

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



TESIS

**GENOTIPIFICACIÓN DE ROTAVIRUS EN ALPACAS (*Vicugna pacos*)
DEL CICAS LA RAYA PROVINCIA DE CANCHIS – CUSCO**

PRESENTADO POR:

Br. Nelson Gustavo Salguero Campana

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL
DE BIÓLOGO**

ASESOR:

M. Sc. Jorge Acurio Saavedra

FINANCIADO POR LA UNSAAC – FONDOS CANON

CUSCO - PERÚ

2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, Asesor del trabajo de investigación/tesis titulada: GENOTIPIFICACIÓN
DE ROTAVIRUS EN ALPACAS (VICUÑA PUCOS) DEL CICAS
LA PAYA PROVINCIA DE CANCHIS - CUSCO

presentado por: NELSON GUSTAVO SALGUEIRO CAMPANA con DNI Nro.: 278914564 presentado
por: con DNI Nro.: para optar el
título profesional/grado académico de BIOLOGO

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 2 veces, mediante el
Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la
UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 8%.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o
título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y adjunto la primera página del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 25 de Julio de 2024

Firma

Post firma JORGE ACURIO SAAVEDRA

Nro. de DNI 23983840

ORCID del Asesor 0000-0001-9184-1662

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: oid: 27259:369969356

NOMBRE DEL TRABAJO

Tesis Rotavirus NGSC.docx

AUTOR

Nelson Gustavo Salguero Campana

RECUENTO DE PALABRAS

18997 Words

RECUENTO DE CARACTERES

103321 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

103 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

9.1MB

FECHA DE ENTREGA

Jul 25, 2024 10:42 AM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Jul 25, 2024 10:43 AM GMT-5

● 8% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 7% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 5% Base de datos de trabajos entregados
- 2% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Bloques de texto excluidos manualmente
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 8 palabras)

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi agradecimiento a Dios por permitirme conocerlo en mi formación profesional y seguir conmigo en este nuevo camino.

Quiero agradecer a mi asesor de tesis M. Sc. Jorge Acurio Saavedra por su orientación, apoyo y sus diversos consejos a lo largo de todo el proceso de investigación. Su compromiso y dedicación fueron esenciales para llevar a cabo este trabajo de manera exitosa.

También deseo agradecer a mi alma mater la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco y a todos los docentes de la Escuela Profesional de Biología, por sus conocimientos y enseñanzas que fueron de gran utilidad para formarme como Biólogo.

No puedo dejar de mencionar el apoyo incondicional de mi familia y amigos por su constante ánimo sin su apoyo esta investigación no habría sido posible.

Al Laboratorio institucional de investigación de Genética y Genética Molecular por brindarme los recursos y el ambiente propicio para llevar a cabo esta investigación.

La realización de la presente Tesis ha sido posible gracias a la subvención del proyecto con fondos Canon titulado “INVESTIGACIÓN SOBRE PATÓGENOS VIRALES ASOCIADOS CON MORBILIDAD Y MORTALIDAD POR NEUMONÍA Y DIARREA EN CRÍAS DE ALPACA (*Vicugna pacos*)” en el CICAS la raya.

DEDICATORIA

Al mismo tiempo nos sentimos seguros incluso en las tribulaciones, sabiendo que la prueba ejercita la paciencia, que la paciencia nos hace madurar y que la madurez aviva la esperanza, la cual no quedará frustrada, pues ya se nos ha dado el Espíritu Santo, y por él el amor de Dios se va derramando en nuestros corazones.

Romanos 5: 3-5

Dedicado a mi esposa Julissa Kassandra Ampuero Quispe, que junto al amor de Dios conducirá nuestros sueños y metas juntos.

Te amo mi bonita.

Dedicado a mis queridos padres Melquiades Salguero Huarsaya y Agripina Campana Hanco, por su amor, apoyo constante y sacrificios incansables que han hecho posible este logro.

Dedicado a mis hermanos Edy Salguero Campana y Melinda Salguero Campana, por sus constantes consejos y acompañarme en todo momento.

Nelson Gustavo Salguero Campana

ÍNDICE

RESUMEN.....	I
INTRODUCCIÓN.....	II
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	IV
JUSTIFICACIÓN.....	V
OBJETIVOS.....	VI
HIPÓTESIS.....	VII
1 CAPÍTULO I.....	9
MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL.....	9
1.1 ANTECEDENTES DEL ESTUDIO.....	9
1.1.1 Antecedentes internacionales.....	9
1.1.2 Antecedentes Nacionales y Locales.....	12
1.2 GENERALIDADES.....	13
1.2.1 Alpaca.....	13
1.2.2 Importancia.....	13
1.2.3 Hábitat.....	14
1.2.4 Posición taxonómica.....	14
1.2.5 Patología de " <i>Vicugna pacos</i> ".....	16
1.2.5.1 Las enfermedades bacterianas en alpacas.....	16
1.2.5.2 Las enfermedades virales en alpacas.....	16
1.2.5.3 Las enfermedades parasitarias en alpacas.....	16
1.2.5.4 Las enfermedades fúngicas en alpacas.....	17
1.3 ROTAVIRUS.....	18
1.3.1 Clasificación taxonómica ICTV.....	19
1.3.2 Antigenicidad de rotavirus.....	20
1.4 ESTRUCTURA GENÓMICA DEL ROTAVIRUS.....	21
1.4.1 Estructura viral.....	21
1.4.2 Estructura antigénica de las proteínas virales.....	23
1.4.2.1 VP7.....	23
1.4.2.2 VP6.....	24
1.4.2.3 VP4.....	24
1.4.3 Genoma viral.....	25

1.5	CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL	31
1.5.1	Fijación de partículas de virus.	31
1.5.2	Penetración y eliminación de partículas víricas.....	31
1.5.3	Síntesis de ARNm de cadena positiva	32
1.5.4	Formación de viroplasma.....	32
1.5.5	Empaquetamiento, síntesis de ARN y formación de DLP.....	34
1.5.6	Maduración y liberación del virus (virión)	34
1.6	DIAGNÓSTICO DE ROTAVIRUS.....	35
1.6.1	Microscopía Electrónica.	36
1.6.2	ELISA.	36
1.6.3	Reacción en cadena de la polimerasa.....	36
1.7	EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR.....	37
1.7.1	Modo de transmisión	37
2	CAPÍTULO II	39
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
2.1	LUGAR DE EJECUCIÓN.....	39
2.2	MATERIALES	39
2.2.1	Material biológico	39
2.2.1.1	Material genético.	39
2.2.2	Material de laboratorio.....	39
2.2.2.1	Equipos	39
2.2.2.2	Reactivos.....	40
2.2.2.3	Consumibles y fungibles.....	41
2.2.2.4	Materiales de campo	41
2.3	METODOLOGÍA	42
2.3.1	Tipo de investigación.....	42
2.3.2	Flujograma de la investigación	42
2.4	MÉTODOS	43
2.4.1	Extracción, purificación del ARN viral con TRIzol	43
2.4.2	Extracción de ARN Purelink RNA Mini kit®.....	43
2.4.3	Cuantificación de ARN.....	45
2.4.4	Retrotranscripción y amplificación de VP6.....	45
2.4.5	Retrotranscripción, amplificación y genotipificación VP4 (P-tipo).	48

2.4.6	Retrotranscripción, amplificación y genotipificación VP7 (G-tipo).....	51
2.4.7	Electroforesis	55
2.4.8	Controles.....	56
3	CAPÍTULO III.....	57
	RESULTADOS	57
3.1	De la detección de rotavirus, mediante VP6 por RT-PCR.....	57
3.1.1	Extracción de ARN viral.....	57
3.1.2	Amplificación de la proteína VP6	58
3.2	De la identificación de genes antigénicos VP7 y VP4, por RT-PCR y PCR.....	60
3.2.1	Amplificación de la proteína VP7 y VP4	60
3.3	De la determinación de genotipos en rotavirus por PCR Multiplex semianidada. ..	62
3.3.1	Genotipificación de VP7 (G-tipo) y VP4 (P-tipo)	62
3.4	Distribución de Genotipos por Sexo	66
3.4.1	Análisis de Proporciones	66
3.4.2	Tablas de contingencia.....	67
4	DISCUSIÓN	68
	CONCLUSIONES.....	71
	RECOMENDACIONES	72
	BIBLIOGRAFÍA.....	73
	ANEXOS.....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Morfología de rotavirus	18
Figura 2 Estructura del virión de Rotavirus	22
Figura 3 Ciclo de replicación de rotavirus	35
Figura 4 Flujograma de actividades realizadas en el siguiente estudio.....	42
Figura 5 Electroforesis Análisis de RT-PCR y PCR de VP6	59
Figura 6 Electroforesis de proteínas VP4 y VP7	61
Figura 7 Electroforesis de genotipos de rotavirus	63
Figura 8 G-tipo por Sexo	67
Figura 9 P-tipo por Sexo	67
Figura 10 Electroforesis en gel de agarosa de la proteína VP6, con productos de 308pb.....	90
Figura 11 Electroforesis en gel de agarosa de la proteína VP4, con productos de 876pb.....	91
Figura 12 Electroforesis en gel de agarosa de la proteína VP7, con productos de 1062pb...91	
Figura 13 Electroforesis en gel de agarosa de genotipos G yP, con productos de 709pb, 289pb, 594pb	92
Figura 14 Electroforesis en gel de agarosa de genotipos, G3, P1 y P11	92
Figura 15 Muestras diarreicas con reactivo trizol	93
Figura 16 Kit de Reactivos para extracción de ARN viral.....	93
Figura 17 Cuantificación de ARN previo a la RT-PCR y PCR	94
Figura 18 Ciclajes insertados en el termociclador.....	94
Figura 19 Reactivos SuperScript TM III RT / Platinum TM Taq (Retrotranscripción y PCR de un solo paso).....	95
Figura 20 Geles puestos en cámara electroforética listos para la electroforesis	95
Figura 21 Visualización de geles en el transiluminador.....	96
Figura 22 Área de PCR en el laboratorio de Genética y Genética molecular C-321	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Segmentos del genoma de rotavirus y productos proteicos de RVA-SA11	27
Tabla 2	Concentración y componentes del Master Mix (RT-PCR y PCR) VP6.....	47
Tabla 3	Ciclaje de Retrotranscripción y PCR de un solo paso. VP6.....	47
Tabla 4	Concentración y componentes del Master Mix (RT-PCR y PCR) para VP4.....	49
Tabla 5	Condiciones para la síntesis de Retrotranscripción y PCR de un paso	49
Tabla 6	Componentes de PCR multiplex semianidada de VP4.....	50
Tabla 7	Condiciones de amplificación de VP4.....	51
Tabla 8	Concentración y componentes del Master Mix (RT-PCR y PCR) para VP7.....	52
Tabla 9	Condiciones para la síntesis de Retrotranscripción y PCR de un paso	52
Tabla 10	Componentes de PCR multiplex semianidada de VP7.....	53
Tabla 11	Condiciones de PCR multiplex semianidada de VP7.....	54
Tabla 12	Concentración y absorbancia de ARN rotaviral.....	57
Tabla 13	Resultados del genotipado G-tipo y P-tipo.....	64
Tabla 14	Distribución de genotipos por sexo, código y genotipos.....	65
Tabla 15	Genotipos por sexo de crías de alpacas.	66
Tabla 16	G-tipo por Sexo	67
Tabla 17	P-tipo por Sexo	67
Tabla 18	Primers, secuencia y producto	88
Tabla 19	Tabla codificada de alpacas.....	89
Tabla 20	Reactivos del Kit SuperScript™ III RT con Platinum™ Taq.....	90

RESUMEN

El rotavirus es un agente causal de diarrea neonatal que está asociado a la morbilidad y mortalidad de las crías de alpacas. Por tanto, la presente investigación tuvo como propósito principal identificar los genotipos circulantes de rotavirus en crías de alpacas menores de tres meses en el CICAS La Raya, Cusco. Se consideró 45 muestras diarreicas, de las cuales 22 fueron diagnosticadas con antígenos de rotavirus por el método de ELISA. Para la retrotranscripción y amplificación de los genes de rotavirus se utilizó el kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum y para identificar diferentes genotipos se aplicó la PCR multiplex semianidada. Se evidenció la presencia de las proteínas antigénicas VP4 y VP7; y los genotipos G3, P[1] y P[11], con una asociación particular de G3P[11] encontrada en las crías de alpacas. Por ello, la genotipificación de Rotavirus permitió identificar diferentes genotipos virales circulantes en el periodo 2016 a 2017, en la población de alpacas del (CICAS) La Raya, provincia de Canchis, Cusco.

