

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



DETECCIÓN MOLECULAR DE CORONAVIRUS A PARTIR DEL GEN N
EN CRÍAS DE ALPACA (*Vicugna pacos*) EN EL CICAS LA RAYA
PROVINCIA DE CANCHIS-CUSCO.

Tesis para optar al título profesional de Biólogo

PRESENTADA POR:

Bach. Sandro Denys Mormontoy Cárdenas.

ASESOR:

M. Sc. Jorge Acurio Saavedra.

CUSCO – PERÚ

2022

DEDICATORIA

A mi familia, Nely, Nury y Joshet que me inspiran
a ser mejor persona cada día, los amo.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor M.Sc. Jorge Acurio Saavedra y al PhD Antonio E. Garmendia Bonanni por el apoyo, la confianza y las facilidades dadas en el avance de la tesis, gracias al proyecto “INVESTIGACIÓN SOBRE PATÓGENOS VIRALES ASOCIADOS CON MORBILIDAD Y MORTALIDAD POR NEUMONÍA Y DIARREA EN CRÍAS DE ALPACA (*Vicugna pacos*) EN CICAS LA RAYA, PROVINCIA DE CANCHIS”.

A mi familia por el infinito soporte brindado tanto económico y moral.

ÍNDICE

	pág.
RESUMEN	I
INTRODUCCIÓN	II
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	IV
JUSTIFICACIÓN	VI
OBJETIVOS	VIII
Objetivo general	VIII
Objetivos específicos	VIII
HIPÓTESIS	IX
VARIABLES	X
Variables dependientes	X
Variables independientes	X
CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1 ANTECEDENTES	1
1.1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES	1
1.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES Y LOCALES	4
1.2 GENERALIDADES	6
1.2.1 CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS	6
1.2.2 DOMESTICACIÓN	7
1.2.3 DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA	7
1.3 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE " <i>Vicugna pacos</i> "	11
1.3.1 HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN	12
1.3.2 UBICACIÓN Y TAXONOMÍA	12
1.3.3 PATOLOGÍA DE " <i>Vicugna pacos</i> "	13
1.4 VIRUS	14

1.4.1 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y CLASIFICACIÓN DE LOS VIRUS	14
1.4.2 CLASE IV: VIRUS CON ARN MONOCATENARIO	16
1.4.3 FAMILIA CORONAVIRIDAE	17
1.4.3.1 SUB FAMILIA CORONAVIRIDAE	17
1.4.3.2 TIPOS DE CORONAVIRUS	18
1.4.3.3 CORONAVIRUS	20
1.4.3.3.1 CLASIFICACIÓN Y TAXONOMÍA	20
1.4.3.3.2 ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL VIRIÓN	20
1.4.3.3.3 CICLO DE INFECCIÓN DE CORONAVIRUS EN ALPACAS	21
1.4.3.3.4 PROTEÍNAS ESTRUCTURALES DE CORONAVIRUS	26
1.4.3.3.5 ETIOLOGÍA DE CORONAVIRUS	28
1.4.3.3.6 TRANSMISIÓN Y PATOGENIA DE CORONAVIRUS	30
1.5 MÉTODOS DE DETECCIÓN MOLECULAR DE CORONAVIRUS	31
1.5.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS: ARN	31
1.5.2 CUANTIFICACIÓN Y CALIDAD DE ÁCIDOS NUCLEICOS	34
1.5.3 RT - PCR	35
1.5.4 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)	37
1.5.5 ELECTROFORESIS Y EVALUACIÓN DE GELES	39
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	42
2.1 LUGAR DE EJECUCIÓN	42
2.2 MATERIALES	44
2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	44
2.2.1.1 MATERIAL GENÉTICO	44
2.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO	44
2.2.2.1 EQUIPOS	44
2.2.2.2 REACTIVOS	45
2.2.2.3 CONSUMIBLES Y FUNGIBLES	46
2.2.3 MATERIAL DE CAMPO	46
2.3 METODOLOGÍA	47
2.3.1 COLECTA DE MUESTRAS	48
2.3.2 PROCESAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS	50

2.3.3 PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y RESUSPENDIDO CELULAR	50
2.3.4 EXTRACCIÓN DE ARN VIRAL	50
2.3.5 OPTIMIZACIÓN DE LOS NIVELES DE PUREZA DEL ARN	52
2.3.6 CUANTIFICACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DEL ARN	52
2.3.7 RT - PCR	52
2.3.8 PCR EN PUNTO FINAL	55
2.3.9 ELECTROFORESIS	59
2.3.10 CÁLCULOS DEL TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS DE PCR	59
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
3.1 DE LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS	60
3.2 DE LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ARN VIRAL	60
3.3 DE LA RT - PCR	62
3.4 DE PCR EN PUNTO FINAL	64
3.5 DEL CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LOS PRODUCTOS DE LA PCR	64
DISCUSIÓN	68
CONCLUSIONES	71
RECOMENDACIONES	73
BIBLIOGRAFÍA	74
ANEXOS	82

ÍNDICE DE FIGURAS

	pág
Figura 01. Mapa ilustrativo: Movimientos evolutivos de los camélidos	6
Figura 02. Actividad viral de coronavirus	26
Figura 03. Retrotranscripción de ARNm a ADNc	36
Figura 04. Ubicación geográfica del centro experimental CICAS La Raya	43
Figura 05 Flujograma de actividades de trabajo	47
Figura 06. Resultados PCR en punto final para coronavirus	65
Figura 07. Resultados PCR en punto final para coronavirus	66

ÍNDICE DE TABLAS

	pág
Tabla 1. Especies de camélidos	8
Tabla 2. Tipos de virus dentro del género coronavirus	19
Tabla 3. Valores respecto a calidad y pureza de ARN	35
Tabla 4. Relación de muestras colectadas de diferentes porciones intestinales	49
Tabla 5. Componentes de la RT - PCR	54
Tabla 6. Componentes de la PCR	56
Tabla 7. Condiciones establecidas para la PCR	57
Tabla 8. Relación de primers específicos para coronavirus	58
Tabla 9. Lecturas respecto a la concentración y calidad del ARN	61
Tabla 10. Lecturas respecto a la concentración y calidad del ADNc	63
Tabla 11. Relación de resultados positivos en el gel de agarosa	67
Tabla 12. Relación y concentración de ADN	85

RESUMEN

El desarrollo de técnicas moleculares, como RT-PCR y PCR es de gran importancia para el diagnóstico de enfermedades virales, caso coronavirus, causante de morbilidad y de altas tasas de mortalidad en crías de alpaca en el CICAS La Raya de la provincia de Canchis – Cusco. En el presente trabajo de investigación se determinó la presencia de coronavirus a partir de necropsias realizadas a crías de alpaca del CICAS La Raya; para este propósito se extrajo porciones intestinales del sistema digestivo, correspondientes al colon ascendente, transverso, descendente, duodeno, íleon, yeyuno y recto. Se colectó un total de 113 muestras en cadena de frío y luego se llevaron a congelación; a partir de éstas se seleccionaron por observación directa dos tipos diferentes de muestras: 44 muestras de material entérico y 69 muestras con contenido fecal, teniendo en cuenta que ambos tipos diferentes de muestras contenían en una misma porción intestinal.

Posteriormente se realizó la extracción del ARN viral, mediante el método TRIzol LS, modificado en laboratorio, habiendo obtenido 95 muestras de ARN, luego se cuantificaron en el espectrofotómetro para evaluar los parámetros de calidad y pureza óptima de ARN. Seguidamente se realizó el ensayo de RT-PCR para la transcripción reversa en ADN y a partir de este se desarrolló la técnica de PCR en punto final.

Para realizar la amplificación del ADN por PCR en punto final se utilizaron un set de primers, previamente seleccionados con una especificidad de 96,6% y una sensibilidad de 95,1%, con el objetivo de amplificar el fragmento de 407 pb del gen N que codifica la nucleocapside viral. A continuación se corrió una electroforesis horizontal en un gel de agarosa preparado al 2%, durante 50 minutos a 70 V. Una vez obtenido el gel se mantuvo con bromuro de etidio durante 5 minutos, para finalmente identificar la presencia de bandas en el fotodocumentador de imágenes VILVERT E-BOX.

Como resultado se identificó la presencia de coronavirus en 35 muestras de crías de alpaca, lo cual revela una frecuencia de 46.6% del virus, como agente causante de mortalidad y morbilidad de crías de alpaca en la región Canchis - Cusco.

INTRODUCCIÓN

La alpaca es una especie de camélido artiodáctilo que tiene un importante valor cultural y económico para el Perú. Existen indicios arqueológicos que demuestran su domesticación desde hace miles de años en la cultura moche. Se desarrollan en alturas de hasta 5000 m y están ampliamente distribuidos a lo largo del continente Americano, desde América del Norte a la patagonia Argentina, lugares donde se ha potenciado inmensamente su uso en la industria textil y la comercialización de su carne (Méndez, 2008). La mortalidad y morbilidad de camélidos sudamericanos en los andes peruanos crece desmesuradamente cada año debido, a la frecuencia de agentes indiferenciados que afectan a su población, causando desordenes metabólicos como disenterías, infecciones entéricas, problemas respiratorios y posteriormente el deceso (Espada, 2010).

Estudios realizados han demostrado la existencia de agentes microbianos como *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Cryptosporidium parvum* y algunos virus: rotavirus y coronavirus, como agentes causantes de las enfermedades infecciosas en alpacas (Lucas et al., 2016).

Dentro de los agentes virales más importantes descritos como causantes de trastornos digestivos, respiratorios, enteritis moderada y aguda se encuentra coronavirus (Cebra et al., 2003). Este virus se compone de cuatro subtipos principalmente, coronavirus de humanos, bovinos, roedores y porcinos, los cuales se relacionan por la sintomatología que producen (Saif, 2004).

Este patógeno es de crucial importancia por el impacto financiero que genera, en el campo de la ganadería, produciendo la muerte temprana de alpacas y terneros de ganado vacuno, que presentan diarreas profusas y en algunos casos sanguinolentas, los cuales van acompañados con cuadros clínicos de fiebre elevada, hipovolemia y deshidratación severa (Boileau & Kapil, 2010). El virus tiene un periodo de incubación aproximado de 2 a 8 días, en el cual generan la muerte por disenterías severas,

pudiendo prolongarse hasta 6 a 8 semanas en animales con mayor resistencia (Betancourt et al., 2017). Trabajos anteriores han demostrado la presencia de betacoronavirus en alpacas jóvenes en Pasco y Junín (Luna et al., 2015), destacando así la importancia del estudio de este virus en poblaciones de alpacas de la sierra peruana.

Por lo tanto, considerando la importancia económica y alimentaria que representa la crianza de alpacas para el poblador del ande peruano, la escasa información y un registro para la identificación de agentes virales patógenos causantes de morbilidad y mortalidad en alpacas, se planteó llevar a cabo el siguiente trabajo de investigación para detectar mediante técnicas moleculares a coronavirus, como causante de las crecientes tasas de mortalidad en el CICAS La Raya de la región del Cusco.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La provincia de Canchis es uno de los principales centros de producción de fibra de alpaca a nivel regional y nacional. Es por este motivo, que la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco fundó en el año 1985, el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS), ubicado en la provincia de Canchis, distrito de Marangani, comunidad La Raya. Esta institución se creó con la finalidad de mejorar genéticamente, las diferentes variedades de lana de alpaca existentes, a través de los laboratorios de Biotecnología reproductiva y genética molecular.

Cabe resaltar que en la última década las tasas de mortalidad y morbilidad de crías de alpaca van en aumento según los datos obtenidos del MIDAGRI en el 2015, lo que repercute en la producción textil y economía familiar de los pobladores, que se dedican principalmente a la ganadería. Estudios realizados por Rojas et al. (2016) describen como posibles agentes infecciosos a coronavirus y bacterias asociadas a la mortalidad temprana de los camélidos sudamericanos.

Las crías de alpaca son las más sensibles a sufrir infecciones bacterianas y virales. Éstas pueden ser severamente afectadas por la presencia de agentes virales, caso coronavirus en interacción a otros microorganismos como parásitos y bacterias. Así mismo la escasa transferencia de anticuerpos por vía parental, a través del calostro, no permite desarrollar una inmunidad activa en las crías (Valenzuela et al., 2021).

Investigaciones realizadas por Luna et al. (2015) demostraron la presencia de enteropatógenos en asociación a Betacoronavirus, causantes de numerosos decesos de crías de alpaca de Pasco y Junín. Sin embargo, la región de Cusco no registra datos exactos respecto al número de muertes, a lo que se suma los escasos estudios de investigación molecular realizados sobre patógenos virales, caso coronavirus en asociación a otro tipo de microorganismos.

En base a lo establecido realizamos la siguiente pregunta:

¿El coronavirus causante de mortalidad por infecciones entéricas y respiratorias en crías de alpaca del CICAS La Raya es detectable mediante PCR en punto final a partir de la secuencia del gen N?

JUSTIFICACIÓN

Desde tiempos ancestrales la alpaca ha sido considerada como una especie nativa y endémica de los andes peruanos de gran importancia económica y social para miles de familias de la sierra peruana, que se encargan de su crianza y explotación. La provincia de Canchis constituye uno de los centros productores de lana, fibra y curtidos de cuero más importantes del departamento del Cusco, siendo uno de los principales lugares de procesamiento de la fibra de alpaca, cueros y obtención de carne para consumo humano en la región (SPAR, 2014).

En la actualidad la producción alpaquera se ve severamente afectada por los problemas sanitarios y reproductivos que se presentan, los que generan enfermedades gastrointestinales y posteriormente la postración de un sinnúmero de crías.

Las eminentes tasas de mortalidad de crías de alpaca van aumentando progresivamente cada año, según los datos registrados por el Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI, 2015). La pérdida anual de alpacas genera un gran impacto económico en la región y afecta principalmente al bolsillo de las familias, que se dedican exclusivamente a la actividad.

Por otro lado, cabe señalar que a finales del año 2019 se ha reportado de manera sorpresiva el brote de una enfermedad viral causada por una cepa de coronavirus en humanos, que cobró la vida de aproximadamente tres millones de personas, infectando a más de 140 millones de habitantes a nivel mundial. El conocimiento de la estructura y secuencias de su genoma han permitido detectar al virus y proponer medidas de bioseguridad y finalmente ha facilitado para el diseño y elaboración de vacunas contra esta enfermedad (OMS, 2020).

Por tanto, la identificación de agentes patógenos capaces de afectar la producción pecuaria resulta de vital importancia, para futuros diagnósticos y como medida de control en la morbilidad y mortalidad del ganado alpaquero, así como modelo de desarrollo de vacunas.

Tomando en cuenta los antecedentes, y los estudios realizados para el departamento del Cusco, se plantea realizar el presente estudio, que tiene como principal objetivo identificar la presencia de coronavirus a partir de la secuencia del gen N, como agente infeccioso causante de la mortalidad de la población alpaquera de la región.

OBJETIVOS

Objetivo general

Detectar coronavirus a partir del gen N en crías de alpaca (*Vicugna pacos*) del CICAS – La Raya mediante la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Objetivos específicos

1. Extraer y purificar ARN viral a partir de muestras con contenido fecal y entérico de crías de alpaca mediante el método TRIZOL LS modificado.
2. Generar ADNc por RT-PCR a partir de muestras de ARN extraído.
3. Obtener copias de la secuencia del gen N de coronavirus mediante la técnica de PCR en punto final.
4. Identificar presencia de coronavirus a partir del patrón de bandas mediante evaluación en geles de agarosa.

HIPÓTESIS

Es posible detectar coronavirus mediante la amplificación por PCR de la secuencia del gen N a partir de muestras entéricas y fecales de crías de alpaca (*Vicugna pacos*) del CICAS La Raya provincia de Canchis – Cusco.

VARIABLES

Variables dependientes

1. Calidad y concentración del ARN viral.
2. Producto obtenido por RT-PCR y PCR.

Variables independientes

1. Muestras diarreicas tomadas del tracto digestivo de alpacas muertas.
2. Contenido entérico del intestino de crías de alpaca.

CAPÍTULO I REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

Rocha et al. (2018). Efectuaron un estudio en el Instituto de Microbiología Paulo de Góes de Rio de Janeiro – Brasil y el Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA), Cusco – Perú, con el propósito de detectar la frecuencia de infección y características moleculares de coronavirus en alpacas y vacas del Brasil y Perú, mediante el uso de una técnica molecular RT-PCR. Encontraron 46,5% (47/101) de muestras de terneros y 26,8% (70/261) de alpaca fueron positivos para CoV. Todas las cepas pertenecen al linaje de Betacoronavirus (BCoV).

Crameri et al. (2016). Llevaron a cabo un ensayo experimental en el Laboratorio Australiano de Salud Animal, Geelong, Victoria – Australia, denominado desafío/reexposición infectando a tres alpacas con el síndrome respiratorio de Medio Oriente coronavirus, las cuales fueron puestas a observación. Para la identificación de coronavirus emplearon la técnica molecular de RT-PCR, logrando detectar la presencia del virus, posteriormente fueron sometidos a un descarte adicional al momento de la reexposición el día 21, resultando positivas. El ensayo indica que las alpacas pueden ser modelos adecuados para la infección y la pérdida de la dinámica de este virus.

Stipp et al. (2009). Desarrollaron un estudio para evaluar la frecuencia de infección por BCoV en rebaños de terneros en Brasil. Mediante la técnica de PCR en el Laboratorio de Virología Animal de la Universidad Estatal de Londrina, Perene-Brasil. Realizaron una amplificación de la región altamente conservada, denominada Gen N, en geles de electroforesis al 2%. Analizando un total de 282 muestras fecales, de las cuales 15.6% (44/282), resultaron positivas para coronavirus, las que se corroboraron por la técnica de RFLP.

Sánchez (2008). Analizó 21 muestras diarreicas de becerras, de siete establos de la Cuenca lechera de Delicias, Chihuahua - México, con el fin de identificar antígenos de coronavirus y rotavirus. Se utilizó un método de análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), para el diagnóstico. Obteniendo 14.28 % de heces positivas para antígenos de coronavirus (3/21) y un 57.14% para rotavirus (12/21).

Genova et al. (2008). Examinaron la presencia de coronavirus (BCoV) en tres crías de alpaca, de las que se obtuvieron muestras fecales diarreicas. Para el análisis las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades de Animales de la Universidad de Oklahoma – Estados Unidos. Se realizó un análisis molecular mediante la técnica de RT - PCR, demostrándose la presencia de coronavirus (BCoV) en una de las alpacas.

Beate et al. (2007). Aislaron un tipo de coronavirus (ACov) asociado a una enfermedad respiratoria aguda en alpacas (*Vicugna pacos*) en el Laboratorio de Seguridad Alimentaria y Salud Animal de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria de la Universidad de California. Se extrajo ARN viral de 11 tejidos de necropsias provenientes de alpacas. Se obtuvo solo una muestra positiva, que se caracterizó molecularmente mediante el secuenciamiento tipo Sanger. El marco adicional de lectura abierta entre el gen de nucleocápside N y 3' UTR demostró que ACoV es genéticamente más parecido al coronavirus humano común (HCoV) 229E, con un 92,2% de identidad de nucleótidos en todo el genoma.

Khalili (2006). Realizó un estudio en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Shahid Bahonar de Kerman - Irán. Evaluó la presencia de BCoV en 108 muestras diarreicas y 80 no diarreicas de terneros, mediante PCR para la detección de Gen N de la nucleocápside de coronavirus. Los resultados fueron revelados en geles de agarosa al 1.5%, obteniendo 80 muestras positivas para las 108 muestras diarreicas (44.44%) y 4

positivas de muestras no diarreicas. Asimismo utilizaron kits de ELISA para demostrar mayor sensibilidad en las pruebas de PCR.

Park et al. (2006). Examinaron 184 muestras fecales diarreicas recolectadas de 75 rebaños de ganado vacuno de siete provincias de Corea, las muestras fueron recolectadas durante las épocas de primavera, otoño y verano. Realizaron la extracción viral de ARN mediante el método de TRIzol LS logrando extraer ARN de pureza óptima. Posteriormente desarrollaron la amplificación de las regiones externas e internas de BCoV del gen N de coronavirus mediante técnicas moleculares de PCR y RT-PCR. Se detectaron 107 muestras positivas, lo que revela una frecuencia de (58.2%) muestras diarreicas fecales (en 47/75 rebaños). De estas 107 muestras positivas, 90 muestras fecales de 33 rebaños dieron positivo para BCoV y 17 muestras fecales de 14 rebaños también resultaron positivo para otros patógenos.

Cebra et al. (2003). Desarrollaron un estudio observacional prospectivo con 45 crías de alpaca y llamas, utilizando muestras de heces diarreicas, con el propósito de evaluar posibles patógenos entéricos potenciales. Las muestras recolectadas fueron enviadas a un Laboratorio de Diagnóstico del estado de Oregón - Estados Unidos. Como resultado se encontró 39 patógenos dentro de los que destaca coronavirus (19=42%), *Giardia spp* (8=18%), *Eimeria spp* (6 =13%), *Cryptosporidium spp.* (4=9%), rotavirus (1=2%) y *Nematodos ova* (1= 2%). Para la identificación de los virus se tiñeron con fosfotungstato de potasio y se pusieron a observación directa en un microscopio electrónico, reconociendo las estructuras más características.

