusión de las membranas viral y celular. La unión es mediada por la interacción de la proteína S y su receptor celular, la especificidad de esta unión dirige el tropismo tisular y determina el rango de especies hospedadoras que el CoV puede infectar (Masters, 2013).

Son variados los receptores celulares que emplean los coronavirus para infectar a sus hospederos. Entre estos podemos indicar que el MERS-CoV usa la dipeptidil peptidasa 4 (DPP4) (también conocida como CD26), mientras el SARS-CoV 1 y 2 a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). Por otra parte, algunos α CoV usan a la aminopeptidasa N (APN) o también llamada CD13 (De Wilde 2017, Fenner's, 2017).

Inmediatamente después de la interacción inicial entre la proteína S y el receptor celular, ocurre la escisión proteolítica de esta a través de proteasas extracelulares o endosomales como cathepsinas, una proteasa transmembrana serina tipo 2 (TMPRSS2), entre otras (Maier, 2015). Esta escisión permite que se muestre un péptido de fusión el cual se va a insertar en la membrana, continuando con la unión de HR1 y HR2, para formar una estructura más estable y resistente a las proteasas (Bosch *et al.*, 2003). Esta estructura permite la fusión entre las membranas viral y celular y la consiguiente deposición del genoma del virión en el citoplasma. (Masters, 2013; Maier, 2015)

Síntesis, replicación y transcripción

En general los virus ARN, como los CoV, presentan diferentes estrategias de replicación según la polaridad de su genoma y la presencia de una replicasa con actividad DNA polimerasa a partir de ARN y, salvo en contadas excepciones (Ortomixovirus, Bornavirus y Retrovirus), la replicación del ARN viral ocurre asociado a las membranas celulares (Santos *et al.*, 2015).

Esta etapa del ciclo viral se puede resumir de la siguiente manera: la traducción de la poliproteína viral precursora comprende inicialmente sólo a las proteínas no estructurales y continúa con el procesamiento del precursor no estructural por la proteasa viral. Luego, la RpRd viral facilita las siguientes etapas: transcripción de la cadena complementaria de ARN (negativa) a partir del molde genómico, sigue con la transcripción de ARNm subgenómicos, a partir de la cadena de ARN negativa, que sirven como molde para la traducción de las proteínas estructurales faltantes y termina con la transcripción de la cadena de ARN genómico completo a partir de la cadena de ARN negativa.

Coronaviridae comparte esta estrategia de replicación con las familias *Togaviridae*, *Arteriviridae*, *Astroviridae* y *Caliciviridae*, caracterizándose por presentar

un mecanismo temporal de control de la síntesis de las proteínas no estructurales contra las estructurales (Santos *et al.*, 2015).

El genoma viral es empleado directamente en la síntesis de la RdRp y las ORF1a y ORF1b se traducen como una sola poliproteína: poliproteína 1a (pp1a) o poliproteína 1ab (pp1ab). Inmediatamente, las proteasas virales contenidas en esta misma poliproteína la autoescindirán en productos maduros, incluyendo las nsp1-nsp16. (Fenner's, 2017; Masters, 2013). La traducción de la pp1ab se realiza a través de un mecanismo de cambio de marco ribosómico (frameshift), donde un ribosoma de traducción desplaza un nucleótido desde el marco de lectura ORF1a al marco de lectura ORF1b, reposicionándose. Este evento es inducido por estructuras secundarias (stem loop) y terciarias (pseudoknot) complejas, además de la participación de dos elementos de ARN programados: una secuencia “resbaladiza” del heptanucleótido 5'-UUUAAAC-3' y una estructura de pseudonudo de ARN (Perlman, 2015; Santos *et al.*, 2015). Cuando el ribosoma encuentra estas estructuras ocurre una inestabilidad en la ligación el ARNm molde y la localización de los sitios A y P ribosomales en relación a la fase de lectura original (Santos *et al.*, 2015). Este evento aumenta la capacidad codificante del genoma viral sin la necesidad de aumentar el número de bases nucleotídicas (Santos *et al.*, 2015).

Se sugiere que este cambio de marco programado podría tener como función fijar una proporción adecuada de productos de traducción para ensamblarlos en un complejo macromolecular, evitando la expresión de productos enzimáticos de ORF 1b, hasta el momento cuando los productos de la ORF 1a hayan preparado un entorno adecuado para la síntesis de ARN. Las nsp que fueron procesadas en paralelo formarán luego el “complejo replicasa transcriptasa” (RTC), entre estas, algunas con actividad proteasa, como la nsp3 (similar a la papaína), separará a nsp1, nsp2 y a la misma nsp3. Además, la nsp5, otra proteasa tipo serina, ejecutará los eventos de clivaje restantes.

En seguida se inicia la expresión de ORF 1b, donde la nsp12 contiene a la RdRp y la nsp13 a la helicasa, clave para la síntesis de ARN. A su vez, esta ORF1b sintetiza su endonucleasa y exonucleasa, esta última encargada de corregir los errores de la RdRp y responsable de preservar la genética del virus, pero con un papel en la replicación viral poco relevante (Perlman, 2015; Masters 2015).

La RdRp es una replicasa, que inicialmente hace una copia, de sentido negativo (complementario), del genoma viral, comenzando en la región 3'. Posteriormente, copia la totalidad del ARN genómico (ARNg), pero en sentido positivo (Figura 10). Además, la RdRp también tiene actividad transcriptasa, generando ARNsg de sentido positivo, a partir de la transcripción discontinua del ARN de hebra negativa. Estos ARNsg de sentido positivo servirán para la expresión de genes estructurales y accesorios que luego serán traducidos.

La hebra negativa contiene secuencias reguladoras de transcripción (TRS), ubicadas en cada marco de lectura abierto. La RdRp se detiene en cualquiera de estas TRS y luego se transloca al final del genoma. Este evento, característico de los *Nidovirus*, es conocido como “transcripción discontinua” y permite un tipo de recombinación especial en los CoV (Masters, 2013; Perlman, 2015; Fenner's, 2017).

Ensamblaje y liberación de viriones

Luego de traducidas, las proteínas estructurales S, E y M se insertan en el retículo endoplásmico (RE) y luego se movilizan hacia el retículo endoplásmico - compartimento intermedio de Golgi (ERGIC) (Figura 9 y 10), donde los genomas virales encapsidados por la proteína N brotan desde las membranas del ERGIC. La proteína M es clave para el ensamblaje de viriones (Perlman, 2015), mientras se sugiere que la proteína E cumple un rol en la inducción de la curvatura de la membrana. La interacción de las proteínas N y M promueve la condensación de la nucleocápside con los componentes de la envoltura para completar el ensamblaje del virión, además, la proteína M captura a la proteína S y la incorpora al virión porque esta tiene función pasiva. También se ha observado en algunos coronavirus que la proteína S que no se ensambla en los viriones se moviliza hacia la membrana plasmática para mediar la fusión entre células infectadas y células contiguas no infectadas. Esta fusión resulta en la formación de células gigantes multinucleadas, permitiendo la propagación de la infección sin que el virus sea detectado o neutralizado. El ciclo viral concluye cuando los viriones se transportan a la membrana plasmática en vesículas lisas y se liberan por exocitosis (Masters, 2013; Perlman, 2015; Fenner's, 2017). Se debe notar que los *Orthocoronavirus* adquieren sus envolturas lipídicas al brotar en las membranas del retículo endoplásmico, el compartimento intermedio y/o el complejo de Golgi de las células huésped (Klumperman *et al.*, 1994).

2.3.2.4 Taxonomía y clasificación

El orden *Nidovirales*, se diferencia de otros virus ARN por su organización genómica general invariante con un gen de replicasa amplio; la expresión de la poliproteína replicasa – transcriptasa por medio de un cambio de marco ribosómico; las actividades enzimáticas contenidas en los productos de la proteína replicasa – transcriptasa y la expresión de genes a través de la transcripción de múltiples ARNs mensajeros anidados subgenómicos 3'. (Masters, 2013, Cui, 2019).

El orden *Nidovirales* incluye a las familias *Arteriviridae*, *Coronaviridae* (el más amplio), *Mesoniviridae* y *Roniviridae* (Fenners, 2017). Desde el 2019, el Comité Internacional de Taxonomía del Virus (ICTV), pasó a fundamentar la taxonomía de los virus ARN según sus relaciones filogenéticas y estructuras genómicas; esto provocó la reclasificación de nuevas familias y subfamilias, pasando la familia *Coronaviridae* a incluir a las subfamilias *Orthocoronavirinae*, *Letovirinae* y *Pitovirinae* (ICTV, 2023).

La familia *Coronaviridae*, una de las que tiene mayor tamaño de genoma entre los virus ARN, infecta a cuatro de las siete clases de vertebrados: mamíferos y aves (*Orthocoronavirinae*), anfibios (*Letovirinae*) y peces óseos (*Pitovirinae*) (ICTV, 2023). La primera subfamilia, y objeto de este estudio, *Orthocoronavirinae*, está subdividida en 4 géneros: *Alphacoronavirus* (α CoV), *Betacoronavirus* (β CoV), *Gammacoronavirus* (γ CoV) y *Deltacoronavirus* (δ CoV) (Woo *et al.*, 2012; ICTV, 2021). El género α CoV se subdivide en 15 subgéneros (*Decacovirus*, *Duvinacovirus*, *Rhinacovirus* y *Tegacovirus*, entre otros), β CoV 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, 2023, Fung y Liu, 2019). Los *Gammacoronavirus* (γ CoV) y *Deltacoronavirus* (δ CoV) se dividen en 5 y 3 subgéneros, respectivamente (ICTV, 2023).

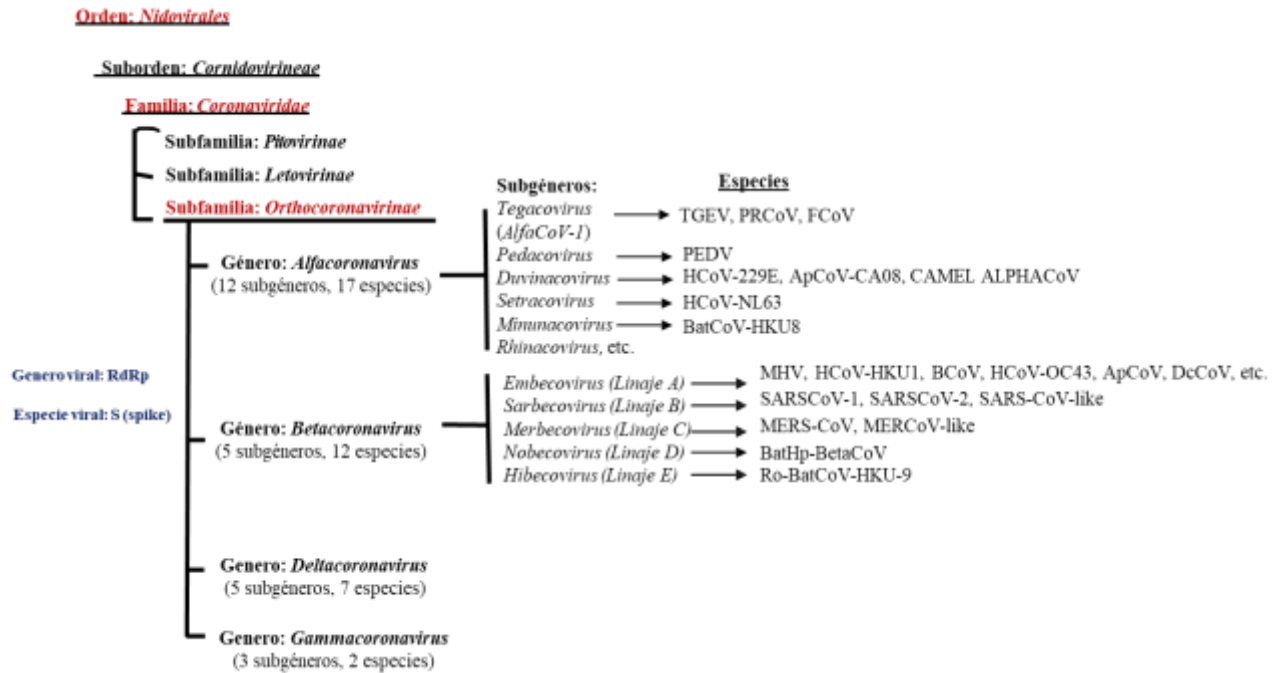


Figura 3. Organización taxonómica actual del orden Nidovirales y de la familia Coronaviridae. Fuente: ICTV, 2023; Couceiro *et al.*, 2015 (Adaptado)

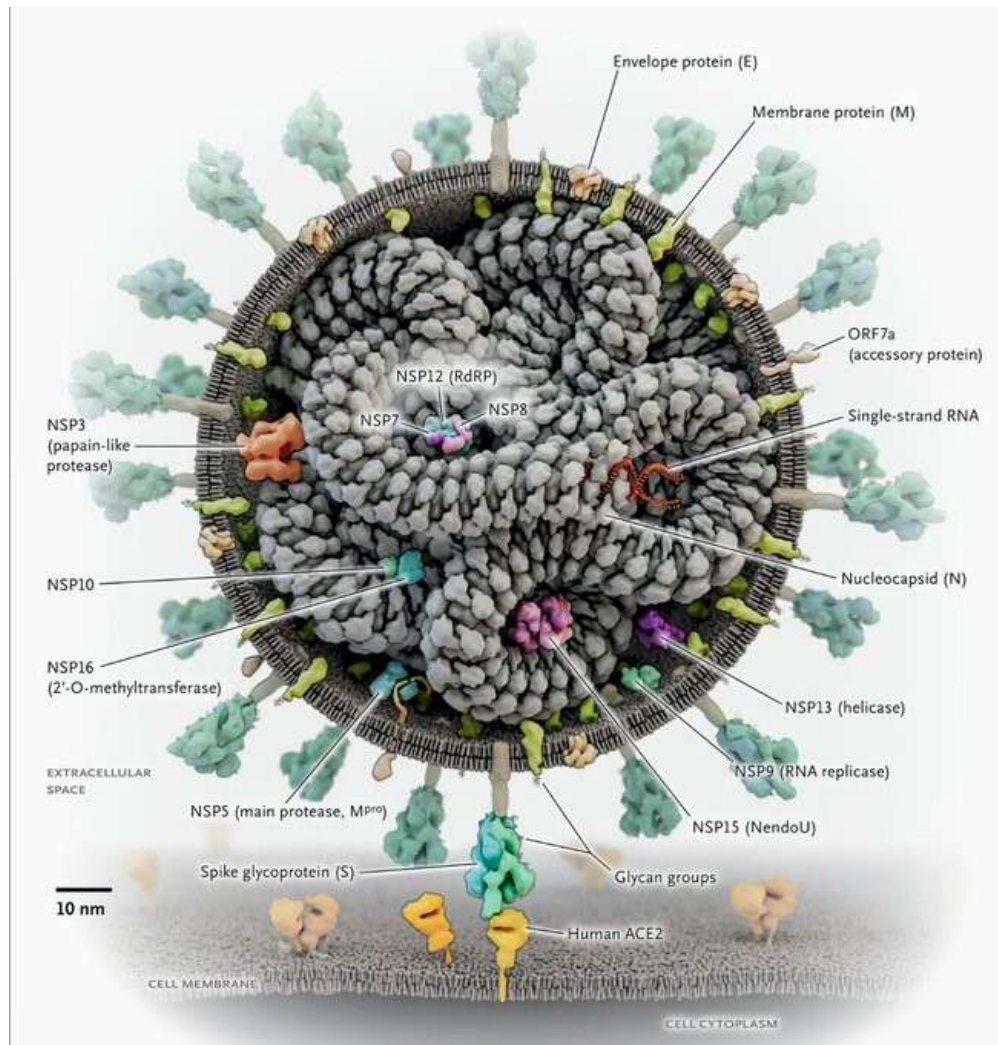


Figura 4. Interacción entre la ACE2 y la proteína Spike del SARS-CoV-2.

2.3.2.5 Epidemiología de la infección por Coronavirus

Los CoV se transmiten principalmente por infección fecal oral, secreciones respiratorias y aerosoles. El contagio por fómites es posible pero aparentemente juega un papel menor. En la fase inicial la replicación viral ocurre en el epitelio entérico y respiratorio cursando con sintomatología local (diarrea, por ejemplo) para luego de la diseminación causar, algunas veces, un cuadro clínico grave (Masters, 2013; Fenner, 2017).

Los CoV son patógenos de amplia distribución mundial, afectando al hombre, mamíferos y aves en los que provocan principalmente infecciones respiratorias y entéricas, y en algunos casos sintomatología nerviosa o hepática. La mayoría de veces

son cuadros leves pero en otras ocasiones pueden tener curso grave, con seria amenaza para la vida. (Masters 2013; Khbou, 2020).

Se ha reportado que los géneros α CoV y β CoV tienen como principales hospederos a mamíferos, mientras que los géneros γ CoV y δ CoV son albergados mayoritariamente por aves. Respecto al origen de los CoV, estudios filogenéticos moleculares proponen un modelo evolutivo donde los murciélagos son la fuente original de los α CoV y β CoV, mientras las aves tendrían ese papel como fuente de los γ CoV y δ CoV (Woo *et al.*, 2012).