Palabras claves: Genotipificación, Rotavirus, Alpacas, Diarreicas.

INTRODUCCIÓN

Perú posee la mayor población de alpacas con más del 87% a nivel mundial, esta población enfrenta desafíos críticos en la salud y producción ganadera; puesto que, la mortalidad de las crías entre los tres y cuatro meses, puede superar el 50%, principalmente debido a enfermedades entéricas como la diarrea neonatal producido por virus, bacterias y otros parásitos (Garmendia et al., 2015). Esta patología afecta el tracto gastrointestinal incrementando la morbilidad y mortalidad de las alpacas, así como en la economía de las comunidades dedicadas en la crianza de esta especie (Rojas et al, 2016a).

El rotavirus es una de las principales causas de enfermedades entéricas en diversas especies animales, incluidas las alpacas (*Vicugna pacos*) (Miño et al., 2022). En particular, las crías de alpaca son especialmente susceptibles a esta infección por la baja inmunidad que poseen, lo que puede tener graves consecuencias para su salud y bienestar (Moreno-Morales et al., 2021). La diversidad de genotipos de rotavirus reveló la presencia de coinfecciones con más de dos cepas de rotavirus, lo que sugiere un posible riesgo de zoonosis en el futuro (Rojas et al., 2019). Evidenciando la necesidad de conocer los genotipos circulantes de rotavirus de la población en estudio.

El presente estudio se centra en la genotipificación de rotavirus en alpacas menores de tres meses en la provincia de Canchis, Cusco, Perú. Las muestras colectadas fueron obtenidas durante el periodo de diciembre del 2016 a marzo del 2017, que corresponde a la temporada de lluvias en la región, donde se observó un brote de enfermedades entéricas en las alpacas jóvenes. Para lograr este objetivo, se empleó una metodología que incluye la extracción de ARN viral, la realización de RT-PCR con el KIT SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ y PCR multiplex semianidada, seguida de la genotipificación por electroforesis.

A pesar de la importancia económica y de salud pública del rotavirus en alpacas, la investigación en este campo es limitada (Badaracco et al., 2021). Este estudio busca generar datos científicos sólidos sobre la diversidad genética del rotavirus, al conocer los genotipos del rotavirus de esta población se pueden desarrollar estrategias más efectivas para el control y prevención de esta enfermedad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diarrea neonatal afecta la salud de las crías de alpacas, así como su supervivencia, representando un reto significativo en su crianza (Espada et al., 2010), esta enfermedad se manifiesta de manera progresiva, con síntomas que incluyen diarrea, deshidratación, acidosis, fiebre y pérdida de peso, pudiendo llevar a la caquexia y la muerte. Así mismo, este problema adquiere mayor relevancia al considerar al rotavirus como agente infeccioso presente en otras especies domésticas, como llamas, alpacas y otros (Desselberger, 2014).

La falta de estudios exhaustivos sobre los genotipos de rotavirus en poblaciones de alpacas limita nuestra comprensión de este fenómeno. La escasez de datos epidemiológicos y genéticos sobre el rotavirus en alpacas dificulta la evaluación precisa del riesgo de transmisión entre especies y la implementación de estrategias preventivas y de control (Barbieri et al., 2014). Esta brecha de conocimiento resalta la necesidad urgente de realizar investigaciones que aborden la genotipificación del rotavirus en alpacas, especialmente menores de tres meses.

Es esencial investigar la diversidad genética del rotavirus en alpacas y establecer sistemas de vigilancia epidemiológica para comprender su dinámica de transmisión y su posible impacto en la salud humana. Este enfoque permitirá el desarrollo de políticas y estrategias de manejo veterinario efectivas para mitigar los riesgos asociados con la zoonosis y la propagación del rotavirus en las poblaciones de alpacas. En base a lo expuesto desarrollamos la siguiente pregunta:

¿Cuáles son los genotipos de rotavirus que se identificaran en muestras diarreicas de crías de alpacas del CICAS La Raya provincia de Canchis - Cusco?

JUSTIFICACIÓN

La genotipificación de rotavirus en alpacas menores de tres meses en la región del Cusco, Perú, surge de la necesidad de comprender y abordar las enfermedades entéricas que afectan a estas especies. La presencia de rotavirus en alpacas, es reconocido como un agente patógeno importante, representa una preocupación creciente debido a su impacto en la salud, la producción ganadera, así como la transmisión zoonótica del rotavirus (Estes & Greenberg, 2013).

Este estudio busca llenar este vacío de conocimiento al proporcionar datos científicos sólidos sobre la diversidad genética del rotavirus. Ya que estos genotipos están distribuidos y aún no se conoce a detalle las cepas circulantes de rotavirus en *Vicugna pacos* (Barbieri, 2014). Al conocer los genotipos presentes y su implicación en la epidemiología de la enfermedad, se pueden desarrollar estrategias más efectivas para la prevención y el control de las infecciones por rotavirus en estas poblaciones vulnerables.

Implementar sistemas de vigilancia epidemiológica para identificar las cepas o genotipos circulantes de rotavirus en camélidos y así prevenir brotes severos de diarrea, como sugieren Rojas et al. (2019). Ello nos permitirá formular vacunas específicas adaptadas a las necesidades locales para el manejo y control de un posible brote de rotavirus en las alpacas, ofreciendo una solución eficaz y de este modo permitir la evaluación y la efectividad de una vacuna (WHO, 2013).

Con este estudio queremos dar un aporte para la mejora de la salud y la producción ganadera de los camélidos sudamericanos. Además, servirá como aporte para futuros estudios epidemiológicos y para el diseño de medidas efectivas.

OBJETIVOS

Objetivo General.

- Determinar los genotipos circulantes de rotavirus presentes en muestras diarreicas de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) menores de tres meses en el Cicas La Raya provincia de Canchis – Cusco.

Objetivos Específicos.

- Detectar la presencia de rotavirus mediante la amplificación de la proteína estructural VP6, mediante RT-PCR.
- Identificar los genes antigénicos de rotavirus VP7(G) y VP4(P), mediante RT-PCR y PCR.

HIPÓTESIS

La genotipificación de rotavirus en muestras diarreicas de crías de alpacas permitirá identificar diferentes genotipos virales circulantes de rotavirus, en la población de alpacas del (CICAS) La Raya, provincia de Canchis, Cusco.

Variables.

- Variables dependientes: Genotipos de rotavirus.
- Variables independientes: Muestras diarreicas en crías de alpacas.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

1.1 ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

1.1.1 Antecedentes internacionales

Miño et al. (2022). En Brasil estudiaron las relaciones evolutivas de las cepas sudamericanas de rotavirus A (RVA) que portan el genotipo E12, basados en la proteína NSP4 no estructural que define el genotipo E. De los 31 genotipos E descritos mediante enfoques filogenéticos encontraron que el genotipo E12 se originó en América del Sur con el linaje del guanaco (*Lama guanicoe*) como huésped natural, infectando animales y humanos. El camino evolutivo y la impronta genética del genotipo E12 se reconstruyeron a partir de la introducción de especies bovinas no autóctonas que entraron en contacto con los camélidos sudamericanos, y sus crías estuvieron expuestas a cepas locales de RVA traídas de Europa y a nuevas cepas de RVA que se propagaron en guanacos, dando como resultado nuevas cepas de RVA en linajes actuales altamente específicos.

Badaracco et al. (2021). En Argentina realizaron un estudio tomando muestras fecales de diferentes localidades del departamento de Puno - Perú, analizaron mediante la prueba de ELISA la captura de antígeno de un total de (57/1423) fueron positivas a Rotavirus. La constelación de genotipos de tres cepas RVA de alpaca seleccionadas fue G3/8 P[1/14]-I2-R2/5-C2/3-M2/3-A17-N2/3-T6-E3-H3. Dos de las cepas analizadas presentaron una constelación de genotipos de tipo bovino, mientras que la tercera cepa presentó seis segmentos pertenecientes al genogrupo de tipo AU-1 (G3, M3, C3, N3, T3 y E3), lo que sugiere eventos de reordenamiento.

Rojas et al. (2019). En un estudio llevado a cabo en Brasil, examinaron la transmisión inter-especie como un mecanismo significativo en la evolución y la diversidad del Rotavirus. Para ello, se recolectaron 265 muestras fecales de alpacas, llamas, ovejas y humanos en la región de Cusco, Perú. Los resultados revelaron la presencia de Rotavirus A en el 20,3% de las muestras de alpacas, el 47,5% en muestras de llamas, el 100% de las muestras de ovejas y el 33,3% de las muestras humanas. Se observaron diferentes constelaciones genéticas, siendo las más comunes G3 - P [40] -I8 en alpacas, G1 / G3 - P [8] en llamas, G1 / G3 / G35 - P [1] / P [8] en ovejas y G3 - P [40] -I1 / I8 - E3 - H1 en humanos. Además, se informó sobre la aparición reciente del genotipo P [40]. Los resultados del genotipado también revelaron la presencia de coinfecciones con más de dos cepas de rotavirus, lo que sugiere un posible riesgo de zoonosis en el futuro.

Rojas et al. (2016a). En Brasil, aislaron e identificaron SA44 de rotavirus A (RVA) de una alpaca peruana neonatal con diarrea, determinando el genotipo G3P[40]. Los análisis filogenéticos revelaron la constelación genotípica G3-P[40]-I8-R3-C3-M3-A9-N3-T3-E3-H6. La secuencia del gen VP7 mostró similitud con cepas RVA de alpacas peruanas y humanos. El gen VP4 se designó como la cepa de referencia para el nuevo genotipo P[40], sugiriendo la emergencia de SA44 a partir de eventos de reordenamiento entre murciélagos y cepas RVA de equinos y humanos.

Rojas et al. (2016b). En Brasil luego de brote diarreico en alpacas en Silli, Cusco, realizaron un análisis de las cuales el 32% de 50 crías de alpacas estaban infectadas con rotavirus mostrando también coinfecciones con bacterias como 80% infectadas con *Eimeria spp*, 22% con *Clostridium spp*, 20%. con *Cryptosporidium spp*, 34% con *E. coli*, Y 40% con coronavirus. También se observó que estos animales padecían enteritis necrótica o hemorrágica con infecciones cuádruples. aumentando la gravedad de la enfermedad posiblemente ocurridos por la coinfección.