Hasoksuz et al. (2002). Ejecutaron un estudio para evaluar la presencia de coronavirus en muestras diarreicas y de frotis nasales de 85 individuos de ganado bovino, procedentes de un centro de engorde del estado de Ohio. Se realizó el análisis de las muestras mediante pruebas de ELISA y RT - PCR a partir del gen N. Detectando tasas globales de BCoV nasales y de eliminación fecal de 48% (41/85)

y 53% (45/85) por ELISA y 84% (71/85) y 96% (82/85) por RT - PCR, respectivamente. Así mismo desarrollaron una correlación estadística entre las muestras positivas de ELISA Y RT - PCR.

Cho et al. (2001). Hicieron un estudio de protección cruzada en betacoronavirus, a partir de muestras diarreicas, hisopados faríngeos y cepas de coronavirus aisladas de terneros de un centro de crianza del estado de Ohio - Estados Unidos. El trabajo de investigación buscó demostrar la alta sensibilidad de la pruebas de PCR y RT - PCR frente a las pruebas de ELISA, centrándose en el Gen N de Coronavirus, específicamente el fragmento 730 pb de la nucleocápside para el método de RT - PCR y 407 pb del Gen N para PCR. Se analizaron un total de 268 hisopados faríngeos, y se obtuvo 27 muestras (10,0%) positivas tanto para ELISA y PCR, 64 (23,8%) positivas para PCR y negativas para ELISA, no hay muestras que resultaron positivas para ELISA y negativo para PCR, por ultimo 177 (66,0%) fueron negativas por ambas pruebas. Asimismo se analizaron 268 muestras fecales, resultando 40 muestras fecales (14,9%) positivas tanto para ELISA y PCR anidada, 76 muestras (28,3%) fueron positivas para PCR y negativo para ELISA, y 152 (56,7%) fueron negativas por ambas pruebas.

1.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES Y LOCALES

Rojas et al. (2016). Hicieron un estudio con el objetivo de identificar patógenos bacterianos y virales, que podrían haber causado un brote de diarrea entre las alpacas de Silli - Cusco. Se realizaron lavados intestinales y obtuvieron muestras fecales de 50 crías de alpaca. Utilizaron técnicas de RT - PCR y PCR para la detección del virus, los productos de la amplificación se observaron en 1.2% de agarosa. Y los resultados mostraron la presencia de *Eimeria spp.* (80%), coronavirus (40 %), *Escherichia coli* (34%), rotavirus (32%), *Clostridium spp.* (22%) y *Cryptosporidium spp.* (20%). De estas 50 crías de alpaca, 20 presentaron una sola infección (19 positivos para *Eimeria spp.* y 1 positivo para rotavirus). Así

mismo se produjeron coinfecciones con hasta cuatro patógenos en el 60% de las muestras.

Luna et al. (2015). Detectaron la presencia de BCoV, en muestras fecales de 60 crías de alpaca provenientes de seis establos diferentes del departamento de Puno. Mediante la técnica PCR, encontrando 11 muestras positivas (18.3%) para coronavirus.

Lucas et al. (2016). Evaluaron a 60 crías de alpaca que presentaban casos de diarreas agudas en las regiones de Pasco y Junín. Para lo cual se procesaron muestras diarreicas, mediante el uso de un kit comercial de inmunocromatografía tipo sándwich demostraron la presencia de agentes virales. Identificando así *Salmonella sp.* con un (18.3%), *Cryptosporidium spero.* con un (20%), rotavirus con un (36.6%), *Nematodirus sp.* (40%), *Eimeria sp* (43.3%), coronavirus (53.3%) y *E. coli* en un (80%). De igual manera, se demostró tres tipos de agentes infecciosos en un (38.3%) de los animales, el 23.3% tenían asociaciones de parásitos y bacterias, y el 11.7% asociaciones de bacterias y virus.

López et al. (2011). Realizaron la detección de antígenos para rotavirus y coronavirus en muestras diarreicas acuosas y contenidos intestinales de crías de alpaca procedentes de CICAS La Raya, distrito de Marangani, provincia de Canchis - Cusco. Llevaron a cabo pruebas rápidas de inmunocromatografía. Como resultado obtuvieron 5 pruebas positivas a coronavirus de un total de 14 muestras procesadas.

1.2 GENERALIDADES

1.2.1 CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Los camélidos son un grupo de mamíferos conocidos como los camellos del nuevo mundo (orden de los artiodáctilos, familia camélida). Tuvieron su origen en América del Norte hace más de 60 millones de años.

Según datos paleontológicos el primer camélido (Poebrodon) nació en el eoceno hace 40 millones de años, es así como este ancestro dio origen a una diversidad de cameloides en el hemisferio norte durante este periodo. Durante la época del mioceno medio se identificó un ancestro común para los camélidos sudamericanos y asiáticos (el paracamelus). Este individuo vivió en California y México hace aproximadamente 9 a 11 millones de años. Por otro lado otro ancestro se trasladó a Asia (Camelini), el cual dio nacimiento a los camélidos africanos y asiáticos, por ejemplo el dromedario de una joroba. Al emerger el Istmo de Panamá, un grupo de camélidos denominados Lamini se establecieron en América del Sur, dando origen a Paleolama, dentro de este amplio grupo de camélidos estaban los Hemiauchenia, que generaron el estirpe de dos especies silvestres conocidas en la actualidad: el guanaco y la vicuña (Vilá, 2012).

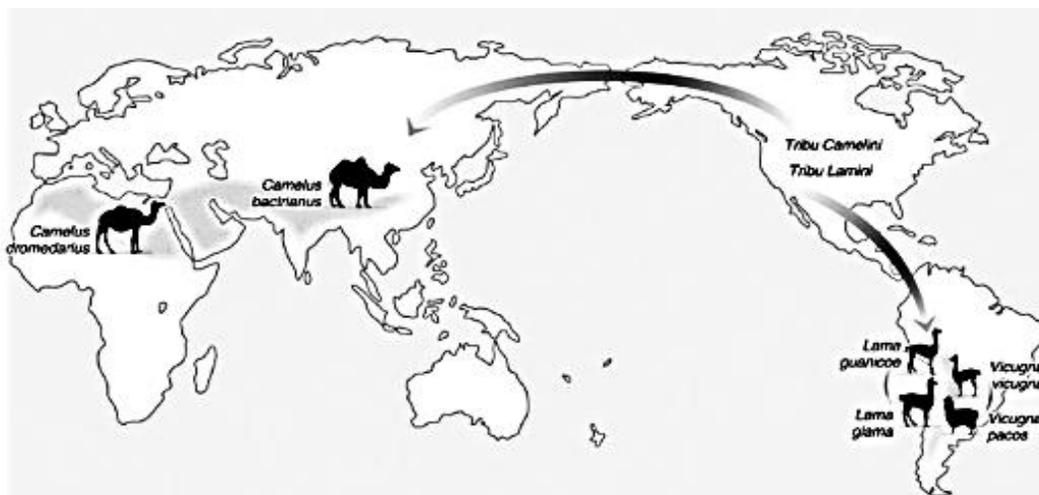


Figura 01. Mapa ilustrativo: Movimientos evolutivos de los camélidos.

Fuente: (Vilá, 2012).

Tras el origen de la cordillera de los andes y la diversificación de numerosos ambientes geográficos y climas, los camélidos sudamericanos llegaron a establecerse en la puna peruana y boliviana, generando una vasta población de especies de llamas, vicuñas y guanacos. Y establecieron un importante valor cultural y socioeconómico para la población andina (Vilá, 2012).

1.2.2 DOMESTICACIÓN

Desde hace más de 12,000 años los camélidos sudamericanos han sido domesticado en los andes peruanos, principalmente por intervención del hombre, quien ha manejado un tipo de reproducción controlada, generando una gama de variedades de colores en el pelaje, así como su uso para el transporte y la obtención de carne y cuero. Como consecuencia de esta interacción se cree que los guanacos norteños (*L.g. cacsilensis*) hayan dado origen a las llamas (*L. glama*). Las especies que el hombre ha logrado domesticar son la llama y la alpaca, mientras que el guanaco y la vicuña son consideradas como especies silvestres (Vilá, 2012).

1.2.3 DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA

Actualmente los camélidos sudamericanos se encuentran distribuidos ampliamente en el continente americano desde el Ecuador hasta Chile y Argentina. Se ubican en alturas desde los 3600 hasta 5000 m. La mayor población está localizada en el altiplano Peruano - Boliviano, así mismo se encuentran en pequeños grupos en el norte de Chile y Argentina. Su hábitat esta entre la Puna y los Altos Andes, conocido como altiplano. Dentro de este grupo encontramos principalmente: La vicuña (*Vicugna vicugna*); la llama (*Lama glama*); el guanaco (*Lama guanicoe*) y la alpaca (*Vicugna pacos L*). Nuestro país es considerado el principal productor de camélidos sudamericanos a nivel mundial, que alberga al 80% de la población (MIDAGRI, 2015).

Alpacas posee cerca del 90% (unos 3 millones de cabezas), de vicuña cerca del 90% (unos 65 mil cabezas) y de llamas cerca del 30% (unas 300 mil cabezas) (MIDAGRI, 2015).

Los camélidos sudamericanos se adaptan de mejor manera a la región altiplánica de la puna, propia de la cadena de montañas de los andes peruanos. Y se han adaptado favorablemente a condiciones extremas propios de la zona, así como a los duros pastos, lo que se expresa en su resistencia y en la eficiencia fisiológica de digerir, ya que presentan el estómago dividido en tres compartimientos, a diferencia de los bovinos. Desde el punto de vista ecológico están adaptados a los pastos duros y pocos palatables de la puna y son considerados como controladores ecológicos, evitando la desertificación en los altos andes. Investigaciones realizadas concluyen que la vicuña y la alpaca, digieren con un 22% de mejor manera los pastos a comparación de los ovinos (MIDAGRI, 2015).

Los camélidos sudamericanos comparten características comunes como un cuello fino y patas largas, con órganos sexuales claramente diferenciados. Son uníparos, es decir tienen una sola cría al año, cuya gestación dura de diez a doce meses. Se consideran crías hasta los 8 meses, en los que finalizan el destete.

Tabla 1. Especies de camélidos

ESPECIE	DESCRIPCIÓN	HÁBITAT	TIPO
 <p>Vicuñas <i>Vicugna vicugna</i> (Miller, 1924)</p>	<p>Silvestre, ejemplar tipo: <i>Camelus vicugna</i>, Molina, 1782. Distribuido a lo largo de la cordillera de los andes. Con un peso de 45 kg. Poseen una fibra muy fina de unos 12.5 micrones. Los dientes inferiores incisivos son de formas cuadrangulares, los cuales tienen una raíz cubierta.</p>	<p>Estepa puneña y altoandina. Región Neotropical, con un dominio Andino - Patagónico, Desde las provincias Altoandinas de Perú, Bolivia, Chile y Argentina.</p>	<p><i>Vicugna vicugna vicugna</i> (Molina, 1782)</p>

ESPECIE	DESCRIPCIÓN	HÁBITAT	TIPO
 <p data-bbox="240 835 349 1024">Guanaco <i>Lama guanicoe</i> (Müller, 1776).</p>	<p data-bbox="509 428 824 741">Animal silvestre. Distribuido desde los andes del Perú, Chile hasta la Patagonia argentina. Posee un peso que varía desde los 95 - 130 kg y una fibra de aproximadamente 20 - 25 micrones.</p>	<p data-bbox="961 428 1122 1568">Desde el altiplano hasta el nivel del mar. Estepas altoandinas, puneñas y patagónicas. Bosque andino patagónico. Región neotropical, dominio andino patagónico Altoandinas y Puneñas. Región austral, Chile y Argentina concentran la mayor población, En la actualidad Bolivia y Perú tienen poblaciones reducidas.</p>	<p data-bbox="1214 428 1356 909">Inicialmente cuatro. En la actualidad se aceptan dos: <i>Lama guanicoe cacsilensis</i> (Lonnberg, 1913) <i>Lama guanicoe guanicoe</i> (Müller, 1776).</p>

ESPECIE	DESCRIPCIÓN	HÁBITAT	TIPO
 <p>Llamas Lamas glama (Thomas, 1821</p>	<p>Es un animal doméstico con una población enorme. Distribuido a lo largo de los andes peruano, el altiplano y la Patagonia argentina. Con un peso que supera los 130 kg y una fibra que abarca desde los 20 - 25 micrones.</p>	<p>Ubicados a lo largo de la cordillera andina, el altiplano boliviano y la Patagonia argentina. Actualmente se pueden encontrar en Asia, Europa y Oceanía.</p>	<p>En el Perú existen dos clases conocidas como Chaku o Llampulli o peluda y Q´ara o pelada.</p>
 <p>Alpacas Vicugna pacos (Antes Lama pacus)</p>	<p>Es una especie doméstica. Ejemplar tipo: <i>Camelus pacos</i> (Linneo, 1758; Lesson, 1827 Man. Of Mmmal, p. 352). Localizadas en los Andes sudamericanos. Tiene un peso esquilada de aproximadamente 60 kg. Apreciado por la fibra que posee y la coloración de su pelaje que van desde tonos blancos a negros e intermedios. Su fibra posee un diámetro que va desde los 15 a 28 micrones.</p>	<p>Se encuentran habitando bofedales o vegas del ande peruano. Y se encuentran distribuidos desde Chile, Bolivia y Argentina. Actualmente se pueden ubicar en los continentes de Europa, Asia y Oceanía.</p>	<p>Dos tipos Suri y Huacaya.</p>

Fuente: (Vila, 2012).

1.3 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE “*Vicugna pacos*”

La alpaca (del quechua “alpaqa”, “paqu”), es un animal mamífero uníparo, que se encontraba domesticado en épocas incaicas, hallazgos arqueológicos demuestran que ya se encontraba presente en la cultura Mochica (Goepfert et al., 2013). Con características físicas que van desde un cuerpo delgado, al que se ve cubierto de una densa fibra, que en su conjunto se denomina vellón, posee un cuello delgado y largo, orejas largas y puntiagudas, pueden llegar a pesar entre 60 y 77 kg. Presenta almohadillas plantares, cuentan con dos dedos terminados en pezuña, característica de las especies artiodáctilas. Con una esperanza de vida que abarca 20 – 25 años, es considerado un animal ecológico al no dañar el pasto, ni provocar la erosión de los suelos.

Evolutivamente ligadas a las vicuñas, las alpacas han sufrido progresivamente una influencia genética por parte de las llamas (*Lama glama*), conocida como introgresión genética (Mestanza, 2014).

Desde el punto de vista evolutivo, las alpacas han sufrido numerosas adaptaciones morfológicas y biológicas, particularmente anatómicas y fisiológicas, ligadas a las bajas concentraciones de oxígeno, temperatura y la escasa presencia de alimento en los andes peruanos. Una clara evidencia de ello es la alta concentración de glóbulos rojos y su conformación elíptica, así como los 25 aminoácidos presentes en la hemoglobina, más que el del ser humano, lo que les favorece en el transporte de oxígeno en un medio hipóxico, como la altura (Vilá, 2012).

Además presentan una mayor capacidad de digestión de la fibra, que les permite una mayor asimilación de los nutrientes de los pastos lignificados, aprovechando todas sus propiedades. Por otro lado, la conformación anatómica del cuerpo y de las extremidades, les permite movilizarse con un consumo mínimo de energía, que

les favorece por la accidentada topografía de los andes sudamericanos (Quispe, 2011).

Las alpacas son consideradas como especies polígamas, pudiendo formar harenes de hasta 10 hembras, la etapa de madurez sexual varía desde 12 y 24 meses en las hembras y 2 años en machos, prolongándose hasta los tres años. Presentan una gestación que dura 11.5 meses hasta un año, produciendo una cría al año (Bioenciclopedia, 2015).

1.3.1 HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN

Habita en las zonas alto andinas (punas y zonas altiplánicas) por encima de los 3,800 m. de altura en Perú, Ecuador, Bolivia, Chile, Argentina y en menor medida, en los Estados Unidos, Canadá, Nueva Zelanda y Australia (Novoa & Flores, 2007)

1.3.2 UBICACIÓN Y TAXONOMÍA

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Mammalia

Orden: Artiodáctila

Familia: Camelidae

Tribu: Lamini

Género: Vicugna

Especie: *Vicugna pacos* ([Linnaeus](#), 1758)

Nombre común: Alpaca (Marín et al., 2007).

1.3.3 PATOLOGÍA DE “*Vicugna pacos*”

Las alpacas es un grupo extenso de mamíferos que a lo largo de su vida quedan expuestas a diversos tipos de agentes patógenos, causantes de diferentes enfermedades. Las enfermedades infecciosas repercuten directamente en el organismo del individuo. Como respuesta el organismo sufre cambios fisiológicos, que afectan las defensas y por consiguiente el vigor de los animales, y en algunos casos causar el deceso.

Las elevadas tasas de morbilidad y mortalidad de alpacas se deben principalmente a las enfermedades que producen bacterias, hongos, protozoarios y virus (Quiso, 2014).

Enfermedades bacterianas

- Enterotoxemia: *Clostridium perfringens*.
- Neumonía: *Pasteurella multocida*.
- Diarreas: *Escherichia coli*.
- Fiebre de alpacas: *Streptococcus zooepidemicus*.
- Abscesos: *Corynebacterium pseudotuberculosis*.
- Listeriosis: *Listeria monocytogenes*.
- Tétano: *Clostridium tetani*.
- Tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*.

(Quiso, 2014).

Enfermedades virales

- Disenterías agudas y diarreas sanguinolentas: Coronavirus y rotavirus

(López et al., 2011).

Enfermedades parasitarias

Endoparasitarias:

- Gastroenteritis verminosa: *Nematodirus spp.* y *Trichuris spp.*
- Distomatosis hepática: *Fasciola hepática*.
- Hidatidosis: *Echinococcus granulosos*.
- Coccidiosis: *Eimeria punoensis*.
- Teniasis: *Moniezia expansa*.
- Ectoparasitarias:
- Sarna: *Sarcoptes scabiei var aucheniae*.
- Garrapatosis: *Amblyoma parvitarsum*.
- Piojera: *Microthoracius proelongiceps*.

(Quiso, 2014).

1.4 VIRUS

Etimológicamente la palabra virus proviene del latín que significa veneno. Considerado como un agente infeccioso o partícula infecciosa, está constituido por un solo ácido nucleico ADN o ARN, asociado a proteínas específicas, algunos contienen lípidos o glúcidos, tienen una organización estructural simple y necesitan de una célula viva para su replicación. Se le considera como agentes submicroscópicos capaces de desarrollarse en células vivas (LLop et al., 2001).

Los virus son parásitos intracelulares obligados o estrictos porque dependen totalmente de la maquinaria metabólica de una célula huésped para su multiplicación. Llega afectar a todos los organismos vivientes, desde el hombre, plantas, animales, bacterias, hongos y parásitos (LLop et al., 2001).

1.4.1 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y CLASIFICACIÓN DE LOS VIRUS

Tamaño (20 – 300 nm).

No tienen actividad metabólica.

Los virus más simples poseen una cápside proteica o capa proteínica protectora que encierra un ácido nucleico.

Los conjuntos proteicos que conforman la cápside se denominan capsómeros.

El genoma posee un solo tipo de ácido nucleico (ARN o ADN).

Algunos virus poseen una envoltura o capa de naturaleza lipídica.

Son resistentes a los antimicrobianos habituales (Llop et al., 2001).

PROTEÍNAS VIRALES

- Estructurales: Conforman parte integral de la partícula viral. Ejemplo: Proteína S de coronavirus, que le confiere la forma de corona.
- No estructurales: Tienen actividad enzimática y regulatoria. Ejemplo: Neuraminidasa de los mixovirus facilitan el ingreso del virus a las células vivas (Lam et al., 2021).

ESTRUCTURAS DE LAS NUCLEOCÁPSIDES VIRALES

- Morfología helicoidal: El ácido nucleído está dispuesto en forma de hélice y las proteínas de la cápside están recubriendo la hélice formando cilindros.
- Morfología icosaédrica: Con formas geométricas.
- Morfología compleja: Presentan formas de tamaño considerable con una composición química compleja que pueden incluir lípidos (Llop et al., 2001).

CLASIFICACIÓN DE BALTIMORE

Esta clasificación reconoce 7 diferentes grupos de combinaciones de ácidos nucleicos, bajo los criterios de cadena monocatenaria o bicatenaria, sentido positivo o negativo y por último método de replicación (Cordo, 2021).

- **GRUPO I: VIRUS CON ADN BICATENARIO** (Ejemplo: *Poxvirus*, *herpesvirus*, y *adenovirus*).

- **GRUPO II: VIRUS CON ADN MONOCATENARIO CON POLARIDAD POSITIVA** (Sentido positivo) (Ejemplo: *Parvovirus*).
- **GRUPO III: VIRUS CON ARN BICATENARIO** (Ejemplo: *Reovirus*).
- **GRUPO IV: VIRUS CON ARN MONOCATENARIO CON POLARIDAD POSITIVA** (Sentido positivo) (Ejemplo: *Togavirus*, *picornavirus* y *coronavirus*)
- **GRUPO V: VIRUS CON ARN MONOCATENARIO CON POLARIDAD NEGATIVA** (Sentido negativo o antisentido) (Ejemplo: *Rabdovirus* y *ortomixovirus*).
- **GRUPO VI: VIRUS CON ARN MONOCATENARIO RETROTRANSCRITO** (Sentido positivo) ARN con ADN intermedio en el ciclo de vida (Ejemplo: *Retrovirus*).
- **GRUPO VII: VIRUS CON ADN BICATENARIO RETROTRANSCRITO**, ADN de virus con ARN intermedio en el ciclo de vida (Ejemplo: *Hepadnavirus*).