Los coronavirus tienen genomas altamente mutables volviéndolos genética y fenotípicamente modificables, con potencial para transmitirse a nuevas especies. (Santos *et al.*, 2015). Este aspecto es importante para la epidemiología de los CoV y sus principales mecanismos de variabilidad genética son las mutaciones, ganancia o pérdida de genes y recombinaciones. Este último mecanismo permite a los coronavirus adaptarse mejor y relativamente rápido a nuevos hospederos, facilitando la transmisión interespecie y el salto entre hospedadores. El coronavirus bovino (BCoV) es probablemente el ejemplo estudiado de cómo estos virus pueden cruzar la barrera entre especies, al transmitirse a una amplia variedad de rumiantes domésticos como la alpaca, rumiantes silvestres e incluso el hombre (Zhang *et al.*, 1994, Saif, 2010). En ese sentido, se han encontrado evidencias de transmisión zoonótica donde el SARS-CoV-1 pasó de la *Paguma larvata* (civeta de palma) a los seres humanos (Song *et al.*, 2004), el MERS-CoV del *Camelus dromedarius* (camello) (Drosten *et al.*, 2003) mientras el coronavirus SARS-CoV-2 desde el *Manis javanica* (pangolín) (Wacharapluesade, 2021).

Coronavirosis en medicina humana

En medicina humana, los coronavirus son responsables por enfermedades respiratorias leves, como el resfrío común (causado por HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 y HKU1), y severas, como el MERS y el SARS (Cui, 2019). Estos últimos mostraron una importante tasa de mortalidad, y que afortunadamente no llegaron a diseminarse a nivel mundial debido a dificultades en su transmisión, algo que sí ocurrió con el SARS-CoV2, causante de la pandemia por Covid-19, que provocó cuadros respiratorios graves acompañados de mortalidad considerable (Khbou, 2020).

En el caso del resfrío común, como con otros virus respiratorios, la transmisión se da por aerosoles (emitidos durante el estornudo) o contacto de fómites con las vías respiratorias altas (mediadas por el contacto de las manos con la mucosa nasal, ocular o bucal, principalmente). La infección primaria ocurre en células epiteliales ciliadas de la nasofaringe donde causan la exacerbación de quimiocinas y citocinas, que generalmente es insuficiente para inducir una inmunidad protectora estable (Masters, 2013).

Cuando se reportó la infección por el SARS-CoV, aproximadamente el 30% de personas infectadas presentó como un cuadro grave de neumonía intersticial. La sintomatología cursó con fiebre, malestar general, mialgias, escalofríos y tos seca que estuvieron acompañados de diarrea acuosa (Su *et al.*, 2016).

En el caso del MERS-CoV, la transmisión ocurrió por aerosoles o el 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 correspondieron al de un virus con afinidad por diferentes tipos de tejidos (politrópico) variando desde una neumonía asintomática hasta neumonía grave, con disnea aguda, shock séptico e insuficiencia renal y muerte. Los vómitos y diarreas estuvieron presente en casi el 30% de los afectados (Su *et al.*, 2016).

La más reciente pandemia por el SARS-CoV2 se transmite por el contacto de las gotículas respiratorias (emitidas durante el estornudo) con la mucosa oral, nasal y ocular y, aunque la transmisión vertical es controversial, así como la oro-fecal, ambas parecen tener un papel menor en la transmisión que necesita investigarse (León, 2020). El receptor celular identificado para este virus es la Enzima Convertidora de la Angiotensina 2 (ACE2), presente en diferentes tipos celulares, pero que cuando infecta los neumocitos tipo II desencadena una cascada inflamatoria, conocida comúnmente como “tormenta de citocinas”, en el tracto respiratorio inferior. La gran mayoría de infectados reportó que el principal síntoma fue la fiebre, seguida de tos y disnea inspiratoria. Las complicaciones severas se observaron principalmente en ancianos, inmunodeficientes y personas con comorbilidades como la diabetes, hipertensión arterial y obesidad. En estos, la enfermedad cursó con insuficiencia respiratoria, shock séptico y/o fallo multiorgánico acompañado de muerte en casi el 5 % de los casos (OMS, 2020).

Coronavirosis en medicina veterinaria

En la medicina veterinaria, los CoV son reconocidos como importantes agentes causadores de enfermedades esporádicas y brotes estacionales, de impacto económico relevante para la producción animal (Holmes, 1999).

Coronavirus en camélidos

Los primeros reportes de COV en alpacas y llamas ocurrieron en USA (Oregon), frecuentemente asociados a cuadros diarreicos en crías de hasta 7 meses de edad (Cebra *et al.*, 2003). El secuenciamiento genómico de este CoV mostró una similitud del 99.5% con cepas de origen bovino (BCoV), sugiriendo que ambas tienen un ancestro común (Jin, 2007). Por otra parte, en alpacas adultas la diarrea por coronavirus es poco común, detectándose en una alpaca hembra de 4 años también en EE.UU. (Genova *et al.*, 2008). En ambos casos se clasificó a estos virus como β CoV.

Interesantemente, el secuenciamiento del genoma completo de un CoV de alpaca, asociado a cuadro respiratorio agudo, reveló halló una similitud nucleotídica de 92.2% con un α CoV (HCoV-229E) (Crossley *et al.*, 2012), diferente de lo reportado en estudios previos, de origen gastrointestinal.

Estudios en comunidades campesinas de la sierra sur de nuestro país han reportado la presencia de CoV en crías de alpacas, a partir de muestras diarreicas. Así, en la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cuzco (UNSAAC), aplicando pruebas inmunocromatográficas rápidas, se detectó coronavirus en 5 de 14 muestras fecales (López *et al.*, 2011). De manera similar, Luna *et al.*, el 2015, detectaron coronavirus en el 18% (11/60) de muestras fecales que analizó y mediante secuenciamiento identificó un β CoV similar al BCoV (Luna *et al.*, 2015). Existen pocos estudios basados en la detección molecular de coronavirus en alpacas pertenecientes a comunidades campesinas. Posteriormente, Rojas *et al.* (2016), en un estudio realizado en la comunidad de Silly, Cuzco, desde muestras de lavado intestinal de alpacas neonatas muertas en un brote diarreico reportó una frecuencia del 40%. Poco después, se reportó una frecuencia de coronavirus del 27% en muestras fecales, diarreicas y normales, de alpacas provenientes de la misma comunidad campesina (Rocha *et al.*, 2018). Estos 2 últimos estudios se realizaron con el apoyo del 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).

Más recientemente, a partir de muestras de heces diarreicas y no, de alpacas y llamas de 3 comunidades campesinas en Sicuani-Cuzco, se detectó coronavirus en casi el 90%, siendo más frecuente de los 3 virus incluidos en este trabajo. Este trabajo es importante porque además de reportar coinfección de CoV con Rotavirus A (RVA) y Mammalian Orthoreovirus (MRV) y confirmar a los β CoV como el género más importante, también informó de la presencia del subgénero *Embecovirus* y de CoVs de género y subgénero aún no identificados (Castilla *et al.*, 2021).

Coronavirus bovino

En los bovinos la principal forma de transmisión de los CoV es a través de la vía fecal-oral. Durante el primer mes de vida, Coronavirus es el principal agente causal de la diarrea neonatal en el ganado lechero y de carne, donde la alta densidad animal es el principal factor de riesgo de esta enfermedad a la que se atribuye elevada mortalidad y retraso en el crecimiento (Khbou, 2020). Luego de la infección, los terneros eliminan el virus por la vía fecal y nasal hasta por 10 días. En la patogénesis de la enfermedad, la replicación inicial ocurre en el epitelio de la vellosidad del intestino delgado y luego en el intestino grueso, causando una diarrea por mala absorción y digestión que puede avanzar a un desequilibrio ácido-base que termina causando insuficiencia circulatoria y muerte (Fenner's, 2017).

La Disentería de invierno es otra importante enfermedad atribuida al BCoV. En este cuadro, el virus destruye las células maduras del intestino delgado y grueso, causando hemorragia intestinal y necrosis a nivel de las criptas de la mucosa del intestino grueso, afectando la absorción. El cuadro clínico se caracteriza por una aguda diarrea sanguinolenta, fiebre y depresión, y aunque la mortalidad es baja, la elevada morbilidad y afectación severa de la producción láctea son importantes (Natsuaki *et al.*, 2007).

Durante el transporte de los animales a los centros de engorde, el hacinamiento, estrés y la diseminación por las vías nasal y fecal del BCoV, causa la fiebre del embarque. Esta infección predispone a otras infecciones secundarias, mixtas con otros virus y

bacterias, que cursan con una característica bronconeumonía fibrinosa grave, siendo a menudo fatal (Fenner's, 2017).

Se han descrito a los CoVs de tipo bovino (BCoV) en diferentes rumiantes domésticos y silvestres (Amer, 2019). Así, en el ganado ovino y caprino se ha reportado anticuerpos contra este virus, atribuyendo la infección al contacto estrecho que ocurre en la crianza mixta (Khbou, 2020). Esta infección es reconocida como una causa de diarreas e infecciones respiratorias en neonatos (Burimuah *et al*, 2020).

En dromedarios de África y Oriente Medio circulan cepas silvestres de MERS-CoV, detectándose seroprevalencia del 71% (Egipto), 84% (Arabia Saudita) y 94% (Nigeria), aunque no asociado a cuadros clínicos en estos animales (Reusken *et al.*, 2014; Ali *et al.*, 2017; Harrath y Abu Duhier, 2018).

En los terneros de búfalos de agua, BCoV ha sido reportado como uno de los patógenos más frecuentemente asociados a casos de diarreas, llegando a reportarse una prevalencia de 37.7 % en Egipto. Similarmente, un brote diarreico en bubalinos de Italia, mostró una alta de mortalidad neonatal. Estudios moleculares sugieren que el origen más probable de los coronavirus bubalinos sería una cepa de BCoV (Amer, 2019).

Coronavirus porcinos

Entre los coronavirus que afectan la producción porcina, el virus de la gastroenteritis transmisible porcina (TGEV) se ha convertido actualmente en uno de los más preocupantes debido a su distribución mundial y alta morbi-mortalidad en lechones. Este virus tiene aparición estacional (invierno) y la sintomatología se caracteriza por profusas emesis y diarreas (Chen *et al.*, 2018). Se ha reportado que la entrada de este virus ocurre con la llegada de nuevos reproductores al plantel, que excretan el virus asintomáticamente, o por fómites contaminados. Luego de la transmisión oro-fecal, y un periodo de incubación de 18 a 72h, el virus se replica masivamente en los enterocitos causando su destrucción y un cuadro de mala absorción y digestión que viene acompañado de vómitos, diarrea acuosa, pérdida de peso y deshidratación en el caso de lechones. En los adultos suele haber diarrea transitoria y vómitos pero generalmente es asintomática (Fenner's, 2017).

El virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) es el agente causador de diarrea porcina más importante (tasa de infección de 78.25%) y debido a una mortalidad que puede llegar al 100% en lechones, causa pérdidas económicas invalorable en esta industria (Zhou *et al.*, 2018). Este virus tiene sintomatología similar al TEGV en lechones y también, la mayoría de veces, es asintomático en adultos, siendo esto importante para la transmisión de la enfermedad (Fenner's, 2017).

Interesantemente, el CoV respiratorio porcino (PRCoV), surgió a partir de una delección en el gen de la proteína S del TGEV, causando infecciones respiratorias con signos leves o subclínicos fácilmente ignorados o subdiagnosticados, que ha conseguido distribuirse en Europa, Asia y USA (Laude *et al.*, 1993; Caswell y Williams 2015). Este virus se transmite por vía aerógena, a través de gotitas y aerosoles respiratorios, replica intensamente en amígdalas, epitelio de la mucosa nasal y neumocitos de tipo I y II de alveolos pulmonares causando necrosis y una neumonía bronco intersticial (Fenner's, 2017).

El virus del síndrome de diarrea porcina (SADS-CoV), al igual que los 3 anteriores es otro α CoV con gran repercusión en la industria porcina asiática, asociándosele a diarrea severa y rápida pérdida de peso en lechones lactantes (Khbou, 2020). Es considerado actualmente como un virus reemergente con la habilidad para evadir la acción del Interferón β (Zhou *et al.*, 2020).

El virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina (PHEV), un β CoV, comparte distribución geográfica con el PRCoV, infecta a los terneros después del destete. (Zhou *et al.*, 2018). Aunque se transmite por aerosoles respiratorios y replica de forma similar a otros CoV porcinos (en células de la mucosa nasal, amígdalas, pulmón e intestino delgado), causando sintomatología digestiva y pérdida de peso, puede llegar al sistema nervioso central y periférico provocando opistótonos, postura de perro sentado, movimiento de remar, parálisis o convulsiones (Fenner's, 2017; Khbou *et al.*, 2020).

El Deltacoronavirus Porcino (PDCoV), enzoótico en China, es el único coronavirus patogénico que pertenece al género δ CoV. Aunque originalmente era asintomático, desde la década pasada este virus se ha asociado a infecciones gastroentéricas alcanzando prevalencias inferiores al 20% en Taiwán. (Marthaler *et al.*,

2014; Hsu *et al.*, 2018). También conocido como HKU15, el PDCoV presenta sintomatología similar al PEDV en lechones (Fenner's, 2017).

Epidemiología de coronavirus aviares

En la industria avícola, el virus de la bronquitis infecciosa (IBV), un γ CoV, es probablemente el más importante por su distribución mundial y alta contagiosidad. Afecta las vías respiratorias superiores alcanzando tasas de morbilidad del 100% y mortalidad del 82%, según la edad, sistema inmunológico y si viene acompañado de otras infecciones (Khbou, 2020).

Este virus se transmite por aerosol y vía oro-fecal, replica en el epitelio ciliado del tracto respiratorio y tiene un corto periodo de incubación (18 a 48 horas). Luego de alcanzar varios órganos, se observa engrosamiento de la mucosa en el tracto respiratorio, exudado seroso o catarral en fosas nasales, tráquea, bronquios y alveolos. Cepas virulentas producen enfermedad respiratoria severa, acusando dificultad respiratoria (jadeo, tos, estertores traqueales, estornudos, abundante exudado nasal, disnea, entre otros). Por otra parte, cepas menos virulentas provocan cuadros clínicos más leves. También se han reportado cepas que provocan nefritis intersticial (Masters, 2013).

Cuando la infección alcanza al tracto intestinal causa daños leves. En ponedoras se produce yema libre en cavidad abdominal y peritonitis mientras que en hembras jóvenes provoca hipoplasia del oviducto afectando la ovoposición y calidad de huevos (Masters, 2013).

Existen reportes de varios CoV, emparentados con el IBV probablemente por eventos de recombinación, afectando otras aves domésticas (pavo, faisán y gallina de guinea) y aves silvestres de los géneros Anseriformes, Columbiformes, Charadriiformes y Galliformes (Cavanagh, Jonassen *et al.*, 2005; Domanska-Blicharz *et al.*, 2014). Entre estos destaca el coronavirus del pavo, 85 a 90% similar a nivel genómico con el IBV, pero con diferencias en la proteína S, inicialmente detectado en USA y que ha sido asociado a cuadros entéricos graves en las primeras semanas de vida aunque afecte a todas las edades (Fenner's, 2017).

En Australia se ha reportado, en aves silvestres migratorias y no migratorias como garzas, patos y aves playeras la presencia tanto de δ CoV y δ CoV en una frecuencia

aproximada del 16% (Chamings, 2018). Además, estudios llevados a cabo en Hong Kong y en China, han detectado δCoV en aves silvestres muertas (bubuls, tordos, munias, ojo blanco, gorrión, urraca, garza nocturna, pato silbón europeo y polla de agua común) (Woo, 2009, 2012).

Coronavirus caninos

Desde comienzo de este siglo, cuadros estacionales de traqueo bronquitis infecciosa pudieron asociarse al CoV respiratorio canino (CRCoV). Se ha demostrado que este virus se transmite por vía aerógena, principalmente entre animales hacinados, en perreras, causando dificultad respiratoria (disnea), inapetencia y neumonía que puede tener curso fatal (Fenner's, 2017).

La infección por este coronavirus tiene alcance mundial y se atribuye a 2 serotipos de CoV canino (CCoV) (I y II) los cuadros entéricos que provoca, similares a los causados por otros coronavirus. También se han identificado cepas pantrópicas de CCoV que causan fiebre elevada, diarrea, anorexia y vómitos que pueden inclusive cursar con síntomas nerviosos (ataxia y convulsiones, por ejemplo) (Fenner's, 2017).

Coronavirus felinos

La Peritonitis Infecciosa Felina (PIF) es una grave enfermedad que afecta al gato doméstico, es causada por 2 serotipos (I y II) del CoV felino (FCoV), con distinta distribución, siendo el segundo más raro. Igual que el coronavirus canino, la transmisión oro-fecal ocurre principalmente en lugares con alta densidad como albergues. La sintomatología cursa con anorexia, fiebre crónica, pérdida de peso llegando a causar problemas oculares y/o neurológicos. Se sugiere que durante una infección persistente del intestino, con excreción fecal crónica, se generaron suficientes mutaciones en el FCoV entérico para provocar la aparición del VFIP. Este nuevo virus puede modular la respuesta inmune para favorecer la replicación persistente, pero controlada, de macrófagos y monocitos. Este mecanismo provoca que animales bajo estrés o inmunosupresión, aparentemente sanos, sean susceptibles al desarrollo de la PIF, caracterizada por focos piogranulomatosos en varios órganos (Hartmann, 2005; Fenner's, 2017).

Table 1. Coronaviruses of relevant veterinary species.