Louge (2016). En Argentina, investigó la asociación de Rotavirus, coronavirus y *Escherichia coli* en terneros neonatos en Buenos Aires, analizando los genotipos y las relaciones filogenéticas entre las cepas de rotavirus. Se evaluó la patogenicidad de los rotavirus G6(III)P[11] y G10P[11] en terneros. El análisis filogenético, realizado mediante RT-PCR semi-anidada y PCR múltiplex, mostró buenos resultados, confirmando la utilidad de estas técnicas para el genotipado epidemiológico. Se encontró una relación estrecha entre la cepa bovina G8P[11] de Argentina y varias cepas G8 en camélidos sudamericanos mediante el análisis filogenético de VP7.

Barbieri et al. (2014). En Argentina, evaluaron la presencia de anticuerpos de rotavirus en el 100 % de los animales evaluados, de los cuales un 70 % poseían anticuerpos contra PI-3. También se logró evidenciar la circulación de G8P[14] y G8P[1] en las crías de guanacos, estas presentando diarrea severa, y la cepa G8P[14] en vicuñas asintomática de Abrapampa, Jujuy. Presentando el serotipo G8 con asociación a los P-tipos P[1] o P[14]. Sugiriendo que los brotes podrían prevenirse mediante los genotipos circulantes presentes en la vacuna.

Badaracco et al. (2013). En Argentina, detectaron anticuerpos específicos contra el rotavirus del grupo A (RVA) en los 4 miembros de los camélidos sudamericanos (vicuñas, alpacas, llamas y guanacos). En vicuñas, se identificó la presencia de cepas G8 RVA en dos muestras de 59 analizadas. Una cepa seleccionada (RVA/Vicuña-wt/ARG/C75/2010/G8P[14]) reveló una constelación genotípica G8-P[14]-I2-R2-C2-M2-Ax-N2-T6-E3-Hx. Asimismo, se realizó un análisis filogenético de una cepa RVA de guanaco (RVA/Guanaco-wt/ARG/Chubut/1999/G8P[14]), sugiriendo la conservación parcial de grupos genotípicos de cepas RVA que infectan a los diferentes camélidos sudamericanos, a pesar de que sus hábitats naturales no se superponen en la actualidad.

Parreño (2004). En Argentina, reportó el análisis de tipo G y P como también un análisis filogenético de dos cepas de RV en guanacos recién nacidos (*Lama guanicoe*) con diarrea. Los aislamientos fueron del grupo A G8 RV. El análisis filogenético determinó una estrecha relación con el rotavirus de bovinos G8 en Japón, EE. UU. y Suiza. Los tipos P son P [1] y un P [14] inusual, relacionado con humanos y cabras Cepas P [14]. Este es el primer reporte de una cepa P [14] G8 en Argentina.

1.1.2 Antecedentes Nacionales y Locales

Salguero (2017). Mediante técnica de ELISA detecto antígenos de Rotavirus en alpacas neonatas menores de tres meses en muestras diarreicas colectadas del Cícas La Raya – Cusco, se encontraron antígenos positivos a rotavirus en un 48.89% de un total de 45 muestras analizadas. mostrando una estrecha relación de la diarrea neonatal con rotavirus con un 68,2% de hembras y un 31,8% de machos.

Garmendia et al. (2015). Mediante cultivos celulares aislaron los rotavirus y estos fueron identificados por RT-PCR utilizando un par de primers específicos para el rotavirus humano VP7 y VP6. Se les designó la denominación de ALRVA-K'ayra/Perú/3368-10 como G3/P11. Los genomas segmentados (codificando para VP4 y VP7) de la alpaca se aislaron y revelaron las homologías parciales al cerdo y los rotavirus humanos, respectivamente. Estos resultados demuestran que el rotavirus está asociado con una proporción de casos de diarrea en crías de alpacas.

López et al. (2011). Realizaron la detección de antígenos de rotavirus y coronavirus en heces de 14 crías de alpaca con diarrea aguda y contenidos intestinales de cinco crías muertas. Tres de catorce muestras diarreicas resultaron positivas a la prueba para detección de antígenos de rotavirus mientras que los contenidos intestinales fueron negativos. El contenido intestinal de una cría de alpaca muerta dio positivo a la prueba de rotavirus.

1.2 GENERALIDADES

1.2.1 Alpaca

Es una especie doméstica artiodáctilo mamífero, que habita principalmente en la cordillera de los Andes centrales de Sudamérica compartida principalmente entre Perú y Bolivia. Pertenece a la familia Camelidae comprende 6 especies, de las cuales 2 especies se desplazaron hacia Asia y las demás especies migraron hacia América del Sur como la llama “*Lama glama*”, alpaca “*Vicugna pacos*”, guanaco “*Lama guanicoe*” y la vicuña “*vicugna vicugna*” (De Lamo, 2011). “El análisis combinado de variaciones cromosómicas y moleculares demostraron una alta similitud genética entre alpacas y vicuñas, así como entre llamas y guanacos” (Marín et al., 2007).

1.2.2 Importancia

La alpaca (*Vicugna pacos*) presenta una importancia simbólica para el Perú en diversos niveles. En primer lugar, los análisis genéticos sobre las poblaciones de alpaca Huacaya en el sur de Perú revelan una alta diversidad genética, necesaria para la conservación (Figuroa et al., 2023). Además, la fibra de alpaca que utiliza la industria moderna textil en la innovación con la nanotecnología es un ejemplo de la competencia global de este producto con los materiales artificiales (Pedro et al., 2022). Además, el papel de la alpaca en la supervivencia y la seguridad alimentaria de las comunidades altoandinas se ve respaldado por estudios sobre su anatomía digestiva y los microorganismos esenciales que ayudan en la utilización de nutrientes, aun con el consumo de forrajes con paredes celulares difícilmente digeribles, y particularmente en época seca donde la disponibilidad de pastos naturales es de baja calidad y a la vez escaso (Flores et al., 2022). En conjunto, estos hallazgos mencionan la importancia multifacética de las alpacas para el Perú, que abarca la conservación de la diversidad genética, el potencial económico, la competitividad de la industria textil y el sustento de las poblaciones locales.

1.2.3 Hábitat.

El hábitat de los camélidos sudamericanos se ubica principalmente en la formación ecológica del páramo muy húmedo subalpino, tundra húmeda alpina, matorral desértico subalpino, tundra pluvial alpina, tundra muy húmeda alpina, páramo húmedo subalpino, y tundra seca alpina, caracterizados por presentar montañas de altitudes considerables quienes presentan una vegetación diversa de hierbas, arbustos, líquenes y otras especies adaptados a la altitud del ecosistema; las cuales se hallan desde el norte del Perú que se distribuye hasta el norte de Argentina, comprendiendo las regiones alto andinas de Bolivia y Chile; la cual posee una mayor humedad en el norte y en menor proporción en el sur. La altitud de la Puna varía entre los 3800 y 4500 msnm con una temperatura climática desde los 6 a 8°C y con una precipitación pluvial de 400 a 700 mm (Lupton et al., 2006).

Una de las formaciones ecológicas donde las alpacas se adaptaron es la tundra andina húmeda (oconales o bofedales), las cuales son escasos en pastos naturales y con un ambiente difícil, además presenta variaciones abruptas de temperaturas durante el día, soportando una altitud de hasta más de 5000 msnm (Gutierrez & Canales, 2023).

1.2.4 Posición taxonómica.

Posterior a la primera convención relacionada a los camélidos desarrollada en el año 1970, se concluyó denominar a las alpacas con el nombre de camélidos sudamericanos. Esta clasificación se atribuye de acuerdo a las categorías del reino animal, ubicándose en el sub reino de los metazoos en el phylum de los cordados, del sub phylum de los vertebrados (FAO, 2005).

También pertenecen a la clase mammalia, animales con glándulas mamarias que producen leche para alimentar a sus crías, del orden artiodactyla que poseen pezuñas y un número par de dedos en cada pie.

Dentro de la familia *camelidae* Incluye a los camélidos, que son mamíferos rumiantes, con patas largas y delgadas. que incluye a las alpacas y vicuñas dentro del género *Vicugna*, denominando la especie *Vicugna pacos*: La alpaca, domesticada a partir de la vicuña, conocida por su fibra (Sepúlveda, 2011).

Reino: *Animalia*

División: *Eumetazoa*

Filo: *Chordata*

Subfilo: *Vertebrata*

Clase: *Mammalia*

Subclase: *Theria*

Infraclase: *Eutheria*

Orden: *Artiodactyla*

Suborden: *Tylopoda*

Familia: *Camelidae*

Género: *Vicugna*

Especie: *Vicugna pacos* (Alpaca)

Lama glama (Llama)

Lama guanicoe (Guanaco)

Vicugna vicugna (Vicuña)

Camelus dromedarius (Dromedario)

Camelus bactrianus (Camello)

Nota: (Linnaeus, 1758)

1.2.5 Patología de " *Vicugna pacos* "

Las alpacas pueden verse afectadas por diversas enfermedades causadas por bacterias, parásitos, virus y hongos. Estos pueden causar problemas de salud significativos en las alpacas, especialmente en condiciones de producción extensiva y semiintensiva en las zonas de producción (Lucas et al., 2016).

1.2.5.1 Las enfermedades bacterianas en alpacas.

Tétanos: Enfermedad causada por *Clostridium tetani*, que afecta al sistema nervioso y provoca rigidez y espasmos musculares. Enterotoxemia Clostridiales: Enfermedad causada por *Clostridium perfringens*, que afecta el sistema digestivo y provoca diarrea y muerte súbita en animales jóvenes. Infecciones por *Pasteurella multocida* (PM) y *Mannheimia haemolytica* (MH): estas bacterias a menudo se asocian con enfermedades respiratorias en las alpacas, como la neumonía. (Lucas et al., 2016).

1.2.5.2 Las enfermedades virales en alpacas

Rotavirus (RV) y coronavirus que producen enfermedades gastrointestinales. Virus sincitial respiratorio bovino (BRSV) y parainfluenza 3 (PI3), se asocian con enfermedades respiratorias en las alpacas, como la neumonía, y pueden coexistir con infecciones bacterianas (Lopez et al., 2011)

1.2.5.3 Las enfermedades parasitarias en alpacas.

Entre los parásitos más comunes que afectan a las alpacas están los ectoparásitos *Amblyomma parvitarsum*, *Microthoracius mazzai*, *M. praelongiceps*, y *M. minor*. Conocidos como las garrapatas. En cuanto a los endoparásitos, se destacan géneros como *Lamanema*, *Nematodirus*, *Cooperia*, *Camelostrongylus*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, y *Graphinema*, que son frecuentes en las alpacas (Allccarima, 2021).

1.2.5.4 Las enfermedades fúngicas en alpacas.

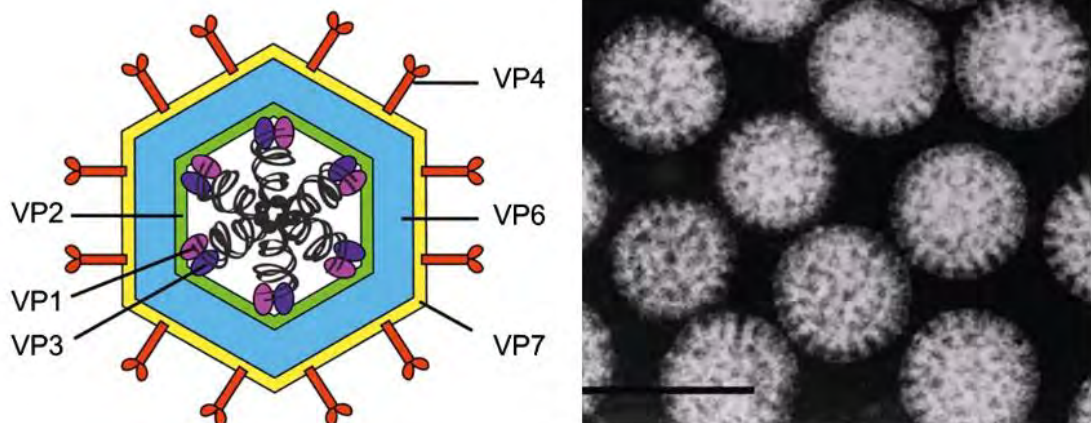
Candidiasis: una infección fúngica causada por *Candida albicans*, que puede afectar varios órganos, incluido el sistema digestivo y la piel. Es importante señalar que estas enfermedades se pueden prevenir y tratar con la atención veterinaria adecuada. Además, es fundamental mantener buenas prácticas de bioseguridad para prevenir la propagación de enfermedades entre las alpacas (Siuice, 2012).