1.4.2 CLASE IV: VIRUS CON ARN MONOCATENARIO CON POLARIDAD POSITIVA

Es un virus ARN monocatenario positivo (ssARN +), presenta un ARN de cadena sencilla de sentido positivo poliadenilado, el que se replica a través de una cadena de ADN, que usa como molécula intermediaria. El genoma que tienen es idéntico al ARNm viral, por lo que podrían ser traducidos inmediatamente en la célula hospedera. La replicación de este tipo de virus puede darse en el citoplasma ya que no es tan dependiente al ciclo celular como otros virus (ICTV, 2007).

Estos tipos de virus de clase IV de configuración positiva pueden funcionar como ARNm inmediatamente después de la infección. El mecanismo de funcionamiento radica en que una vez dentro de la célula actúa junto en asociación de otras proteínas para codificar un ARN polimerasa, denominado ARN replicasa. Este tipo de polimerasa se encarga de generar cadenas de ARN complementarias, que luego utiliza como molde para originar nuevas cadenas positivas, las cuales a su

vez pueden ser traducidas como cadenas de ARNm o empaquetadas como el genoma de nuevos viriones (Cordo, 2021).

Las cadenas de ARN simples de polaridad positivas: pueden ser subdivididos en dos subgrupos:

a) Virus con ARNm policistrónico: El genoma del ARN forma el ARNm y es traducido a la forma de polipoproteínas, que posteriormente se dividen a la forma de proteínas maduras (Vargas, 2002).

b) Virus con transcripción compleja: Para los cuales son necesarias dos rondas de traducción (como el caso de *Togavirus*) o se necesita ARNs subgenómico para producir ARN genómico (Vargas, 2002).

1.4.3 FAMILIA CORONAVIRIDAE

Los coronavirus son una diversa familia de virus que causan diferentes afecciones tanto en animales como en seres humanos, pueden presentarse desde simples resfriados, fiebre, tos, dolores musculares, diarreas o problemas gástricos hasta complicaciones más severas como neumonías y fallas renales.

Los virus pertenecientes a esta familia se pueden contagiar de animales a humanos por zoonosis, tal y como se demuestran en investigaciones realizadas en Asia el 2003, donde se transmitió el virus de la civeta hacia el ser humano, generando el SARS-CoV, que causó innumerables neumonías y provocó el deceso de al menos 10% de las personas infectadas. Otra enfermedad conocida es el MERS-CoV, que se transmitió del dromedario al ser humano. Así como la nueva cepa descrita en humanos, originada en la capital central de Wuhan - China conocida como "2019 - nCov" (OMS, 2020).

1.4.3.1 SUB FAMILIA CORONAVIRIDAE

Dentro de las características más resaltantes de esta subfamilia está el tamaño genómico que varía entre 16 a 31 kb (posiblemente el de mayor longitud entre los

virus ARN), así como la alta capacidad de codificación con una gama de estrategias de expresión génica. Un ejemplo de esto es que el ARN genómico se sintetiza a través de la polimerasa ARN, la que durante la replicación origina una especie de ARN genómico (ARNg) intermedio (polaridad negativa) del que se generan múltiples ARNs subgenómicos (ARNsg) anidados que poseen terminales 3' comunes y terminales 5' únicos. A partir del ARN genómico intermedio se genera el ARN genómico de la progenie viral (Masters & Perlman, 2013). El ensamblaje de los viriones se produce una vez que las proteínas virales y genoma viral maduran por brote en el retículo endoplasmático, donde a su vez adquieren la membrana bilipídica. Es así como los nuevos viriones maduros están listos para salir de la célula por exocitosis (Gelambi, 2019).

1.4.3.2 TIPOS DE CORONAVIRUS

Esta subfamilia es conocida comúnmente como coronavirus, alberga alrededor de 4 géneros principalmente: Alfacoronavirus, Betacoronavirus, Deltacoronavirus y Gammacoronavirus (α , β , δ y γ). Son virus filogenéticamente enparentados por el tipo de ARN monocatenario positivo envuelto que presentan, poseen una nucleocápside de simetría helicoidal, el tamaño del genoma oscila entre 26 y 32 kb aproximadamente, lo que los convierte en uno de los genomas con mayor tamaño dentro de los virus. Se diferencian de forma práctica según varios parámetros establecidos como: relaciones antigénicas y genotípicas, características genómicas, y digestión de la proteína S en subunidades S1 (Saltigeral & Leon, 2020). A la actualidad se han registrado 39 tipos de coronavirus, varias especies son de reciente investigación, debido a la mutabilidad que presentan, así como la escasa información que se tiene respecto a la transmisión, gravedad del impacto clínico, cabe resaltar que hasta la fecha no se han identificado tratamientos efectivos, ni vacunas para erradicar el virus, pero si se cuentan con tratamientos farmacológicos para la sintomatología de los afectados (Frustagli, S., 2020).

Tabla 2. Tipos de virus dentro del género de coronavirus

GÉNERO	ACRÓNIMO	TIPOS	H	DIANA
A	TGEV	Virus de la gastroenteritis porcina transmisible	Cerdo	Aparato digestivo
	Prov.	Coronavirus respiratorio porcino	Cerdo	Aparato respiratorio
	FIPV	Virus de la peritonitis infecciosa felina	Gato	Macrófagos
	CoN	Coronavirus canino	Perro	Aparato digestivo
	HCoV-229E	Coronavirus humano cepa 229E	Humano	Aparato respiratorio
	HCoV-NL63	Coronavirus humano cepa NL63	Humano	Aparato respiratorio
	COVID2019 2019-nCoV	Coronavirus humano	Humano	Aparato respiratorio
	Bate-CoV	Coronavirus de murciélago	Murciélago	Aparato respiratorio
B	MHV	Virus de la hepatitis murina	Ratón	Hígado
	RCoV	Coronavirus de rata	Rata	Aparato respiratorio
	BCoV	Coronavirus bovino	Vaca Alpaca Camello	Aparato Digestivo
	ACoV		Murciélago Humano Camello	Aparato Digestivo
	HEV	Virus de la encefalomiелitis aglutinante porcina	Cerdo	Sistema nervioso central
	CRCoV	Coronavirus respiratorio canino	Perro	Aparato respiratorio
	HCoVOC43	Coronavirus humano cepa OC43	Humano	Aparato respiratorio
	SARS-CoV	Síndrome respiratorio agudo y grave Pulmón	Humano	Pulmón
	HCoVHKU1	Coronavirus humano cepa HKU	Humano	Aparato respiratorio
	Bat-SARSCoV	Coronavirus respiratorio agudo y grave del murciélago	Murciélago	Aparato respiratorio
	Г	IBV	Virus de la bronquitis infecciosa	Pollo
TCoV		Coronavirus del pavo	Pavo	Riñón
PhCoV		Coronavirus del faisán	Faisán	Aparato digestivo

Fuente: (Martín-Espada et al., 2010)

1.4.3.3 CORONAVIRUS

1.4.3.3.1 CLASIFICACIÓN Y TAXONOMÍA.

Grupo: IV (Virus ARN monocatenario positivo)

Orden: Nidovirales.

Familia: Coronaviridae

Subfamilias Coronaviridae

Especie: Coronavirus sp.

Fuente: (ICTV).

1.4.3.3.2 ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL VIRIÓN

Coronavirus posee una morfología esférica y moderadamente pleomórfica. Su genoma está constituido por una cadena sencilla de ARN con polaridad positiva, ARNss+ (27 a 32 kb), posee una capucha metilada en el extremo 5' y una cola poliadenilada poli-A en el extremo 3', convirtiéndolo de modo muy parecido al ARNm de la célula hospedera. Dos tercios del genoma 5' codifica dos poliproteínas 1a y 1ab y que contienen las proteínas necesarias para la replicación del ARN y un tercio del genoma 3' codifica dos proteínas no estructurales (NS1 y 2) y varias proteínas estructurales, incluyendo una proteína de la nucleocapside (N) y tres o cuatro proteínas de la envoltura: la membrana (M), espícula (S), hemaglutinina - esterasa (HE), y/o una membrana pequeña (E) (Jin et al., 2007).

El virión tiene un diámetro de alrededor de 80 y 220 nm. Su superficie posee proyecciones de hasta 17 - 20 nm, las cuales pueden ensancharse hasta 10 nm hacia el extremo más distal. Este tipo de proyecciones recibe la denominación de

espículas o peplómeros, que corresponden a trímeros de la glicoproteína S, los peplómeros o espículas le dan un aspecto parecido al de una corona solar, es por este motivo que se les conoce como coronavirus. En algunos casos como en MHV y BCoV la proteína hemaglutininaesterasa (HE) les provee de proyecciones adicionales, que se asemejan a espigas grandes, en forma de raqueta o pétalo. Tienen una nucleocápside helicoidal de 9 a 11 nm de diámetro. Este tipo de virus se replican en el citoplasma celular y maduran en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi para posteriormente salir por gemación (LLop et al., 2001).

1.4.3.3.3 CICLO DE INFECCIÓN DE CORONAVIRUS EN ALPACAS

FIJACIÓN DEL VIRUS A LA CÉLULA HOSPEDERA

La fijación del coronavirus en la célula se inicia con la proteína S, que inicialmente se une al ácido siálico, así mismo lo hace la proteína HE. El ácido siálico está en las superficies celulares y los coronavirus presentan un tropismo tisular restringido, lo que hace que la fijación sea más lenta. De igual manera existen ciertos tipos de coronavirus que no se adhieren al ácido siálico, y la proteína S puede unirse a otros tipos de receptores, que son más específicos. Por ejemplo el virus que afecta a los murinos, tiene un receptor miembro de la familia de las inmunoglobulinas y cualquier otro tipo de anticuerpo contra esta proteína inhibe la fijación del virus. Por otro lado, algunos coronavirus, como el coronavirus respiratorio humano emplean una metaloproteinasa de la membrana (aminopeptidasa N) como principal receptor (Masters & Perlman, 2013).

PENETRACIÓN

En esta fase la membrana celular se fusiona a la membrana viral, este proceso es necesario para iniciar la replicación viral en el citoplasma, puede llevarse a cabo en la membrana plasmática o en los endosomas ácidos (LLop et al., 2001).

ENSAMBLAJE VIRAL

Existe una secuencia de 61 nucleótidos aproximadamente hacia el genoma del extremo terminal 3' del ARN viral de cadena positiva. Es así como la proteína N interactúa con esta región para formar la nucleocápside. Una vez formada la nucleocápside esta a su vez interactúa con la proteína M, que posteriormente será expuesta en las superficies citoplasmáticas de las membranas intracelulares (retículo endoplasmático, aparato de Golgi y especialmente un compartimiento entre el RE y el aparato de Golgi, quizá la red cis - Golgi). La proteína M no se halla expuesta completamente en la superficie citoplasmática de la membrana. Al parecer la proteína N debe hallarse asociada al ARN para que esto suceda. Así mismo, la proteína E, se ocupa del proceso de gemación de la nucleocápside a la membrana en donde modifica la curvatura de la misma durante este proceso. Es muy probable que la proteína E sea una proteína de andamiaje para la iniciación del ensamblaje, ya que es probable que se una a la proteína M, y que se encuentre en el virus maduro en pequeñas cantidades y este libre. Otras proteínas que también interactúan en el plano de la bicapa lipídica, específicamente en el compartimiento de gemación son las proteínas S y HE, los complejos S - M y HE - M, formados se unen y luego las cadenas de sacarosa son procesadas a medida que el virus va hacia el aparato de Golgi. Mientras el virus madura morfológicamente en el aparato de Golgi, se empiezan a acumular vesículas en la membrana citoplasmática para luego fusionarse en la membrana plasmática (Betancourt et al., 2017).

GENOMA DE CORONAVIRUS

Coronavirus presenta un genoma de una sola cadena de ARN lineal no segmentado, de polaridad positiva (es decir, posee el mismo sentido que el ARNm). El tamaño del genoma es variable desde 27 a 32 kb (LLop et al., 2001).

El ARN genómico contiene 7-metil-guanosine en el extremo 5' y es poliadenilado hacia el extremo 3'. El orden de codificación de los genes va del extremo 5', que codifica principalmente proteínas no estructurales como la polimerasa (Pol) ARN viral de tipo replicasa (1a y 1ab) y hacia el extremo 3' codifica las cuatro proteínas estructurales: S, E, M, y N (Lam et al., 2021).

Ciertos coronavirus poseen un gen entre el gen (Pol) polimerasa y el gen S que puede haber sido adquirido de paramixovirus, conocida como la hemaglutinina - esterasa (HE). Existen también otros marcos de lectura abiertos (ORFs) que no están altamente conservadas entre diferentes coronavirus. Estos genes codifican proteínas cuya función aun es desconocida. Además de los genes que codifican proteínas en el ARN genómico, todos los coronavirus tienen secuencias intergénicas no codificantes (intrones) que se encuentran en el extremo 5' de cada gen (Hunt, 2008).

REPLICACIÓN DE CORONAVIRUS

La infección por coronavirus empieza con la adhesión de los viriones al receptor celular que puede ser aminopeptidasa N, enzima convierte la angiotensina 2, CEACAM-1, N-acetil-9-0-acetil ácido neuramínico. Una vez terminada la unión se desarrollan una serie de procesos, que producen la liberación de la nucleocápside en el citoplasma de la célula infectada, la cual está lista para su traducción inicial.

El ARN viral al ser de polaridad positiva funciona como ARNm y se traduce parcialmente en proteínas del complejo de la replicasa. Este complejo usa el genoma paterno como molde para la síntesis de un ARN genómico intermedio (negativo) del que se sintetiza genomas de la progenie (positivo) y una serie de ARNm subgenómicos anidados. Así como el ARN genómico, los ARNm subgenómicos también son poliadenilados. Existe una proteína que es traducida de cada ARNm subgenómico, esta se encuentra codificada en el marco de lectura

abierto (ORF) 5', cabe señalar que todas las moléculas, con excepción de la más pequeña poseen más de una secuencia codificadora. Cada ARNm contiene una secuencia iniciadora de aproximadamente 70 bases en el terminal 5' (Betancourt et al., 2017).

En la actualidad se desconoce el proceso de síntesis de los ARNm subgenómico, pero se manejan diferentes postulados, una de ellas señala que la secuencia iniciadora de la hebra negativa es copiada a una hebra positiva de cerca de 70 bases. Esta secuencia iniciadora puede separarse de la hebra genómica y reconocer una de las secuencias intergénicas en la plantilla. Es en este proceso en el que se puede sintetizar hebras positivas largas como el ARN genómico (Masters & Perlman, 2013).

LA POLIMERASA (LA REPLICASA)

La replicasa o ARN polimerasa es el primer gen que se codifica en el terminal 5'. Tiene una longitud de 20 kb, lo que le confiere responsabilidad en más de la mitad del genoma. La replicasa tiene dos secuencias codificadoras de proteínas ubicados en distintos marcos de lectura que se encuentran solapados. Estas dos secuencias dan origen a una proteína denominada poliproteínas o Gen Pol, este proceso se realiza a partir de la pérdida ribosómica cuando el ribosoma se acerca al inicio de la segunda secuencia. Algunas proteasas se encargan de separar la gran poliproteína, a medida que esta se sintetiza, liberando así a la ARN polimerasa (Hunt, 2008).

MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN DE CORONAVIRUS

Los coronavirus poseen generalmente genomas de gran tamaño de ARN, los que se replican por replicasa/polimerasa que codifica el virus. Las ARN polimerasas carecen de un marco de corrección de lectura, presentan una tasa de error de casi

1 en 10,000 nucleótidos. Generalmente el genoma de un coronavirus promedio es aproximadamente 30 kb, esta cantidad originaría mutaciones en la progenie viral. Además los coronavirus generan mutaciones por supresión formadas en las células, este tipo de mutación es conocida como deleción. Existe una elevada frecuencia de recombinación en el genoma viral. La elevada frecuencia de recombinación se debe a la manera discontinua de la replicación del ARN, ya que después que la secuencia iniciadora es sintetizada, el iniciador/polimerasa se traslada o "salta" de una hebra a otra. Esta alta tasa de recombinación representa la evolución del virus y por consiguiente la producción de nuevas cepas virales (Masters & Perlman, 2013).

TRADUCCIÓN DE CORONAVIRUS

La traducción de los ARNm subgenómicos da paso a la producción de las proteínas accesorias y estructurales. Las proteínas estructurales M, S y E se unen a la membrana para posteriormente insertarse en el retículo endoplasmático, una vez insertadas transitan hacia el compartimento intermedio entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (ERGIC). En sincronía a la formación de estas proteínas se forma la nucleocápside como respuesta a la encapsidación de los genomas de la progenie por la proteína N. Las nucleocapsides recién formadas se fusionan con los componentes que unen a la membrana en vesículas o sacos del aparato de Golgi (Betancourt et al., 2017).

Es así como el virión madura al obtener su membrana bilipídica por brotes en vesículas introcitoplasmáticas del retículo endoplasmático. Estos nuevos viriones son exocitados al exterior de la célula infectada. Mientras se produce la infección de algunos coronavirus, una fracción de la proteína S, no ensamblada, es transportada a la membrana plasmática causando la fusión de células infectadas y células adyacentes no infectadas. Esta fusión origina sincitios multinucleados,

además la unión de células permite la proliferación de la infección independientemente a la acción del virus extracelular, es decir permite escapar al virus del sistema inmunitario (Llop et al.,2001).

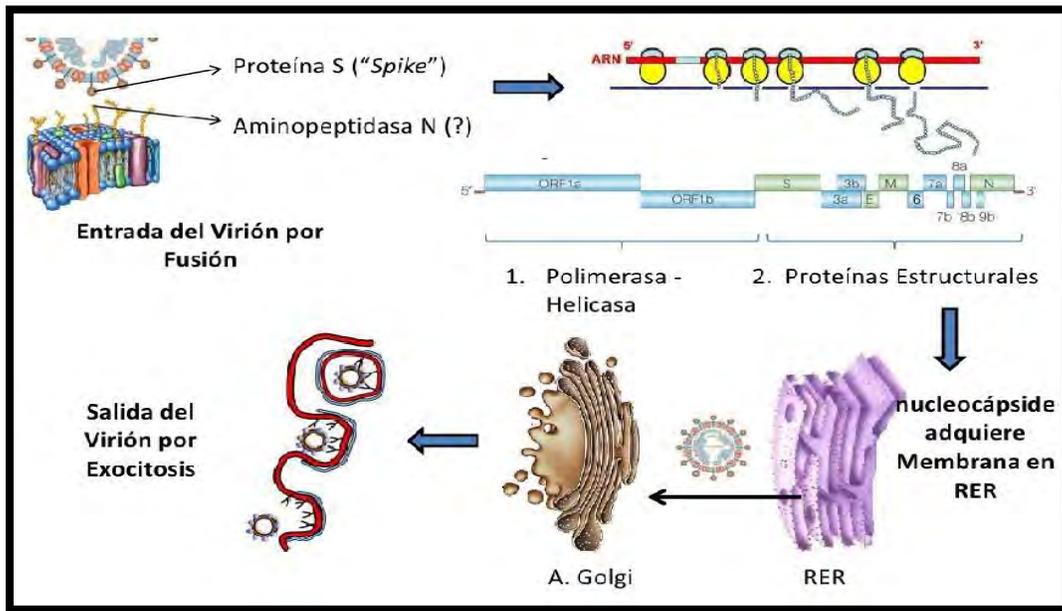


Figura 02. Actividad viral de coronavirus.

Fuente: (López, 2020)

1.4.3.3.4 PROTEÍNAS ESTRUCTURALES DE CORONAVIRUS

Proteína de la nucleocápside (N). (50 - 60 kDa): La proteína de la nucleocápside se une al ARN genómico a través de la secuencia líder y la proteína M, en la superficie interna de la membrana viral. La proteína N se fosforila a comparación de muchos otros virus de ARN y se produce abundantemente en la célula infectada. Considerada como una proteína multifuncional, desempeña numerosas funciones, incluyendo la unión a ARN viral para formar el ribonucleocapside y también

participando activamente en la replicación, la transcripción y la traducción de la maquinaria viral.

Estudios científicos realizadas en células huésped han demostrado que la proteína N causa diferentes trastornos patológicos como: la desregulación del ciclo celular, la inhibición en la producción de interferón, la apoptosis celular, así como su estrecha relación con la enfermedad tipo SARS-CoV (McBride et al., 2014).

Proteína de membrana (M) (20 - 55 kDa): Esta proteína atraviesa la membrana plasmática, gran porción de esta es interna y sólo una pequeña parte con dominio N-terminal es externa. Esta proteína de membrana se encuentra atravesando la membrana tres veces. La proteína de membrana (M) es una glicoproteína que permite la fijación de la nucleocápside a la membrana, es por eso que se denomina así, posee estructuras internas similares al aparato de Golgi. No se encuentra ligada exclusivamente a la membrana plasmática de la célula a diferencia de otras glicoproteínas (LLop et al., 2001).

Proteína (S) espiga (180 - 220 kDa): Es una glicoproteína transmembranal que posee tres dominios: el dominio largo externo (con dos sub dominios), la secuencia transmembranal y el pequeño dominio interno.