Host	Virus	Genus	Organ affected	Clinical sign
Bovine 	Bovine coronavirus	<i>Betacoronavirus</i>	GI Tract Respiratory tract	Calf diarrhea Winter dysentery (bloody diarrhea) in adult cattle Bovine respiratory disease complex (shipping fever)
Porcine 	Transmissible gastroenteritis (TGE) virus	<i>Alphacoronavirus</i>	GI Tract	Profuse watery yellow diarrhea, Vomition, dehydration
	Porcine respiratory coronavirus	<i>Alphacoronavirus</i>	Respiratory tract	Mild respiratory disease or subclinical
	Porcine epidemic diarrhea virus (PEDv)	<i>Alphacoronavirus</i>	GI Tract	Watery diarrhea, vomition, dehydration
	Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus	<i>Betacoronavirus</i>	GI Tract CNS	Vomition, Diarrhea Wasting disease Encephalomyelitis
Feline 	Porcine deltacoronavirus	<i>Deltacoronavirus</i>	GI Tract	Gastroenteritis
	Feline enteric coronavirus	<i>Alphacoronavirus</i>	GI Tract	Mild gastroenteritis and diarrhea
	Feline infectious peritonitis virus	<i>Alphacoronavirus</i>	Respiratory tract Abdominal cavity CNS	Pneumonia Peritonitis Neurological disorder
Canine 	Canine coronavirus	<i>Alphacoronavirus</i>	GI Tract	Mild to severe gastroenteritis
	Canine respiratory coronavirus	<i>Betacoronavirus</i>	Respiratory tract	Kennel cough Pneumonia
Equine	Equine coronavirus	<i>Betacoronavirus</i>	GI Tract	Gastroenteritis
Camel	Middle East respiratory syndrome (MERS) coronavirus	<i>Betacoronavirus</i>	Respiratory tract	Mild respiratory signs
Chicken 	Avian infectious bronchitis virus	<i>Gammacoronavirus</i>	Trachea Kidney Reproductive tract	Tracheobronchitis, Rales Nephritis Decreased egg production

Figura 5. principales especies de coronavirus de interés veterinario

Coronavirosis relevantes para la salud pública

Es un hecho bien documentado que algunos coronavirus tienen potencial zoonótico, pueden atravesar la barrera entre especies y causar epidemias. Un ejemplo fue la aparición del SARS-CoV-1, que causó la muerte de un millar de personas en China (Chan-Yeun y Xu, 2003). Estudios demostraron la participación de varios animales, donde los murciélagos del género *Rhinolophidae* actúan como reservorio natural del SARS-CoV-1 y las civetas como el hospedador intermediario antes de afectar al hombre (Guang *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2016).

De modo similar, el MERS-CoV causó la muerte de un número parecido de personas pero alcanzando a distribuirse en cuatro continentes entre los años 2012-2019 (Su *et al.*, 2016), diferenciándose del SARS-CoV-1 por la participación del dromedario como huésped natural. Desde su identificación, el MERS-CoV se ha detectado en rumiantes (ovinos y caprinos) criados próximamente de dromedarios seropositivos (Reusken *et al.*, 2013). Se sugiere, como con los otros coronavirus zoonóticos, que el estrecho contacto entre dromedarios infectados y humanos aumenta la probabilidad de transmisión (De Wit *et al.*, 2016), donde el consumo de leche sin pasteurizar parece ser el factor principal para la transmisión zoonótica (Reusken, Farag *et al.*, 2014).

Sobre la pandemia del Covid-19, diferentes estudios apuntan a la participación del murciélago *Rhinolophus acuminatus* y el pangolín (Wacharapluesadee *et al*, 2021). El SARS-CoV-2 ha sido detectado infectando animales domésticos (perro y gato) sin cuadro clínico así como en animales felinos en zoológicos (tigres, leones), con signos compatibles a Covid-19 (OIE, 2020). Sacrificios masivos de visones infectados con este virus fueron realizados en granjas de países europeos donde este animal es criado para explotar su piel. Así, Países Bajos, Dinamarca y España, además de EE.UU., reportaron infecciones respiratorias y mortalidad en esta especie (Khbou, 2020).

Qiu (2020) ha propuesto que la vaca, búfalo, cabra, oveja, cerdo y otras especies silvestres podrían ser posibles hospedadores intermediarios del SARS-CoV-2, basados en análisis de la secuencia del receptor de la ACE.

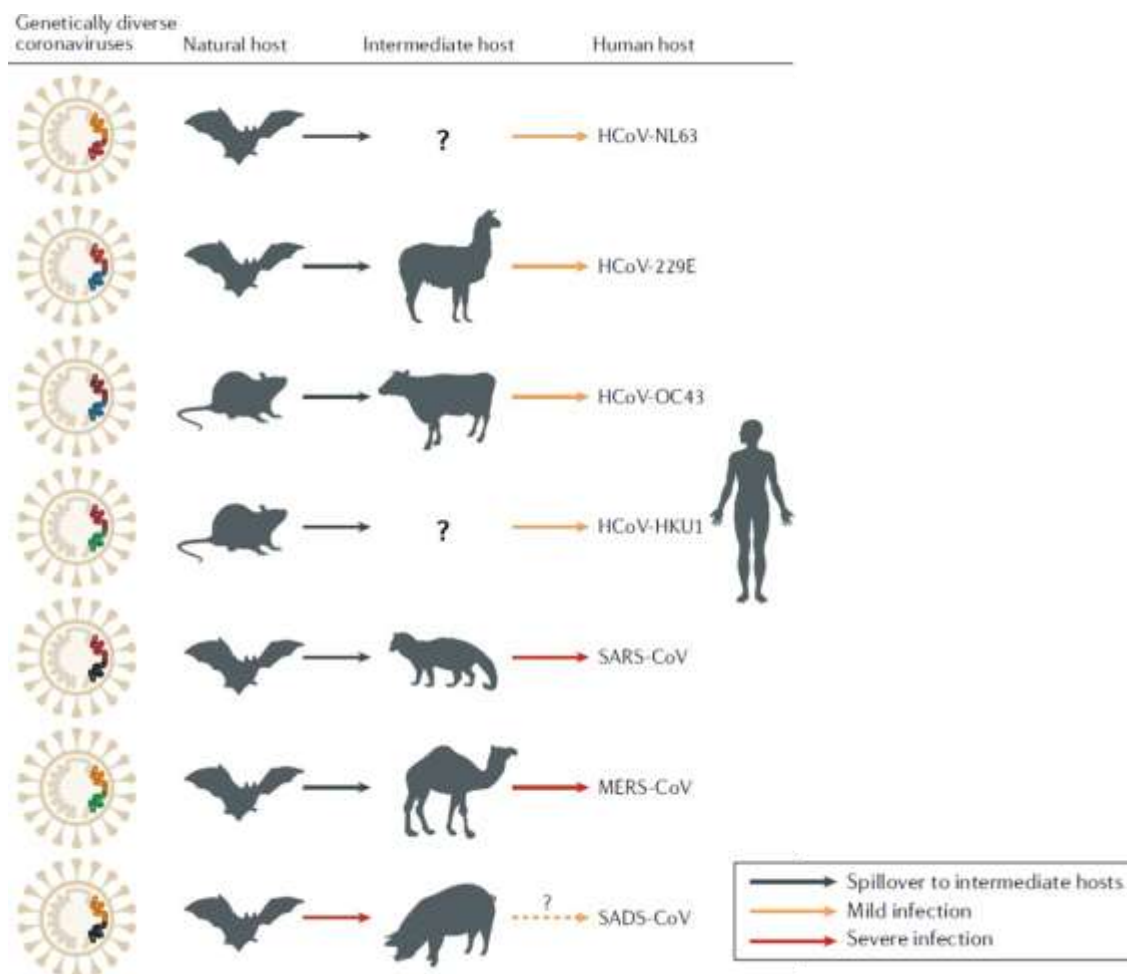


Figura 6. Transmisión interespecies de coronavirus zoonóticos. De un hospedero natural a uno intermediario (animal) antes del contagio a humanos. Fuente: Dhama *et al.*, 2020.

III MATERIALES Y METODOS

3.1 Lugar y tiempo de estudio

El estudio se inició durante el año 2021. Se trabajó con muestras de heces colectadas durante la campaña del 2015, obtenidas de alpacas neonatas de las comunidades campesinas de Patacallasaya (distrito de Sicuani), Quisini y Silly (distrito de Marangani) y también con muestras de lavado traqueal procedentes de la comunidad rural de Silly, obtenidas el 2012; todas estas localidades pertenecen a la provincia de Canchis, departamento de Cuzco-Perú. Las muestras fueron conservadas en congelación hasta su procesamiento y análisis en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Laboratorio de Microbiología y Parasitología (sección Inmunología).

3.2 Muestras biológicas

Se testaron 112 muestras provenientes de heces (n=80) y lavado pulmonar (n=32) para la detección de coronavirus en alpacas (n=100) y llamas (n=12 llamas) de 1 a 6 semanas de edad provenientes de 3 comunidades campesinas de la Provincia de Canchis, departamento del Cuzco (Cuadro 1). Las muestras de heces, con y sin diarrea, se colectaron los años 2014-2015 mientras que las muestras respiratorias (del pulmón durante la necropsia) durante el 2012.

Las muestras se trasladaron hasta el Laboratorio de diagnóstico Microbiológico de IVITA-Marangani (Cuzco-Perú) donde se conservaron a -20°C hasta completar la colecta. Posteriormente, estas 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 1. Características de las muestras incluidas en este estudio.

Especie	Tipo de muestra	Comunidad campesina (distrito)	Coordenadas geográficas / altitud*	Nº. de muestras	Periodo de Colecta
Alpacas	Heces	Silly (Marangani)	14°21'12''S, 71°10'17''W 3800 msnm±	33	2015
Alpacas	Heces	Quisini (Marangani)	14°39'72''S, 71°10'89''W 4300 msnm±	23	2015
Alpacas	Heces	Pataccalasaya (Sicuani)	14°16'9.5''S, 71°9'39.1''W 4700 msnm±	12	2015
Llamas	Heces	Silly (Marangani)	14°21'12''S, 71°10'17''W 3800 msnm±	12	2015
Alpacas	Lavado pulmonar	Silly (Marangani)	14°21'12''S, 71°10'17''W 3800 msnm±	32	2012
Total				112	

3.3 Metodología

3.3.1 Procesamiento de las muestras

Luego de descongelar, las muestras fecales pasaron por un proceso de clarificación y filtración para eliminar restos de alimentos que pudieran dificultar los procedimientos posteriores. Para esto se prepararon suspensiones fecales al 10% en PBS (tampón salino fosfato) a un pH de 7.2, homogenizaron y se sometieron a centrifugación por 5 minutos a 2500 x g; luego, el sobrenadante fue separado de microorganismos de mayor tamaño como bacterias, parásitos y hongos, con filtros de 0.22 µm. El sobrenadante fecal clarificado fue utilizado para la extracción del ARN viral. Las muestras de lavado pulmonar no sufrieron ningún tipo de tratamiento más que la descongelación.

3.3.2 Controles positivos

La técnica de RT-PCR fue estandarizada y validada empleando como controles positivos dos estirpes de Coronavirus de alpacas (AlpCoV), AlpCoV-SA44 [aislado en células LLC-MK2] y AlpCoV-HSN [virus en heces], ambas del género β CoV cuyas 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 (γ CoV) y el virus de la diarrea epidémica porcina (α CoV) proveniente del laboratorio de virología de la FMV-UNMSM.

3.3.3 Diseño de oligonucleótidos (primers/iniciadores)

Dentro del proyecto se seleccionaron y diseñaron primer en dos momentos específicos y cruciales del estudio para cumplir con los objetivos establecidos. Estos iniciadores son los que demarcaron el segmento genético a amplificar dentro de las reacciones de RT-PCR para la detección del virus en la muestra biológica mediante la amplificación de una región conservada del gen de L que codifica la polimerasa viral. Una vez detectado el virus, se diseñó nuevos primers para amplificar el gen S completo para su secuenciamiento y análisis filogenético o que al menos amplificaran la región S1 de la espícula que de la información suficiente sobre su variabilidad genética.

Para diseñar estos primer, se creó una fasta que contuvo la mayor diversidad de secuencias de nucleótidos de los genes L y S de los diferentes géneros y especies de CoV, para su posterior análisis por alineamiento múltiple. Después del alineamiento determinamos las regiones conservadas y variables de cada gen para el diseño correspondiente de nuestros oligonucleótidos. Para esto utilizamos los algoritmos de los programas EditSeq, Megalign y Primerselect del software Lasergene v.7.0 [DNASTAR Inc., Madison, WI, EUA], una vez diseñados como mínimo 15 pares de oligonucleótidos por cada gen, fueron sometidos a un alineamiento simple múltiple contra el banco de secuencias del GenBank utilizando el programa BLAST [www.ncbi.nlm.gov/BLAST] para seleccionar de forma general los primers que solo se unan al segmento diseñado de cada gen de virus. Una vez seleccionados fueron evaluados por la concentración de GC, formación de bucles, dímeros y heterodímeros utilizando el programa gratuito OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) de la empresa IDT (Integrated

DNA Technologies). Los oligonucleótidos con los mejores parámetros mostrados después de esta evaluación fueron adquiridos para el desarrollo del proyecto.

3.3.4 Extracción de ARN viral

Se realizó la extracción de ARN viral utilizando el kit innuPREP RNA Kit 2.0 (Analytik Jena, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. La extracción de ARN viral se obtuvo a partir de 300 µl del sobrenadante fecal clarificado o del lavado pulmonar descongelado. Al concluir con la extracción se resuspendió el ARN en 30 µl de agua libre de nucleasas y se incubó a 60°C por 15 minutos. Terminada la incubación, una alícuota fue cuantificada empleando el Qubit™ RNA HS Assay Kit (Invitrogen, USA), según las recomendaciones del fabricante. Finalmente, se conservó el RNA a -70°C hasta su utilización.

3.3.5 Producción de ADN complementario (ADNc) viral

Desde el ARN genómico extraído, se procedió a realizar la transcripción reversa (RT) para la producción de ADNc utilizando los oligonucleótidos reversos (antisensos) específicos para cada gen (L y S) (ver el cuadros 2 y 3). Brevemente, en un tubo de PCR se colocó 5 µL del ARN extraído e incubó a 95°C por 5 minutos. Inmediatamente, se enfrió la suspensión a 4°C por 5 minutos y se añadió 5 µL de la siguiente mezcla de reactivo: 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 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); 1.4 µL de agua libre de nucleasa y, finalmente, 0.2 µL de la enzima transcriptasa reversa (*ImProm-II Reverse Transcriptase*, Promega, Madison, Estados Unidos). La reacción se realizó en el termociclador Veriti 96 wells (Applied Biosystems, California – Estados Unidos), con una temperatura inicial de 25°C durante 5 minutos seguido de una temperatura de 42°C por 1 hora.

3.3.6 Detección de coronavirus

El ADNc obtenido previamente fue sometido a la reacción de *panRT-PCR*, para la detección de CoV, utilizando iniciadores específicos para la amplificación de una región conservada del gen de la polimerasa (L) (RdRp – ORF1b), presente en los 4 géneros de CoV, siguiendo el protocolo descrito por Moës *et al.* (2005) (Cuadro 2). El amplificado tiene un tamaño esperado de 251 o 280 pb. En seguida, estas mismas muestras fueron sometidas a una reacción de PCR anidado (nested PCR) utilizando oligonucleótidos específicos para identificar a los *Betacoronavirus*, siguiendo el protocolo descrito por Brandão (2004) (cuadro 2).

Cuadro 2. Iniciadores utilizados en las reacciones de RT- PCR y PCR anidado para la detección de CoV, β CoV y *Embecovirus*.

Virus	Gen	Técnica	Iniciador *	Secuencia (5'®3')	Posición	Tamaño amplicón (bp)	Referencia
Todos los CoV	ORF 1b RpRd	panRT-PCR	Cor-FW	ACWCARHTVAAYYTNAARTAYGC	14,922 – 14,944	251	Moës <i>et al.</i> 2005
			Cor-RV	TCRCAYTTDGGRTARTCCCA	15,153 – 15,172		
Todos los β -CoV	ORF 1b RpRd	panPCR anidado	Beta.CoV.F	ATTAGTGCWAAGAATAGAGCYCGCAC	14,946 – 14,971	227	Castilla <i>et al.</i> 2021
			Beta.CoV.R	TCACAYTTWGGRTARTCCCADCCCA	15,148 – 15,172		
<i>Embecovirus</i> (β CoV 1)**	ORF 1b RpRd	PCR anidado	CV2U.F	TACTATGACTGGCAGAATGTTTCA	14,996 – 15,019	136	Brandão. 2004
			CV2L.R	AACATCTTTAATAAGGCGRCGTAA	15,108 – 15,131		
Todos los CoV	ORF 1b RpRd	panRT-PCR	panCoV.F2	AARTTYTAYGGHGGYTGG		668	Hu <i>et al.</i> 2018
			panCoV.R1	GARCARAATTCATGHGGDCC			

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

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

3.3.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) – reacción de panRT-PCR

Para la reacción de PCR se utilizó 5 µL del ADNc y los siguientes reactivos del GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA): 12.5 µL del tampón de la enzima concentrada en 2X conteniendo una solución de cloruro de magnesio (50 mM; concentración final 3 mM), mezcla de dNTPs (10 mM; concentración final 0,2 mM) y 0.5 U de la enzima *Taq* polimerase; 1,5 µL de una solución conteniendo los 2 oligonucleótidos Cor-Fv y Cor-Rv (20 µM; concentración final 0,6 µM de cada iniciador); 6 µL de agua libre de nucleasas, dando un volumen final de 25 µL. Los reactivos fueron colocados en un termociclador Bio-Rad T100 PCR 36thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), con el siguiente ciclo: una desnaturalización inicial 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 almacenado a 4°C. (Cuadro 2).