1.3 ROTAVIRUS

En 1973, Bishop y su equipo, pudieron observar mediante microscopía electrónica, un virus similar a una rueda con rayos cortos y borde externo liso, a los que denominaron rotavirus (del latín, rueda) todo ellos vistos en biopsias duodenales de niños que presentaron diarrea. Estudios futuros confirmaron la presencia de virus en muestras diarreicas estableciendo una relación causal entre rotavirus y la diarrea aguda. Informándose también en 1976 la presencia de rotavirus en otras especies animales (Woode, 1976). El tamaño de las partículas virales oscila entre 65 a 75 nm de diámetro; posee una estructura icosaédrica con 3 capas proteicas formando una cápside compuesta. Estas se denominan capas externa, intermedia e interna. También, poseen 60 espículas que se extienden 120 Å a partir de la superficie lisa de la capa externa. El genoma de rotavirus contiene 11 segmentos de ARN de doble cadena (ARNdc). (Cherepushkin et al., 2021)

Figura 1

Morfología de rotavirus



Nota. Micrografía electrónica de partículas de rotavirus vistas mediante tinción negativa. La barra representa 100 nm. ICTV (Prasad et al., 1996).

1.3.1 Clasificación taxonómica ICTV.

Los miembros del orden *Reovirales* tienen genomas de ARNdc lineales, mediante la clasificación establecida por el ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). Rotavirus pertenece a la familia *Sedoreoviridae*, comprendiendo dentro de esta familia 6 géneros y 8 especies de rotavirus (Matthijssens et al., 2022).

Basados en la clasificación de Baltimore rotavirus pertenece al **Grupo III**: Virus ARN bicatenario (Virus ARNdc). Estas a partir del ARN bicatenario obtienen la hebra de ARN monocatenario positivo que actuará como ARNm. Al traducirse este ARNm generará proteínas reguladores y estructurales. La replicación del genoma del virus consta de dos pasos.

Síntesis de proteínas: ARNdc → ARNm → proteínas

Replicación del genoma: ARNdc → ARNm_{c+} → ARNdc

Primeramente, se desarrollará un ensamblado parcial de la hebra de ARN monocatenario positivo como también de las proteínas virales en viriones inmaduros. Seguidamente se realiza la replicación del ARN monocatenario positivo volviéndose ARN bicatenario todo esto dentro de los viriones. Lo que caracteriza a este grupo (Sung et al., 2023).

Ubicación taxonómica según el comité internacional de taxonomía de virus

Reino: *Riboviria*

Subreino: *Orthornavirae*

Phylum: *Duplornaviricota*

Clase: *Resentoviricetes*

Orden: *Reovirales*

Familia: *Sedoreoviridae*

Género: (Rotavirus)

Especies: (A, B, C, D, F, G, H, I, J)

Nota: ICTV (Matthijssens et al., 2022).

1.3.2 Antigenicidad de rotavirus

Se toman en consideración las tres proteínas virales (VP4, VP6 y VP7) de mayor abundancia. Al ser la proteína VP6, altamente conservada e inmunogénica, este será específico de la especie. Por ese motivo VP6 lleva epítomos que se usan para discriminar la antigenicidad del virus por subgrupos (SG). Podrían ser SG I, SG II, ambos SG I y II, o ninguno SG, según la reactividad con dos anticuerpos monoclonales (Tongyao et al., 2022).

Hace más de dos décadas, se estableció una clasificación binaria basada en la antigenicidad de las proteínas de la cápside externa. Están dirigidos a las proteínas VP4 y VP7, que provocan anticuerpos neutralizantes de forma independiente. Así, las cepas de rotavirus se clasificaron en serotipos P (VP4 es sensible a la proteasa) y serotipos G (VP7 es una glicoproteína). “Si el método utilizado es inmunológico (anticuerpos policlonales o monoclonales tipo-específicos dirigidos contra los epítomos antigénicos de las proteínas VP7 y VP4) se habla de serotipos” (Tongyao et al., 2022), “mientras que si el método de detección es molecular (RT-PCR con primers tipo-específicos, así como secuenciación de los genes que codifican las proteínas VP7 y VP4) se denominan genotipos” (Gouvea et al., 1990).

Hasta el momento, se identificaron 14 serotipos G y 14 serotipos P. El genotipo P se indica con un número entre corchetes, que sigue inmediatamente al genotipo G. Cuando no se conoce el genotipo G, sólo se utiliza el genotipo P. Este esquema de clasificación comprende actualmente 36 G (VP7), 51 P (VP4), 26 I (VP6; *cápside* interna), 22 R (VP1; *R* dRP), 20 C (VP2; núcleo) , 20 M (VP3; *metiltransferasa*), 31 A (NSP1; antagonista del interferón) , 22 N (NSP2; *NTPasa*), 22 T (NSP3; *potenciador de la traducción*), 27 E (NSP4; *enterotoxina*) y 22 H (NSP5/6; fosfoproteína). Nomenclatura descrita por “El Grupo de Trabajo de Clasificación de Rotavirus para el Rotavirus *A*” (RCWG) (Matthijnssens et al., 2011).

1.4 ESTRUCTURA GENÓMICA DEL ROTAVIRUS

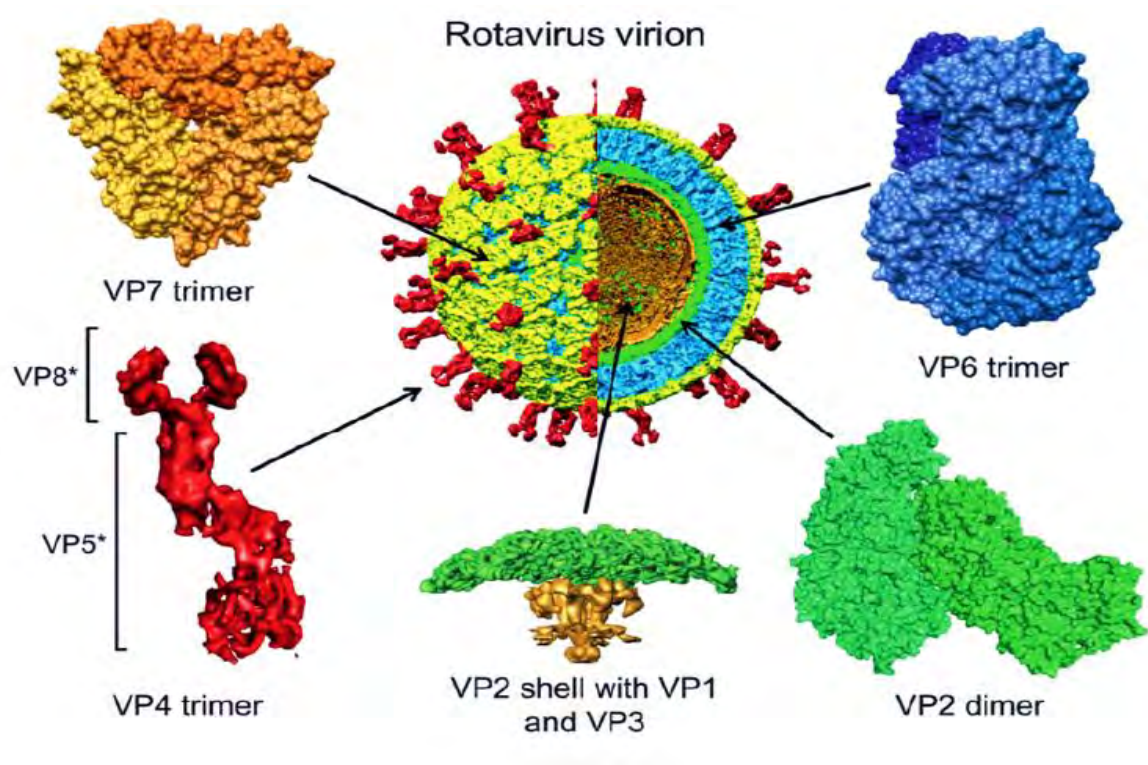
1.4.1 Estructura viral

Los rotavirus son virus desnudos, carentes de membrana lipídica, con simetría icosaédrica, su cápside está formada por 3 capas de proteínas concéntricas. La capa interna, núcleo o core, contiene 60 dímeros de proteína VP2, que contienen en el núcleo al genoma viral y las proteínas. La proteína VP3 está involucrada en la replicación del virus (SIB Swiss Institute of Bioinformatics) (Le Mercier & Edouard, 2022).

La proteína VP2 está cubierta por moléculas de VP6 que están dispuestas formando trímeros que llega a ser la segunda cubierta proteica de envoltura. VP6 es la proteína más abundante en el virus y proporcionará homogeneidad morfológica. La tercera capa externa de proteína consta de trímeros de la glicoproteína VP7, estas se ensamblan. y de esta capa sobresalen 60 espículas formadas por la proteína VP4, interactuando con 2 moléculas de VP7 y hacia adentro con 6 moléculas de las tres capas proteicas y a su vez están conectadas a través de 132 canales. La proteína VP6, a través de interacciones con las proteínas VP7/VP4, establece una interacción para la integridad estructural, apoyándose entre las tres capas de proteínas. Es un virus completo cuando presenta en su estructura las tres capas proteicas. La pérdida de la capa externa determina las partículas recubiertas de proteína doble, que no son infecciosas ni serotificables debido a la ausencia de VP7 y VP4. como también la proteína VP6 se puede eliminar con agentes caotrópicos (Carballal y Oubiña, 2014).

Figura 2

Estructura del virión de Rotavirus



Nota. Estructura y componentes proteicos de un virión de rotavirus. VP4 superior (rojo), capa VP7 (amarillo), capa VP6 (azul) y capa VP2 (verde). Una porción de VP2 se extiende hacia el núcleo "core", y las transcriptasas VP1 y VP3 son doradas en la imagen ampliada en el pico de cinco veces (centro inferior). Se muestran los productos de escisión VP8* y VP5* de la punta VP4. Se pueden ver el pie trimérico y el tallo dimérico y la cabeza de VP4. Se utilizaron archivos PDB 3KZ4 (VP6 y VP2 para la cepa A del rotavirus del Reino Unido) y 3GZT (VP7 para la cepa RRV del rotavirus A) (Prasad et al., 1999).

1.4.2 Estructura antigénica de las proteínas virales

Dentro de las proteínas antigénicas del rotavirus podemos encontrar a VP6 (contiene determinantes antigénicos de grupo y sub-grupo). VP7 y VP4 (contienen determinantes antigénicos de genotipo). Dentro de estos anticuerpos neutralizantes sero-específicos, las proteínas VP7 y VP4, son los que confieren la inmunidad protectora frente a próximas reexposiciones al virus (Matthijssens et al., 2011).