El dominio externo (N-terminal) se pliega para adoptar una forma globular, y para formar estructuras de tipo espinas, lo que le da la forma característica de corona. Esta región le confiere al virus propiedades antigénicas y contiene al lugar de unión para el receptor celular. La parte interna del dominio externo se encuentra probablemente enrollado como un espiral y contiene repeticiones en serie de siete. La parte interna del dominio externo presenta un trímero, el cual está formado por estructuras en forma de talo asociado a otras proteínas de tipo S. En algunos coronavirus, el dominio externo se encuentra dividido, más no las dos partes de la glicoproteína que permanecen unidas mediante interacciones iónicas (parecidas a

las gp41 y gp120 del VIH). La parte interna de la proteína S, tiene como función la unión de membranas. Esta glicoproteína comprende una región similar a los receptores Fc-gamma de las inmunoglobulinas permitiendo que el virus sea capaz de protegerse frente a ataques inmunes, además la glicoproteína S puede adherirse al ácido siálico (ácido 9-O-acetil neuramínico) de hematíes infectados, proporcionando al virus la capacidad de hemoaglutinación. Los anticuerpos contra la proteína S son neutralizantes (Lam et al., 2021).

Proteína (HE) (65 kDa): Sólo algunos coronavirus poseen este tipo de proteína hemaglutinina - esterasa. Estas también forman espigas o espinas (más cortas que las espículas de la proteína S) en la superficie del virus. Tiene una actividad de tipo acetilsterasa, separando el ácido siálico de la cadena de sacarosa, lo cual permite que el virus escape de la célula en la que se replicó. Los anticuerpos contra la proteína HE también pueden neutralizar el virus (Hunt, 2008).

Proteína TRANS-MEMBRANA (E) Envoltura (9 - 12 kD): Es un polipéptido con uno de los tamaños más pequeños de 9 - 12 kDa (76 - 109 aminoácidos). Es un componente minoritario de la membrana del virión y de función incierta. En la célula afectada se encuentra en la superficie celular y cerca del núcleo. Tiene en su estructura un extremo amino hidrófilo de 7 - 12 aminoácidos con carga negativa. La proteína transmembrana E también posee un dominio hidrófobo de aproximadamente 25 aminoácidos, esta región tiene una hélice anfipática, que se oligomeriza para formar un conducto de iones en las membranas (Lam et al., 2021).

1.4.3.3.5 ETIOLOGÍA DE CORONAVIRUS

El coronavirus es un amplio grupo de virus distribuidos a nivel mundial, causan diferentes trastornos o enfermedades en el organismo infectado. Los virus más reconocidos y estudiados son el virus respiratorio humano, COVID - 2019, virus de

la hepatitis murina, y virus de la encefalomiелitis hemoaglutinante porcina, virus de la gastroenteritis porcina transmisible, virus de la peritonitis infecciosa felina, coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave del murciélago, coronavirus bovino, SARS y el MERS, coronavirus en alpacas y coronavirus en llamas (López et al., 2011).

Causan enfermedades mortales como: infecciones respiratorias del tipo SARS, infecciones entéricas, gastroenteritis, trastornos hepáticos, neurológicos y la peritonitis felina, todos estos de importancia clínica y veterinaria a nivel mundial, tal es el caso de la pandemia producida en la actualidad causada por el COVID - 2019, que ha generado miles de decesos a nivel global.

A finales del año 2019 se reportó el hallazgo de un nuevo coronavirus, el cual resultó ser una variante del agente etiológico del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) conocido como SARS - Cov2, causante de la pandemia actual de coronavirus en humanos (COVID - 2019), se cree que el virus infectó a la población humana por medio del contacto con los murciélagos en la ciudad de Wuhan - China.

Se han hecho estudios que demuestran que el coronavirus posee una envoltura lipoproteica que rodea la cápside, la cual se inactiva frente a la presencia de solventes orgánicos como deoxicolato de sodio, cloroformo, éter, así como detergentes como el Nonident P-40. El virus reduce drásticamente su grado de infectividad a pH de 3 (Betancourt et al., 2017). Algunas investigaciones revelan que la termosensibilidad del virus es de -20°C, proporcionándole al virus la facultad de resistir a largos periodos de congelación de más de dos años, así mismo se ha demostrado que el virus no resiste a temperaturas superiores a 50°C (De Troi, M., 2020). A temperatura ambiente la presencia del virus disminuye progresivamente, debido a las radiaciones solares y las altas temperaturas, pero puede prevalecer en

las superficies como metales, cristales, acero inoxidable y plástico alrededor de cinco días o más en condiciones de temperatura y humedad adecuadas. El virus se elimina totalmente en presencia de rayos UV, fenol al 0.5%, formalina al 0.05%, durante un periodo de 30 minutos (OPS, 2003).

1.4.3.3.6 TRANSMISIÓN Y PATOGENIA DE CORONAVIRUS EN ALPACAS

Los coronavirus son reconocidos por causar numerosas enfermedades respiratorias y entéricas en diferentes animales, desde bovinos, camellos, cerdos, alpacas y perros, llevando anualmente a una pérdida económica en la ganadería afectando a varias familias de la sierra peruana.

La transmisión es por inhalación, ingestión de secreciones nasales (gotas de Flugge), por ejemplo al estornudar o mediante la leche de las madres. Los más perjudicados son las crías de animales recién nacidos, debido a la cantidad de leche ingerida. Presentando un cuadro clínico que dura alrededor de 1 a 2 semanas. El periodo de incubación del virus en el individuo dura 2 días, llegando a presentar diarreas líquidas y amarillas, y en los casos más graves diarreas sanguinolentas, que llegan a persistir hasta 6 días. Aunque las infecciones por coronavirus son generalmente locales, pueden llegar a diseminarse. En los humanos, estos virus han sido implicados en las infecciones de oído medio, vías respiratorias y orofaringe causando neumonías y miocarditis en pacientes inmunosuprimidos. Asimismo en crías de alpaca, se presentan acompañadas de una infinidad de parásitos como *Eimeria sp*, bacterias (*Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Campilobacter spp.*) y virus como rotavirus. Acompañados de esta diversidad de agentes patógenos, los coronavirus repercuten agresivamente en el organismo del individuo. Los virus infectan las células epiteliales del tracto entérico bloqueando las microvellosidades del intestino delgado. La infección de los enterocitos provocada por coronavirus influye en la absorción de electrolitos y agua, además de inducir la actividad secretora del intestino, desencadenado en

cuadro clínico de deshidratación, acidosis e hipoglicemia en los animales. En individuos recuperados el daño celular ocasionado puede regenerarse y eventualmente volver a su normal funcionamiento fisiológico (López et al., 2011).

DIAGNÓSTICO DE CORONAVIRUS EN ALPACAS

Existen diferentes tipos de diagnóstico para la identificación del virus, uno de ellos es el basado en serología de la alpaca afectada, debido a que estos generan anticuerpos en respuesta a la infección, los cuales pueden aparecer en estadíos tempranos a la enfermedad. El diagnóstico del virus se desarrolla mediante la recolección de heces diarreicas y secreciones nasales. Una vez colectados pasan a ser procesados por técnicas de tipo ELISA o por genotipificación mediante técnicas moleculares como es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), siendo éste el método de detección más sensible y eficaz diagnóstico (Cho et al., 2001).

1.5 MÉTODOS DE DETECCIÓN MOLECULAR DE CORONAVIRUS

1.5.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS: ARN

El ARN viral es aislado y separado a partir de diferentes moléculas y componentes celulares, así como iones, aminoácidos, nucleótidos, lípidos, carbohidratos, proteínas, material genético ADN, ARNasas, propios de la muestra. La purificación y extracción del ARN viral se desarrolla con el objetivo de obtener un material genético completamente integro, puro, no degradado, libre de todo tipo de impureza que afecte a su estructura, como ARNasas, ADN exógeno e inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa. Este procedimiento se realiza acorde a las características fisicoquímicas del ARN, donde se usan principalmente reactivos de alta calidad como detergentes aniónicos, alcoholes especiales, trizol, fenol y

cloroformo, los cuales permiten un mayor aislamiento del material genético a partir de todas las moléculas suspendidas en el medio, además de favorecer a mantener la integridad de los nucleótidos, y por consiguiente toda la cadena de ARN (Cho et al., 2001).

Es importante conocer el tipo de tratamiento que se le debe dar a los diferentes tipos de muestras biológicas a analizar, algunas de éstas necesitan ser pulverizadas con nitrógeno líquido o hielo seco, en el caso de muestras diarreicas se deben agregar soluciones salinas o de buffer o tampón de extracción, en este caso se emplea el PBS salino a un pH de 7.3, este tampón sulfato salino permite mantener el pH del medio, diluir sustancias, así como mantener las células infectadas en condiciones fisiológicas estables antes de la ruptura celular. Se encarga también de resuspender el medio en el que se encuentran suspendidas las células infectadas por el virus. La adaptación de la diversidad de técnicas moleculares utilizadas en biología molecular para el estudio del material genómico depende de la habilidad del investigador (Velazco, 2004). Las muestras a procesar pueden ser de diferentes tipos desde tejidos celulares hasta muestras de contenido entérico o secreciones nasales.

Determinar la integridad de los nucleótidos de las cadenas de ARN constituye un elemento fundamental, y la búsqueda de un método estandarizado para la extracción hace posible que se obtengan resultados óptimos, los cuales nos permitan evitar problemas como, la presencia de bandas falsas, la formación de bucles, poca reproductibilidad del ensayo y dimerizaciones en la RT - PCR y PCR. Además el éxito de una secuenciación de calidad, la obtención de librerías genómicas y perfiles de amplificación depende en gran medida a la pureza del ARN (Fraga et al., 2004).

Se puede encontrar una variedad de métodos de extracción, dentro de los cuales se tiene:

LA RUPTURA CELULAR

Considerado como uno de los pasos más importantes en el aislamiento del ARN, la ruptura de la membrana celular se desarrolla en base a diferentes procedimientos de fuerza mecánica, fuerzas de gravedad, variaciones térmicas, químicas y enzimáticas. Dentro de los métodos mecánicos más sobresalientes tenemos el licuado a alta presión, la molienda y la sonificación. Los métodos de lisis celular incluyen CTAB, EDTA, PVP, Tris, acetato de amonio, no obstante su aplicación puede provocar la ruptura de las cadenas de ARN, debido a que el ARN es una cadena simple, las estructuras nucleotídicas son más lábiles e inestables, por ello es recomendable utilizar procedimientos químicos o enzimas que resulten menos agresivos a la hora de la ruptura celular y la separación de organelos. Los detergentes tienen la capacidad de lizar las capas bilipídicas de la membrana. Existen casos particulares de membranas celulares resistentes a procesos químicos, entonces es necesario realizar un previo tratamiento enzimático, para que posteriormente el detergente actúe de manera eficaz (Surzycki, 2012).

REMOCIÓN DE PROTEÍNAS Y ADN

La separación de proteínas y contaminantes celulares del ARN se realiza con la finalidad de purificar el material genético. La lisis celular va en función a las diferencias bioquímicas de las proteínas (hidrofóbicas) y ácidos nucleicos (hidrofílicas). En la actualidad la industria química nos ofrece una gama de solventes orgánicos como soluciones desproteinizantes (trizol), fenol y cloroformo. El uso de solventes orgánicos se realiza en función a sus propiedades bioquímicas como: Diferencia en solubilidad, gradiente de densidad (diferencias en volumen

especifico) del tipo Trizol, la sensibilidad de la proteína y la actividad de enzimas digestivas como la proteinasa K (Surzycki, 2012).

El método del Trizol se utiliza de acuerdo a la gradiente de densidad que presentan las proteínas, permitiendo la precipitación y aislamiento de ARN total, que se encuentra unido a proteínas en el mismo medio. Además el fenol y el isotiocianato de guanina presentes en el reactivo le permite separar y eliminar progresivamente las proteínas y otros componentes celulares, obteniendo así un ARN más precipitado, integro, puro y de alta calidad.

1.5.2 CUANTIFICACIÓN Y CALIDAD DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Una vez removida las proteínas, el procedimiento final para la purificación implica la concentración total del ARN de las soluciones desproteinizantes utilizadas, asimismo se necesita remover todas las impurezas, producidas en la lisis celular. Este procedimiento se realiza precipitando el ARN con alcohol isopropílico, alcoholes helados en diferentes concentraciones y posteriormente, la elusión con agua libre de nucleasas (Alejos et al., 2015).

Para la evaluación de la integridad y pureza del ARN total extraído, se somete a medidas de fluorometría, comparación de intensidad de bandas en geles de agarosa o espectrofotometría ultravioleta. La espectrofotometría es una herramienta basada en las mediciones cuantitativas de espectros de luz, las medidas realizadas son las longitudes de ondas de luz al cual está expuesto el material, propiedades conocidas absorbancia, transmitancia y reflectancia (Park et al., 2006).

La espectrofotometría de absorbancia es utilizada para las mediciones del ARN expuestas a longitudes de onda de 260 nm a más, y para determinar la pureza y concentración a través de lecturas de ratios de 260nm y 280 nm (propia de

proteínas). La medida de la densidad óptica OD se da a razón de los ratios 260/280 (calidad de pureza, contaminación con proteínas) y 260/230 (contaminación con sales y fenoles). Estos ratios se miden a partir de la fluorescencia emitida por el ARN, los cuales se comparan con los patrones estándar (Surzycki, 2012).

Tabla 3. Valores respecto a calidad y pureza de ARN

<i>RATIO</i>	<i>VALOR</i>	<i>INDICADOR</i>
<i>260/280</i>	2.0- 2.2 >1.7 <1.7	ARN de pureza óptima. ARN de pureza aceptable. Presencia de compuestos aromáticos y proteínas.
<i>260/230</i>	<1.5	Contaminación con sales, carbohidratos y fenoles.

Fuente: Elaboración propia.

Otro método de cuantificación y determinación de pureza del ARN se realiza en geles de Agarosa mediante la adición de marcadores de peso molecular.

1.5.3 RT - PCR

El ARN al ser una cadena sencilla de una sola hebra, es muy sensible al calor y cualquier elemento químico, siendo muy lábil en su estructura, por tal motivo es necesario hacer una transcripción reversa (RT) generando una copia ADNc complementario monocatenario a partir de la cadena de ARN. La RT - PCR inicia con la unión de primers y oligo dT, para posteriormente utilizar la enzima

transcriptasa reversa que tenga una actividad endo H, esta enzima se encarga de eliminar el ARNm y sintetizar los nucleótidos para la formación de la cadena doble o bicatenaria complementaria. Durante el proceso se añaden primers.

Componentes de la RT - PCR:

- Oligo dT: Son los oligonucleótidos necesarios para el alineamiento de las cola poli A en el extremo 3' del ARNm, implicadas en la síntesis de la cadena complementaria de ADN.
- Random primers: Son oligonucleótidos que se insertan de manera no específica, con cualquier región del ARN.
- dNTP: Contienen a los cuatro monómeros necesarios para la síntesis del ARN, pueden provocar variaciones en la actividad enzimática cuando se añaden en concentraciones elevadas.
- RT Buffer: Mantienen el pH adecuado para la actividad de la enzima transcriptasa reversa.

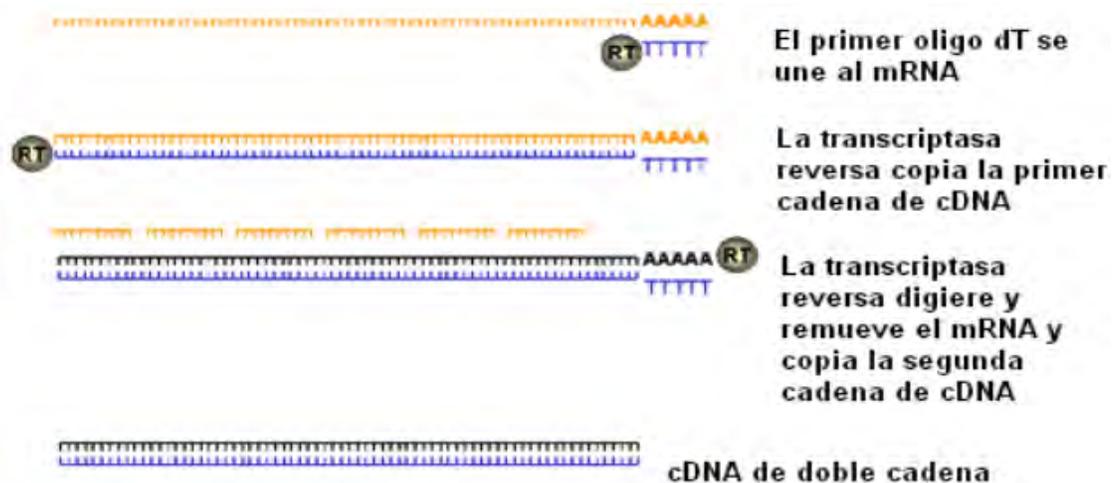


Figura 03. Retrotranscripción de ARNm a ADNc

Fuente: (Cortazar & Silva, 2004).

El ADN complementario de cadena doble se desnaturaliza a temperaturas de 90 – 94 °C, momento en el que separan las dos hebras. A temperaturas de 50 - 60 °C los primers específicos se ordenan con el sitio complementario en cada cadena. Los productos obtenidos de la RT - PCR pueden observarse mediante la técnica de electroforesis en agarosa, las cuales se tiñen con bromuro de etidio. Los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio revelan la presencia de bandas para la cuantificación del ADN complementario (Cortazar & Silva, 2004).

1.5.4 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

El método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está muy difundido en el campo de la biología molecular, es considerado como una técnica adecuada para el diagnóstico y la obtención de resultados fiables y de calidad. Esta técnica amplifica de manera rápida y eficiente millones y millones de copias de ADN bicatenario a través de reacciones enzimáticas in vitro durante un ciclaje repetitivo (Surzycki, 2012).

Los componentes para una reacción estándar de PCR son (Surzycki, 2012):

- Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs): Son los cuatro tipos de nucleósidos trifosfatados dATP, dCTP, dGTP, y dTTP. Estos monómeros emparejan a los desoxirribonucleótidos complementarios correspondientes del ADN molde, para llevar a cabo la síntesis del ADN. La maquinaria sintética está estrechamente ligada a su especificidad, dado que en concentraciones elevadas pueden inhibir la actividad enzimática de la Taq polimerasa (Surzycki, 2012).
- MgCl₂ (cofactor enzimático): Son iones divalentes, considerados cofactores enzimáticos. Están implicados en la actividad enzimática. Estos componentes

son termoestables y poseen un bajo peso molecular (Sambrook & Green, 2012).

- **Primers (cebadores):** Son un par corto de cadenas de nucleótidos, de aproximadamente 18 - 22 nucleótidos, contienen un porcentaje de GC entre 40 - 75%. Son denominados forward y reverse. Estos oligonucleótidos son reconocidos e hibridados por la enzima para que se inicie la amplificación con las regiones complementarias. Delimitan regiones específicas de ADN, permitiendo el estudio de investigaciones de variabilidad genética a partir de la extensión de genes específicos. Poseen un a temperatura de melting (T_m), que es necesaria para la fusión de los primers y el inicio del alineamiento (Surzycki, 2012).
- **Buffer o Solución Amortiguadora:** Conserva el pH adecuado durante la reacción enzimática de la polimerasa. Por lo regular incluye Tris-HCl (pH=8,4 a temperatura ambiente), KCl, MgCl₂. Algunos investigadores sugieren el uso de adyuvantes químicos como DMSO (dimetilsulfóxido), los cuales disminuyen las estructuras secundarias del ADN, otros en cambio como los detergentes Tween 20 o el Tritón X-100, se encargan de mantener la estabilidad de la enzima. También encontramos el PEG, glicerol, formamina y seroalbumina bovina. Estas sustancias potencian la especificidad y fidelidad de la PCR (Surzycki, 2012).
- **ADN molde:** Es el ADN complementario obtenido de la RT - PCR. Comprende la región de ADN que a amplificar es de cadena doble. Para el desarrollo de la PCR se pueden utilizar cantidades de 1 ng, en caso de muestras de material genético clonado, o también pueden ser 20 ng para el caso de investigaciones de ADN genómico de células eucariotas o 10 ng en caso de ARN viral (Sambrook & Green, 2012).

- Agua libre de nucleasas: Es una sustancia utilizada como solvente para la conservación del ADN. Es recomendable que sea un agua desionizada o de grado molecular. Si se necesita de un mayor rendimiento es necesario que esté libre de ADNasas y ARNasas, purificada por luz ultravioleta, ozono o 0,1% de dietil - pirocarbonato (este último inactiva las ARNasa) como el agua DEP (Sambrook & Green, 2012).

El principio de la prueba de PCR se basa en la reproducción de numerosas reacciones de manera cíclica a través de diferentes temperaturas de incubación. El ADN es un ácido nucleico de doble cadena que necesita ser desnaturalizado por calentamiento a temperaturas de 94 °C, para obtener cadenas simples, las cuales serán usadas como molde. Posteriormente se inicia el proceso de alineamiento donde los primers o cebadores se solapan sobre las cadenas complementarias de ADN. Una vez reconocidos los cebadores, la enzima ADN Taq polimerasa se encarga de realizar la síntesis de una nueva hebra complementaria de ADN, realizando una copia fiel del ADN molde. Una vez terminada la amplificación y la reproducción de nuevas cadenas de ADN, el ciclo se repite de manera consecutiva durante varios ciclos programados (Surzycki, 2012).

El ADN copiado se revela a través de la presencia de bandas en geles de agarosa. La visibilidad de la banda depende en gran medida de la eficiencia de los primers y el número de copias generadas en los diferentes ciclos de la PCR. El producto final de la reacción in situ se obtiene alrededor de los 30 ciclos a más, con la generación de copias ADN de alta calidad, gracias a la gran eficiencia de ADN Taq polimerasa (Surzycki, 2012).