3.3.8 Reacción de PCR anidado para la detección de *Betacoronavirus 1*

El producto de PCR obtenido fue enseguida sometido a una subsecuente reacción de PCR anidado, utilizando iniciadores específicos para identificar a todos los β CoV, siguiendo el protocolo desarrollado por Castilla *et al.* (2021). Para esta reacción de PCR fueron mezclados 5 µL del producto de la primera PCR y los reactivos que contiene el GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA): 12.5 µL del tampón de la enzima concentrada en 2X que incluye una solución de cloruro de magnesio (50 mM; concentración final 3 mM), mezcla de dNTPs (10 mM; concentración final 0,2 mM) y 0.5 U de la enzima *Taq* polimerase; 1,2 µL de una solución conteniendo los 2 oligonucleótidos β CoV.F y β CoV.R (20 µM; concentración final 0,4 µM de cada iniciador) y se completó con 6.3 µL de agua libre de nucleasas. La reacción fue llevada a cabo en un termociclador Bio-Rad T100 PCR 36thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) según el siguiente protocolo: desnaturalización inicial 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 almacenaje a 4°C. (Cuadro 2). El amplificado tiene un tamaño de 227 pb.

3.3.9 Reacción RT-PCR para la identificación del subgénero *Embecovirus* (*Betacoronavirus* tipo 1)

Las muestras positivas a β CoV fueron sometidas a una RT-PCR utilizando 5 μ L del DNAC de las muestras indicadas y los reactivos que contiene el GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA): 12.5 μ L del tampón de la enzima concentrada en 2X que incluye una solución de cloruro de magnesio (50 Mm; concentración final 3 Mm), mistura de dNTPs (10 Mm; concentración final 0,2 Mm) y 0.5 U de la enzima Taq polimerase; 1,2 μ L de la solución conteniendo los 2 oligonucleótidos CV2U.F y CV2L.R (20 μ M; concentración final 0,6 μ M de cada iniciador) y 6.3 μ L de agua libre de nucleasas, siguiendo el protocolo desarrollado por Brandão (2004) (Cuadro 2).

Todos los iniciadores fueron sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) y las reacciones realizadas en equipo Bio-Rad T100 PCR 37ermal cyclers (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) según el siguiente protocolo: desnaturación inicial 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 conservación a 4°C. El amplificado tiene un tamaño de 136 pb.

3.3.10 Electroforesis en gel de Agarosa

Los amplificados de las reacciones de *pan*RT-PCR y PCR anidado se sometieron a electroforesis en gel de agarosa para su análisis. Para esto se preparó un gel de agarosa al 1.5% en TBE 0.5X (Tris 0.089M; ácido bórico 0.0089 M; EDTA 0.025M, pH 8,3), el cual se mezcló con 5 μ L de bromuro de etidio (0,5 μ g/ μ L). Luego se aplicó 5 μ L del producto de PCR, sometió a 120V por 1 hora con tampón TBE 0,5X. Finalmente, el gel fue observado en transiluminador de luz UV (ultravioleta) y fotografiado con cámara digital. En cada corrida electroforética, el tamaño del amplificado fue estimado por comparación con un patrón de tamaño molecular 100 pb (Promega, Wisconsin-USA).

3.3.11 Identificación del género de coronavirus de las muestras negativas a *Betacoronavirus* 1

Para identificar el género de las muestras negativas al PCR para β CoV y para el subgénero *Embecovirus* se realizó secuenciamiento y análisis filogenético de una región

parcial del gen L (ORF1b), utilizándose los iniciadores para pancoronavirus diseñados por Hu *et al.*, 2018 (Cuadro 2). Para esto se tomaron en cuenta y enviaron a secuenciar las muestras que mostraron mayor intensidad (carga viral) al análisis electroforético en la primera reacción de *panRT-PCR*.

3.3.12 Identificación de las especies de coronavirus por secuenciamiento del gen S

Para el análisis filogenético se realizó la amplificación de gen S completo o la subunidad S1 de las muestras positivas a CoV. Para este análisis se seleccionaron las muestras positivas que presentaron mayor carga viral, determinado por la intensidad del fragmento amplificado en la reacción de *panRT-PCR* visualizado en el gel de agarosa. Para esto se diseñaron oligonucleótidos capaces de amplificar el gen S completo; cuando no se logró amplificar el gen completo usamos los diseñados para amplificar un fragmento de dominio S1 descrito en cuadro 3.

3.3.13 Amplificación del gen S

La amplificación de las secuencias del gen S para el análisis filogenético se realizaron a través de la obtención del ADNc viral conforme descrito anteriormente y en seguida se realizaron las reacciones de PCR y PCR semianidada utilizando los oligonucleótidos listados en el cuadro 3. Para la PCR fueron adicionados a los 5 µL del ADNc, 45 µL de la siguiente mistura de PCR: 30 µL de agua libre de nucleasas; 10 µL de tampón de enzima concentrada 5X; 2 µL de solución de cloruro de magnesio (50 mM; concentración final 3 mM), 1 µL de la mistura de dNTPs (10 mM; concentración final de 0,2 mM); 1,6 µL de la solución conteniendo los oligonucleótidos (20 µM concentración final de 0.8 µM) y 0,4 µL de la enzima Taq polimerasa (Ludwig Biotec). Las reacciones fueron realizadas en un termociclador (Veriti 96 wells), en el cual fue configurado para el siguiente ciclo: desnaturación 95°C/3 min, 40 ciclo de 94°C/40 seg, 55°C/1 min, 72°C/1min y 20 seg, seguido de una extensión final de 72°C/10 min, y conservación a 4°C /∞.

Para las muestras cuya intensidad de fragmento amplificado no era adecuado para la reacción de secuenciamiento, se realizó un PCR semi-anidado utilizando 5 µL del producto de la 1° PCR, con los iniciadores descritos en el cuadro 3 y la mistura descrita anteriormente para la PCR. Las reacciones fueron sometidas al siguiente ciclo:

desnaturación 95°C/3 min, 30 ciclos de 94°C/40 seg, 50°C/1 min y 72°C/1 min 20 seg, seguidos de una extensión final de 72°C/7 minutos, y conservación en 4°C/∞.

Cuadro 3. Iniciadores específicos para la amplificación y secuenciamiento de la región hipervariable de la subunidad S1 del gen S.

Gen	Técnica	Iniciador	Secuencia (5'– 3')	Posición	Tamaño del fragmento	Referencia
S1	1ª PCR	SE-1 (F)	GACCTACAATTGGGTAATTTGGG	851-873	651pb*	Rocha <i>et al.</i> , 2018
		AS (R)	TTGTAAATCAGTAGAACAAGTAG	1479-1501		
S1	Semi-nested-PCR	SE (F)	TGTCAGTTGTATTATAATTTACCTG	920-941	581pb*	
		AS (R)	TTGTAAATCAGTAGAACAAGTAG	1479-1501		

*pb = pares de base.

3.3.14 Secuenciamiento de los productos amplificados

Para determinar el género y variabilidad genética, los amplificados pendientes de clasificación se sometieron a secuenciamiento utilizando los iniciadores de las reacciones de RT y PCR, de ambas cadenas, descritos en los cuadros 2 y 3. El secuenciamiento genómico se realizó en la empresa MacroGen Inc. (Seúl, Corea) utilizando el método de Sanger.

3.3.15 Organización y análisis estadístico de los datos

Todos los datos fueron registrados y tabulados con el programa Office 2019, Microsoft Excel, y luego analizados con el Statistical Package For the Social Science (SPSS) vs. 25.0.

3.3.16 Análisis de secuencias de nucleótidos

Las secuencias de nucleótidos obtenidos del gen L y S se editaron y analizaron, utilizando los programas Chromas [Technelysium Pty Ltd] y Editseq, del paquete bioinformático Lasergene [DNASTAR Inc., Madison, WI – EE.UU.]. Luego se alinearon, utilizando el programa BLAST [www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi], con las

secuencias obtenidas del GenBank confirmando que son secuencia de CoV. Luego se creó un fasta de secuencias propias, empleando los algoritmos de los programas EditSeq, SeqMan y Megalign del software Lasergene v.7.0 [DNASTar Inc., Madison, WI, EUA], adicionando las secuencias con mayor porcentaje de identidad de nucleótidos obtenidas en el GenBank, agregando finalmente en la fasta las secuencias de referencia de cada género y especie de coronavirus para poder tener una fasta de secuencias rigurosa para el análisis. El análisis filogenético se realizó utilizando el programa MEGA v.7.0.14 (Kumar, Stecher y Tamura, 2016), calculando la distancia filogenética entre todas las secuencias de la fasta. El resultado se presentó en porcentajes de identidad de nucleótidos. 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. Las secuencias fueron comparados con cepas CoV de referencia obtenidas del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>).

3.3.17 Procesamiento de la información o de datos

Todos los datos se mostraron en la forma de dendogramas filogenéticos, detallando las relaciones filogenéticas entre todos los aislados, y a través de cuadros comparativos que indican la posición de cada mutación dentro del genoma del virus.

IV RESULTADOS

4.1 Detección de Coronavirus

De las 112 muestras analizadas, 100 (89.3%) fueron positivas a por los menos un género de CoV. No observamos mayor diferencia en la frecuencia de infección por CoV entre las muestras entéricas y respiratorias y ambos tipos de muestras presentaron altas tasas de infección del virus con un 87.5% (70/80) y 93.8% (30/32), respectivamente (Figura 7; Cuadro 4).

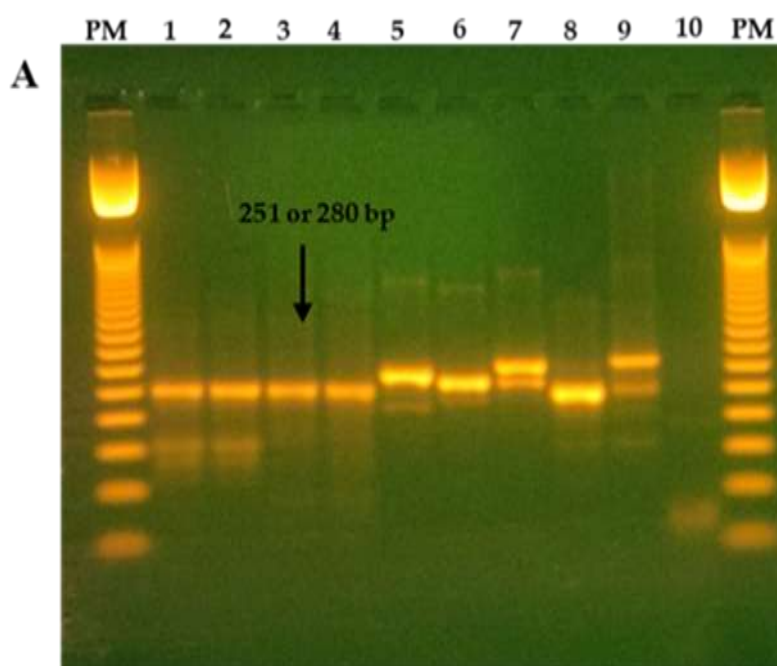


Figura 7. Detección por RT-PCR de pancoronavirus (CoV, gen RdRp) (251 o 280 pb). Carriles 1 al 9: muestras analizadas; carril 10: control negativo. PM: marcador de peso molecular 50 pb. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

Cuadro 4. Distribución de la infección por coronavirus entre las alpacas y llamas de comunidades de la provincia de Canchis de Cuzco.

Comunidad	Especie	Nº de muestras	Nº de muestras de coronavirus	
			Positivos (%)	Negativos (%)
Silly		33	29 (87.9%)	4 (12.1%)
Quisini	Alpacas	23	21 (91.3%)	2 (8.7%)
Pataccallasaya		12	9 (75%)	3 (25%)
Silly	Llama	12	11 (91.6%)	1 (8.4%)
*Silly	Alpacas	32	30 (93.8%)	2 (6.2%)
Total		112	100	12

*Muestras de lavado pulmonar.

4.2 Identificación del género y subgénero de CoV

El 31% del total de muestras positivas fueron clasificadas como género β CoV-subgénero *Embecovirus*, en el 59 % se identificó el género (β CoV) pero no el subgénero (Figuras 8 y 9). Por otra parte, 6 muestras positivas al RT-PCR de pancoronavirus fueron negativas a la identificación por PCR para β CoV, 4 de ellas eran de heces y las otras 2 del lavado pulmonar (Cuadro 5); todas estas fueron sometidas al protocolo de RT-PCR de pancoronavirus descrito por Hu *et al.* (2018) pero no se consiguió obtener un resultado positivo.

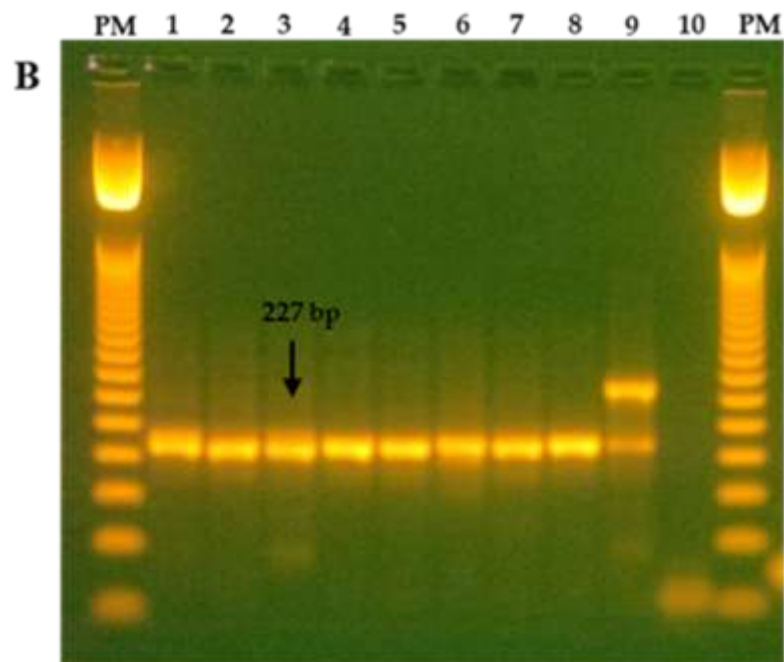


Figura 8. Detección por nested-PCR de *Betacoronavirus* (227 pb). Carriles 1 al 9: muestras analizadas; carril 10: control negativo. PM: marcador de peso molecular 50 pb. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

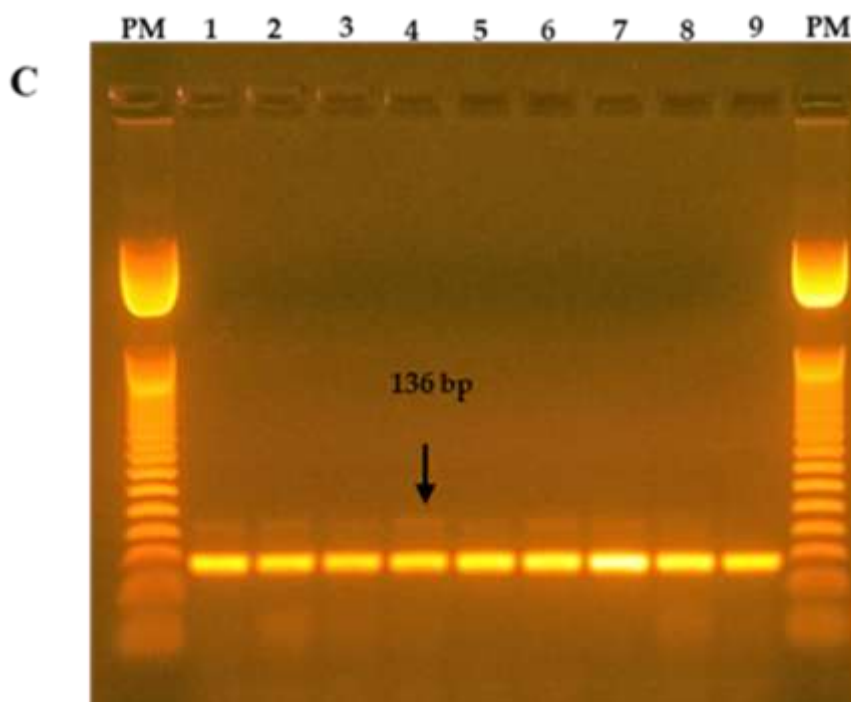


Figura 9. Detección por nested-PCR de *Embecovirus* (136 pb). Carriles 1 al 9: muestras analizadas; carril 10: control positivo. PM: marcador de peso molecular 50 pb. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

Las muestras con mayor intensidad en los productos de RdRp amplificados así como las cepas con perfiles de electroforesis inusuales fueron sometidas a aislamiento en cultivo celular (Vero-76). Esta línea celular, debido a una delección en el cromosoma 12, es deficiente en la secreción de interferón alfa o beta, lo que facilita el aislamiento viral (Desmyter *et al.*, 1968). Lamentablemente no se tuvo éxito debido a la coinfección con al menos otro virus de genoma RNA, destacando un Mammalian Orthoreovirus que a partir del pasaje celular 3 y 4 predominó desplazando a los CoV. Además, en las muestras entéricas también se detectó una alta frecuencia de Rotavirus A (datos no mostrados).

Mono infecciones por β -, α -, o un género aún no clasificado de CoV fueron identificados en 90, 1 y 1 de las muestras positivas, respectivamente. El género de CoVs no pudo ser identificado en 6 muestras con mono infecciones. Coinfecciones fueron detectadas en 2 muestras: una coinfección por β - y α -CoV, y el otro reveló un β - y un coronavirus murciélago actualmente sin clasificar por el ICTV (Cuadro 5).

Cuadro 5. Identificación del género y subgénero de CoV en muestras de heces y lavado pulmonar de alpacas y llamas de tres comunidades campesinas de la provincia de Canchis, departamento de Cuzco.