1.4.2.1 VP7

La proteína VP7 o denominada proteína G, inducirá en el hospedador anticuerpos neutralizantes. esta se modifica posttraduccionalmente por la adición de azúcares, “En una N-glicoproteína que contiene únicamente oligosacáridos del tipo de alfa manosa, lo que indica que no viaja por el retículo endoplasmático al aparato de Golgi, donde normalmente los oligosacáridos con estas características son modificados” (Infante et al., 2007). Mediante ensayos de neutralización se lograron identificar 15 serotipos de la proteína VP7, dentro de ellos 11 G, aislados en humanos. Por secuenciación de estos 15 serotipos se ubicaron 9 regiones muy divergentes entre serotipos distintos, pero conservados dentro de un mismo serotipo denominados VR1-VR9 (Coulson et al., 1991).

“Esto permite predecir el serotipo a partir de la secuencia de estas regiones, entre un 91 y 100% de identidad nucleotídica intragenotípica entre cepas del grupo A, aisladas de diferentes especies animales y un porcentaje de identidad mayor al 95% entre cepas homólogas de igual serotipo” (Leena & Von, 1998). También se ha demostrado que la proteína VP7 es blanco importante de actividad citotóxica seroespecífica y heterotípica. La estructura de VP7 difiere en su composición aminoacídica entre los grupos A, B y C, mostrando homologías de un 38% y 30% de cepas del grupo B y C con referencia al grupo A. Esto se traduce en que la inmunidad inducida por la proteína VP7 del grupo A, no protege en infecciones con virus del grupo B y C (Nair et al., 2017).

1.4.2.2 VP6

La proteína VP6, contiene los epitopes antigénicos de reactividad de grupo específicos en cuatro regiones aminoacídicas (residuos peptídicos 32-64, 155-167, 208-294 y 380-397), y de reactividad del subgrupo ubicados en las posiciones aminoacídicas 172, 305 y 315 y un residuo aminoacídico 296-299. Los anticuerpos subgrupo específicos reconocen epítopes conformacionales, formados por trímeros de VP6. Una mutación en la posición 172 y 305 afectará en la estructura conformacional del trímero que une los anticuerpos dirigidos contra el subgrupo I y la mutación en las posiciones 305, 306 y 315 inciden en el reconocimiento de anticuerpos dirigidos contra el subgrupo II (Filatov et al., 2023). “También se han localizado en esta proteína epitopes que inducen la activación de linfocitos T con actividad citotóxica y cooperadora” (Carballal y Oubiña. 2014). La estructura antigénica de grupo está altamente conservada en los rotavirus grupo A, sea la cepa de origen animal o humano. Es el motivo por lo que la respuesta inmune que se produce contra la proteína VP6 tenga reactividad cruzada con virus heterólogos del grupo A (cepas de diferentes especies animales) y virus heterotípicos (cepas de diferente serotipo) (Xu et al., 2021).

1.4.2.3 VP4

La proteína P o proteína de clivaje, posee determinantes antigénicos de serotipo P, que inducirá en el hospedador anticuerpos neutralizantes. Por ensayos de neutralización, se lograron identificar 7 serotipos (1-6 y 11) y dos subtipos (A y B) que infectan humanos, de las combinaciones resultan 9 variantes antigénicas (P1A, P1B, P2A, P3A, P3B, P4, P5A, P6 y P11) (Gentsch et al., 2005). También “la proteína VP4 permite la unión a la célula receptora, la penetración a la célula, formación de anticuerpos neutralizantes y una de sus funciones más importantes es la hemaglutinación” (Oyola.2015). Estas propiedades son determinantes en el huésped, su tropismo, virulencia y la inducción de inmunidad protectora. Cuando la proteína se expone a tratamiento proteolítico por las enzimas proteasas tipo tripsina liberan dos

polipéptidos de menor peso molecular denominados VP8 (aa 1-131) y VP5 (aa 247 al 776) (Infante et al., 2007).

1.4.3 Genoma viral

El genoma rotaviral consta de 11 segmentos de ARN de doble cadena (ARNdc) estas porciones genómicas codificarán 6 proteínas estructurales de los virus denominados (VP1-VP4, VP6 y VP7) y otras 6 proteínas no estructurales (NSP1-NSP6). El segmento 11 codifica a 2 proteínas no estructurales. Durante la replicación del virus los segmentos del virus se reasocian por lo que es muy probable las coinfecciones con dos o más cepas originando un material genómico con segmentos de cepas parentales. Postulando esta vía como alternativa de la evolución del rotavirus (Hoxie & Dennehy, 2021).

La hebra positiva de ARN tiene un inicio de 5' guanidina continuando con una región codificante y también regiones de secuencias no codificantes que terminarán en dos citidinas en el extremo 3'. Esta disposición de los marcos de lectura es similar en diversos serotipos virales. En la región codificante, los primeros 10 nucleótidos del extremo 5' y los últimos 8 nucleótidos del extremo 3' están altamente conservados en todos los segmentos” (Carballal y Oubiña, 2014), esta secuencia codifica las señales para la replicación y ensamblaje del rotavirus. Mediante un electroferotipo se puede observar un perfil de migración por electroforesis en geles de poliacrilamida, se pueden observar una migración característica de las proteínas de rotavirus (Borodavka et al., 2017).

Estas se distribuyen en 4 grupos:

Grupo 1 (4) mayor peso molecular, segmentos 1, 2, 3 y 4

Grupo 2 (2) mediano peso molecular, segmentos 5 y 6

Grupo 3 (3) pequeño peso molecular, segmentos 7, 8 y 9

Grupo 4 (2) menores peso molecular, segmentos 10, 11

Esta distribución 4,2,3,2 distingue a los rotavirus del grupo A (excepto los aislados de pollo). Se describieron variantes electroferotípicas que no corresponden a variantes serotípicas porque estas cepas de igual serotipo pueden presentar un electroferotipo diferente y estos electroferotipos iguales pueden corresponder a serotipos diferentes. Por lo que este patrón de migración no es considerado como un método de clasificación, sino de diferenciación de cepas de rotavirus (Nakagomi et al., 2006).

Tabla 1*Segmentos del genoma de rotavirus y productos proteicos de RVA-SA11*

Segmento (genoma)	pb	Proteína	Masa proteica (kDa)*	Ubicación	Función
Seg1	3302	VP1 (pol)	125.0	centro	RdPR; componente central menor activado por VP2
Seg2	2690	VP2 (T1)	102.4	cápside más interna	Proteína de cubierta central con actividad de unión a ARN; antígeno de especificidad de subgrupo. <i>simetría T=1</i> con dos moléculas en la unidad asimétrica icosaédrica (interpretada en los orbivirus como simetría T=2);
Seg3	2591	VP3 (Gorra)	98.1	centro	Enzima taponadora. Componente central menor con actividades de unión de guaniltransferasa, metiltransferasa, 2'- 5' oligoadenilato fosfodiesterasa y ssRNA
Seg4	2362	VP4	86.8	cápside exterior	Homotrimeico, proteína de pico de unión viral activada por escisión de tripsina para generar restos VP5* (penetración de

					membrana) y VP8* (unión de carbohidratos, con actividad de hemaglutinación). Antígeno de neutralización tipo P.
		VP5*	60.0		
		VP8*	28,0		
Seg5	1611	NSP1	58.7	citoplasma	Antagonista de la expresión de interferón. Supuesta ubiquitina ligasa E3 viral, con actividad de unión a ARN y un dominio RING
Seg6	1356	VP6 (T13)	44.8	cápside intermedia	Proteína viral interna principal trimérica con simetría $T=13$. Antígeno de especificidad de grupo y subgrupo.
Seg7	1104	NSP3	34.6	citoplasma	Se une al extremo 3' del ARNm viral y al eIF4G celular; promueve la circularización de los ARNm virales. Subrogado de PABP, inhibe la traducción del huésped
Seg8	1059	NSP2 (ViP)	36.7	viroplasma	Cuerpo de inclusión viral o proteína de matriz de viroplasma. Octamer con NTPase, RTPase, ssRNA vinculante

					y actividades desestabilizadoras de hélice. Componente esencial de viroplasma que interactúa con NSP5
Seg9	1062	VP7 (1)	37.4	cápside exterior	Glicoproteína de la superficie del virión, formando un trímero estabilizado con Ca^{2+} · antígeno de neutralización tipo G,
		VP7 (2) forma escindida	33,9		
Seg10	751	NSP4	20.3	membrana RER	Glicoproteína transmembrana RER, se une a DLP, esencial para la gemación en el RE y la adición de la cápside externa, enterotoxina inductora de diarrea dependiente de la edad, interrumpe la homeostasis del Ca^{2+}
Seg11	667	NSP5	21.7	viroplasma	Proteína fosforilada, glicosilada ligada a <i>O</i> y rica en serina-treonina con actividad de unión al ARN. Componente esencial de viroplasma que interactúa con NSP2

NSP6	11.0	viroplasma	Producto del segundo ORF de Seg11 con actividad de unión a ARN. Interactúa con NSP5; componente de viroplasma no esencial
------	------	------------	---

Nota: Se identificaron trece productos génicos de rotavirus (RVA-SA11). Cada segmento (Seg9 y Seg11) codifica dos productos de traducción primaria. Y otros segmentos de un solo producto. En el caso de Seg9, los dos codones de iniciación se pueden usar en el mismo marco de lectura, lo que da como resultado formas en gran medida superpuestas del producto proteico VP7. El gen 11 contiene dos ORF fuera de marco, cuya traducción produce dos proteínas no estructurales no relacionadas, NSP5 y NSP6. (ICTV) (Matthijnssens et al.,2022).

1.5 CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL

El ciclo de la replicación del rotavirus está mediado por:

1.5.1 Fijación de partículas de virus.

Los rotavirus del grupo A infectan a enterocitos maduros de las porciones distal y media de las vellosidades del intestino delgado de humanos y animales (Ramig, 2004). La unión del virus está dirigida por la subunidad VP8* de las espículas de VP4 que poseen receptores celulares. La subunidad VP8* interactúa con los glicanos de la membrana celular que posee residuos de ácido siálico (Dormitzer et al., 2002), también pueden interactuar con los antígenos histo-sanguíneos (HBGAs) que se expresan en la superficie celular (Huang et al., 2012). Todos los correceptores están asociados con lípidos que son resistentes a detergentes cerca de la membrana plasmática que actúan como plataformas que asocian los TLP (Triple-Layered Particle) del RV (Isa et al., 2004). La importancia relativa de los diversos receptores para la infección humana por RV está comenzando a evaluarse (Fleming et al., 2014). Tras el acoplamiento inicial, otras moléculas de la superficie celular pueden actuar como co-receptores virales, como es el caso de algunas integrinas que reaccionan con VP5* o VP7 (Gutiérrez et al., 2010) o la proteína humana del shock térmico 70 (Hsc70) que interactúa con VP5* (Pérez-Vargas et al., 2006). “Cabe señalar que algunas cepas de RV hemaglutinan y que es el componente VP8* de VP4 (en la punta de las espículas) el que media esta interacción” (Fiore et al., 1991).

1.5.2 Penetración y eliminación de partículas víricas

Al entrar en contacto con el receptor celular, las espículas de VP4 de los TLP de RV presentan cambios conformacionales en la proteína VP5 que se encuentra debajo de la proteína VP8, quede expuesta formando dominios lipofílicos conformado un "post - penetración umbrella" (Settembre et al., 2011). Tras la unión, la penetración celular del RV aún no está muy definida; puede ocurrir por endocitosis o penetración directa en la membrana, que estará

bajo la solubilización de las proteínas de la cápside externa por las bajas concentraciones de Ca^{2+} en los endosomas para producir DLP (Ludert et al., 1987). Mediante un análisis de ARNi del genoma se reveló el "complejo de clasificación endosomal para el transporte" (ESCRT) y están involucrados en la entrada del RV (Silva-Ayala et al., 2013). Las cepas de RV difieren en el uso de las vías endosómicas; por lo que algunas requieren el transporte dirigido por Rab7 a los endosomas tardíos que es crucial para la formación de los viroplasma (Díaz-Salinas et al., 2014).