1.5.5 ELECTROFORESIS Y EVALUACIÓN DE GELES

La electroforesis en geles de agarosa permite separar macromoléculas en función del tamaño, a la carga eléctrica y otras propiedades físicas. El término proviene de

“Electro” que se refiere a electricidad y “foresis” del vocablo griego phoros, que significa “trasladar”. La electroforesis en gel de agarosa es una técnica en la que se somete a una corriente eléctrica a los electrodos de ambos extremos de un pocillo diseñado para las placas de gel que contienen a las moléculas de ADN (Sambrook & Green, 2012).

Los aminoácidos, los péptidos, las proteínas, los nucleótidos y los ácidos nucleicos son macromoléculas biológicas que tienen grupos ionizables a un pH determinado. En la presencia de diferentes soluciones estas macromoléculas se cargan eléctricamente, sean cationes (+) o aniones (-). Durante el proceso de electroforesis los iones positivos hidratados, normalmente asociados con los grupos aniónicos fijados de la agarosa, pueden moverse hacia el electrodo negativo y las moléculas negativas, como los grupos fosfato de ADN, migran hacia el electrodo positivo (Westermeyer, 2005).

La electroforesis en gel de agarosa es un método normalizado que se utiliza para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN (Sambrook & Green, 2012). Estos fragmentos se detectan a partir de diferentes patrones de bandas, los cuales poseen un determinado peso molecular. Así mismo existen una variedad de colorantes que ayudan a indicar la posición de corrimiento del ADN en el gel de agarosa, conocidos como tampón de carga, dentro de los más conocidos encontramos el azul de bromofenol y el xileno cianol. Existen también dos tipos de buffer aplicados en la separación de los fragmentos de ADN, el TAE y TBE. Dentro de las diferencias más significativas de los buffers encontramos que el Buffer TAE se emplea para el análisis de fragmentos de ADN de alto peso molecular (900 – 2000 bp), que necesiten de una mayor resolución, son ideales para la recuperación del ADN, poseen una baja fuerza iónica y tienen una mayor capacidad de separación en agarosas al 0.8%. Por otro lado el buffer TBE es utilizado para la disgregación de fragmentos pequeños de ADN (100 – 500 bp), siendo más

estables y realizando corridas mucho más rápidas que el buffer TAE. Poseen una capacidad amortiguadora más alta que el buffer TAE y pueden soportar varias corridas de electroforesis durante 3 o 4 días. Su capacidad de separación es más eficiente en geles de agarosa preparados al 2% (Sambrook & Green 2012).

Por último, para el revelado de las bandas de ADN en los geles de agarosa, es utilizada el bromuro de etidio, sometiéndose a teñidos de hasta 20 minutos. Este reactivo se une a los ácidos nucleicos al intercalarse entre las bases nitrogenadas. Una vez teñidos los geles de agarosa se utiliza un fotodocumentador para las lecturas de ondas ultravioletas y la colecta de información genómica. A longitudes de onda de 300 a 360 nm los geles con bromuro de etidio absorben la radiación ultravioleta y en respuesta emiten una fluorescencia de una longitud de onda de aproximadamente 590 nm (Sambrook & Green 2012).

CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

La colecta de muestras a partir de necropsias de porciones intestinales de crías de alpaca se efectuó en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos, CICAS La Raya, adscrita a la Escuela Profesional de Agronomía y Zootecnia, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC) en la época de lluvias entre los meses de setiembre de 2017 y marzo 2018.

El Centro Experimental CICAS La Raya se encuentra a una altitud de 4130 m, entre las coordenadas 14° 21' 25" sur y 71° 10' 8" de longitud oeste (ver figura 04), ubicado al norte del centro poblado de Marangani, a una distancia de 33 km, a la margen izquierda de la carretera que conduce a la ciudad de Sicuani - Canchis. Políticamente pertenece al distrito de Marangani, provincia de Canchis, departamento de Cusco. Esta región presenta una zona de vida natural rodeada de pastizales altoandinos y bofedales, rodeados de riachuelos que discurren a lo largo del caserío.

Presentan temperaturas máximas que oscilan entre 13 – 17 °C y mínimas que comprenden los -7 y 2.5 °C, con una precipitación pluvial que varía entre 90 y 200 mm³/mes.



Figura 04. Ubicación geográfica del centro experimental CICAS La Raya.

FUENTE: (Google Maps, 2020).

El procesamiento de muestras y el desarrollo de técnicas moleculares del presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio institucional de genética y genética molecular, cito en el ambiente C-321, pabellón C, de la Escuela Profesional de Biología, Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del departamento del Cusco.

2.2 MATERIALES

2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

75 muestras colectadas de diferentes porciones intestinales con contenido entérico a partir de necropsias de alpacas muertas del CICAS La Raya.

2.2.1.1 MATERIAL GENÉTICO

Aislamientos de ARN viral obtenidos mediante extracción y purificación a partir de muestras con contenido entérico y materia fecal.

2.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO

2.2.2.1 EQUIPOS

- Autoclave (Bio Clave 16L)
- Balanza Analítica (SARTORIUS)
- Baño maría (Mettler)
- Cámara de electroforesis (BIORAD)
- Cámara de flujo laminar (Thermo Fisher Scientific™)
- Cámara de flujo laminar para PCR (UVP UV3 HEPA PCR STATION)
- Cámara fotográfica (Cannon)
- Destilador de agua (GFL)
- Espectrofotómetro (DENOVI DS-11)
- Estufa de esterilización (Mettler)
- Fotodocumentador de gel (VILVERT E-BOX)
- Fuente de poder (BIORAD)
- Incubadora convencional (Mettler)
- Microcentrifuga (Thermo Fisher Scientific™)

- pH metro (Thermo Fisher Scientific™)
- Sistema de posicionamiento geográfico (GPS)
- Refrigeradora REVCO (Thermo Fisher Scientific™)
- Termociclador (Applied biosystems)
- Ultracentrífuga (Thermo Fisher Scientific™)
- Laptop Lenovo Intel Core i3

2.2.2.2 REACTIVOS

- Agarosa ultrapura
- Agua destilada
- Agua ultrapura
- Amplitaq gold 360 master mix. (Marca: Thermo Fisher Scientific™)
- ARN MiniKit Extraction (Marca: Thermo Fisher Scientific™)
- DNA leader full ranger 1 ml.
- Desoxirribonucleótidos dATP, dTTP, dGTP, dCTP.
- Etanol absoluto (Scharlau)
- MgCl₂
- Nuclease - free water (NSW)
- PBS Tampon 10%
- Primers
- Qubit RNA HS assay kit, 100 assays. (Marca: Thermo Fisher Scientific™)
- Tabletillas de PBS – tween
- TAE buffer 10X
- Trizol LS reagent
- 2x PCR master mix with dual Dye (Marca: abm)
- 2-mercaptoetanol al 99.0%

- 6x cargador de buffer loading buffer (Marca: Thermo Fisher Scientific™)

2.2.2.3 CONSUMIBLES Y FUNGIBLES

- Bisturí
- Bolsas de polietileno
- Frascos para colecta
- Gradillas
- Guantes de nitrilo
- Matraz Erlenmeyer
- Micropipetas graduadas de 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l y 1000 μ l
- Pabilo
- Probeta
- Puntas con filtro de 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l y 1000 μ l
- Strips x 8 (Strips 8-tube. Thermo Fisher Scientific™)
- Tubos de centrifuga de 1.5 m
- Tubos eppendorf
- Tubos falcon
- Vaso de precipitado 200 ml – 500 ml

2.2.3 MATERIAL DE CAMPO

- Coolers
- Libreta de datos
- Pabilo

2.3 METODOLOGÍA

El desarrollo de las diferentes etapas del presente trabajo de investigación se realizó de acuerdo al siguiente flujograma de actividades.

FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

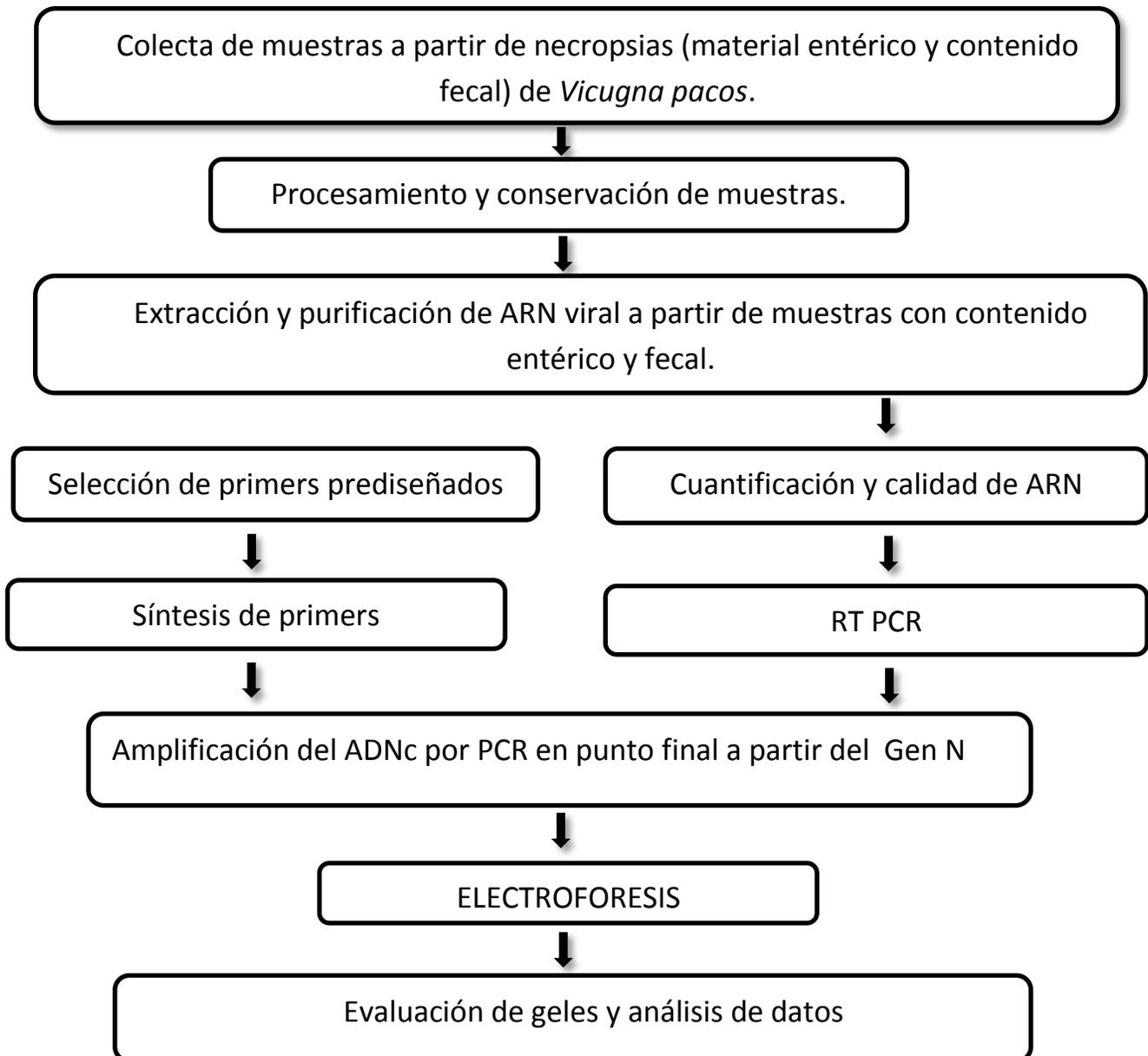


Figura 05. Flujograma de actividades de trabajo.

2.3.1 COLECTA DE MUESTRAS

La colecta de muestras se realizó en el ámbito del Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos CICAS La Raya. Se colectó un total de 113 muestras, a partir de 75 crías de alpaca muertas, en la época de lluvia entre los meses de setiembre de 2017 y marzo de 2018. Las muestras colectadas fueron obtenidas después de haber realizado necropsias de las diferentes porciones intestinales, correspondientes a segmentos del colon ascendente, descendente, transverso, duodeno, íleon, yeyuno y recto de las 75 crías de alpaca muertas (tabla 4). Cabe resaltar que se extrajo más de una muestra por cría de alpaca.

Posteriormente se procedió a su almacenamiento en cadena de frío en bolsas estériles de polipropileno previamente etiquetadas, considerando el código del animal, fecha, lugar de deceso y probable causa de muerte. Del mismo modo se tomó en cuenta la edad, peso y sexo de las crías muertas. Finalmente, la obtención de muestras se desarrolló en condiciones de asepsia y bioseguridad.

Tabla 4. Relación de muestras colectadas de diferentes porciones intestinales de crías de alpaca.

N° CRÍA	CÓDIGO DE MUESTRA	DUODENO	YEYUNO	ÍLEON	C.ASCENI	C.TRANSVER	C.DISCENDEN	RECTO	TIPO DE MUESTRA		OBSERVACIÓN
									HECES	MATERIAL ENTÉRICO	
1	CH-18 335 E	X	X	X	X	X			●	●	Probable causa de muerte: Clostridium sp.
2	CH-8	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
3	CH-B	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
4	CH-9		X	X				X (heces)	●	●	
5	CH-11850573	X	X		X	X	X (heces)	X (heces)	●	●	
6	CH-a115/12 - 17		X	X	X	X	X	X	●	●	Probable causa de muerte: Neumonía y desorden nerviosos.
7	CH-9646/2 - 18	X	X	X		X	X (heces)		●	●	
8	CM-7	X	X		X (heces)	X	X		●	●	
9	CH-2 /2 - 18	X	X	X	X	X		X (heces)	●	●	Probable causa de muerte: Clostridium sp. Edad : H 1 mes.
10	CH-9268 / 1 - 18	X	X	X	X	X	X (heces)		●	●	Probable causa de muerte: Debilidad de miembros, inanición y sangrado por fosas nasales.
11	CH-SN /2 -18	X	X	X	X	X	X	X (heces)	●	●	
12	CH-A	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
13	CH-1811007D	X (C.p)	X	X	X (heces)	X (heces)	X (heces)	X (heces)	●	●	Probable causa de muerte: Clostridium sp. Edad: H 2 meses.
14	CH-9149 /12-17	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	Probable causa de muerte: Enteritis y neumonía.
15	CH-9794/ 2-18	X	X	X	X (heces)	X	X		●	●	Probable causa de muerte: Clostridium sp. Sexo: macho.
16	CM-9552/ 2-18		X	X (C.p)	X (C.p)	X	X (heces)	X	●	●	Probable causa de muerte: Neumonía, sangrando y Clostridium sp.
17	CH-9813 / 2- 18	X	X	X	X	X	X	X (heces)	●	●	Sexo: Hembra.
18	CH-SO 590/ 2 - 18		X	X	X (C.p)	X	X	X	●	●	Probable causa de muerte: Clostridium sp.
19	CM-9581 / 2 -18	X (C.p)	X (C.p)	X	X (heces)	X (heces)	X (heces)	X (heces)	●	●	Probable causa de muerte: Clostridium sp. Sexo: macho.
20	CH-3576	X	X (C.p)	X	X (heces)	X	X	X	●	●	Probable causa de muerte: Clostridium sp.
21	CH-9275/ 1-18	X	X	X	X (C.p)	X	X	X	●	●	Probable causa de muerte: Enteritis.
22	CH-SO 595/ 2 -18	X	X	X	X	X	X	X (heces)	●	●	Sexo : Hembra.
23	CH-4559/ 2- 18	X	X	X	X	X	X	X (heces)	●	●	
24	CH-593/ 2 -18 / 03-03	X	X	X	X	X	X	X (heces)	●	●	
25	CH-5	X	X	X (C.p)	X (heces)	X (heces)	X	X	●	●	Probable causa de muerte: Clostridium sp.
26	CH-9235/ 1 - 18	X	X	X	X	X	X	X (heces)	●	●	Probable causa de muerte: Infección intestinal crónica (Fermentación de leche diarrea).
27	CH-561 / 23-03-18	X	X	X	X	X (heces)	X	X (heces)	●	●	Fecha de muerte: 23-03-18.
28	CH-N2 / 12 - 18	X	X	X	X (heces)	X	X (heces)	X (heces)	●	●	
29	CH-D / 02 - 18	X	X	X	X	X	X	X (heces)	●	●	Probable causa de muerte: Clostridium sp.
30	CH-RN	X (heces)	X	X	X	X	X	X (heces)	●	●	Fecha de muerte : Hembra recién nacida muerta.
31	CH-9587 / 2 -18	X	X	X	X	X	X	X (heces)	●	●	Sexo: Macho.
32	CM-S/N / 3 - 14 -18	X	X	X (heces)	X (heces)	X	X	X	●	●	Sexo: Macho.
33	CM-9642 / 2 - 18	X	X	X	X (heces)	X	X	X (heces)	●	●	
34	CH-9834 / 08 - 18	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
35	CH-F / 1 - 18	X	X	X	X (heces)	X	X	X (heces)	●	●	
36	CH-A2D	X	X	X	X	X	X	X (heces)	●	●	Probable causa de muerte: Aborto 72 horas.
37	CH-SN 3 / 3 -18	X	X	X	X	X	X	X (heces)	●	●	Probable causa de muerte: Clostridium sp.
38	CH-9137 / 12 - 17	X	X	X	X	X	X	X	●	●	Probable causa de muerte: Inanición.
39	CM-SN 2 / 2 -18	X	X	X	X	X	X (C.p)	X	●	●	Sexo: Macho.
40	CH-1MFHU	X	X	X	X	X	X	X (heces)	●	●	Edad: Cría de 1 mes. Procedencia: Huaycho.
41	CH-S 15 / 2 -18	X	X	X	X	X	X	X (heces)	●	●	
42	CH-9193	X	X	X	X	X	X	X (heces)	●	●	
43	CH-18 / 20-03-18	X	X	X	X	X	X	X (heces)	●	●	
44	CH-16/ 03 2018	X	X	X	X	X	X	X (heces)	●	●	
45	CH-1/ 9 18							X	●	●	
46	CH-9190/ 2 -18	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
47	CH-18 h 171/ 1	X	X (heces)	X	X (heces)	X	X	X	●	●	Sexo: Hembra.
48	CH-6m	X	X			X	X (heces)	X (heces)	●	●	
49	CM-18 m 64	X	X (heces)	X	X (heces)	X	X	X	●	●	Probable causa de muerte: Clostridium sp. Sexo y edad: macho de 3 meses.
50	CH-2 m / 10 -17	X	X	X	X (heces)			X	●	●	
51	CH-17 m 53			X			X		●	●	
52	CH-4m	X	X (heces)	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
53	CH-9569 / 2 -18	X	X	X		X (heces)	X	X	●	●	
54	CH-3m	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
55	CM-8009SR	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
56	CH-7818SR	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
57	CM-8102SR	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
58	CH-7565SR	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
59	CH-7346SR	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
60	CH-7868SR	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
61	CH-8058SR	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
62	CM-7916SR	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
63	CH-7592SR	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
64	CH-7122SR	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
65	CH-8054SR	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
66	CM-3368SN	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
67	CM-7969SN	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
68	CH-7524SN	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
69	CM-7834SN	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
70	CM-7034SN	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
71	CH-7688SN	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
72	CH-7912SN	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
73	CH-7817SN	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
74	CH-7712SN	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
75	CH-6239SN	X	X	X	X (heces)	X	X	X	●	●	
TOTAL	MATERIAL ENTERICO	44									
	CONTENIDO FECAL	69									

LEYENDA:

- CH: Cría hembra
- CM: Cría macho
- C.p: Clostridium sp.
- m: Meses
- X: Presencia de porción intestinal
- ● : Muestra seleccionada

2.3.2. PROCESAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

Las 113 muestras obtenidas de las 75 crías de alpaca fueron transportadas en cadena de frío a la ciudad del Cusco, a una temperatura de 2 a 8°C, para posteriormente ser almacenadas y procesadas en el laboratorio de Genética y Genética Molecular de la escuela profesional de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Una vez trasladadas las muestras, se transvasaron a tubos con tapa rosca tipo falcón en máximas condiciones de asepsia posibles, para su procesamiento y almacenamiento a -30°C.

2.3.3 PREPARACIÓN DE MUESTRA Y RESUSPENDIDO DE CÉLULAS

Se seleccionaron un número total de 113 muestras. De las cuales se extrajo dos tipos de muestra: 44 muestras de material entérico y 69 muestras con contenido fecal, que corresponde a una misma porción intestinal (tabla 4). A continuación se procedió pesar 200 miligramos de muestra contenida en microtubos, previamente codificados. Luego se procedió a añadir 2 ml de solución salina PBS al 10% con un pH de 7.4, para mantener la viabilidad de las células en una concentración isotónica a un pH estable. Finalmente se centrifugó los microtubos a 2500 g durante 5 minutos a 4°C.