Comunidad	Especie	N° de muestras	Genero/subgénero de coronavirus				
			β CoV /EmbeCoV	β CoV /no identificado	Género/Subgénero no identificado	No clasificado (Megaderma Bat-CoV-like)	α CoV/DecacoCoV
Silly	Alpaca	29	10 (34.5%)	17 (58.6%)	2 (6.9%)	0	0
Quisini		21	4 (19%)	15 (71.4%)	2 (9.5%)	0	0
Pataccalasaya		9	1 (11.1%)	8 (88.9%)	0	0	0
Silly	Llama	11	1 (9%)	10 (91%)	0	0	0
*Silly	Alpaca	30	15 (50%)	9 (30%)	2 (6.6%)	1 (3.3%)	1 (3.3%)
Total		100	31 (31%)	59 (59%)	6 (6%)	1 (1%)	1 (1%)

*Muestras de lavado pulmonar.

4.3 Secuenciamiento y análisis filogenético de las muestras positivas a *Embecovirus*

El análisis de las secuencias de los productos del gen de la RdRp identificó 33 cepas del género β -CoV pertenecientes al subgénero *Embecovirus* y 2 α -CoV pertenecientes al subgénero *Decacovirus* (Figura 10); este subgénero sólo ha sido reportado en murciélagos. El análisis filogenético de 2 cepas reveló una distancia filogenética estrecha con otro coronavirus murciélago denominado *Megaderma BatCoV* (CoV aún no clasificado) (Figura 10).

Al análisis filogenético se observó que las secuencias nucleotídicas de las muestras CoV de heces de Quisini (S05, H07, H016, H019, H026), Silly (H117, H132, H218) y Pataccalasaya (H206) fueron 100% idénticas entre sí. Por otra parte, las muestras pulmonares de Silly (25K y 32K) presentaron 99% de identidad entre sí; al alineamiento con las 9 secuencias previas presentan un 93.1% y 95.7% de identidad, respectivamente.

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.

Al comparar las secuencias de alpacas de este estudio con las secuencias de las cepas de β 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. Las secuencias generadas en este estudio fueron depositadas en el GenBank bajo los números de acceso ON873839-ON873876 (Secuencias de RdRp de heces); OQ845932-OQ845939 (Secuencias RdRp de lavado pulmonar).

Las especies de coronavirus filogenéticamente más relacionadas con nuestras muestras de heces fueron algunos coronavirus bovino como BCoV-LUN (97.2%), BCoV-ENT (97%), BCoV (96.5%) y algunos coronavirus bovine like (BCoV-like) como son ApCoV (96.9%) y WtDCoV (96.4%).

Las especies de coronavirus filogenéticamente más relacionadas con nuestras muestras respiratorias fueron el BCoV (HT315, 96.9% a 97.7%) y BCoV-like (WtDCoV, 97.6%), siendo que BCoV-LUN presenta un 96.3% a 97.7% de identidad de nucleótidos.

Las muestras positivas a las reacciones de pancoronavirus y panbetacoronavirus pero negativas al subgénero *Embecovirus*, no se pudieron clasificar porque sus secuencias presentaron mucho ruido en la cromatografía (múltiples picos nucleotídicos en la misma posición).

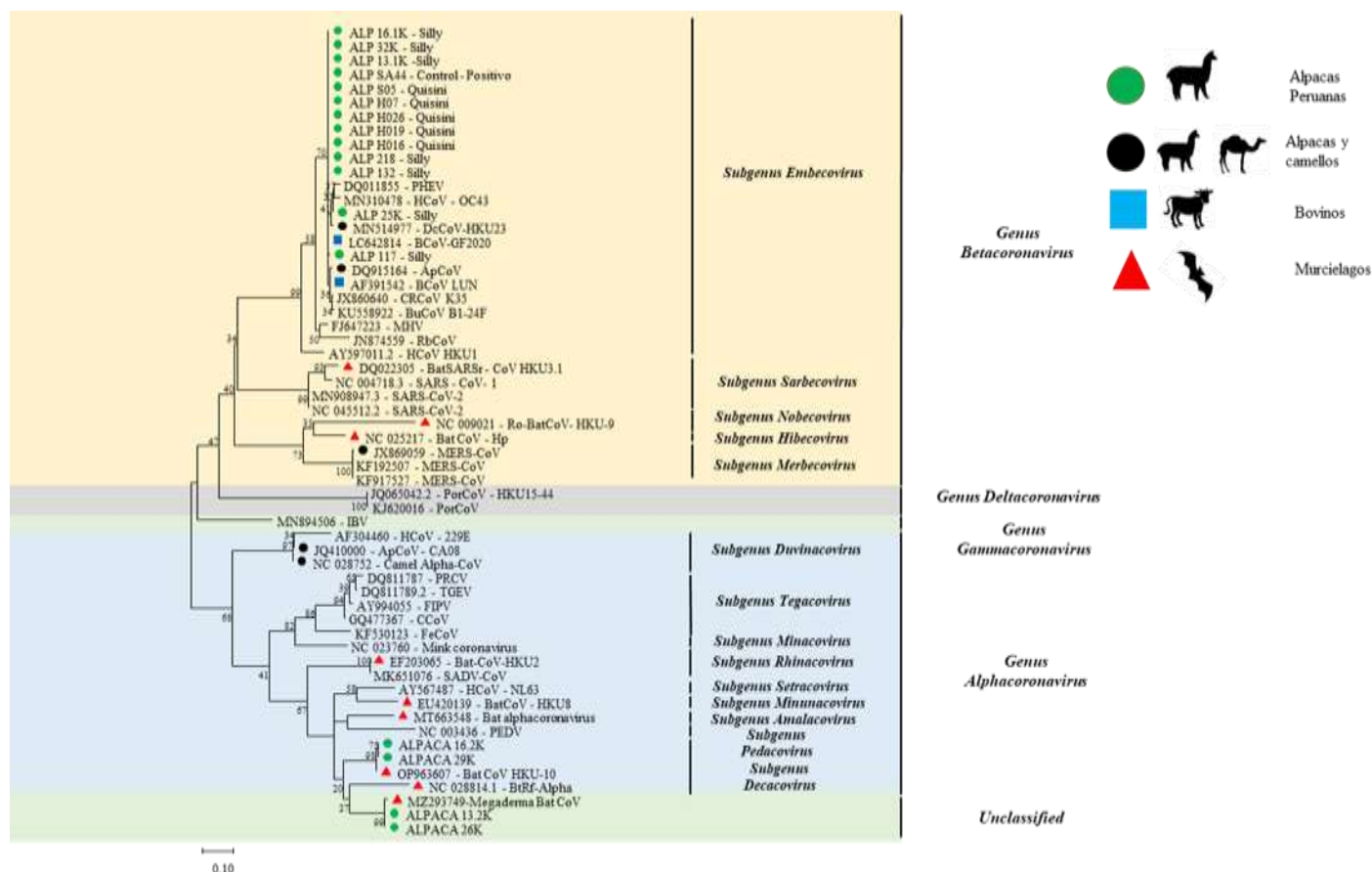


Figura 10. Dendrograma construido a partir de la secuencia parcial del gen ORF1 que codifica la RdRp de cepas de CoV detectadas en alpacas neonatas de comunidades rurales de Cusco positivas a *Embecovirus*. Bootstrap (1000 replicados), valores encima 75% son mostrados como nudos de rama. La escala de distancia está en sustituciones/sitio. Triángulos negros, cepas de alpaca CoV de Perú; círculos negros, cepa CoV de alpaca de EE. UU.; círculos abiertos, BCoV; triángulos abiertos, cepa CoV de dromedario de Asia.

4.4 Identificación de especies de coronavirus por secuenciamiento del gen S

Utilizando los primeros diseños para la amplificación del gen de la espícula (S) se pudo secuenciar y analizar con éxito las muestras del género β -CoV pertenecientes al subgénero *Embecovirus*. Se observó que las secuencias tienen entre 100-93% de identidad entre sí. También se confirma que nuestras cepas presentan entre un 98 a 100% de identidad de nucleótidos con las cepas de coronavirus bovinos-like (BCoV-Like) y entre 97.7% a 96.7% de identidad con BCoV (LUN y ENT) y ApCoV (Figuras 11 y 12; Cuadro 6).

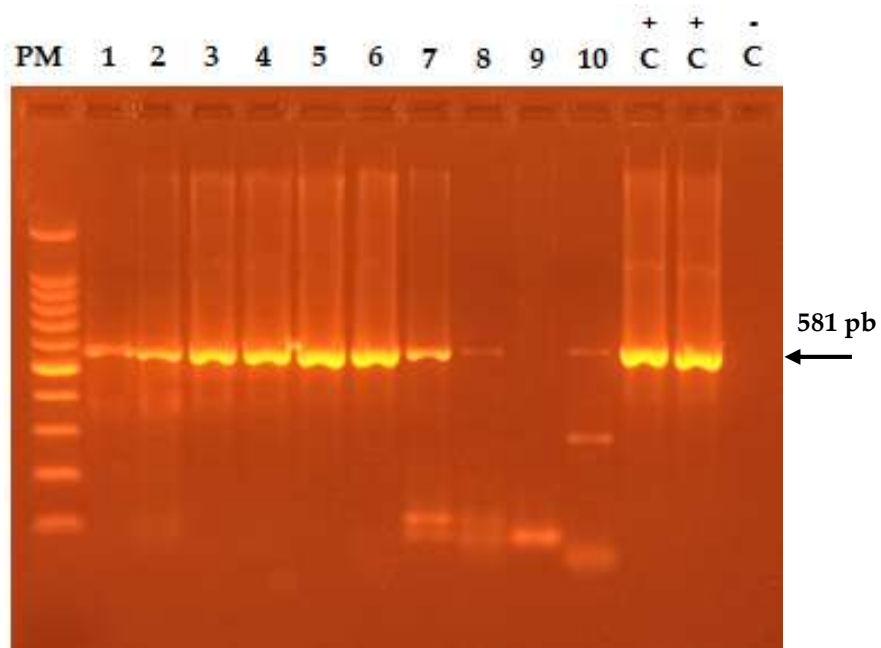


Figura 11. Detección por nested-PCR del gen S (581 pb). Carriles 1 al 10: muestras analizadas; C+: control positivo; C-: control negativo. PM: marcador de peso molecular 50 pb. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

Cuadro 6. Distancia filogenética representada en el porcentaje de identidad de nucleótidos entre las secuencias del dominio S1 del gen S (Spike) de alpacas peruanas y el resto de las estirpes de coronavirus las cuales se agrupan en los 4 géneros del virus.

Porcentaje de identidad																														
	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	
1		99.0	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	95.7	96.3	89.0	59.3	96.7	65.7	97.3	93.3	85.0	86.0	96.7	96.0	85.0	52.2	48.0	47.5	85.0	45.5	1
2	1.0		95.8	95.8	95.8	95.8	95.8	95.8	95.8	95.8	95.8	97.7	97.7	92.0	60.8	97.7	65.8	98.7	95.0	88.1	89.4	97.3	97.1	87.3	56.2	50.8	50.9	89.1	49.2	2
3	7.1	4.4		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	97.1	97.2	91.9	66.3	96.9	71.0	96.5	93.4	88.2	89.9	96.2	95.4	86.6	60.4	56.0	56.1	88.8	52.2	3
4	7.1	4.4	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	97.1	97.2	91.9	66.3	96.9	71.0	96.5	93.4	88.2	89.9	96.2	95.4	86.6	60.4	56.0	56.1	88.8	52.2	4
5	7.1	4.4	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	97.1	97.2	91.9	66.3	96.9	71.0	96.5	93.4	88.2	89.9	96.2	95.4	86.6	60.4	56.0	56.1	88.8	52.2	5
6	7.1	4.4	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	97.1	97.2	91.9	66.3	96.9	71.0	96.5	93.4	88.2	89.9	96.2	95.4	86.6	60.4	56.0	56.1	88.8	52.2	6
7	7.1	4.4	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	97.1	97.2	91.9	66.3	96.9	71.0	96.5	93.4	88.2	89.9	96.2	95.4	86.6	60.4	56.0	56.1	88.8	52.2	7
8	7.1	4.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	97.1	97.2	91.9	66.3	96.9	71.0	96.5	93.4	88.2	89.9	96.2	95.4	86.6	60.4	56.0	56.1	88.8	52.2	8
9	7.1	4.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	97.1	97.2	91.9	66.3	96.9	71.0	96.5	93.4	88.2	89.9	96.2	95.4	86.6	60.4	56.0	56.1	88.8	52.2	9
10	7.1	4.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	97.1	97.2	91.9	66.3	96.9	71.0	96.5	93.4	88.2	89.9	96.2	95.4	86.6	60.4	56.0	56.1	88.8	52.2	10
11	7.1	4.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		97.1	97.2	91.9	66.3	96.9	71.0	96.5	93.4	88.2	89.9	96.2	95.4	86.6	60.4	56.0	56.1	88.8	52.2	11
12	4.5	2.3	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0		98.9	92.5	66.0	98.9	70.5	98.5	95.1	89.4	89.9	97.8	96.8	87.9	60.9	56.1	55.9	88.8	52.9	12
13	3.8	2.3	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	1.1		92.4	66.5	99.1	70.7	98.3	94.9	88.9	90.1	97.7	97.2	87.4	60.7	56.0	56.2	88.6	52.7	13
14	12.0	8.6	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	7.9	8.1		65.3	92.5	72.7	93.3	92.0	87.8	95.8	92.2	91.9	86.5	61.1	56.3	56.4	87.8	52.2	14
15	59.5	56.4	45.3	45.3	45.3	45.3	45.3	45.3	45.3	45.3	45.3	45.9	44.9	47.1		66.0	63.9	66.3	64.5	65.2	64.0	66.0	67.0	64.4	61.6	55.6	58.9	55.4	49.8	15
16	3.4	2.3	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	1.1	0.9	7.9	45.9		70.5	98.0	94.9	89.2	90.2	97.4	96.3	87.7	60.6	55.6	55.4	88.9	53.0	16
17	46.3	46.0	37.0	37.0	37.0	37.0	37.0	37.0	37.0	37.0	37.0	37.7	37.4	34.2	49.8	37.7		70.7	70.1	70.8	70.9	70.8	69.4	70.2	60.2	57.3	57.9	71.8	49.8	17
18	2.7	1.4	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	1.6	1.7	7.0	45.2	2.0	37.5		96.0	89.6	90.9	98.2	97.7	88.0	60.4	55.6	56.1	89.9	53.0	18
19	7.1	5.2	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	5.1	5.3	8.5	48.8	5.3	38.5	4.1		88.9	89.4	94.6	94.3	87.4	59.9	56.3	55.9	89.1	51.9	19
20	16.9	13.1	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0	11.5	12.1	13.5	47.4	11.7	37.4	11.3	12.1		86.5	89.4	89.1	94.4	62.1	56.8	56.6	88.9	50.6	20
21	15.8	11.5	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	10.8	4.4	49.9	10.6	37.3	9.8	11.6	15.1	89.4		89.1	85.0	62.9	57.0	56.2	86.2	53.4	21	
22	3.4	2.8	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	2.2	2.3	8.3	45.9	2.7	37.2	1.9	5.6	11.5	11.6		97.4	87.9	60.7	55.6	56.4	88.8	52.7	22
23	4.1	2.9	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	3.3	2.8	8.6	44.0	3.8	39.5	2.3	5.9	11.9	12.0	2.7		87.9	60.6	55.8	56.4	88.6	52.2	23
24	16.9	14.0	14.9	14.9	14.9	14.9	14.9	14.9	14.9	14.9	14.9	13.4	14.0	15.1	49.1	13.6	38.4	13.2	14.0	5.9	17.1	13.4	13.4		61.9	57.3	57.4	88.2	51.1	24
25	77.2	67.1	57.5	57.5	57.5	57.5	57.5	57.5	57.5	57.5	57.5	56.2	56.6	55.8	54.5	56.9	57.2	57.4	58.4	53.8	53.1	56.6	56.9	54.2		62.0	61.6	61.7	49.8	25
26	89.3	81.4	67.0	67.0	67.0	67.0	67.0	67.0	67.0	67.0	67.0	66.6	66.9	66.1	68.5	67.8	63.6	67.8	66.1	64.7	64.8	67.8	67.3	63.6	53.4		79.1	56.5	45.9	26
27	91.6	80.8	67.0	67.0	67.0	67.0	67.0	67.0	67.0	67.0	67.0	67.3	66.4	66.2	60.2	68.6	62.7	66.9	67.4	65.7	67.0	66.1	66.1	63.7	54.3		24.7	56.7	44.4	27
28	107.1	12.0	12.0	12.3	12.3	12.3	12.3	12.3	12.3	12.3	12.3	12.3	12.5	13.5	47.4	12.1	35.6	11.0	11.9	12.1	15.5	12.3	12.5	13.1	54.5	65.7	65.6		51.1	28
29	102.1	88.2	78.3	78.3	78.3	78.3	78.3	78.3	78.3	78.3	78.3	76.1	76.6	77.8	83.5	75.6	85.1	75.6	79.0	82.7	74.1	75.8	78.1	81.1	83.8	99.2	106.7	81.7		29
	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	
																				</										