1.5.3 Síntesis de ARNm de cadena positiva

Las DLP de rotavirus producen Transcripciones de ARNm (+) no poliadeniladas de la cadena negativa del ARN genómico, todo esto ocurre en el citoplasma y se liberan de la partícula a través de los canales de clase I. Estas transcripciones permitirán la traducción de proteínas que serán codificadas por el virus (principio del ciclo de replicación) o como plantillas para la replicación (al final del ciclo de replicación) estos formarán el genoma de ARNdc de la progenie de RV (Silvestri et al., 2004).

Las DLP del RV producirán ARNm activo transcripcionalmente usando energía como ATP estos ubicados en el citoplasma celular y funcionales también in vitro (Lu et al., 2008). Un aumento logarítmico al producir ARNm en etapas posteriores de la infección (> 4 h pi) “indica que las DLP recién sintetizadas se han vuelto activas para la transcripción” (transcripción secundaria) (Ayala-Breton et al., 2009).

1.5.4 Formación de viroplasma

Para la formación de los viroplasma es muy necesaria la presencia de las proteínas no estructurales el NSP2 y NSP5, estas al coexpresarse en las células no infectadas llegan a producir estructuras similares al viroplasma (Fabbretti et al., 1999).

Las proteínas y los ARN de rotavirus interactúan específicamente en los cuerpos de inclusión citoplásmicos denominados "viroplasma". La NSP2 citoplasmática también forma complejos con VP1, VP2 y tubulina formando también parte del viroplasma (Criglar et al., 2014). “Los proteosomas funcionales y algunos componentes de la autofagia. son esenciales para la formación de viroplasma y la replicación del RV” (Arnoldi et al., 2014).

La NSP4, al ser una glicoproteína transmembrana, estará en el retículo endoplásmico (ER) y tendrá muchas funciones:

- Receptor intracelular para DLP al interactuar con VP6 (Taylor et al., 1996).
- Actúa como viroporina al liberar Ca^{2+} de los depósitos intracelulares de esta manera se eleva los niveles de Ca intracelularmente que estabilizan los TLP.
- La proteína NSP4 altera la permeabilidad de la membrana plasmática desestabilizando las uniones intercelulares, descubriendo que NSP4 actúa como enterotoxina viral (Dong et al., 1997).

La proteína NSP3 permitirá la circularización del ARNviral mediante interacciones en los extremos del ARN funcionando como proteína de unión a la poliA (PABP) para los ARNm celulares (Groft y Burley, 2002). “La traducción de ARNm celular es inhibida por NSP3 expresado, lo que conduce a la acumulación de PABP y de los propios ARNm celulares en el núcleo celular” (Rubio et al., 2013).

La función de la proteína NSP1 es probable que esté involucrada en la restricción del rango de huéspedes (Broome et al., 1993; Feng et al., 2013). Los viroplasma guardan lípidos celulares cuando ocurre una interferencia con la homeostasis de los lípidos celulares o se degradan las grasas disminuyen el número, tamaño e infectividad de la progenie viral (Crawford et al., 2013).

1.5.5 Empaquetamiento, síntesis de ARN y formación de DLP

Los 11 segmentos de ARNmc (+) se organizan uniéndose a las proteínas que forman el núcleo viral. Las proteínas VP1/VP3/ARNmc interactúan con un decámero de la proteína VP2 (involucrando también a NSP5 y NSP2) (Berois et al., 2003), formando así las partículas centrales.

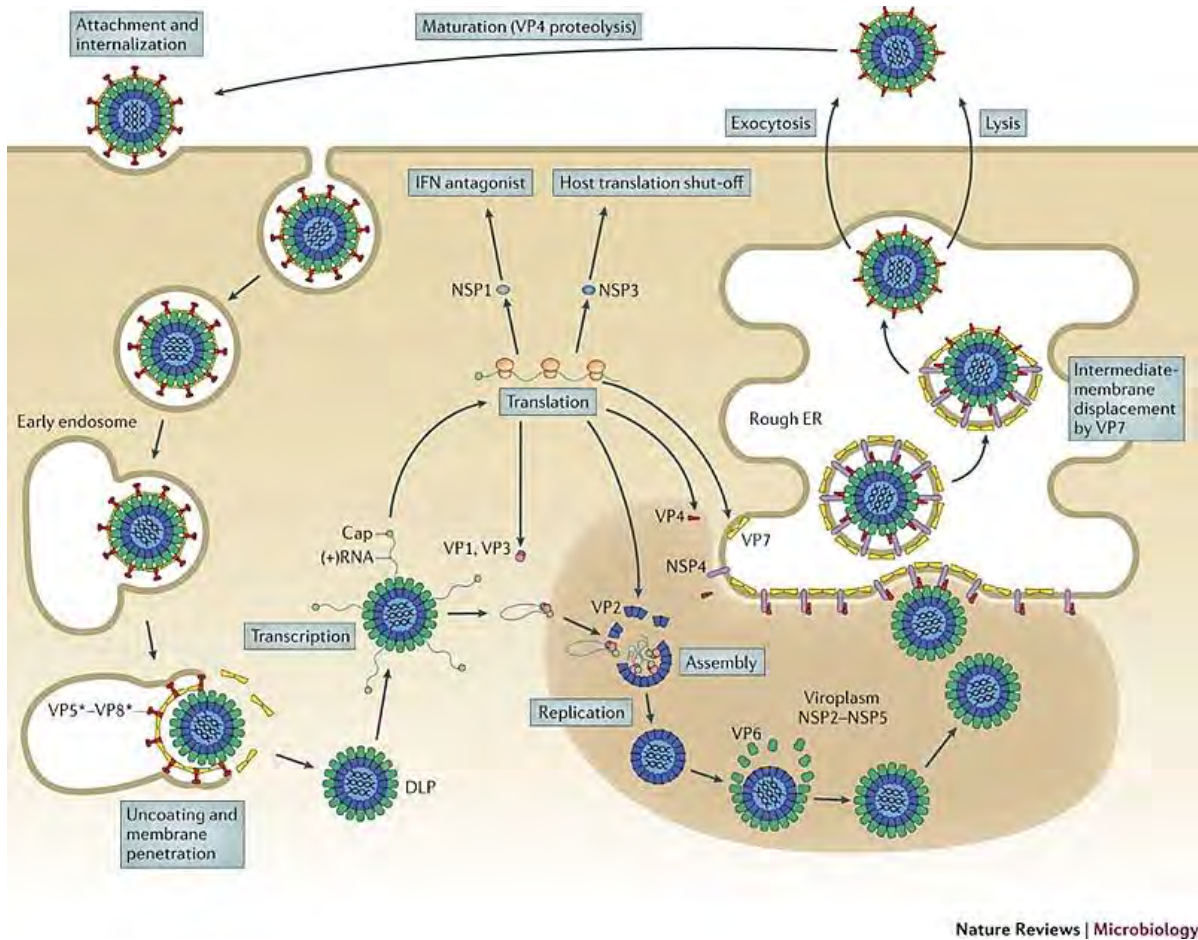
La VP2 con su dominio N-terminal de VP2 encapsida a VP1 adjunto con el ssRNA (Boudreaux et al., 2013). Con este complejo se formará la actividad de RdRp de VP1. La VP1/VP2 son las partículas mínimas de replicación in vitro (Estes et al., 2001). Junto con el material genético de los 11 segmentos, las partículas del núcleo mediante la VP6 forman la DLP. Este último proceso ha sido estudiado in vitro (Desselberger, 2014).

1.5.6 Maduración y liberación del virus (virión)

El DLP de Rotavirus, al salir del viroplasma, ingresa al retículo endoplásmico (RE) para madurar. La NSP4 actúa como un receptor intracelular al interactuar con VP6 (Browne et al., 2000). Dentro del RE, las partículas en maduración de RV se envuelven transitoriamente, Al mismo tiempo, las proteínas VP7 y VP4 son reubicadas sobre la superficie de las partículas virales formando la última capa proteica o cápside externa (60 trímeros de VP4 y 260 trímeros de VP7) dando lugar así a las partículas virales de triple capa (TLPs) totalmente desarrolladas y esta se desprende cuando la partícula de RV se forma en TLP, la capa exterior que posee VP4 (60 trímeros) y VP7 (260 trímeros). (Estes y Greenberg, 2013). NSP4 tiene una función crucial en el proceso de maduración del DLP, “por lo que el bloqueo de la expresión de NSP4 por siRNA conlleva a defectos de maduración de partículas RV” (Silvestri et al., 2004), “también la replicación del ARN del RV se inhibe, posiblemente por la interacción de la fracción NSP4 con los viroplasmos” (Berkova et al., 2006). Los TLP del RV se liberan de las células epiteliales por lisis mediante un proceso de gemación que no daña inmediatamente a la célula (Gardet et al., 2006).

Figura 3

Ciclo de replicación de rotavirus



Nota: Tomada de Nature Reviews (Crawford et al., 2017)

1.6 DIAGNÓSTICO DE ROTAVIRUS

Mediante la sintomatología clínica se torna muy difícil llegar a un diagnóstico provocado por rotavirus, puesto que otros virus enteropatógenos y bacterias son capaces de producir el mismo cuadro sintomatológico. Se conoce que las partículas víricas secretadas llegan a (1,012 por gramo de heces) durante la primera fase de la enfermedad (Gastañaduy P., Hall, & Parashar, 2013). Por lo que las técnicas para el diagnóstico de rotavirus incluyen, inmunocromatografía, ensayos de detección del antígeno (ELISA), PAGE, microscopía electrónica, RT-PCR y aislamiento de rotavirus (Cunliffe et al., 2014).

1.6.1 Microscopía Electrónica.

El rotavirus fue descubierto en preparación de heces y tejido epitelial en niños que presentaban gastroenteritis. La visualización de los viriones es fácilmente diferenciable de otros virus por la forma y tamaño (65 – 75 nm) de las partículas virales es una técnica sensible y específica, pero su diagnóstico requiere de equipos costosos, y es compleja para ser usada en el diagnóstico (Gómez et al., 2002).

1.6.2 ELISA.

Es el método más empleado para el diagnóstico de rotavirus, se aplica con gran frecuencia en los laboratorios de diagnóstico de rutina debido a la sencillez, su especificidad y sensibilidad, este método se basa en la detección de proteínas antigénicas en la superficie de las partículas virales en muestra de heces (Desselberger, 2014).

1.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa

Usando la transcripción inversa como la (RT-PCR), o la PCR en tiempo real (qRT-PCR) es altamente sensible y específico, considerando a estos métodos como la prueba *gold standard* para el diagnóstico de rotavirus. debido a que los primers que se usan en la genotipificación deben tomarse en consideración por los cambios genómicos ocasionados por mutaciones puntuales, por lo que estos deben ser cambiados periódicamente (Desselberger, 2014). La RT-PCR es usada para estudios de tipo epidemiológico y permiten identificar aislados proteicos, permitiendo no recurrir a técnicas de secuenciación o de identificación en base a anticuerpos monoclonales de tipo neutralizantes, las cuales son muy costosas (Sirok & Pera, 2008).