2.3.4 EXTRACCIÓN DEL ARN VIRAL

Para la extracción y purificación del ARN viral se utilizó un protocolo modificado en el laboratorio, basado en el método de TRizol LS desarrollado por Chomczynski & Sacchi (1987). Se debe señalar que todo el procedimiento se realizó en cadena de frío, para lo cual se utilizaron termobloques previamente congelados. Cabe resaltar que la extracción del ARN viral se realizó utilizando el sobrenadante de la muestra:

1. Se transfirió 500 µl del sobrenadante a un nuevo microtubo.

2. Se añadió 500 µl de TRIzol LS reagent por cada 500 µl de muestra.
3. Se adicionó 150 µl de cloroformo por cada 500 µl de TRIzol LS reagent.
4. Se homogenizó el contenido del microtubo en un vortex por 15 segundos.
5. Se incubó durante 2 - 3 minutos en baño María.
6. Los microtubos se centrifugaron en una microcentrífuga refrigerada a 12.000 g y 4 °C durante 15 minutos.
7. Se transfirió la fase acuosa de la parte superior de la muestra a un nuevo microtubo a una inclinación de 45°.
8. Se añadió 500 µl de isopropanol o alcohol isopropílico a la fase acuosa y se incubó a -70°C por dos horas.
9. Una vez descongelados los microtubos se trasladaron a una microcentrífuga refrigerada y se centrifugó a 12,000 g a 4°C durante 10 minutos.
Nota: Se aprecia la formación del ARN precipitado total, similar a un sedimento blanco en gel.
10. Se descartó el sobrenadante con una micropipeta de 1000 µl.
11. Se resuspendió el precipitado en 1 ml de etanol a -30 °C al 75 % por 1ml TRIzol LS reagent.
12. Se trasladaron los microtubos a un Vortex, para someterlos a agitación suave, posteriormente se centrifugaron los microtubos a 7500 g por 5 minutos.
13. Se descartó el sobrenadante con una micropipeta de 1000 µl.
14. Se dejó secar de manera invertida el microtubo durante 10 minutos.
15. Se resuspendió el precipitado en 40 µl de agua libre de ARNsas y agua DCP molecularmente pura.
16. Los microtubos se dejaron incubando a baño maría sobre un bloque, a una temperatura de 55 - 60 °C.
17. Una vez obtenidos los microtubos con el ARN, se transfirieron a una congeladora de -86°C para su conservación.

2.3.5 OPTIMIZACIÓN DE LOS NIVELES DE PUREZA Y CALIDAD DEL ARN

Para mejorar la calidad y la pureza del ARN, se realizaron diferentes lavados con etanol helado en porcentajes de 100 y 75, mediante el siguiente procedimiento. Cabe señalar que el etanol helado tiene la propiedad de precipitar el ARN, permitiendo separar el material genético de cualquier contaminante.

- Se añadió 1 ml de etanol helado al 100% a los microtubos con ARN extraído.
- El contenido de los microtubos se centrifugó en una centrífuga refrigerada a 7500 g a una temperatura de 4°C durante 5 minutos.
- Se realizó un segundo lavado del contenido de los microtubos con alcohol helado al 75%.
- Se volvió a colocar los microtubos en una Ultracentrífuga a 8000 g a 4°C durante 5 minutos.
- Se descartó el sobrenadante e incubaron los microtubos a una temperatura de 55 - 60 °C durante 10 minutos.
- Finalmente se resuspendieron las muestras en 40 ml de agua DCP (Agua molecularmente pura) y se conservaron a – 86 °C.

2.3.6 CUANTIFICACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DEL ARN

Una vez extraído el ARN viral, se realizaron mediciones cuantitativas a partir de 2 µl en el Espectrofotómetro DENOVI DS-11. Para el control de calidad y nivel de pureza se utilizó las proporciones 260/230 y 260/280, que determinan la presencia de contaminación por carbofenoles y proteínas que acompañan al material genético, respectivamente.

2.3.7 RT - PCR.

El método seleccionado para la síntesis de ADN complementario a partir de ARN, fue mediante la técnica de RT-PCR. Para este fin se utilizó el kit OneScript® Plus

Reverse Transcriptase OneScript® Plus cDNA Synthesis OneScript de la marca abm de Applied Biological Materials Inc., con las siguientes especificaciones:

Componentes:

OneScript®, la transcriptasa inversa es una modificación optimizada a partir de la enzima RTasa (retrotranscriptasa) original. La RNasa H es una endonucleasa cuya función es eliminar la degradación del ARN durante la síntesis de ADNc, permitiendo que esta sea más larga. La falta de actividad RNasa H ayuda a eliminar la degradación del ARN durante la síntesis de ADNc de una sola cadena, resultando en un mayor rendimiento y mayor longitud de ADNc. Además, OneScript® RTase contiene una subunidad potenciadora Fidelity - adicional que mejora drásticamente la precisión de la transcriptasa inversa.

El RNaseOFF: Es una ribonucleasa encargada de proteger eficazmente la plantilla de ARN de procesos de degradación. El ADNc de cadena sencilla se puede utilizar directamente como molde en la PCR.

Oligo (dT): Son oligonucleótidos encargados de hibridar el extremo 3' poli (A) del ARNm. Por lo tanto, sólo el ARNm o plantillas de ARN total con las colas 3' poli (A) se utilizan en la síntesis de ADNc.

Random Primers: Estos oligonucleótidos reconocen sitios no específicos de las plantillas de ARN (ABM, 2019).

El procedimiento se desarrolló según el protocolo establecido por el fabricante:

1. Se irradió con UV la cabina de bioseguridad durante 10 minutos y se puso a descongelar las muestras con ARN conjuntamente con otros componentes del kit. Luego se procedió a la homogenización por agitación moderada.

2. Se preparó todos los reactivos según la tabla número 5. Todo el procedimiento se desarrolló en cadena de frío.

Tabla 5. Componentes de la RT - PCR

COMPONENTES	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
ARN total muestra	5 μ l	2 ng - /rxn
Oligo(dT) (10 μ M)	1 μ l	0.5 μ M 0.5 μ M 10 - 15 Nm
dNTP Mix (10 mM)	1 μ l	500 Mm
NFW (Agua libre de nucleasas)	7.5 μ l	-

3. Se calentó la mezcla a 65°C durante 5 minutos y se transfirió en cadena de frío durante al menos 1 minuto. Posteriormente se sometió a todos los componentes en una breve centrifugación.

4. Una vez centrifugada la mezcla se añadió los siguientes reactivos:

COMPONENTES	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
5X RT Buffer	4 μ l	1X
RNAseOFF	0.5 μ l	20 U/rxn
Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μ l)		
OneScript [®] Plus RTase (200 U/ μ l)	1 μ l	200 U/rxn

5. Se mezcló todos los componentes mediante una breve centrifugación.
6. Se trasladó la muestra a un termociclador para proceder con la síntesis de ADNc, incubándose durante 50 minutos a 42 °C.
7. Se detuvo la reacción mediante un calentamiento a 85°C durante 5 minutos. Finalmente se trasladó la muestra a un termobloque frío. La hebra recién sintetizada de ADNc se almacenó a -20 °C.

Notas generales

1. Tanto la cola poli (A) del ARNm y el ARN total se pueden utilizar para la síntesis de ADNc, se observa un mayor rendimiento y pureza junto a los oligo dT.
2. Las muestras de ARN deben estar libres de contaminación de ADN genómico.
3. Respecto a la cuantificación de ADNc y control de calidad.- El ADNc se midió en el Espectrofotómetro DENOVI X DS-11. Para verificar la calidad del ADN y los niveles de pureza, se utilizó las proporciones 260/230 y 260/280 (ABM, 2019).

2.3.8 PCR EN PUNTO FINAL

El método utilizado fue la PCR convencional en punto final. Se utilizó el Kit 2X PCR Taq MasterMix with dye de la marca abm de Applied Biological Materials Inc. Este método se desarrolló en función al uso de un par de primers específicos para coronavirus. El par de primers utilizados corresponden a regiones específicas de 407 pb del gen N. La concentración de ADNc óptima para la PCR en punto final fue 10 ng/μl, para lo cual se realizaron numerosos cálculos y diluciones conforme a los valores obtenidos en el espectrofotómetro. Se utilizó un control positivo para coronavirus, identificado con la denominación CH-3B y también se estableció un control negativo de una muestra escogida al azar, que no presentaba virus alguno.

La amplificación de ADNc se realizó mediante el protocolo establecido en el kit, que a continuación se detalla:

1. Se irradió con rayos UV la cabina de bioseguridad durante 15 minutos.
2. Se estableció controles negativos y positivos para el desarrollo de la PCR. Los controles positivos seleccionados, se obtuvieron en base a muestras que presentaban coronavirus y recibieron la codificación CH-3B. Así mismo se trabajó con controles negativos, que no presentaban amplificaciones específicas de algún tipo virus.
3. Se agregó los siguientes componentes a un tubo de PCR estéril de 0.2 ml.

Tabla 6. Componentes de la PCR.

ORDEN	COMPONENTES	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN PARA 1 REACCIÓN (UL)	VOLUMEN PARA 100 REACCIONES (UL)
1°	ADN	~2 ng/ µl	5 µl	
2°	Forward primer	200 - 500 Nm	2.5 µl	250
3°	Reverse primer	200 - 500 nM	2.5 µl	250
4°	2X PCR Taq Master Mix/ with dye	1X	25 µl	2500
	NFW (Agua libre de nucleasas)		15 µl	1500
Final	Volumen total de la reacción		50 µl	

4. Se preparó una solución maestra (master mix) para múltiples reacciones con la finalidad de minimizar la pérdida de reactivo y permitir un pipeteo preciso. Se añadió el par de primers correspondiente a la mezcla.
5. Se mezcló el contenido del tubo y se centrifugó brevemente.
6. Una vez obtenido el master mix y los primers, se dispensaron 45 µl de solución por cada pocillo de PCR.
7. Se añadió 5 µl de muestra de ADNc a cada pocillo.
8. Se transfirió la placa de PCR a un termociclador de punto final de la marca Applied biosystem para precalentar la muestra durante 5 min a 94°C.
9. Se realizó diferentes amplificaciones de 35 ciclos cada una.
10. Se estableció un ciclaje único para el desarrollo del PCR en punto final.

Tabla 7. Condiciones establecidas para la PCR.

PROCESO	TEMPERATURA	TIEMPO	Nº DE CICLOS
Desnaturalización inicial	94 ° C	5 min	1
Desnaturalización	94°C	1 min	
Alineamiento	58°C	1 min	35
Extensión	72°C	2 minuto	
Extensión final	72°C	7 min	1
Mantener	4°C	Indefinidamente	1

11. Al finalizar la amplificación, las muestras fueron almacenadas a -86 °C, para posteriormente descongelarlas y someterlas a una corrida electroforética.

12. Inmediatamente después de descongelar las muestras, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 2%. Seguidamente se procedió a la evaluación del patrón de bandas en el fotodocumentador.

Evaluación de cebadores o primers.- Los primers utilizados son los descritos por Cho et al. (2001). Para la evaluación de primers forward y reverse prediseñados se obtuvo datos de secuencias genómicas disponibles en el GenBank con código: M16620 y el programa usado fue Primer3Plus-Bioinformatics (<http://www.bioinformatics.nl/cgiAbin/primer3plusprimer3plus.cgi>). Para el diseño de primers se tomó en cuenta las siguientes características: temperatura de hibridación óptima 55°C - 70°C, el tamaño de los cebadores comprendidos entre 18 - 22 nucleótidos. Así mismo se empleó un programa para el control de calidad del primer IDT Primer Quest Tool (<https://www.idtdna.com/site/account/login?returnurl=/site/home/home/help>). Este programa permite verificar todas las características que debe tener un primer, asimismo indica la formación de dímeros (estructuras secundarias) que puedan afectar el proceso de PCR e incidir en la formación de loops o bucles.

Tabla 8. Relación de primers específicos para Coronavirus.

BCoV N

Primers	Secuencias	Longitud	Temperatura	G-C%
Forward	GCCGATCAGT	20	58.4	60%
	CCGACCAATC			
Reverse	AGAATGTCAG	19	62.3	58%
	CCGGGGTAA			

Especificidad “96,6%” y sensibilidad “95,1%” (Cho et al., 2001).

2.3.9 ELECTROFORESIS

Una vez obtenido el producto de amplificación por PCR en punto final, se dispuso a la preparación de geles de agarosa al 2% con buffer TAE al 1X. A continuación, se dispensó 15 µl de alícuotas de ADN a los geles de agarosa y se añadió 1.5 µl de azul de bromofenol al 6X. Posteriormente se corrieron los geles de agarosa por el método de electroforesis durante un periodo de 50 minutos a un amperaje de 70 V. Para concluir el proceso se trasladaron los geles de agarosa a un recipiente especial con bromuro de etidio y se tiñeron durante 5 minutos para el análisis visual de bandas en el digitalizador para imágenes UV VILVERT E-BOX, donde se revelaron los fragmentos de ADN, según los estándares apropiados de peso molecular, adquiridos en el loading buffer.

2.3.10 CÁLCULOS DEL TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS DE PCR

El tamaño molecular correspondiente a cada fragmento se evaluó utilizando el programa Bioinformático Vilvert Smart Imaging para identificar la presencia de coronavirus.

Para ajustar el tamaño de la imagen se cargó desde los archivos de las carpetas de guardado automático del sistema Bioinformático Vilvert Smart Imaging 0. Automáticamente el sistema reconoce la imagen y se identifican las líneas y fragmentos con la opción Lane and bands. Una vez identificadas las bandas se digita el estándar del peso molecular, para elegir el peso molecular seleccionado. Finalmente al pulsar el botón report se obtienen los tamaños exactos de las bandas de PCR.

Para el cálculo de la frecuencia de coronavirus se realizó una regla de tres simple a partir del total de 75 crías de alpacas (100 %), y crías positivas para coronavirus.

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 DE LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se identificaron 113 muestras representativas por observación directa (44 muestras de material entérico y 69 muestras con contenido fecal) a partir de necropsias de los diferentes intestinos de 75 crías de alpaca muertas. La fecha de colecta comprende los meses de setiembre de 2017 y marzo de 2018, durante las épocas de lluvias. Cabe resaltar que en algunos casos se extrajo más de una muestra por cría de alpaca, dado que los dos tipos de muestras estaban contenidas en una misma porción intestinal (tabla 4). La mayoría de muestras fecales presentan una consistencia diarreica y de colores variantes desde tonos, amarillo claro, café y verde, además algunas de ellas presentaron estrías de sangre. Se demuestra también que las épocas de lluvias durante los meses de setiembre 2017 y marzo 2018 influyeron en la presencia del virus y el incremento de las tasas de mortalidad.

3.2 DE LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ARN VIRAL

Para determinar la efectividad del método de TRIzol LS modificado, se cuantificó 113 muestras de ARN viral extraídas a partir de material entérico y contenido fecal, logrando obtener 95 muestras con concentraciones elevadas y de gran calidad. Así mismo según los valores de calidad y pureza establecidos "260/280" y "260/230" se logró extraer muestras de ARN de pureza aceptable (>1.7) y ARN de pureza optima (2.0 - 2.2), libre de contaminantes fenólicos y propios del medio (<1.5) (tabla 9), más no así en 18 muestras. Esta cantidad sugiere un mayor afinamiento del método de extracción utilizado.

Tabla 9. Lecturas respecto a la concentración y calidad del ARN

N°	CRÍA	M.C.F	ng/ul	260/230	260/280
1	N° 01	CH-18 335 E	24.03	0.847	1.884
2	N° 02	CH-8	21.56	0.474	1.576
3	N° 03	CH-B	8.157	0.423	2.102
4	N° 04	CH-9	3.081	0.305	2.289
5	N° 05	CH-11850573	3.842	0.583	1.678
6	N° 06	CH-a115/12-17	34.99	0.257	1.575
7	N° 07	CH-9646/2 - 18	9.238	1.287	1.688
8	N° 08	CM-7	5.096	0.224	1.962
9	N° 09	CH-* /2 - 18	7.093	0.786	1.697
10	N° 10	CH-9268 / 1 - 18	9.729	0.347	1.378
11	N° 11	CH-SN /2 -18	88.81	1.758	1.842
12	N° 12	CH-A	12.79	0.360	1.690
13	N° 13	CH-1811007D	91.67	0.592	1.754
14	N° 14	CH-9149 /12-17	4.14	0.696	1.711
15	N° 15	CH-9794/ 2 -18	5.213	1.052	1.397
16	N° 16	CM-9552 / 2-18	14.55	8.600	1.849
17	N° 17	CH-9813 /2- 18	1.976	0.521	1.020
18	N°19	CM-9581 / 2 -18	15.17	0.627	1.578
19	N°20	CH-3576	20.31	0.480	1.458
20	N°22	CH-SO 595/ 2 -18	5.707	0.798	3.200
21	N°23	CH-4559/ 2- 18	10.31	0.130	1.569
22	N°24	CH-593/ 2 -18 / 03-03	6.005	0.558	1.539
23	N°25	CH-5	8.050	0.934	1.721
24	N°26	CH-9235/ 1 - 18	66.51	0.559	2.039
25	N°27	CH-561 / 23-03-18	46.87	0.246	1.716
26	N°28	CH-N2 / 12 - 18	17.72	0.060	1.685
27	N°29	CH-D / 02 - 18	6.677	0.232	1.754
28	N°30	CH-RN	14.48	0.499	1.685
29	N°31	CH-9587 / 2 -18	18.54	0.459	1.564
30	N°32	CM-S/N / 3 - 14 -18	24.45	0.227	2.075
31	N°33	CM-9642 / 2 - 18	22.27	0.209	1.659
32	N°34	CH-9834 / 08 - 18	18.65	0.244	1.541
33	N°35	CH-F / 1 - 18	43.18	0.243	1.732
34	N°36	CH-A2D	1.555	0.303	2.673
35	N°37	CH-SN 3 / 3 -18	38.20	0.202	1.984
36	N°40	CH-1MFHU	16.55	0.161	1.480
37	N°41	CH-S 15 / 2 -18	7.094	0.044	1.693
38	N°42	CH-9193	41.76	0.301	1.474
39	N°43	CH-18 / 20-03-18	12.41	0.413	1.866
40	N°44	CH-16/ 03 2018	11.83	0.637	1.557
41	N°46	CH-9190 / 2 -18	12.64	0.171	1.557
42	N°47	CH-18 h 171/ 1	11.90	0.582	1.505
43	N°48	CH-6m	7.244	0.133	1.500
44	N°49	CM-18 m 64	5.711	0.129	1.694
45	N°50	CH-2 m / 10 -17	3.444	0.135	1.095
46	N°52	CH-4m	8.931	0.302	1.971
47	N°53	CH-9569 / 2 -18	15.92	0.079	1.381
48	N°54	CH-3m	22.46	0.451	1.094
49	N°55	CM-8009SR	5.187	0.119	1.293
50	N°56	CH-7818SR	11.80	0.328	1.465
51	N°57	CM-8102SR	6.880	0.137	2.026
52	N°58	CH-7565SR	3.329	0.192	2.178
53	N°59	CH-7346SR	13.38	0.450	1.617
54	N°60	CH-7868SR	11.92	0.317	1.617
55	N°61	CH-8058SR	3.908	0.032	1.306
56	N°62	CM-7916SR	8.192	0.286	1.640
57	N°63	CH-7592SR	3.980	0.557	1.352
58	N°64	CH-7122SR	3.666	0.197	1.702
59	N°65	CH-8054SR	2.933	0.095	0.642
60	N°66	CM-3368SN	65.77	0.228	1.752
61	N°67	CM-7969SN	2.741	0.041	2.041
62	N°68	CH-7524SN	98.89	0.136	1.978
63	N°69	CM-7834SN	2.089	0.068	1.538
64	N°70	CM-7034SN	4.493	0.046	2.471
65	N°71	CH-7688SN	94.37	0.150	2.265
66	N°72	CH-7912SN	2.606	0.044	1.274
67	N°73	CH-7817SN	78.63	0.157	2.395
68	N°74	CH-7712SN	120.5	0.202	2.039
69	N°75	CH-6239SN	76.32	0.110	2.495

N°	CRÍA	M.M.E	ng/ul	260/230	260/280
1	N° 01	CH-18 335 E	3.195	0.530	1.856
2	N° 02	CH-8	18.74	0.449	1.656
3	N° 03	CH-B	5.831	0.383	1.265
4	N° 04	CH-9	58.12	1.118	1.720
5	N° 05	CH-11850573	240.1	1.063	1.932
6	N° 06	CH-a115/12-17	7.091	0.759	1.642
7	N° 07	CH-9646/2 - 18	135.6	1.740	1.850
8	N° 08	CM-7	131.1	1.308	1.806
9	N° 09	CH-* /2 - 18	543.8	1.290	2.063
10	N° 10	CH-9268 / 1 - 18	45.18	1.032	1.808
11	N°12	CH-A	132.1	0.456	2.106
12	N°13	CH-1811007D	28.45	0.411	1.899
13	N°14	CH-9149 /12-17	1.978	0.050	0.873
14	N°15	CH-9794/ 2 -18	109.3	0.715	2.050
15	N°16	CM-9552 / 2-18	3.045	0.203	2.247
16	N°17	CH-9813 /2- 18	94.50	1.324	1.869
17	N°18	CH-SO 590/ 2 - 18	52.07	0.549	2.053
18	N°20	CH-3576	233.9	1.846	2.030
19	N°21	CH-9275/ 1 -18	37.49	1.037	1.705
20	N°22	CH-SO 595/ 2 -18	299.5	1.079	1.798
21	N°23	CH-4559/ 2- 18	113.9	0.971	2.020
22	N°25	CH-5	63.02	0.205	1.696
23	N°26	CH-9235/ 1 - 18	52.59	0.722	1.913
24	N°27	CH-561 / 23-03-18	1.523	0.192	2.137
25	N°30	CH-RN	572.6	1.629	1.868
26	N°31	CH-9587 / 2 -18	5.350	0.760	2.242
27	N°32	CM-S/N / 3 - 14 -18	601.4	0.962	1.977
28	N°33	CM-9642 / 2 - 18	125.7	2.115	1.782
29	N°34	CH-9834 / 08 - 18	715.9	0.980	1.855
30	N°35	CH-F / 1 - 18	6.720	0.272	1.642
31	N°37	CH-SN 3 / 3 -18	79.81	2.086	1.813
32	N°38	CH-9137 / 12 - 17	1.450	0.110	1.542
33	N°39	CM-SN 2 / 2 -18	235.6	1.218	1.786
34	N°40	CH-1MFHU	31.61	1.969	1.701
35	N°41	CH-S 15 / 2 -18	44.87	0.272	2.026
36	N°42	CH-9193	67.29	1.910	1.847
37	N°43	CH-18 / 20-03-18	4.369	1.059	1.620
38	N°44	CH-16/ 03 2018	77.15	2.023	1.748
39	N°46	CH-9190 / 2 -18	191.0	1.178	1.976
40	N°47	CH-18 h 171/ 1	10.27	2.119	1.656
41	N°48	CH-6m	160.9	0.729	1.700
42	N°51	CH-17 m 53	329.6	1.943	1.874
43	N°53	CH-9569 / 2 -18	203.3	1.412	1.855
44	N°54	CH-3m	25.35	0.685	1.868

LEYENDA

- CH: Cría hembra
- CM: Cría macho
- M.C.F: Muestra de contenido fecal
- M.M.E: Muestra de contenido entérico
- ng/ul: Concentración del ARN
- N°: Número
- Muestras de contenido fecal : 69
- Muestras de material entérico :44

Se realizó la extracción de 113 muestras de ARN viral extraídas, 44 muestras de material entérico y 69 de contenido fecal. Se logró obtener 95 muestras con concentraciones elevadas y de gran calidad, según los valores de calidad y pureza establecidos "260/280" y "260/230", más no así en 18 muestras.