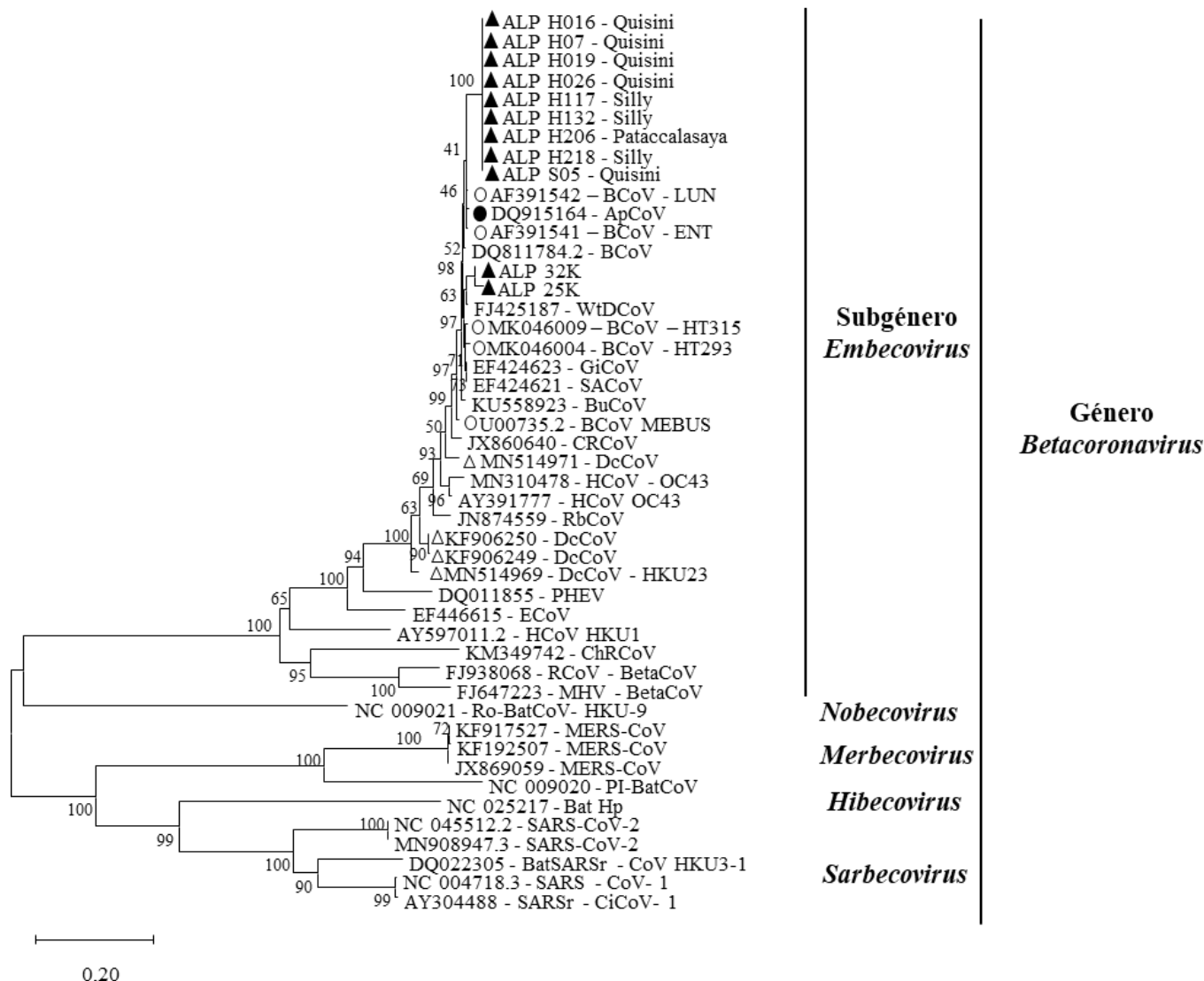


Figura 12: Dendrograma construido a partir de la secuencia parcial del dominio S1 del gen que codifica la proteína S (Spike) de cepas de CoV detectadas en alpacas de comunidades rurales de Cusco. Bootstrap (1000 replicados), valores encima 75% son mostrados como nudos de rama. La escala de distancia está en sustituciones/sitio. Triángulos negros, cepas de alpaca CoV de Perú; círculos negros, cepa CoV de alpaca de EE. UU.; círculos abiertos, BCoV; triángulos abiertos, cepa CoV de dromedario de Asia.

Finalmente, como contamos con datos sobre la geolocalización de los sitios de muestreo decidimos compararla con la otros estudios; 3 sobre la diversidad de coronavirus en animales silvestres en países de Latinoamérica y otro sobre la distribución de murciélagos en nuestro país. Se observó que los animales que estudiamos y *Desmodus*

rotundus comparten el mismo hábitat y que estos murciélagos son hospederos naturales de coronavirus (Figura 13).

En resumen, nuestros datos muestran una alta frecuencia de CoV, así como una alta diversidad genética de géneros y subgéneros de CoV que infectan a las alpacas y llamas, en los que predominó el género β -CoV de subgénero desconocido y en menor medida el subgénero *Embecovirus* especie BCoV-Like. La detección de α CoV subgénero *Decacovirus*, sugiere un nuevo papel para los murciélagos en la diseminación y transmisión de CoV poco comunes a las alpacas criadas en las zonas rurales muestreadas (Canchis-Cuzco) que además tienen potencial patogénico letal.

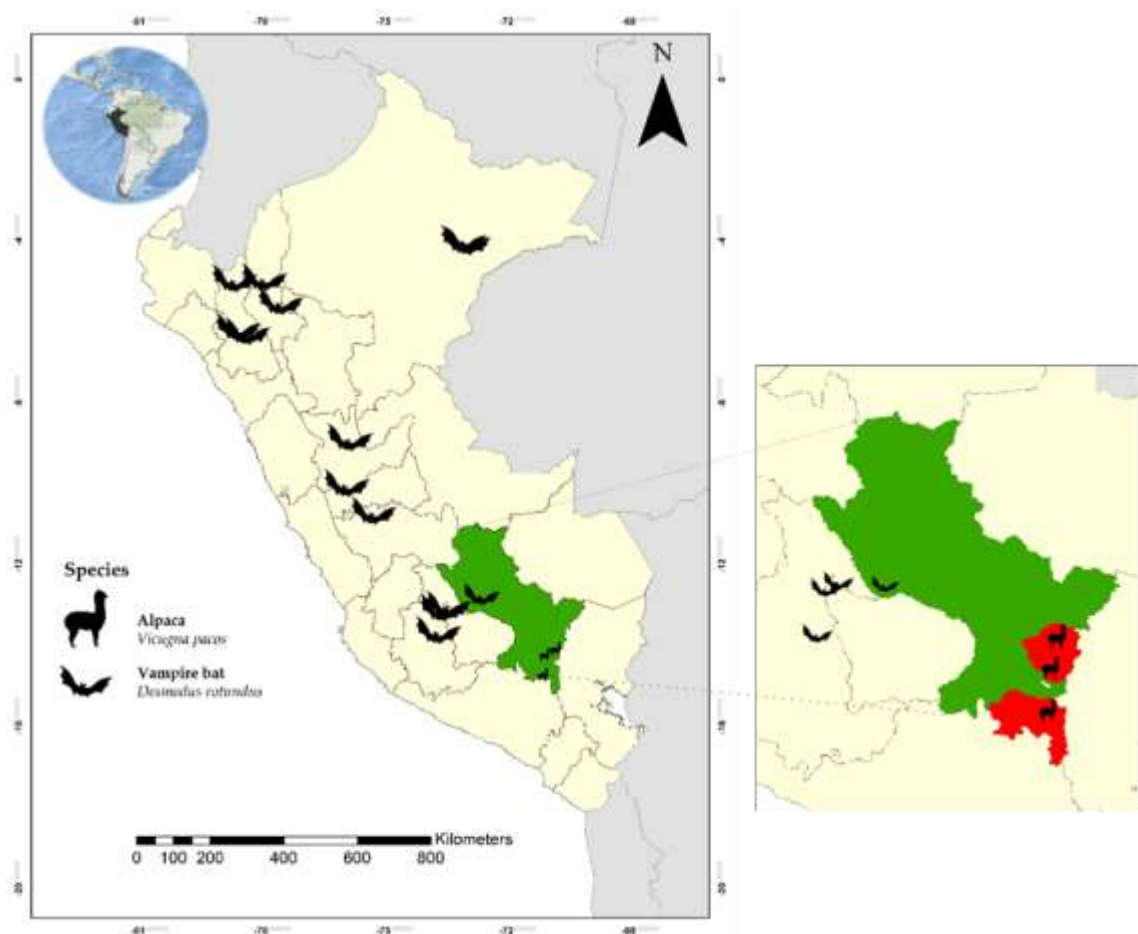


Figura 13. Distribución geográfica del murciélago *Desmodus rotundus* (Quintana *et al.*, 2007) y sitios de detección de CoV, en muestras de alpacas neonatas (presente estudio) y de murciélagos (Bergner *et al.*, 2019, 2020, 2021) en Perú.

V DISCUSIÓN

Diferentes especies de CoV son considerados entre los principales patógenos que infectan a animales de producción causando cuantiosas pérdidas económicas, principalmente por enfermedades respiratorias y entéricas. Lo mismo ocurre con animales salvajes como aves, felinos, cánidos, murciélagos, ratones, entre otros (Cebra *et al.*, 2003; Amer, 2018; Cui *et al.*, 2019; Khbou *et al.*, 2021).

Aunque en nuestro país se han reportado infecciones por CoV, en la forma de cuadros entéricos en alpacas y llamas recién nacidas, con altas tasas de morbilidad y mortalidad (Castilla *et al.*, 2021; Cebra *et al.*, 2003; Cirilo *et al.*, 2012; Rojas *et al.*, 2016; Rocha *et al.*, 2018], en general los estudios moleculares sobre infecciones virales que afectan a los camélidos sudamericanos son escasos (López *et al.*, 2011; Luna, 2012; Lucas *et al.*, 2016; Rojas *et al.*, 2016), además de incluir animales bajo sistemas de manejo, status sanitario y nutricional diferentes a los observados en comunidades campesinas (Luna, 2012; Luna *et al.*, 2015; Rocha *et al.*, 2018). Aunque las comunidades rurales poseen más del 80 % de la población alpaquera, sus sistemas de producción son extensivos y su acceso al crédito y la capacitación son limitados (Ho, 2017).

El alto precio de la fibra de alpaca garantiza a los pobladores altoandinos un capital de ahorro, para cuando las demás actividades económicas a las que se dedican (principalmente la agricultura y el comercio) no satisfacen sus necesidades (MINAGRI, 2020). Por esto, las infecciones virales que causan altas tasas de morbilidad y mortalidad tienen repercusiones económicas que degradan la calidad de vida de la población altoandina (Chau, 2017). Además, y no menos importante, la aparición y reemergencia de virus con potencial zoonótico, puede poner en peligro la salud de los agricultores y sus comunidades (Khbou *et al.*, 2021; Islam *et al.*, 2021; Cui *et al.*, 2023).

Se detectó CoV en todos los sitios de muestreo, una elevada positividad general de casi 90%, por lo que se puede concluir que este virus está ampliamente distribuido en la región de muestreo y que circula entre las alpacas y llamas neonatas causando cuadros entéricos y respiratorios. Esta tasa de infección es superior a la reportada anteriormente en la sierra de nuestro país. Por ejemplo, en comunidades rurales de Junín, con sistema extensivo, se reportó una frecuencia de 53.3% (Lucas *et al.*, 2016) mientras que en el IVITA-Maranganí de Cuzco, con sistema semi-intensivo, CoV fue detectado con una tasa

aún menor (26.8 %) (Rocha *et al.*, 2018). Además, Luna reportó una frecuencia de 66.7% y 18.3 % en muestras del centro experimental La Raya y en fincas en Puno, respectivamente (Luna, 2012; Luna *et al.*, 2015). Como los animales de estos estudios fueron criados extensivamente en una ubicación geográfica de gran altitud, con pastos pobres, rodeados de fauna típica de ese nicho ecológico particular y en condiciones insalubres se puede argumentar que las diferencias en las tasas de infección pueden deberse al diseño de los estudios (estrategia de muestreo y el método de diagnóstico empleado, por ejemplo) o a características propias de las poblaciones animales muestreadas (densidad animal, el sistema de producción así como el manejo sanitario, por ejemplo (Cebra *et al.*, 2003; Whitehead y Anderson 2006; Rojas *et al.*, 2016; Islam *et al.*, 2021). Sobre este último punto en particular, es conocido que los productores no registran datos sanitarios (número de animales enfermos ni tratamientos) ni parámetros zootécnicos (peso al nacer, por ejemplo), apenas el número de animales muertos y sólo cuando las pérdidas son considerables.

Respecto a la detección de CoV en heces de animales positivos pero asintomáticos, Oma *et al.* (2016), estudiando la dinámica de la infección por CoVs bovinos, reportaron que los terneros pueden eliminar virus en heces y en secreción nasal hasta por 5 y 4 semanas, respectivamente. Es durante estos periodos de tiempo que, principalmente los individuos asintomáticos pero también aquellos que se recuperaron de la infección, diseminan activamente el virus. Nosotros no podemos descartar que estos animales no contribuyan en la diseminación de este patógeno.

Por otra parte, no podemos descartar que los iniciadores empleados en este estudio para la detección de β CoV (Castilla *et al.*, 2021), sean más específicos que los empleados por otros autores y hayan aportado a la detección de un mayor número de casos positivos.

Respecto a la clasificación de los géneros de CoV identificados, en USA y en nuestro país se han reportado principalmente los β CoV, emparentados filogenéticamente con especies de origen bovino “Coronavirus Bovino-like” (BCoV-like) (Jin *et al.*, 2007; Luna *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2018). En nuestro estudio el género β CoV también fue predominante, con un 90% (90/100).

El subgénero *Embecovirus* (antiguamente denominado β CoV linaje A, *Betacoronavirus* tipo 1) fue identificado en sólo en el 31% de todos los CoV detectados

(31/100) (Cuadro 5). Esta frecuencia es inferior a la obtenida por Luna *et al.* los años 2012 y 2015 y por Rocha *et al.* 2018 quienes lo identificaron en la totalidad de muestras diarreicas CoV positivas que analizaron. Esto podría deberse a razones geográficas, de proximidad con otras especies animales, a características propias del virus o a que está ocurriendo una sucesión entre ellos. Vale resaltar que en las muestras respiratorias se observó una mayor frecuencia de este subgénero respecto a las provenientes de heces (15/30 vs 16/70). Dada la rápida capacidad de evolución de los CoV (Cui *et al.*, 2019), esto lo podemos atribuir a diferencias en el tropismo histológico de este subgénero o a que otros subgéneros se fueron adaptando a sus hospedadores volviéndose más prevalentes con el paso de los años.

En concordancia con los estudios de Luna *et al.*, (2015) y Rocha *et al.*, (2018), el análisis filogenético de los *Embecovirus* secuenciados y su comparación con otras especies de los 4 géneros de CoV confirmó su identidad, mostró una relación muy estrecha entre ellas (Figura 10), sugiriendo que estos se originaron muy probablemente de bovinos.

Respecto al 6% (6/100) de muestras a las que no conseguimos atribuir el género de CoV, ni el 59% (59/100) al que no pudimos asignarle el subgénero de β CoV correspondiente, podemos afirmar que existe una destacada diversidad de géneros y subgéneros de CoV infectando a las alpacas y llamas muestreadas (Cuadro 5).

Los intentos por atribuir el género y subgénero a las muestras no identificadas no rindieron frutos debido a la baja calidad de los cromatogramas y al uso de iniciadores degenerados (Cuadro 2) (Moës *et al.*, 2005, Hu *et al.*, 2018) que, aunque son muy útiles para fines diagnósticos, no lo son para el secuenciamiento. En ese sentido, creemos que el intento fallido de aislamiento de estos virus en células Vero puede deberse al largo período de almacenamiento de las muestras. Estos resultados apuntan a que en nuestros futuros estudios deberemos emplear técnicas de secuenciamiento masivo (NGS) para comprender mejor la epidemiología y la diversidad genética de los CoV que afectan a las alpacas peruanas.

Este estudio reporta el primer brote respiratorio mortal por CoV en Latinoamérica, sugiriendo un rol patogénico nuevo para los CoV en camélidos sudamericanos. La literatura reporta un antecedente de CoV causando un síndrome respiratorio agudo en

alpacas de California, USA, pero de mucha menor magnitud (Crossley *et al.*, 2010). Dos años después, el mismo grupo de investigación secuenció el genoma de este virus y lo identificó como un α CoV (*Duvinacovirus*), muy similar a un coronavirus humano común (HCoV-229E). Los autores sugieren que la transmisión del virus ocurrió entre los humanos y las alpacas aunque no llegan a dilucidar cual fue hospedero inicial y si se trató de zoonosis o antropozoonosis (Crossley *et al.*, 2012). Experimentalmente, se ha logrado la replicación y transmisión del MERS-CoV y SARS-CoV-2, otros coronavirus respiratorios, en alpacas y llamas (Adney *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2021).

La secuenciación de cuatro cepas (Alp16K-01, 13K-01, 25K y 32K), clasificadas como β -CoV/*Embecovirus*, mostró una estrecha relación con BCoV (Figura 10). Este resultado era esperado ya que estudios previos sugieren que la alpaca y los BCoV surgieron de un ancestro común, o que los BCoV se transmiten continuamente a la alpaca, como ha ocurrido con otras especies animales (Luna *et al.*, 2015; Rocha *et al.*, 2018; Jin *et al.*, 2007). Aunque los camélidos sudamericanos han estado en contacto con el ganado bovino desde la llegada de los españoles, los informes de enfermedades asociadas al BCoV pueden deberse a la aparición de nuevas variantes de CoV que son patógenas tanto para bovinos como para camélidos (Cebra *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2007). Estos resultados también pueden explicarse por las condiciones geográficas y climatológicas, donde diferentes especies animales (cerdos, vacas, llamas, caballos, etc.) coexisten y pastan en proximidad (Espada *et al.*, 2010).