1.7 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

1.7.1 Modo de transmisión

El modo de transmisión de rotavirus es por vía fecal oral, estas al ser excretadas en grandes cantidades por las heces describiendo más de 10^{11} partículas víricas por gramo, algunos autores especulan la transmisión por vía respiratoria debido a que hay una frecuencia en molestias respiratorias reportando la presencia del rotavirus en el tracto respiratorio superior y la adquisición rápida de anticuerpos contra rotavirus (Ramig et al., 2005). Sin embargo, la predominancia hace que este es un modo inusual de transmisión.

Los rotavirus son muy contagiosos por el número de partículas que se eliminan durante la fase aguda de infección que estas se prolongan en los huéspedes inmunocomprometidos (Patel et al., 2010), estas unidades infecciosas serán suficientes para infectar a un individuo, aunado que las partículas de RV son muy resistentes a la temperatura, pH y permanece viable durante días a temperatura ambiente, lo que permite su transmisión en muchos entornos (Keswick et al., 1983).

Al replicarse el virus en el enterocito del intestino delgado, éste transita al intestino delgado para causar la enfermedad sintomática. Luego del período de incubación de 24 a 48 horas, seguida de 5 a 7 días de diarrea acuosa aguda, puede provocar una deshidratación rápida. Existe una inmunidad adquirida cuando la infección es del tipo salvaje, que brinda un grado de protección contra futuras infecciones

El rotavirus es muy estable en las heces y Aunque la zoonosis es un evento raro; algunos autores especulan sobre el rol de los animales como fuente de infección de rotavirus. basándonos en los estudios epidemiológicos realizados en las “cepas de rotavirus de animales presentan reacciones cruzadas con cepas de rotavirus de humanos y ciertas cepas de rotavirus de animales pueden infectar humanos” (Kapikian. 2001). Con el advenimiento del genotipado

de RV por RT-PCR, se han hecho posibles estudios detallados de la epidemiología molecular de los RV. “La genotipificación tiene un enorme valor para evaluar la evolución y las vías epidemiológicas de los RV en humanos, mamíferos y aves” (Matthijnsens & Van Ranst, 2012).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El trabajo de identificación y genotipado de rotavirus se realizó en el laboratorio de Genética y Genética Molecular C-321, de la Escuela Profesional de Biología, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC).

2.2 MATERIALES

2.2.1 Material biológico

Se realizó el estudio con 22 muestras diarreicas de crías de alpaca positivas a rotavirus obtenidas por el proyecto en “Investigación sobre patógenos virales asociados con morbilidad y mortalidad por neumonía y diarrea en crías de alpaca (*Vicugna pacos*)” provenientes del centro de Investigación CICAS La Raya.

2.2.1.1 Material genético.

ARN viral de rotavirus, obtenidos de contenido diarreico de *Vicugna pacos*.

2.2.2 Material de laboratorio

2.2.2.1 Equipos

- Refrigeradora (Thermo Fisher Scientific™, REVCO).
- Centrifuga SL 8R -20°C Y -30° (Thermo Fisher Scientific™).
- Microcentrifuga CL 17 (Thermo Fisher Scientific™).
- Autoclave (Benchmarck, BioClave 16L).
- pH metro. (Thermo Fisher Scientific™).
- Balanza Analítica (Sartorius).
- Termociclador (Applied Biosistem).

- Cámara de electroforesis (BIORAD Sub®-Cell GT Systems).
- Fuente de poder. (BIORAD).
- Digitalizador, transiluminación de luz UV (VILVERT E-BOX).
- Espectrofotómetro (DENOVI X DS-11).
- Cámara de bioseguridad (Thermo Fisher Scientific™).
- Cámara de PCR (UVP UV3 HEPA PCR STATION).
- Plancha de calentamiento (Thermo Fisher Scientific™).

2.2.2.2 Reactivos

- Cloroformo.
- Etanol absoluto.
- TRIzol.
- Agua destilada.y bidestilada.
- Bromuro de etidio 10 ml.
- Primers.
- ARN miniKit Extraction (Thermo Fisher Scientific™).
- 6x buffer loading buffer. (Thermo Fisher Scientific™).
- SuperScript™ III with ADN Platinum™ Taq
- 2x PCR Taq MasterMix (abm^R).
- TAE buffer 1X.
- Marcador de peso molecular 1ml.
- Agua libre de nucleasas.
- Tabletas de PBS –tween.
- Agarosa.

2.2.2.3 Consumibles y fungibles

- Probeta.
- Vaso de precipitado.
- Matraz Erlenmeyer.
- Micropipetas graduadas de 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l y 1000 μ l.
- Puntas con filtro de 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l y 1000 μ l.
- Tubos de centrifuga de 1.5 m.
- Tubos Falcon de 50 ml.
- Tubos Eppendorf.
- 96 pocillos para PCR (Thermo Fisher Scientific™).
- Strips para PCR 8 tube (Thermo Fisher Scientific™).
- Gradillas.
- Guantes de nitrilo.

2.2.2.4 Materiales de campo

- Libreta de datos
- Cooler

2.3 METODOLOGÍA

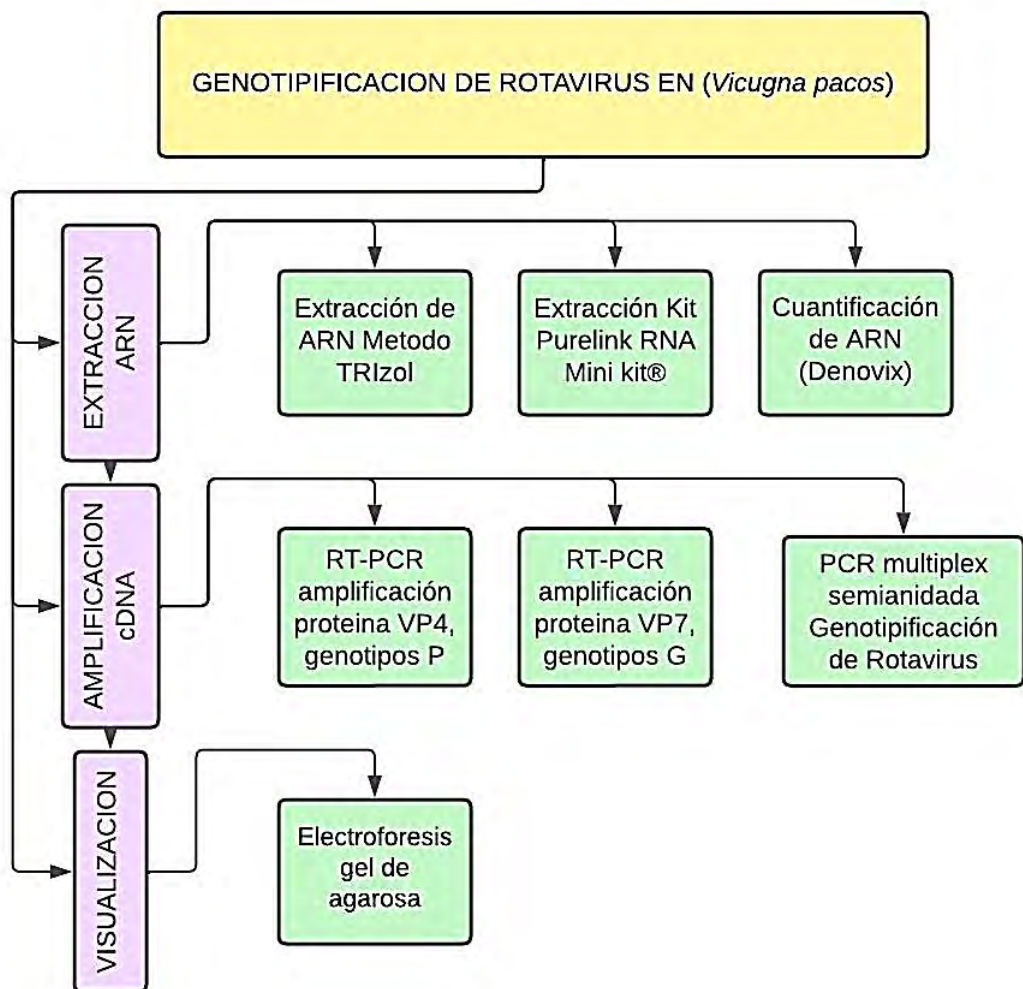
2.3.1 Tipo de investigación

Investigación cuantitativa de tipo descriptivo que describe características de una población determinada. con un enfoque no experimental, que consiste en la identificación de los genotipos de rotavirus y se determinó molecularmente por técnicas directas.

2.3.2 Flujograma de la investigación

Figura 4

Flujograma de actividades realizadas en el siguiente estudio



2.4 MÉTODOS

2.4.1 Extracción, purificación del ARN viral con TRIzol

La extracción del ARN se realizó a partir de 22 muestras diarreas, por el método de TRIzol que contiene en sus componentes fenol e isotiocianato de guanidina que facilitan la inhibición de la actividad RNasa. el proceso consiste en los siguientes pasos:

- Las muestras se suspendieron con PBS aproximadamente 500 μ L de la solución, se realizó un ligero vortexeo para homogeneizar la muestra, se usó solo la suspensión del sobrenadante.
- Posteriormente se tomó 250 μ L del sobrenadante y se mezcló con 750 μ L de Trizol (Invitrogen) en un tubo eppendorf. homogeneizamos la muestra, y se incubó por un tiempo de 5 minutos.
- Seguidamente se añadió 200 μ L de cloroformo y se mezcló cada tubo durante 15 segundos, para dejar en reposo por 15 minutos a temperatura de ambiente, luego se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
- A continuación, se transfirió solo la fase acuosa al cartucho de centrifugado para proseguir con el siguiente paso.

2.4.2 Extracción de ARN Purelink RNA Mini kit®

A continuación, usamos el protocolo para extracción del kit Purelink ARN Mini kit® (Life technologies)

- Seguidamente se transfirió 700 μ L o menor cantidad del sobrenadante de la fase acuosa al cartucho de centrifugado donde se incluyó el tubo colector propio del kit.
- Luego se centrifugó a 12000 G por 15 segundos a temperatura ambiente junto al cartucho donde se realizó el proceso de toda la muestra.
- repetimos el paso anterior con el objetivo de quitar ADNasas que afecten el proceso.

- Seguidamente se añadió la cantidad de muestra y el tampón de lavado I en la misma proporción y se centrifugó a 12000 G durante 15 segundos (tubo nuevo).
- Se desecho el flujo, cuidando el cartucho de centrifugado y se añadió 500 µL de Wash Buffer II, (previamente preparado con etanol como indica el inserto) y se repitió este paso de lavado con Wash buffer II.
- Para secar la membrana del cartucho recolector junto al tubo de recuperación se puso a centrifugar a 12000 G por 1 minuto.
- Posteriormente se insertó el tubo de recuperación y se agregó 30 µL de agua libre de ARNasa en el cartucho de recolecta e incubamos a T° ambiente durante 1 minuto.
- Finalmente se procedió a centrifugar el cartucho con el tubo de recuperación de muestra por 2 minutos a ≥ 12000 G a temperatura ambiente, el ARN purificado lo almacenamos a -80° C para futuros procesos.

2.4.3 Cuantificación de ARN

Para la cuantificación del ARN viral extraído de las muestras diarreicas de alpacas, se empleó el espectrofotómetro DeNovix Inc (USA). Previamente a la cuantificación, las muestras de ARN fueron tratadas con DNasa I (Thermo Fisher Scientific, USA) para eliminar cualquier contaminación de ADN residual.