3.3 DE LA RT - PCR

Se produjo un total de 95 muestras de ADN complementario aptas, (53 de contenido fecal y 42 material entérico), comprendidas entre (1.8 - 2.0) según los valores de concentración y calidad "260/280" descritos. Estos resultados se lograron a partir de la síntesis de cadenas simples de ARN extraído, a partir de 113 muestras de material entérico y contenido fecal, mediante el proceso de RT - PCR (tabla 10). Las 95 muestras de ADNc generadas resaltan el grado de calidad y pureza de ARN obtenido, a través del proceso de extracción.

Tabla 10. Lecturas respecto a la concentración y calidad del ADNc

N°	CRÍA	M.C.F	ng/ul	260/230	260/280
1	N° 1	CH-18 335 E	1409.265	2.350	1.810
2	N° 2	CH-8	1304.144	2.400	1.710
3	N° 3	CH-B	1197.083	2.310	1.710
4	N° 4	CH-9	1260.878	2.380	1.760
5	N° 5	CH-11850573	1245.793	2.240	1.730
6	N° 6	CH-a115/12-17	1072.301	2.320	1.800
7	N° 7	CH-9646/2 - 18	1039.258	2.200	1.720
8	N° 8	CM-7	11951.00	2.410	1.770
9	N° 9	CH-* /2 - 18	1152.531	2.290	1.790
10	N° 11	CH-SN /2 - 18	1208.356	2.240	1.900
11	N° 12	CH-A	1592.279	2.460	1.810
12	N° 13	CH-1811007D	1240.438	2.090	1.720
13	N° 14	CH-9149 /12-17	1356.655	2.370	1.830
14	N° 16	CM-9552 / 2-18	1086.600	2.380	1.790
15	N° 19	CM-9581 / 2 -18	1702.158	2.360	1.840
16	N° 23	CH-4559/ 2 - 18	176.4720	2.333	1.755
17	N° 24	CH-593/ 2 -18 / 03-03	765.6330	2.317	1.810
18	N° 25	CH-5	957.5970	2.324	1.825
19	N° 26	CH-9235/ 1 - 18	765.6610	2.195	1.763
20	N° 27	CH-561 / 23-03-18	756.7750	2.099	1.737
21	N° 28	CH-N2 / 12 - 18	749.4890	2.058	1.779
22	N° 29	CH-D / 02 - 18	906.7100	2.234	1.723
23	N° 30	CH-RN	711.0510	2.054	1.701
24	N° 31	CH-9587 / 2 -18	785.6900	2.402	1.875
25	N° 32	CM-S/N / 3 - 14 -18	968.2410	2.269	1.690
26	N° 33	CM-9642 / 2 - 18	744.2540	2.225	1.851
27	N° 34	CH-9834 / 08 - 18	781.9480	2.204	1.761
28	N° 35	CH-F / 1 - 18	955.6170	2.370	1.893
29	N° 36	CH-A2D	742.3100	2.144	1.731
30	N° 37	CH-SN 3 / 3 -18	812.2440	2.445	1.871
31	N° 42	CH-9193	795.9210	2.207	1.862
32	N° 43	CH-18 / 20-03-18	978.5840	2.249	1.871
33	N° 44	CH-16/ 03 2018	873.7150	2.421	1.789
34	N° 46	CH-9190 / 2 -18	952.0270	2.447	1.887
35	N° 47	CH-18 h 171/ 1	746.0330	2.141	1.742
36	N° 48	CH-6m	767.8600	2.167	1.756
37	N° 49	CM-18 m 64	734.5920	2.092	1.715
38	N° 50	CH-2 m / 10 -17	707.3290	2.145	1.730
39	N° 57	CM-8102SR	870.3000	2.138	1.733
40	N° 58	CH-7565SR	850.9800	2.238	1.624
41	N° 59	CH-7346SR	898.7500	2.319	1.772
42	N° 60	CH-7868SR	944.7400	2.348	1.740
43	N° 62	CM-7916SR	928.5570	2.226	1.718
44	N° 64	CH-7122SR	698.6700	2.252	1.770
45	N° 66	CM-3368SN	945.4100	2.154	1.706
46	N° 67	CM-7969SN	886.0480	2.290	1.629
47	N° 68	CH-7524SN	918.9600	1.715	1.811
48	N° 69	CM-7834SN	1000.836	1.690	2.160
49	N° 70	CM-7034SN	896.0500	2.256	1.598
50	N° 71	CH-7688SN	877.4600	1.776	1.658
51	N° 73	CH-7817SN	961.0500	1.872	1.750
52	N° 74	CH-7712SN	993.7000	1.842	1.765
53	N° 75	CH-6239SN	789.5000	1.797	1.736

N°	CRÍA	M.M.E	ng/ul	260/230	260/280
1	N°1	CH-18 335 E	1100.83	2.351	1.860
2	N°2	CH-8	691.329	2.291	1.810
3	N°4	CH-9	608.403	2.220	1.811
4	N°5	CH-11850573	889.357	2.264	1.813
5	N°6	CH-a115/12-17	923.907	2.428	1.870
6	N°7	CH-9646/2 - 18	814.476	2.197	1.763
7	N°8	CM-7	806.482	2.230	1.710
8	N°9	CH-* /2 - 18	868.006	2.233	1.823
9	N°10	CH-9268 / 1 - 18	61.2240	1.155	0.925
10	N°12	CH-A	87.8500	1.324	1.414
11	N°13	CH-1811007D	39.6240	2.210	1.916
12	N°15	CH-9794/ 2 -18	632.890	2.133	1.726
13	N°16	CM-9552 / 2-18	692.116	2.139	1.728
14	N°17	CH-9813 / 2 - 18	50.5750	0.992	0.837
15	N°18	CH-SO 590/ 2 - 18	57.3620	0.970	0.905
16	N°20	CH-3576	327.045	1.943	1.528
17	N°21	CH-9275/ 1 -18	678.060	2.169	1.747
18	N°22	CH-SO 595/ 2 -18	608.532	2.090	1.719
19	N°23	CH-4559/ 2 - 18	561.760	2.071	1.694
20	N°25	CH-5	562.150	2.073	1.707
21	N°26	CH-9235/ 1 - 18	540.916	2.026	1.693
22	N°27	CH-561 / 23-03-18	549.701	2.130	1.719
23	N°30	CH-RN	592.450	2.157	1.719
24	N°31	CH-9587 / 2 -18	642.395	2.103	1.729
25	N°32	CM-S/N / 3 - 14 -18	1306.81	2.173	1.886
26	N°33	CM-9642 / 2 - 18	1010.87	2.232	1.653
27	N°34	CH-9834 / 08 - 18	1123.08	2.172	1.778
28	N°35	CH-F / 1 - 18	1061.96	2.244	1.727
29	N°37	CH-SN 3 / 3 -18	1007.73	2.260	1.714
30	N°40	CH-1MFHU	1035.00	2.162	1.706
31	N°41	CH-S 15 / 2 -18	951.148	2.138	1.772
32	N°42	CH-9193	866.559	2.230	1.760
33	N°43	CH-18 / 20-03-18	1134.17	2.288	1.838
34	N°44	CH-16/ 03 2018	1443.69	2.305	1.824
35	N°46	CH-9190 / 2 -18	1048.35	2.138	1.769
36	N°47	CH-18 h 171/ 1	1061.64	2.245	1.789
37	N°48	CH-6m	1107.56	2.313	1.764
38	N°49	CM-18 m 64	916.360	2.167	1.733
39	N°50	CH-2 m / 10 -17	886.291	2.231	1.715
40	N°51	CH-17 m 53	868.913	2.201	1.825
41	N°53	CH-9569 / 2 -18	914.129	2.289	1.718
42	N°54	CH-3m	1238.65	2.442	1.897

LEYENDA

- CH: Cría hembra
- CM: Cría macho
- M.C.F: Muestra de contenido fecal
- M.M.E: Muestra de contenido entérico
- N°: Número
- Muestras de contenido fecal : 53
- Muestras de material entérico :42

3.4 DE LA PCR EN PUNTO FINAL

La extensión de las secuencias 407 pb del gen N de la nucleocápside se realizó mediante la técnica PCR en punto final. El producto de amplificación en los geles de agarosa al 2% se visualizó en el digitalizador de imágenes UV VILVERT E-BOX, revelando la presencia de bandas correspondientes al segmento 407 pb del gen N de coronavirus. Del mismo modo se logró amplificar un control positivo para cada corrida electroforética con la denominación CH-3B; además se consideró un control negativo, el cual fue adquirido de una muestra sin antecedentes para el virus. Al tomar en cuenta estos parámetros se demostró la confiabilidad del método, eliminando cualquier sospecha de contaminación o posibles reacciones inespecíficas que puedan invalidar la ejecución de la prueba.

3.5 DEL CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LOS PRODUCTOS DE LA PCR

El cálculo de los tamaños moleculares de las muestras y controles se realizó mediante el programa Bioinformático Vilvert Smart Imaging 0. Se logró identificar la extensión del fragmento 407 pb del gen N, a partir de la cual se determinó la presencia de coronavirus (figura 06). Se observa que el tamaño de las bandas son ligeramente mayores al igual que las observadas por (Cho et. al., 2001). Asimismo, el control negativo no presenta algún tipo de banda, debido a que no posee una infección por coronavirus. La ausencia del control negativo descarta la sospecha de algún tipo de inhibición en el proceso de la PCR.



Figura 06. Resultados PCR en punto final para coronavirus. Se visualizan productos de amplificación con un tamaño de 407 pb.

Leyenda:

- **Pozo N°01 y Pozo N°02:** Marcador de peso molecular (M).
- **Pozo N°03:** Control positivo para coronavirus (CH-3B).
- **Pozo N°04:** Amplificación del ADN del segmento 407 pb de coronavirus. Presencia de coronavirus en muestra de contenido fecal de cría de alpaca N°1.
- **Pozo N°05:** Amplificación del ADN del segmento 407 pb de coronavirus. Presencia de coronavirus en muestra de material entérico (e) de cría de alpaca N°8.
- **Pozo N°06:** Resultado negativo en muestra de material entérico (e) de cría de alpaca N°4.
- **Pozo N°07:** Resultado negativo en muestra de material entérico (e) de cría de alpaca N°16.
- **Pozo N°08:** Resultado negativo en muestra de material entérico (e) de cría de alpaca N°30.
- **Pozo N°09:** Resultado negativo en muestra de contenido fecal de cría de alpaca N°26.
- **Pozo N°10:** Amplificación del ADN del segmento 407 pb de coronavirus. Presencia de coronavirus en muestra de contenido fecal de cría de alpaca N°43.
- **Pozo N°11:** Amplificación del ADN del segmento 407 pb de coronavirus. Presencia de coronavirus en muestra de contenido fecal de cría de alpaca N°44.
- **Pozo N°12:** Amplificación del ADN del segmento 407 pb de coronavirus. Presencia de coronavirus en muestra de contenido fecal de cría de alpaca N°46.
- **Pozo N°13:** Resultado negativo en muestra de contenido fecal de cría de alpaca N°48.
- **Pozo N°14:** Resultado negativo en muestra de material entérico (e) de cría de alpaca N°1.
- **Pozo N°15:** Control negativo para coronavirus (N).



Figura 07. Resultados PCR en punto final para Coronavirus obtenidos mediante el método de electroforesis en geles de agarosa al 2%. Se visualizan productos de amplificación con un tamaño de 407 pb.

Leyenda:

- **Pozo N°01:** Marcador de peso molecular (M).
- **Pozo N°02:** Resultado negativo en muestra de contenido fecal de cría de alpaca N°2.
- **Pozo N°03:** Resultado negativo en muestra de contenido fecal de cría de alpaca N°8.
- **Pozo N°04:** Control positivo para coronavirus (CH-3B).
- **Pozo N°05:** Resultado negativo en muestra de contenido fecal de cría de alpaca N°9.
- **Pozo N°06:** Amplificación del ADN del segmento 407 pb de coronavirus. Presencia de coronavirus en muestra de contenido fecal de cría de alpaca N°12.
- **Pozo N°07:** Amplificación del ADN del segmento 407 pb de coronavirus. Presencia de coronavirus en muestra de contenido fecal de cría de alpaca N°13.
- **Pozo N°08:** Amplificación del ADN del segmento 407 pb de coronavirus. Presencia de coronavirus en muestra de contenido fecal de cría de alpaca N°14.
- **Pozo N°09:** Amplificación del ADN del segmento 407 pb de coronavirus. Presencia de coronavirus en muestra de contenido fecal de cría de alpaca N°16.
- **Pozo N°10:** Amplificación del ADN del segmento 407 pb de coronavirus. Presencia de coronavirus en muestra de contenido fecal de cría de alpaca N°25.
- **Pozo N°11:** Amplificación del ADN del segmento 407 pb de coronavirus. Presencia de coronavirus en muestra de contenido fecal de cría de alpaca N°26.

La prueba molecular de PCR en punto final logro detectar satisfactoriamente 15 muestras de material entérico y 25 muestras de contenido fecal positivas para coronavirus. Se determinó la presencia de coronavirus en un 36.23% en muestras de contenido fecal y 34.09% en muestras de material entérico de las 75 crías de alpaca del CICAS La Raya. Asimismo según el cuadro de resultados (Tabla 11), 35 crías resultaron positivas a infecciones virales ocasionadas por coronavirus, lo cual representa un 46.6% del total de individuos muestreados.

Tabla 11. Relación de resultados positivos a partir del patrón de bandas de gel de agarosa.

N°	CRÍA	CÓDIGO MUESTRA	TIPO DE PRUEBA	TIPO DE MUESTRA		CORONAVIRUS
				HECES	MATERIAL ENTÉRICO	
1	N°01	CH-18 335 E	PCR en punto final	+		POSITIVO
2	N°05	CH-11850573	PCR en punto final	+		POSITIVO
3	N°06	CH-a115/12-17	PCR en punto final	+	+	POSITIVO
4	N°08	CM-7	PCR en punto final		+	POSITIVO
5	N°09	CH-* /2 - 18	PCR en punto final		+	POSITIVO
6	N°10	CH-9268 / 1 - 18	PCR en punto final		+	POSITIVO
7	N°12	CH-A	PCR en punto final	+		POSITIVO
8	N°13	CH-1811007D	PCR en punto final	+		POSITIVO
9	N°14	CH-9149 /12-17	PCR en punto final	+		POSITIVO
10	N°15	CH-9794/ 2 -18	PCR en punto final		+	POSITIVO
11	N°16	CM-9552 / 2-18	PCR en punto final	+		POSITIVO
12	N°19	CM-9581 / 2 -18	PCR en punto final	+		POSITIVO
13	N°21	CH-9275/ 1 -18	PCR en punto final		+	POSITIVO
14	N°22	CH-SO 595/ 2 -18	PCR en punto final		+	POSITIVO
15	N°23	CH-4559/ 2- 18	PCR en punto final	+	+	POSITIVO
16	N°24	CH-593/ 2 -18 / 03-03	PCR en punto final	+		POSITIVO
17	N°25	CH-5	PCR en punto final	+		POSITIVO
18	N°26	CH-9235/ 1 - 18	PCR en punto final	+	+	POSITIVO
19	N°37	CH-SN 3 / 3 -18	PCR en punto final		+	POSITIVO
20	N°40	CH-1MFHU	PCR en punto final		+	POSITIVO
21	N°41	CH-S 15 / 2 -18	PCR en punto final		+	POSITIVO
22	N°42	CH-9193	PCR en punto final		+	POSITIVO
23	N°43	CH-18 / 20-03-18	PCR en punto final	+	+	POSITIVO
24	N°44	CH-16/ 03 2018	PCR en punto final	+	+	POSITIVO
25	N°46	CH-9190 / 2 -18	PCR en punto final	+		POSITIVO
26	N°47	CH-18 h 171/ 1	PCR en punto final	+		POSITIVO
27	N°49	CM-18 m 64	PCR en punto final	+		POSITIVO
28	N°50	CH-2 m / 10 -17	PCR en punto final	+		POSITIVO
29	N°57	CH-3m	PCR en punto final	+		POSITIVO
30	N°59	CH-7346SR	PCR en punto final	+		POSITIVO
31	N°62	CM-7916SR	PCR en punto final	+		POSITIVO
32	N°69	CM-7834SN	PCR en punto final	+		POSITIVO
33	N°71	CH-7688SN	PCR en punto final	+		POSITIVO
34	N°74	CH-7712SN	PCR en punto final	+		POSITIVO
35	N°75	CH-6239SN	PCR en punto final	+		POSITIVO
TOTAL	MUESTRAS DE CONTENIDO FECAL POSITIVAS			25		
	MUESTRAS DE MATERIAL ENTÉRICO POSITIVAS			15		

DISCUSIÓN

En la actualidad se tienen escasos estudios científicos basados en la detección molecular de coronavirus en crías de alpaca, el cual en asociación a otros agentes virales y bacterianos son los principales causantes de las elevadas tasas de mortalidad de crías de alpaca (*Vicugna pacos*). La frecuencia de infecciones virales en alpacas es totalmente desconocida por los gobiernos locales, los cuales no ven la necesidad de elaborar proyectos sanitarios para hacer frente a los problemas ocasionados por el virus. El principal enfoque de este estudio fue detectar la presencia de coronavirus a partir del gen N en crías de alpaca (*Vicugna pacos*) del CICAS La Raya, en la provincia de Canchis del departamento de Cusco, mediante la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en punto final, así como las investigaciones realizadas por Khalili et al. (2006); Park et al. (2006); Hasoksuz et al. (2002), que demostraron la alta sensibilidad del método para la detección molecular del gen N de coronavirus en ganado vacuno. Las frecuencias reveladas por estos autores fueron un (44.44%), (58.2%) y (96%), respectivamente. Así mismo en comparación con el estudio concluido por Park et al. (2006) se logró demostrar la efectividad del método TRIzol LS modificado para la extracción de ARN de una pureza óptima para la RT – PCR. El desarrollo del método de TRIzol LS modificado en laboratorio, realizado en el presente trabajo de investigación genera un método de extracción accesible, económico y con altas expectativas de obtención de ARN de buena calidad.

Por otro lado se demostró la alta especificidad de 96,6% y sensibilidad de 95,1% de los primers **Forward** GCCGATCAGTCCGACCAATC y **Reverse** AGAATGTCAGCCGGGTAA utilizados en el estudio logrado por Cho et al. (2001). Estos primers se utilizaron en la detección de coronavirus en ganado vacuno en los EE.UU, los cuales fueron evaluados y seleccionados previamente, generando

resultados óptimos en la amplificación de la secuencia del gen N. Así mismo permitieron realizar un diagnóstico confiable de las crías de alpaca infectadas, que fueron seleccionadas para el presente estudio. En concordancia a esta idea se podría confirmar la identidad genética evaluada entre el coronavirus bovino y el de las alpacas (BCoV), investigada por Rocha et al. (2018).

Investigaciones realizadas a nivel nacional en Silli - Cusco por Rojas et al. (2016) identificaron a coronavirus como causante de un brote diarreico en crías de alpaca. Como resultado obtuvieron una frecuencia de 40% del virus mediante el uso de técnicas de RT – PCR y PCR. De igual manera Lucas et al. (2016), evaluó la presencia de coronavirus mediante el uso de la técnica de Elisa. Este estudio reveló una frecuencia de 53.3% en crías de alpaca de los departamentos de Pasco y Junín. En contraste a estos dos autores se logró identificar la presencia de coronavirus, como causante de las elevadas tasas de mortalidad en crías de alpaca (*Vicugna pacos*) del CICAS La Raya, de la provincia de Canchis - Cusco. Y se determinó una frecuencia de 46.6% en muestras de material entérico y contenido fecal de un total de 75 crías de alpaca. Este hallazgo es de suma importancia debido al atraso que genera en la producción textil y la economía de los pobladores que se dedican principalmente a este tipo de actividad.