Dos cepas (16K-02 y 29K) se clasificaron como α -CoV/*Decacovirus*, estrechamente relacionadas con un CoV de murciélago (CoV de murciélago/HKU; OP963607) (Figura 10). Este no es el primer informe de infecciones por α -CoV en alpacas; sin embargo, el subgénero informado anteriormente era *Duvinacovirus*, más emparentado con el coronavirus humano 229E (HCoV-229E), causador del resfrío común y prevalente en humanos (Crossley *et al.*, 2012). Estudios genéticos posteriores sugieren que el progenitor de HCoV229E es un CoV de murciélago africano y que los camélidos fueron probablemente los primeros huéspedes intermediarios que facilitaron la transmisión a los humanos (Cui *et al.*, 2019; Islam *et al.*, 2021; Corman *et al.*, 2015; Tao *et al.*, 2017). Esto abre la posibilidad que los murciélagos oriundos de la región de estudio pueden estar transmitiendo varias especies de CoV, con la capacidad de adaptarse y

volverse patógenos para nuevas especies hospederas. Hasta donde sabemos, nuestro estudio es el primero en informar infecciones por α -CoV en alpacas peruanas.

No se identificó un género en un par de muestras (13K-02 y 26K); estas secuencias son genéticamente muy similares a una cepa CoV de murciélago (MZ293749/*Megaderma* CoV) que permanece sin clasificar (Figura 10). Esto confirma tanto la gran diversidad de esta familia viral como el papel de los murciélagos como reservorio importante de estos y otros virus no clasificados (Anthony *et al.*, 2017; Bueno *et al.*, 2022; Chidoti *et al.*, 2022).

Un resultado importante sobre las muestras de origen respiratorio fue la ocurrencia de coinfecciones, con múltiples géneros y subgéneros de CoV confirmados mediante la secuenciación de un fragmento de RdRp (Cuadro 5; Figura 10). Se ha demostrado que la recombinación genómica es un factor importante en la evolución de los CoV, pero requiere que diferentes cepas virales infecten el mismo huésped y la misma célula al mismo tiempo (Cui *et al.*, 2019; So *et al.*, 2019; Su *et al.*, 2016). En otras palabras, la coinfección simultánea facilita la recombinación. Así, se ha demostrado que una cepa de MERS-CoV que infectaba a los dromedarios africanos (DcCoV-HKU23, subgénero *Embecovirus*) era un recombinante de CoV de bovinos, conejos (RbCoVHKU14) y roedores (So *et al.*, 2019). En resumen, sugerimos que los CoV que circulan en las alpacas están en recombinación activa, favoreciendo la evolución de β -, α - y otros géneros de CoV aún no detectados o clasificados.

Debido a que los murciélagos están ampliamente distribuidos en Perú, probablemente sean la fuente de las cepas de CoV en las muestras 13K-02, 16K-02, 26K y 29K. Por ejemplo, *Desmodus rotundus*, un murciélago hematófago observado hasta los 3680 msnm habita en la región sur andina (Cusco) (Quintana y Pacheco, 2007); las alpacas y llamas también comparten este espacio geográfico (Figura 13) (Bergner *et al.*, 2019; Quintana y Pacheco, 2007). La invasión de su hábitat, la dieta hematófaga, la migración debido al cambio climático y la proximidad a las alpacas pueden favorecer la propagación entre estas especies. Tampoco podemos descartar la transmisión por el uso de fertilizantes con guano de murciélago o por beber agua contaminada (Anthony *et al.*, 2017; Chidoti *et al.*, 2022).

La transmisión de virus enzoóticos, de murciélagos a animales domésticos, se ha documentado anteriormente. El BatCoV relacionado con HKU2 causó una epizootia a gran escala de enfermedad entérica en China, lo que resultó en la muerte de más de 24 000 lechones. Este brote demostró que el contagio de un BatCoV puede causar una enfermedad grave en el ganado. Diferentes especies de murciélagos suelen ser una de las fuentes más comunes para la mayoría de los CoV que afectan a los humanos (Tao *et al.*, 2017).

Los huéspedes intermediarios de estos CoV suelen pertenecer a otras especies de mamíferos (Islam *et al.*, 2021) y como en general los murciélagos y los humanos no comparten el mismo espacio ecológico, existe la necesidad de que otros mamíferos actúen como huéspedes de enlace entre estos. Bergner *et al.*, usando metagenómica, caracterizaron comunidades virales a partir de muestras salivales y fecales de murciélagos salvajes capturados en cuevas y árboles ubicados en áreas andinas y selváticas de los departamentos de Cusco, Ayacucho y Amazonas en Perú (Figura 13) (Bergner *et al.*, 2019). Este trabajo, pionero en identificar 18 familias virales que infectan murciélagos de la selva y la región andina peruana, destacó a los Coronaviridae como los que presentaron mayor carga viral cuando comparados con otras familias virales (Bergner *et al.*, 2019). Poco tiempo después, este mismo grupo publicó el primer genoma completo de un α -CoV obtenido de murciélagos de la Amazonía peruana (Bergner *et al.*, 2020). Más recientemente, Bueno *et al.* analizaron otros CoV de murciélago identificados en América Latina por Bergner *et al.*, clasificándolos como α -CoV, subgénero *Amalacovirus*, y también informó de coinfecciones con múltiples α -CoV (incluidos 3 subgéneros desconocidos) (Bueno *et al.*, 2022; Bergner *et al.*, 2021). Toda esta información apunta a que un subconjunto de CoVs que infectan a las alpacas neonatales, específicamente α -CoV, subgénero *Decacovirus*, y otros CoVs de género desconocido, son producto de la transmisión interespecie entre murciélagos y alpacas. Esto también puede explicarse porque el área donde se identificaron estos α -CoV es endémica de murciélagos (Crossley *et al.*, 2012; Bergner *et al.*, 2019) y está cerca del área de recolección de nuestro estudio (Figura 13).

Finalmente, las prácticas de manejo, el destete o transporte (Meyer *et al.*, 2014), y la presencia de alpacas gestantes sanas (asintomáticas) positivas para CoV (Rodríguez *et al.*, 2022) podrían desempeñar un papel importante en la transmisión viral a animales

susceptibles y puede contribuir a la contaminación ambiental y la persistencia. Es importante considerar el potencial zoonótico de este virus y cómo podría afectar la salud pública en la población altoandina, que cuenta con escasos recursos económicos y limitados servicios sanitarios básicos, así como acceso a servicios de salud adecuados. La reciente aparición de especies de β -CoV con elevado potencial patogénico, e inclusive letal, como el MERS-CoV y SARS-CoV-2 dejan clara la importancia de estos virus en la salud pública y ha intensificado los estudios para comprender mejor los mecanismos de evolución, transmisión y diseminación que favorecen los saltos interespecies, evidenciándose recombinaciones entre diferentes géneros y subgéneros de CoVs. Por ejemplo, en camellos se ha reportado eventos de recombinación entre β CoV del subgénero *Embecovirus* y entre los subgéneros *Embecovirus* y *Merbecovirus* (Sabir *et al.*, 2016; So *et al.*, 2019).

El secuenciamiento parcial del gen S nos permitió observar una elevada similitud nucleotídica entre nuestras cepas por lo que todas ellas pueden ser consideradas como pertenecientes a una misma variante. Así mismo, estas cepas también se muestran muy relacionadas a cepas BCoV-like. Rocha *et al* (2018) atribuyen el origen bovino a que durante las estaciones frías, los camélidos son transportados de las zonas más altas y con escaso forraje hasta otras más bajas donde se crían bovinos y ovejas, donde esta proximidad favorecería la transmisión del virus. Además, la falta de condiciones sanitarias adecuadas y la visita de personal veterinario a diferentes localidades o el transporte de los animales a los centros de investigación para tratar a los animales también puede estar contribuyendo.

Respecto a nuestros resultados de infecciones mixtas con diferentes géneros de CoV, recientemente se reportó que durante la pandemia por la COVID-19, en una granja de minks americanos (*Neovison vison*) ocurrió la co-infección de un *Alphacoronavirus* y el SARS-CoV-2 en animales aparentemente sanos. Esto es interesante porque se sugiere que es posible la recombinación entre un alfa y un *Betacoronavirus* y que esto podría aumentar el riesgo de transmisión entre el hombre y animales (Wasniewski *et al.*, 2023).

Además, y aunque no sea el objetivo de este trabajo, Castillo *et al* (2021), reportaron la coinfección simultánea de Coronavirus con otros virus (Rotavirus y Mammalian Orthoreovirus) en camélidos sudamericanos. Esto también fue observado en el trabajo de Wasniewski *et al* (2023) quienes reportaron co-infección entre un Calicivirus

y el SARS-CoV-2. El impacto de estas coinfecciones virales en la evolución del cuadro clínico no es claro y debería de investigarse como parte de la exclusión competitiva viral.

Este trabajo espera contribuir a la identificación de los coronavirus que afectan a los camélidos sudamericanos, que sirva de base para adoptar mejores medidas preventivas y que concientice sobre la necesidad de adoptar un sistema de vigilancia epidemiológica molecular para este y otros virus con demostrado potencial zoonótico.

VI CONCLUSIONES

1. Las deficientes condiciones sanitarias observadas en las comunidades campesinas de Canchis-Cuzco, pueden favorecer que la infección por CoV sea elevada.
2. Las alpacas neonatas son susceptibles a la infección por diferentes géneros y subgéneros de CoV, mostrando estos virus una amplia, y poco estudiada, variabilidad genética en la zona de estudio.
3. Los β CoV, subgénero sin clasificar, son los CoV que predominan, independientemente que las muestras tengan origen intestinal o pulmonar.
4. La identificación de α CoV, aunque en baja frecuencia, sugiere que estos podrían relacionarse a enfermedades respiratorias en alpacas.
5. Es posible la co-infección con diferentes géneros de CoV en alpacas. El papel de este hallazgo en el curso y la gravedad de los cuadros respiratorios es desconocido.
6. Aunque los bovinos son el más probable origen de la mayoría de CoV detectados en este estudio, los murciélagos también puede estar contribuyendo a las transmisión interespecies. La crianza con otras especies domésticas y la invasión del nicho ecológico de especies silvestres, respectivamente, podrían explicar estos hallazgos.

VII RECOMENDACIONES

- Es esencial monitorear los CoV continuamente para comprender mejor su dinámica en el medio ambiente.
- Realizar nuevas investigaciones que contemplen secuenciar el gene S de los CoV y de su respectivo receptor en alpacas para confirmar la transmisión interespecies.
- Dado el potencial zoonótico de algunos CoV, como el causador de la reciente pandemia por Covid-19, se debe de plantear ante las autoridades sanitarias la necesidad crear un sistema de vigilancia molecular epidemiológica de CoV para detectar la emergencia de variantes patogénicas para las alpacas y transmisibles a humanos.

VIII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Adney DR, Bielefeldt-Ohmann H, Hartwig AE, Bowen RA. Infection, Replication, and Transmission of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Alpacas. *Emerg Infect Dis*. 2016 Jun;22(6):1031-7.
2. Ali MA, Shehata MM, Gomaa MR, Kandeil A, El-Shesheny R, Kayed AS, El-Taweel AN, Atea M, Hassan N, Bagato O, Moatasim Y, Mahmoud SH, Kutkat O, Maatouq AM, Osman A, McKenzie PP, Webby RJ, Kayali G. Systematic, active surveillance for Middle East respiratory syndrome coronavirus in camels in Egypt. *Emerg Microbes Infect*. 2017 Jan 4;6(1):e1.
3. Alsaadi EAJ, Neuman BW, Jones IM. A Fusion Peptide in the Spike Protein of MERS Coronavirus. *Viruses*. 2019 Sep 5;11(9):825.
4. Alsaadi EAJ, Neuman BW, Jones IM. Identification of a Membrane Binding Peptide in the Envelope Protein of MHV Coronavirus. *Viruses*. 2020 Sep 22;12(9):1054.
5. Ameghino E, De Martini J. 1991. Mortalidad de crías de alpacas. *Bol Div IVITA*. Lima. P 71-80.
6. Amer HM. 2018. Bovine-Like coronavirus in domestic and wild ruminants. *An. Heal. Res Rev*. 19, 113-124.
7. Anthony SJ, Johnson CK, Greig DJ, Kramer S, Che X, Wells H, Hicks AL, Joly DO, Wolfe ND, Daszak P, Karesh W, Lipkin WI, Morse SS; PREDICT Consortium; Mazet JAK, Goldstein T. Global patterns in coronavirus diversity. *Virus Evol*. 2017 Jun 12;3(1):vex012.
8. Bedell K, Buchaklian AH, Perlman S. Efficacy of an Automated Multiple Emitter Whole-Room Ultraviolet-C Disinfection System Against Coronaviruses MHV and MERS-CoV. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2016 May;37(5):598-9.
9. Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR. 2012. Mechanisms of Coronavirus Cell Entry Mediated by the Viral Spike Protein. *Viruses* 4, 1011-1033.
10. Bentancor AB, Halperin P, Flores M, Iribarren F. 2009. Antibody response to the epsilon toxin of *Clostridium perfringens* following vaccination of *Lama glama* crias. *J Infect Dev Ctries*. 3:624-627.

11. Bergner LM, Orton RJ, da Silva Filipe A, Shaw AE, Becker DJ, Tello C, Biek R, Streicker DG. Using noninvasive metagenomics to characterize viral communities from wildlife. *Mol Ecol Resour*. 2019 Jan;19(1):128-143.
12. Bergner LM, Orton RJ, Streicker DG. Complete Genome Sequence of an *Alphacoronavirus* from Common Vampire Bats in Peru. *Microbiol Resour Announc*. 2020 Aug 20;9(34):e00742-20.
13. Bergner LM, Mollentze N, Orton RJ, Tello C, Broos A, Biek R, Streicker DG. Characterizing and Evaluating the Zoonotic Potential of Novel Viruses Discovered in Vampire Bats. *Viruses*. 2021 Feb 6;13(2):252.
14. 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.
15. 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, São Paulo SP, p. 90, 2004.
16. Brian DA, Baric RS. 2005. Coronavirus Genome Structure and Replication. *CTMI* 287:1-30.
17. Bueno LM, Rizotto LS, Viana AO, Silva LMN, de Moraes MVDS, Benassi JC, Scagion GP, Dorlass EG, Lopes BLT, Cunha IN, Melinski R, de Alvarenga IF, Leitão GL, Rodrigues RC, Pereira IMDS, Dos Santos LDN, Fisch F, Rocha AD, Port D, Pereira GS, Greatti A, Barnabé ACS, Tsukamoto J, Hingst-Zaher E, de Azevedo SM Jr, Telino WR Jr, Branco JO, Ometto T, de Araujo J, Arns CW, Ferreira HL, Durigon EL. High genetic diversity of *Alphacoronaviruses* in bat species (Mammalia: Chiroptera) from the Atlantic Forest in Brazil. *Transbound Emerg Dis*. 2022 Sep;69(5):e2863-e2875.
18. Burimuah V, Sylverken A, Owusu M, El-Duah P, Yeboah R, Lamptey J, Frimpong YO, Agbenyega O, Folitse R, Tasiame W, Emikpe B, Owiredo EW, Oppong S, Adu-Sarkodie Y, Drosten C. Sero-prevalence, cross-species infection and serological determinants of prevalence of Bovine Coronavirus in Cattle, Sheep and Goats in Ghana. *Vet Microbiol*. 2020 Feb;241:108544.
19. Castilla D, Escobar V, Ynga S, Llanco L, Manchego A, Lázaro C, Navarro D, Santos N, Rojas M. Enteric Viral Infections among Domesticated South American

- Camelids: First Detection of Mammalian Orthoreovirus in Camelids. *Animals* (Basel). 2021 May 19;11(5):1455.
20. Caswell JL, Williams KJ. 2016. Respiratory System in Kennedy J, Palmer's. 2016. *Pathology of Domestic Animals: Volumen 2*. 6th edition. 465-591.
 21. Cavanagh D. 2005. Coronaviruses in poultry and other birds. *Av Pat.* 34:6, 439-448.
 22. 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.
 23. Chamings A, Nelson TM, Vibin J, Wille M, Klaassen M, Alexandersen S. 2018. Detection and characterization of coronavirus in migratory and non-migratory Australian wild birds. *Scientific Reports*. 8:5980.
 24. Chan-Yeung M, Xu RH. 2003. SARS: Epidemiology. *Respirology*.8(s1). S9-S14.
 25. Chau R. Agricultura familiar y desarrollo alpaquero en el sur del Perú: Auditoría técnica de las experiencias de Soluciones Prácticas (2005-2015). *Soluciones Prácticas*, 2017. 116 p. Disponible en: <https://practicalaction.org.pe/agricultura-familiar-y-desarrollo-alpaquero-en-el-sur-del-peru/> (accessed on 31/07/2023).
 26. Chen Q, Wang L, Zheng Y, Zhang J, Guo B, Yoon KJ, Gauger PC, Harmon KM, Main RG, Li G. Metagenomic analysis of the RNA fraction of the fecal virome indicates high diversity in pigs infected by porcine endemic diarrhea virus in the United States. *Virol J*. 2018 May 25;15(1):95.
 27. Chidoti V, De Nys H, Pinarello V, Mashura G, Missé D, Guerrini L, Pfukenyi D, Cappelle J, Chiweshe N, Ayoub A, Matope G, Peeters M, Gori E, Bourgaire M, Liégeois F. Longitudinal Survey of Coronavirus Circulation and Diversity in Insectivorous Bat Colonies in Zimbabwe. *Viruses*. 2022 Apr 9;14(4):781.
 28. 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.
 29. Cirilo CE, Manchego SA, Rivera H, Rosadio AR. 2012. Coexistencia de virus y bacterias en neumonías agudas en alpacas neonatas. *Rev. Invest. Vet. Perú*. 23(3): 317–335.
 30. Corman VM, Baldwin HJ, Tateno AF, Zerbinati RM, Annan A, Owusu M, Nkrumah EE, Maganga GD, Oppong S, Adu-Sarkodie Y, Vallo P, da Silva Filho LV, Leroy EM, Thiel V, van der Hoek L, Poon LL, Tschapka M, Drosten C,

- Drexler JF. Evidence for an Ancestral Association of Human Coronavirus 229E with Bats. *J Virol.* 2015 Dec;89(23):11858-70.
31. Couceiro JN, Mendes GS, Silva RC. 2015. Viroses respiratórias. *Virologia Humana*, 3ra ed. P.302-349.
 32. 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.
 33. Cui J, Li F, Li Shi Z. 2019. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews*. Vol 17.
 34. Cui X, Wang Y, Zhai J, Xue M, Zheng C, Yu L. Future trajectory of SARS-CoV-2: Constant spillover back and forth between humans and animals. *Virus Res.* 2023 Apr 15;328:199075.
 35. 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.
 36. 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.
 37. 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.
 38. Desmyter J, Melnick JL, Rawls WE. 1968. Defectiveness of Interferon Production and of Rubella Virus Interference in a Line of African Green Monkey Kidney Cells (Vero). *J. Virol.* 2 (10), 955–961.
 39. Dhama K, Patel S, Sharun K, Pathak M, Tiwari R, Yatoo M, Malik Y, Sah R, Rabaan A, Panwar P, Singh K, Michalak I, Chaicumpa W, Martinez-Pulgarin D, Bonilla-Aldana K, Rodriguez-Morales A. 2020. SARS-CoV-2 jumping the species barrier: Zoonotic lessons from SARS, MERS and recent advances to combat this pandemic virus. *Travel Medicine and Infectious Disease.* 37:101830
 40. 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.
 41. Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguière AM, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Müller S, Rickerts V, Stürmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerr HW.

- Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003 May 15;348(20):1967-76.
42. 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.
 43. Farag EA, Reusken CB, Haagmans BL, Mohran KA, Stalin Raj V, Pas SD, Voermans J, Smits SL, Godeke GJ, Al-Hajri MM, Alhajri FH, Al-Romaihi HE, Ghobashy H, El-Maghraby MM, El-Sayed AM, Al Thani MH, Al-Marri S, Koopmans MP. High proportion of MERS-CoV shedding dromedaries at slaughterhouse with a potential epidemiological link to human cases, Qatar 2014. *Infect Ecol Epidemiol*. 2015 Jul 15;5:28305.
 44. Fenner's 2017. *Coronaviridae*. *Veterinary Virology*. Academic Press
 45. Fung TS, Liu DX. 2019. Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction. *Annu. Rev. Microbiol*. 73, 529-557.
 46. 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.
 47. Guan Y, Zheng BJ, He YQ, Liu XL, Zhuang ZX, Cheung CL, Luo SW, Li PH, Zhang LJ, Guan YJ, Butt KM, Wong KL, Chan KW, Lim W, Shortridge KF, Yuen KY, Peiris JS, Poon LL. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science*. 2003 Oct 10;302(5643):276-8.
 48. 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.
 49. Hartmann K. 2005. Feline Infectious Peritonitis. *Vet Clin Small Anim*. 35: 39-79.
 50. Hilgenfeld R, Peiris M. 2013. From SARS to MERS: 10 years of research on highly pathogenic human coronaviruses. *Ant. Res*. 100: 286-295.
 51. 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>.
 52. Hofmann H, Simmons G, Rennekamp AJ, Chaipan C, Gramberg T, Heck E, Geier M, Wegele A, Marzi A, Bates P, Pöhlmann S. Highly conserved regions within the

- spike proteins of human coronaviruses 229E and NL63 determine recognition of their respective cellular receptors. *J Virol*. 2006 Sep;80(17):8639-52.
53. Holmes 1999. *Coronaviruses (Coronaviridae)*. Academic Press. P 298.
 54. Hsu TH, Liu HP, Chin CY, Wang C, Zhu WZ, Wu BL, Chang YC. Detection, sequence analysis, and antibody prevalence of porcine Deltacoronavirus in Taiwan. *Arch Virol*. 2018 Nov;163(11):3113-3117.
 55. Hu H, Jung K, Wang Q, Saif L, Vlasova A. 2018. Development of a one-step RT-PCR assay for detection of pancoronaviruses (α -, β -, γ -, and δ -coronaviruses) using newly designed degenerate primers for porcine and avian fecal samples. *J Virol Meth*. 0166-0934.
 56. Hulswit RJ, de Haan CA, Bosch BJ. Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes. *Adv Virus Res*. 2016;96:29-57.
 57. Hung AL, Alvarado A, Lopez T, Perales R, Li O, Garcia E. 1991. Detection of antibodies to mycoplasmas in South American Camelids. *Res. Vet. Sci*. 51:250-253.
 58. Hurdiss DL, Drulyte I, Lang Y, Shamorkina TM, Pronker MF, van Kuppeveld FJM, Snijder J, de Groot RJ. Cryo-EM structure of coronavirus-HKU1 haemagglutinin esterase reveals architectural changes arising from prolonged circulation in humans. *Nat Commun*. 2020 Sep 16;11(1):4646.
 59. [ICTV] International Committee on Taxonomy of Viruses. 2019. [Internet], [18 agosto 2019]. Disponible en: <https://ictv.global/taxonomy>
 60. [ICTV] International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus taxonomy 2021. [Internet], [20 diciembre 2021]. Disponible en: <https://ictv.global/taxonomy>
 61. [ICTV] International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus taxonomy 2023. [Internet], [20 julio 2023]. Disponible en: <https://ictv.global/report/chapter/coronaviridae/coronaviridae>
 62. [INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2007. Censos Nacionales 2007. [Internet], [25 noviembre 2021]. Disponible: <http://censos.inei.gob.pe/Censos2007/IndDem#>
 63. Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). 2012. Características Socioeconómicas del Productor Agropecuario en el Perú - IV Censo Nacional Agropecuario 2012. 44 p
 64. Islam A, Ferdous J, Sayeed MA, Islam S, Kaisar Rahman M, Abedin J, Saha O, Hassan MM, Shirin T. Spatial epidemiology and genetic diversity of SARS-CoV-

- 2 and related coronaviruses in domestic and wild animals. PLoS One. 2021 Dec 15;16(12):e0260635.
65. Jin et al., 2007. Analysis of the genome sequence of an alpaca coronavirus. Virology 365:198-203.
 66. Khamassi Khbou M, Daaloul Jedidi M, Bouaicha Zaafouri F, Benzarti M. Coronaviruses in farm animals: Epidemiology and public health implications. Vet Med Sci. 2021 Mar;7(2):322-347.
 67. 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.
 68. 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.
 69. Klumperman J, Locker JK, Meijer A, Horzinek MC, Geuze HJ, Rottier PJ. Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. J Virol. 1994 Oct;68(10):6523-34.
 70. Laude H, Van Reeth K, Pensaert M. Porcine respiratory coronavirus: molecular features and virus-host interactions. Vet Res. 1993;24(2):125-50.
 71. Li F, 2016. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike. Annu. Rev. Virol. 3(1):237-261.
 72. 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.
 73. Lucas L Juan R., Morales C Siever, Barrios A Manuel, Rodríguez G José, Vásquez C María, Lira M Boris et al. 2016. Patógenos Involucrados en Casos Fatales de Diarrea en Crías de Alpaca de la Sierra Central del Perú. Rev. Investig. Vet. Perú; 27(1): 169-175.
 74. 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.
 75. Luna L, Brandão PE, Maturrano L, Rosadio R, Silva FDF, Soares RM, Gregori F. *Betacoronavirus* 1 in alpacas (*Vicugna pacos*) in the High Peruvian Andes. Small Rumin Res. 2015 Dec;133:7-9.

76. Maier HJ, Bickerton E, Britton P. 2015. Coronaviruses. Methods and Protocols. Humana Press.285 p.
77. 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.
78. Martín C, Pinto CE, Cid MD. 2010. Camélidos sudamericanos: Estado sanitario de sus crías. Rev. Complutense Cienc. Vet. 4(1): 37-50.
79. Masters P. 2006. The molecular biology of Coronaviruses. Adv Virus Res. 66:193-292.
80. Masters P, Perlman S. 2013. Coronaviridae. Fields Virology, 6th ed., vol I. p. 825-858.
81. Meyer B, Müller MA, Corman VM, Reusken CB, Ritz D, Godeke GJ, Lattwein E, Kallies S, Siemens A, van Beek J, Drexler JF, Muth D, Bosch BJ, Wernery U, Koopmans MP, Wernery R, Drosten C. Antibodies against MERS coronavirus in dromedary camels, United Arab Emirates, 2003 and 2013. Emerg Infect Dis. 2014 Apr;20(4):552-9.
82. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI). 2019. [Internet], [20 julio 2023]. Disponible en: <https://www.ana.gob.pe/2019/consejo-de-cuenca/mantaro/MA>
83. [MIDAGRI] 2022. [Internet], [17 julio 2022]. Disponible en: <https://www.midagri.gob.pe/portal/495-dn-alpaca/11180-p-alpaca>
84. MINAGRI (Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego/Peru). Situación de las actividades de crianza y producción de camélidos sudamericanos en el Peru. MINAGRI. Available online: <https://www.midagri.gob.pe/portal/datero/40-sector-agrario/situacion-de-las-actividades-de-crianza-y-producci/298-camelidos-sudamericanos?start=2> (Revisado el 31/07/2023).
85. Moës E, Vijgen L, Keyaerts E, Zlateva K, Li S, Maes P, Pyrc K, Berkhout B, van der Hoek L, Van Ranst M. A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. BMC Infect Dis. 2005 Feb 1;5:6.
86. Moreno-Morales G, Maximiliano J, Siuce J, Chero A, Medina G, Luna L et al . Evaluation of the immunogenicity of one recombinant protein for the prevention of acute pneumonia in alpacas (*Vicugna pacos*). Rev. Investig. Vet. Perú. 2021 Jul 32(4): e20924.

87. Natsuaki S, Goto K, Nakamura K, Yamada M, Ueo H, Komori T, Shirakawa H, Uchinuno Y. Fatal winter dysentery with severe anemia in an adult cow. J Vet Med Sci. 2007 Sep;69(9):957-60.
88. [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
89. Oma VS, Traven M, Alenius S, Myrmel M, Stokstad M. 2016. Bovine coronavirus in naturally and experimentally exposed calves, viral shedding and the potential for transmission. Virol J 13:100.
90. [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>
91. Patterson EI, Prince T, Anderson ER, Casas-Sanchez A, Smith SL, Cansado-Utrilla C, Solomon T, Griffiths MJ, Acosta-Serrano Á, Turtle L, Hughes GL. Methods of Inactivation of SARS-CoV-2 for Downstream Biological Assays. J Infect Dis. 2020 Oct 1;222(9):1462-1467.
92. Pérez D. 2006. Genotipificación y subtipificación de *Clostridium perfringens* aislados de crías de alpacas muertas por enterotoxemia. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 91 p.
93. Quintana H, Pacheco V. 2007. Identificación y distribución de los murciélagos vampiros del Perú; Lima. Rev. Perú. Med. Exp. Salud Publica, 24, 81-88.
94. 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.
95. Reusken CB, Haagmans BL, Müller MA, Gutierrez C, Godeke GJ, Meyer B, Muth D, Raj VS, Smits-De Vries L, Corman VM, Drexler JF, Smits SL, El Tahir YE, De Sousa R, van Beek J, Nowotny N, van Maanen K, Hidalgo-Hermoso E, Bosch BJ, Rottier P, Osterhaus A, Gortázar-Schmidt C, Drosten C, Koopmans MP. Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralizing serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study. Lancet Infect Dis. 2013 Oct;13(10):859-66.

96. Reusken CB, Farag EA, Jonges M, Godeke GJ, El-Sayed AM, Pas SD, Raj VS, Mohran KA, Moussa HA, Ghobashy H, Alhajri F, Ibrahim AK, Bosch BJ, Pasha SK, Al-Romaihi HE, Al-Thani M, Al-Marri SA, AlHajri MM, Haagmans BL, Koopmans MP. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) RNA and neutralizing antibodies in milk collected according to local customs from dromedary camels, Qatar, April 2014. *Euro Surveill.* 2014 Jun 12;19(23):20829.
97. 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.
98. 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.
99. Rodríguez S, Rojas M, Navarro D, Pezo D, Sandoval N, Herrera A, Santana P, Álvarez C, Ramírez M, Oviedo N, Manchego A. Identificación y frecuencia de detección de coronavirus en alpacas preñadas (*Vicugna pacos*) clínicamente sanas provenientes de un sistema de crianza semi-intensiva en el departamento de Cusco, Perú. In XXII Jornadas de Divulgación Técnico Científicas 2022. Universidad de Rosario-Argentina.; 2022; pp 379–380.
100. 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.
101. Rosadio RH, Rivera H, Manchego A. 1993. Prevalence of neutralizing antibodies to bovine herpesvirus-1 in Peruvian livestock. *Vet Rec.* 132:611-612.
102. Rosadio R, Londoño P, Pérez D, Castillo H, Véliz A, Llanco L, Yaya K, Maturrano L. *Eimeria macusaniensis* associated lesions in neonate alpacas dying from enterotoxemia. *Vet Parasitol.* 2010 Feb 26;168(1-2):116-20.
103. Rosadio R, Cirilo E, Manchego A, Rivera H. 2011. Respiratory syncytial and parainfluenza type 3 viruses coexisting with *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* in acute pneumonias of neonatal alpacas. *Small Ruminant Res.* 1(3):110-116.
104. Rosadio R, Maturrano L, Pérez D, Luna L. 2012. El complejo entérico neonatal en alpacas andinas. *Rev Inv Vet Perú* 23 (3): 261-271.
105. Saif LJ. 2010. Bovine Respiratory Coronavirus. *Vet. Clin. Food Anim.* 26:349-364.

106. Sawicki SG, Sawicki DL, Siddell SG. 2007. A contemporary view of Coronavirus transcription. *J. Virol.* 81(1):20-29.
107. Sharpe MS, Lord LK, Wittum TE, Anderson DE. 2009. Pre-weaning morbidity and mortality of llamas and alpacas. *Aust Vet J.* 87:56-60.
108. So RTY, Chu DKW, Miguel E, Perera RAPM, Oladipo JO, Fassi-Fihri O, Aylet G, Ko RLW, Zhou Z, Cheng MS, Kuranga SA, Roger FL, Chevalier V, Webby RJ, Woo PCY, Poon LLM, Peiris M. Diversity of Dromedary Camel Coronavirus HKU23 in African Camels Revealed Multiple Recombination Events among Closely Related *Betacoronaviruses* of the Subgenus *Embecovirus*. *J Virol.* 2019 Nov 13;93(23):e01236-19.
109. Song HC, Seo MY, Stadler K, Yoo BJ, Choo QL, Coates SR, Uematsu Y, Harada T, Greer CE, Polo JM, Pileri P, Eickmann M, Rappuoli R, Abrignani S, Houghton M, Han JH. Synthesis and characterization of a native, oligomeric form of recombinant severe acute respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein. *J Virol.* 2004 Oct;78(19):10328-35.
110. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, Liu W, Bi Y, Gao GF. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 2016 Jun;24(6):490-502.
111. Tao Y, Shi M, Chommanard C, Queen K, Zhang J, Markotter W, Kuzmin IV, Holmes EC, Tong S. Surveillance of Bat Coronaviruses in Kenya Identifies Relatives of Human Coronaviruses NL63 and 229E and Their Recombination History. *J Virol.* 2017 Feb 14;91(5):e01953-16.
112. Uzal FA, Songer JG. 2008. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal Infections in sheep and goats. *J Vet Diagn Invest* 20:253-265.
113. Wacharapluesadee S, Tan CW, Maneeorn P, Duengkae P, Zhu F, Joyjinda Y, Kaewpom T, Chia WN, Ampoot W, Lim BL, Worachotsueptrakun K, Chen VC, Sirichan N, Ruchisrisarod C, Rodpan A, Noradechanon K, Phaichana T, Jantarat N, Thongnumchaima B, Tu C, Crameri G, Stokes MM, Hemachudha T, Wang LF. Evidence for SARS-CoV-2 related coronaviruses circulating in bats and pangolins in Southeast Asia. *Nat Commun.* 2021 Feb 9;12(1):972.
114. Wang X, Wang L, Liu X. 2003. The Quality and Processing Performance of alpaca Fibers. A report for the Rural Industries research and Development Corporation. RIRDC. 132 p.

- 115.** Wasniewski M, Boue' F, Richomme C, Simon-Lorière E, der Werf SV, Donati F, et al. 2023. Investigations into SARS-CoV-2 and other coronaviruses on mink farms in France late in the first year of the COVID-19 pandemic. PLoS ONE. 18(8): e0290444.
- 116.** Wertheim JO, Chu DK, Peiris JS, Kosakovsky Pond SL, Poon LL. A case for the ancient origin of coronaviruses. J Virol. 2013 Jun;87(12):7039-45.
- 117.** Whitehead CE, Anderson DE. 2006. Neonatal diarrhea in llamas and alpacas. Small Ruminant Res. 61:207-215.