La frecuencia obtenida revelaría un grado notable de infección ocurrida en 35 crías de alpaca del CICAS La Raya, durante las épocas de lluvias de los meses de setiembre 2017 y marzo 2018, en el distrito de Marangani, de la provincia de Canchis.

Estudios realizados por Rojas et al. (2016) en Silli - Cusco y el presente trabajo de investigación da a conocer una probable recirculación del virus, de factores y mecanismos desconocidos en el proceso de contagio. Este virus al parecer estaría

mutando de un organismo a otro y se presume que la causa del contagio sería la proximidad entre las comunidades de Silli y La Raya (65 km aproximadamente), ya que las alpacas de la zona, son trasladadas al centro de investigación CICAS La Raya para su tratamiento y esquila. A todo esto se sumaría, la inadecuada práctica de las medidas de profilaxis realizadas por los productores y la limitada capacitación sanitaria por parte de los gobiernos regionales.

CONCLUSIONES

1. Se detectó la presencia de coronavirus en 35 crías de alpaca (*Vicugna pacos*), mediante la amplificación del gen N de coronavirus a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en punto final, a partir de 113 muestras obtenidas de diferentes porciones intestinales (44 muestras de material entérico y 69 muestras con contenido fecal), de un total de 75 crías de alpaca del CICAS La Raya, lo que corresponde a una frecuencia de 46.6%.
2. Se realizó la extracción de 113 muestras de ARN viral extraídas en base a muestras de material entérico y contenido fecal, obtenidas de una misma porción intestinal, del número total de crías de alpaca, mediante el método TRIzol LS estandarizado y modificado en laboratorio. Y se logró la extracción de 95 muestras de ARN viral de una calidad y pureza óptima con valores comprendidos entre 2.0 - 2.2.
3. Se generó gran cantidad de copias de ADN de cadena doble, termodinámicamente estables, de calidad óptima con valores entre 1.8 - 2.0, a partir de 95 muestras de ARN viral aptas (53 de contenido fecal y 42 material entérico), mediante el uso del kit comercial OneScript[®] Plus Reverse Transcriptase OneScript[®] Plus cDNA Synthesis OneScript, a través del método molecular de RT - PCR.
4. La detección molecular de coronavirus en las 95 muestras de ARN viral (53 muestras de contenido fecal y 42 muestras de material entérico), de crías de alpaca (*Vicugna pacos*) obtenidas, se realizó mediante el uso de los primers **Forward** GCCGATCAGTCCGACCAATC y **Reverse**

AGAATGTCAGCCGGGGTAA que tienen una especificidad de 96,6% y sensibilidad de 95,1%, los cuales resultaron ser óptimos para la amplificación del fragmento 407 pb de la secuencia del gen N de coronavirus, mediante la técnica de PCR en punto final. Se puede considerar que el primer usado es específico para ambos tipos de muestras obtenidas, debido a que hubo una amplificación en 25 muestras de contenido fecal y 15 muestras de material entérico.

5. Se identificó coronavirus en geles de agarosa al 2%, previamente teñidos con bromuro de etidio durante 5 minutos. A partir del análisis visual del patrón de bandas generadas en el programa Bioinformático Vilvert Smart Imaging 0 del fotodigitalizador. Se reveló los fragmentos de ADN del gen N de coronavirus y se consideró la amplificación como resultado positivo.

RECOMENDACIONES

1. Es importante realizar futuras investigaciones para determinar los mecanismos de contagios entre las diferentes especies ganaderas de la región del Cusco: ovinos, equinos, vacunos, llamas y alpacas. Para la prevención de futuros brotes como los sucedidos en la ciudad de Wuhan - China.
2. Ampliar estudios sobre el uso de técnicas moleculares para la detección molecular de coronavirus en crías de alpaca de manera rápida y eficiente.
3. Detectar los diferentes genes y sus secuencias descritos de coronavirus para la identificación molecular del virus.
4. Realizar el secuenciamiento del genoma completo de coronavirus para identificar las regiones responsables de las mutaciones genéticas.
5. Elaborar medidas sanitarias en coordinación con las municipalidades locales y el gobierno regional para el manejo de la población alpaquera afectada.
6. Realizar investigaciones basadas en la identificación de otro tipo de agentes patógenos en asociación a coronavirus, que incrementan las tasas de morbilidad y mortalidad de crías de alpaca.
7. Realizar investigaciones durante la época de secas, para saber si el factor climático influye en la prevalencia del virus.

BIBLIOGRAFÍA

- Alejos, L. P., Aragon, M. & Cornejo, A. (2015). Extracción y Purificación de ADN. Obtenido de <https://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/extraccion.pdf>.
- Applied Biological Material Inc. (2019). Kit OneScript® Plus Reverse Transcriptase OneScript® Plus cDNA Synthesis OneScript. Obtenido de https://www.biocat.com/bc/pdf/OneScript_Plus_RT_and_cDNA_Kit_SL1213.pdf.
- Beate, M., Bradd, C., Barr, K., Magdesian, G., Ing, M., Mora, D., Jensen, D., Loretto, A. & Mcconnell, R. (2007). Identificación de un nuevo *Coronavirus* posiblemente asociado con el Síndrome Respiratorio Agudo en alpacas (*Vicugna pacos*) en California. Revista de Investigación y Diagnostico Veterinario. Pg. 22:94–97.
- Betancourt, A., Rodríguez, E. & Barrera, M. (2017). *Coronavirus* bovino: Infecciones Neumoentéricas. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Agraria de la Habana (UNAH), San José de las Lajas, La Habana. Obtenido de <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/coronavirus-bovino-infecciones-neumoentericas-t41416.htm>.
- Bioenciclopedia. (2015). Alpaca, información y características. Obtenido de <https://www.bioenciclopedia.com/alpaca/>.
- Boileau, J. & Kapil, S. (2010). Síndromes asociados al *Coronavirus* bovino. Clínicas Veterinarias de América del Norte: Práctica de alimentos con animales, Pg. 26(1), 123-146.
- Cebra, C. K., Mattson, D. E., Baker, R. J., Sonn, R. J., & Dearing, P. L. (2003). Patógenos potenciales en heces de llamas no destetadas y alpacas con diarrea. Obtenido de patógenos potenciales en heces de no destetados I. Revista de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria. Pg. 223(12), 1806-1808: <https://doi.org/10.2460/javma.2003.223.1806>

- Cho, K.O., Hasoksuz, M., Nielsen, P. R., Chang, K.O., Lathrop, S., & Saif, L. (2001). Estudios de protección cruzada en hisopados nasales y diarreas de terneros recolectadas en las épocas de invierno a partir de cepas de *Coronavirus* mediante las técnicas de RT-PCR y PCR anidada. *Arco. Virol*, Pg. 146: 2401-2419.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single step method for RNA isolation by acid guanidium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal Biochem*, Pg 162, 156–159.
- Cordo, S. M. (2021). RNA virus, Emergencia y *Coronavirus*. *Revista QUimicaViva*. Obtenido de <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v19n1/E0176.htm>.
- Cortazar, A. y Silva, P. (2004). Métodos físico-químicos en biotecnología PCR. Universidad nacional autónoma de México instituto de Biotecnología.
- Crameri, G., Durr, P. A., Klein, R., Foord, A., Yu, M., Riddell, S. & Wang, L.F. (2016). Infección experimental y respuesta a la reexposición de alpacas con *Coronavirus* del síndrome respiratorio de oriente medio. Obtenido de *Emerging infectious diseases*.Pg 22(6), 1071-1074: <https://doi.org/10.3201/eid2206.160007>.
- De Troi, M. (2020). *Coronavirus: Lecciones antinegacionistas y el futuro del planeta*. Obtenido de https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/62624394/Covid19_Scielo_marco_202020200331-93447-1rp2rws-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1655601902&Signature=NlxPmrbaYlkzWCyE2OUJWC4Wqy4VloIk9qoRmpjhMoQz9m-895pGYTfvpRBeLomH3STFmLCsN1jZzNT56L3hFssHIKkzHpQ9T7WFwZCjaPUr
- Espada, M. (2010). Camélidos sudamericanos: Estado sanitario de las crías South American Camelids: health status of their cria. pg.14.
- Fraga, J., Rodríguez, O., Fuentes, M., & Fernández, C. (2004). Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatomíneos: Su utilización en la técnica de

ADN polimórfico amplificado al azar. Revista cubana de medicina tropical , 56: 208-13.

- Frustagli, S. (2020). Abordajes disciplinares sobre el COVID-19. Obtenido de <https://www.google.com/search?q=A+la+actualidad+se+han+registrado+39+especies+de+coronavirus%2C+varias+especies+son+de+reciente+investigaci%C3%B3n%2C+debido+a+la+mutabilidad+que+presentan%2C+as%C3%AD+como+la+escasa+informaci%C3%B3n+que+se+tiene+respecto+a>.
- Gelambi, M. (2019). Exocitosis: proceso, tipos, funciones y ejemplos. Obtenido de <https://www.lifeder.com/exocitosis/>.
- Genova, S. G., Streeter, R. N., Simpson, K. M., & Kapil, S. (2008). Detección de *Coronavirus* Antigénico del grupo 2 en una alpaca adulta con enteritis. Obtenido de Inmunología clínica y vacunas. Pg 15(10), 1629-1632: <https://doi.org/10.1128/cvi.00232-08>.
- Goepfert, N., Dufour, E., Gutiérrez, B. & Chauchat, C. (2013). Origen geográfico de camélidos en el periodo mochica (100-800 ad) y el análisis isotópico secuencial del esmalte dentario: enfoque metodológico y aportes preliminares. Boletín del Instituto Francés de Estudios Andinos, 42 (1) 25-48.
- Hasoksuz, M., Hoet, A.E., Loerch, S.C., Wittum, T.E., Nielsen, P.R., & Saif, L.J. (2002). Detección de la diseminación respiratoria y entérica de *Coronavirus* bovino en ganado en un corral de engorde de Ohio. Obtenido de Journal Vet. Diagn. Invest. Pg 14:308–313 (2002).
- Hunt, R. (2008). Microbiology, Virology, Parasitology, Mycology. Obtenido de Virologia, *Coronavirus*, Gripe y Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS): <https://www.microbiologybook.org/Spanish-Virology/spanish-chapter25.htm>.
- ICTV.(2007).International committee on taxonomy of viruses. Talk.ictvonline.org, https://elpais.com/elpais/2020/03/06/ciencia/1583515780_532983.html.

- Jin, I., Cebra, C. K., Baker, R. J., Mattson, D. E., Cohen, S. A., Alvarado, D. E. & Rohrmann, G. F. (2007). Análisis de la secuencia del genoma de un *Coronavirus* de Alpaca. *Virología*, 365(1), 198-203. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.035>.
- Khalili, A. M. (2006). Detección de *Coronavirus* bovino por RT-PCR en un estudio de campo. *Archivos veterinarios*. Pg. 76 (4), 291-296.
- Lam Cabanillas, E., Leon Risco, A., Leon Risco, K., LLamo Hoyos, G., Lopez Zabaleta, R., Luzuriaga Tirado, E., Mendoza Blast, E., & Huaman Saavedra., J. (2021). Bases moleculares de la patogénesis de Covid-19 y estudios in silico de posibles tratamientos farmacológicos. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-05312021000200417.
- LLop, A., Valdés-Dápena., M.M., & Zuazo, J I. (2001). *Microbiología y parasitología médica*. Tomo II. Capítulo 74. *Coronavirus*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
- López, L. (2020). Antivirales y vacunas: La ayuda para frenar al *Coronavirus* está en camino. Obtenido de <https://theconversation.com/antivirales-y-vacunas-la-ayuda-para-frenar-al-coronavirus-esta-en-camino-134361>.
- López, W., Chamorro, M. & Garmendia, A. (2011). Rapid detection of *Rotavirus* and *Coronavirus* in baby alpaca (*Vicugna pacos*) with diarrhea in the Cusco region, Peru. *Peru. Peru Veterinary Research Journal*. Pg. 22 (4): 407-411. Obtenido de *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*::http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172011000400016.
- Lucas, L. R., Morales, C. S., Barrios, A. M., Rodríguez, G. J., Vásquez, C, M. & Espinoza, B. J. (2016). Pathogens involved in fatal cases of diarrhea in baby alpaca from the central highlands of Peru. Obtenido de *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. Pg 27(1), 169-175: <https://doi.org/10.15381/rivep.v27i1.11465>.

- Luna, L., Brandão, P.E., Maturrano, L., Rosadio, R., Silva, F.D.F., Soares, R.M. & Gregori, F. (2015). Betacoronavirus 1 in alpacas (*Vicugna pacos*) in the Andes of Peru. *Pequeño Rumiante*, Pg.133: 7-9. .
- Marín, C., Zapata, B., González, B. A., Bonacic, C., Wheeler, J. C., Casey, C. & Spotorno, A. E. (2007). Systematics, taxonomy and domestication of alpacas and llamas: new chromosomal and molecular evidence. Obtenido de *Revista Chilena de historia natural*, 80(2): <https://doi.org/10.4067/s0716-078x2007000200001>
- Martin-Espada, C., Pinto, C., & Cid, M . (2010). South American camelids: Health status of their offspring. *Complutense Journal of Veterinary Sciences*, 4(1), 37–50.
- Masters, P. S. & Perlman, S. (2013). *Fields Virology. Coronaviridae*. Vol. 2.Pg 825–858. Obtenido de https://www.umassmed.edu/globalassets/ambros-lab/meetings/rna-biology-club-2019_20/masters-and-perlman-2013-in-fields-virology_1.pdf.
- Méndez, P. (2008). *Herencia Textil, Identidad Indígena y Recursos Económicos en la Patagonia Argentina. Estudio de un caso: La Comarca de la meseta central de la provincia de Chubut*. Argentina: AIRB. *Revista de Antropología Iberoamericana*.www.airbr.org. Volumen 4, Número 1. Enero-Abril 2009.Pp. 11-53 Madrid: Antropólogos Iberoamericanos en Red. ISSN: 1695-9752.
- Mestanza, O. (2014). Análisis Genético Poblacional en Llamas (*Lama glama*, Linnaeus, 1758) de la Región Puno utilizando la región control de ADN mitocondrial. Obtenido de https://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/501/1/mestanza-genetica_llamas.pdf.
- McBride, R., Zyl, M. & Fielding, B. (2014). La nucleocápside de *Coronavirus* es una proteína multifuncional. *Virus*. ago; 6(8): 2991–3018. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/v6082991>
- MIDAGRI. (2015). MINISTERIO DE DESARROLLO AGRARIO Y RIEGO. Camélidos Sudamericanos. Obtenido de <https://www.midagri.gob.pe/portal/datero/40-sector->

agrario/situacion-de-las-actividades-de-crianza-y-produccion/298-camelidos-sudamericanos?start=35

- Novoa, C. & Flores, A. (2007). Producción de Rumiantes Menores:Alpacas. Obtenido de Con el auspicio del Programa de Apoyo a la Investigación Colaborativa en Rumiantes Menores (SR-CRSP). Convenio Universidad de California, Davis-INIM. Apartado 110097, Lima-Peru.
- OMS.(2020). Enfermedad por *Coronavirus* (COVID-19). Obtenido de <https://www.who.int/es>.
- OPS. (2003). Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de las infecciones respiratorias agudas de etiología viral. Obtenido de https://www3.paho.org/spanish/ad/ths/ev/labs_IPK.pdf.
- Park, S.J., Jeong, C., Yoon, S. S., Choy, H. E., Saif, I. J., Park, S. H. & Cho, K.O. (2006). Detección y caracterización de *Coronavirus* bovinos en muestras fecales de bovinos adultos con diarrea durante las estaciones cálidas. Obtenido de Journal of Clinical Microbiology, pg 44(9), 3178-3188: <https://doi.org/10.1128/jcm.02667-05>.
- Quiso, V. C. (2014). La sabiduría andina en la sanidad de alpacas y llamas en las comunidades de Cangalli – Ilave – El Collao - Puno. Obtenido de http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/2667/Quiso_Choque_Victor.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=En%20alpacas%20adultas%2C%20la%20denominada,estomatitis%2C%20pedera%20y%20carbuncl%20sintom%C3%A1tico.
- Quispe, E. (2011). Hematological adaptations of South American camelids living in high altitude areas. Academic Department of Animal Husbandry. Faculty of Engineering Sciences. National University of Huancavelica. University City of Paturpampa. Huancavelica. Peru.
- Rocha, C. B., Fornells, I. A. A. M. G., Rojas, M., Libetal, M., Manchego, A., Pezo, D. & Santos, N. (2018). Epidemiología molecular de *Coronavirus* en heces de terneros

brasileños y rebaños de camélidos peruanos. Pg. 12(01), 037. Obtenido de <https://doi.org/10.3855/jidc.9528>.

Rojas, M., Manchego, A., Rocha, C. B., Fornells, I. A., Silva, R. C., Mendes, G. S., Santos, N. (2016). Brote de diarrea en alpacas predestete (*Vicugna pacos*) en el altiplano sur peruano. Pg. 10(03), 269. Obtenido de <https://doi.org/10.3855/jidc.7398>.

Saif, I. J. (2004). Animal Coronaviruses: What can they teach us about the severe acute respiratory syndrome. Revista Science Technolgy Off. Int. Epiz. , 23, (2): 643:660.

Saltigeral, P. & Leon, X. (2020). Obtenido de Virus SARS-CoV-2 ¿Qué se sabe al momento?. Acta Pediatriaca Mexico: 41 (Supl 1):53-57. Obtenido de <https://ojs.actapediatrica.org.mx/index.php/APM/article/view/2061/1191>.

Sambrook, J. & Green, M. (2012). Molecular Cloning A Laboratory Manual. Obtenido de <https://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/MC4/MC4FM.pdf>.

Sánchez, A. (2008). Frecuencia de *Rotavirus* y *Coronavirus* en el síndrome de la diarrea indiferenciada de las becerras en la cuenca lechera de Delicias, Chihuahua. Obtenido de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2900/raceli%20sanchez%20gomez.pdf?sequence=1>.

SPAR. (2014). Sociedad peruana de criadores de alpacas y llamas. Obtenido de Alpaqueros a la espera de planta procesadora : <https://diariocorreo.pe/edicion/cusco/alpaqueros-a-la-espera-de-planta-procesadora-545159/>

Stipp D.T., Barry, A.F., Alfieri, A.F., Takiuchi, E., Amude, A.M. & Alfieri, A.A. (2009). Frecuencia de detección BCoV por un ensayo de pcr seminested en las heces de terneros de ganado brasileño rebaños. Prod trop anim health , Pg.41: 1563-1567.

Surzycki, S. (2012). Técnicas básicas en Biología Molecular. Berlin. Springer Verlag, pg. 233-262. Obtenido de <https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=ee7uCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR3>

&dq=Basic+techniques+in+molecular+biology.&ots=54xovwblpu&sig=0thGRsp6vLX
V14ZQiLdYJ5erh4w#v=onepage&q=Basic%20techniques%20in%20molecular%20bi
ology.&f=false.

Vargas Cordoba, M. (2002). Virología médica. Universidad Nacional de Colombia. Obtenido de

<https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=PqmNRXxUkpUC&oi=fnd&pg=PA3&dq=VIRUS+CON+ARN+POLICISTRONICO+Y+CON+TRASCRIPCION+COMPLEJA+TOGAVIRUS&ots=oq8op5sOio&sig=h0xtyOc4nfvJ9WN7sCbtWAtwwqc#v=onepage&q&f=false>.

Valenzuela, S., Benites, R., Moscoso, J., Youngs, C. y Gómez, O. (2021). Impacto de la estrategia de protección de cria en la supervivencia posnatal y crecimiento de alpacas (*Vicugna pacos*). Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2451943X20300752>.

Velazco, R. (2004). Principles of molecular techniques based on PCR. University National of Colombia. Sede Palmira.

Vilá, B. (2012). Camelidos Sudamericanos. Editorial Universitaria de Buenos Aires.

Westermeier, R. (2005). Electroforesis en la práctica: una guía de métodos y aplicaciones de separación de ADN y proteínas: Cuarta Edición, Vch, Weinheim. DOI:10.1002/3527603468.

ANEXO

CICAS - LA RAYA





PROCEDIMIENTO



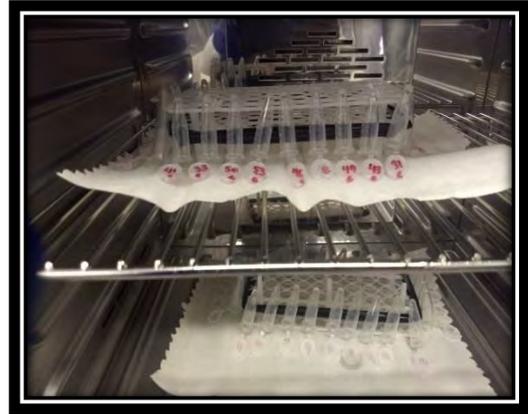


Tabla 12. Relación y concentración de ADN.

<i>RATIO</i>	<i>VALOR</i>	<i>INDICADOR</i>
<i>260/280</i>	1.8 - 2.0 1.6 – 1.8 <1.6 >2.1	ADN de pureza óptima. ADN de pureza aceptable. Presencia de compuestos aromáticos. Contaminación de ARN.
<i>260/230</i>	<1.5	Contaminación con sales.