Se añadió 1-2 μ L de buffer de muestra para calibrar el “blanco” y se calibró el instrumento. Se realizó la limpieza del pedestal y se añadió 1-2 μ L de muestra de ARN, que llevó una primera medición de absorbancia a 260 nm para determinar la concentración inicial de ARN en cada muestra, también se llevó una medición adicional de absorbancia a 280 nm para evaluar la pureza del ARN mediante el cociente A260/A280, con valores óptimos entre 1,8 y 2,0 indicativos de ARN de alta calidad y pureza. y 260/230 con valores de 2,0 y 2,2 indicativos de baja contaminación.

Se realizaron tres mediciones independientes para cada muestra y se calculó el promedio de los valores obtenidos para asegurar la precisión de los resultados. Finalmente, los resultados de la cuantificación de ARN se utilizaron para estandarizar la cantidad de ARN utilizado en las reacciones de amplificación mediante RT-PCR y PCR multiplex semianidada para la genotipificación del rotavirus en alpacas.

2.4.4 Retrotranscripción y amplificación de VP6

Para la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN viral extraído de las muestras fecales de alpacas, se empleó el kit comercial SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum (Thermo Fisher Scientific, USA). Este kit proporciona una combinación de transcriptasa inversa (RT) y ADN polimerasa enzimáticamente activa, permitiendo la retrotranscripción y amplificaciones simultáneas en una sola reacción.

Inicialmente, se prepararon los tubos de reacción, cada uno conteniendo una mezcla de reacción que incluía 5 µL de ARN viral, primers Rot 3(5'AAAGATGCTAGGGACAAAATTG 3') y Rot 5(5'TTCAGATTGTGGAGCTATTCCA 3') para la amplificación de la proteína VP6 del rotavirus, nucleótidos dNTP, enzimas RT y polimerasa. La reacción de retrotranscripción y amplificación se llevó a cabo en un termociclador con las siguientes condiciones de termociclado: una etapa de retrotranscripción a 45°C durante 45 minutos para la síntesis de ADNc a partir del ARN viral, seguida de una etapa de desnaturalización inicial a 97°C durante 3 minutos para activar la enzima de ADN polimerasa.

Posteriormente, se realizaron ciclos de amplificación mediante PCR, que consistieron en una etapa de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, seguida de una etapa de alineamiento de primers a la temperatura 45 °C de alineamiento durante 45 segundos, y una extensión de los fragmentos de ADN a 75°C por 2 minutos determinado por la longitud del fragmento amplificado.

El número de ciclos de PCR se describen en la tabla 3, siendo estas las condiciones óptimas de amplificación para cada muestra, con un número de ciclos de 40 X. Tras la amplificación, se llevó a cabo una última extensión a 72°C durante por 7 minutos para completar la síntesis de los fragmentos de ADN.

Tabla 2*Concentración y componentes del Master Mix (RT-PCR y PCR) VP6*

Componentes retrotranscripción y 1ª PCR (VP6)			
Componentes		Concentración stock	Vol 1x reacción
H₂O		---	17 ul
Reacción mix	MgSO₄	0,4 mM	
	dNTP	3,2 mM	25 ul
Primer ROT 3		20 mM	0.5 ul
Primer ROT 5		20 mM	0.5 ul
SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix		---	2 ul
ARN		---	5 ul
Volumen final			50 ul

Tabla 3*Ciclaje de Retrotranscripción y PCR de un solo paso. VP6*

Condiciones retrotranscripción y Amplificación VP6			
Ciclo de PCR	Temperatura	Tiempo	Nº de Ciclos
Transcripción inversa Activación	45 °C	30 min	1X
inicial de PCR	97 °C	3 min	
Desnaturalizar	94 °C	30 seg	
Hibridación/alineamiento	45 °C	45 seg	40X
Polimerización/extensión	75 °C	2 min	
Extensión final	72 °C	7 min	1X
Mantener	4 °C	Indefinidamente	

2.4.5 Retrotranscripción, amplificación y genotipificación VP4 (P-tipo).

Para la síntesis de ADNc a partir del ARN viral extraído, se utilizó el kit comercial SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum. Este kit contiene los reactivos necesarios para realizar la reacción de retrotranscripción en un solo paso, lo que simplifica el proceso y minimiza el riesgo de contaminación. En primer lugar, se preparó una mezcla que contenía 5 µL de ARN viral, los primers específicos Con 2 (5'*ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC* 3') y Con 3 (5'*TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A* 3') para la retrotranscripción de VP4, los nucleótidos (dNTPs) y la enzima transcriptasa inversa.

La reacción se llevó a cabo en el termociclador programado para realizar la retrotranscripción, que consta de una etapa de incubación inicial a 97°C durante 30 segundos continuando con los procesos descritos en la tabla 5.

Una vez completada la retrotranscripción, el ADNc sintetizado se utilizó como molde en una reacción de PCR para amplificar el gen VP4 del rotavirus. Se seleccionaron los primers Con2 y Con3, mencionados anteriormente específicos para VP4, diseñados para unirse a regiones conservadas del genoma viral y generar un fragmento de ADNc de 876 pares de bases (pb). La reacción de PCR se llevó a cabo inmediatamente luego de la Retrotranscripción en el termociclador que consta de una etapa inicial de activación inicial de 97°C durante 3 minutos, seguido desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineación de primers a 55°C durante 45 segundos y extensión a 75°C durante 2 minutos. Finalmente, se realizó una extensión final a 72°C durante 7 minutos para asegurar la completa elongación de los productos de PCR y evitar la formación de errores en la amplificación.

Tabla 4*Concentración y componentes del Master Mix (RT-PCR y PCR) para VP4*

Componentes retrotranscripción y 1ª PCR (VP4)			
Componentes		Concentración stock	Vol 1x reacción
H₂O		---	17 ul
Reacción mix	MgSO₄	0,4 mM	
	dNTP	3,2 mM	25 ul
Primer Con 2		20 mM	0.5 ul
Primer Con 3		20 mM	0.5 ul
SuperScript™ III RT/		---	2 ul
Platinum™ Taq Mix			
ARN		---	5 ul
Volumen final			50 ul

Tabla 5*Condiciones para la síntesis de Retrotranscripción y PCR de un paso*

Condiciones retrotranscripción y Amplificación VP4			
Ciclo de PCR	Temperatura	Tiempo	Nº de Ciclos
Transcripción inversa	45 °C	40 min	1X
Activación inicial de PCR	97 °C	3 min	
Desnaturalizar	94 °C	30 seg	
Hibridación/alineamiento	55 °C	45 seg	40X
Polimerización/extensión	75 °C	2 min	
Extensión final	72 °C	7 min	1X
Mantener	4 °C	Indefinidamente	

Para la reacción de PCR multiplex semianidada VP4, se preparó una mezcla de reacción de PCR que incluía el ADNc obtenido previamente, los primers específicos para la amplificación de los genotipos P de rotavirus. P1 (5'CGA ACG CGG GGG TGG TAG TTG 3'), P5 (5'GCC AGG TGT CGC ATC AGA G 3') y P11 (5'GGA ACG TAT TCT AAT CCG GTG 3'), así como el primer consenso de inicio Con3. Los primers específicos para cada genotipo se utilizaron en concentraciones finales de 0,5 μ L. cada uno, mientras que la cantidad de ADNc fue de 1 μ L. La mezcla se completó con el Taq Master Mix abm™ y se ajustó el volumen final a 25 μ L.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador, utilizando un programa específico que incluye una etapa inicial de desnaturalización a 96°C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineación de primers a 50°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto. Posteriormente, se realizó una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

Tabla 6

Componentes de PCR multiplex semianidada de VP4

<i>Componentes PCR mutiplex semianidada VP4</i>		
<i>Componentes</i>	<i>Concentración stock</i>	<i>Vol 1x reacción</i>
<i>H₂O</i>	---	<i>9.5 ul</i>
<i>Primer Con 3</i>	<i>20 mM</i>	<i>0.5 ul</i>
<i>Primer P1</i>	<i>20 mM</i>	<i>0.5 ul</i>
<i>Primer P5</i>	<i>20 mM</i>	<i>0.5 ul</i>
<i>Primer P11</i>	<i>20 mM</i>	<i>0.5 ul</i>
2X PCR Taq MasterMix	---	<i>12.5 ul</i>
Amplicon de 1ª PCR	---	<i>1 ul</i>
Volumen final		<i>25 ul</i>

Tabla 7

Condiciones de amplificación de VP4

<i>Condiciones PCR mutiplex semianidada VP4</i>			
Ciclo de PCR	Temperatura	Tiempo	N° de Ciclos
Activación inicial de PCR	96 °C	10 min	1X
Desnaturalizar	94°C	30 seg	
Hibridación/alineamiento	52 °C	30 seg	35X
Polimerización/extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	5 min	1X
Mantener	4°C	Indefinidamente	

2.4.6 Retrotranscripción, amplificación y genotipificación VP7 (G-tipo).

En el proceso de retrotranscripción de la proteína VP7 del rotavirus, se preparó mezclas de reacción individuales para cada muestra, siguiendo las proporciones recomendadas por el kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum. Estas mezclas incluyen 5 µL de ARN viral, primers específicos para VP7, Beg9 (5'GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G 3') y End9 (5'GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG 3'), una enzima transcriptasa inversa (RT), dNTPs, buffer de reacción y RNasa inhibitoria. Posteriormente, las mezclas se incubaron en un termociclador con un programa específico de retrotranscripción para convertir el ARN viral en ADNc mediante la actividad de la enzima RT. Una vez completada la retrotranscripción se inició inmediatamente la reacción para la amplificación de la región VP7, que incluyeron el ADNc sintetizado previamente. Estas mezclas se sometieron a ciclos de termociclado para la amplificación de la región VP7, incluyendo etapas de desnaturalización, alineamiento y elongación del ADN, así como una etapa final de extensión. Descritos en la tabla 9.

Tabla 8*Concentración y componentes del Master Mix (RT-PCR y PCR) para VP7*

Componentes retrotranscripción y 1ª PCR (VP7)			
Componentes		Concentración stock	Vol 1x reacción
H₂O		---	17 ul
Rx-mix	MgSO₄	0,4 mM	
	dNTP	3,2 mM	25 ul
Primer Beg 9		20 mM	0.5 ul
Primer End 9		20 mM	0.5 ul
SuperScript™ III RT/		---	2 ul
Platinum™ Taq Mix			
ARN		---	5 ul
Volumen final			50 ul

Tabla 9

Condiciones para la síntesis de Retrotranscripción y PCR de un paso

Condiciones retrotranscripción y Amplificación VP7			
Ciclo de PCR	Temperatura	Tiempo	Nº de Ciclos
Transcripción inversa	45 °C	40 min	1X
Activación inicial de PCR	97 °C	3 min	
Desnaturalizar	94 °C	30 seg	
Hibridación/alineamiento	52 °C	45 seg	40X
Polimerización/extensión	75 °C	2 min	
Extensión final	72 °C	7 min	1X
Mantener	4 °C	Indefinidamente	

Para la reacción de PCR multiplex semianidada VP7, se preparó los reactivos de PCR en un área de trabajo limpia dentro de la cabina de PCR. La mezcla incluye los primers específicos para VP7, Beg9 como primer consenso de inicio y los primers G3 (5'CGT TTG AAG AAG TTG CAA CAG 3'), G4 (5'CGT TTC TGG TGA GGA GTT G 3'), G8 (5'GTC ACA CCA TTT GTA AAT TCG 3') y G10 (5'ATG TCA GAC TAC ARA TAC TGG 3'). como primers específicos para cada genotipo se utilizaron en concentraciones de 0.5 μ l cada uno, mientras que la cantidad del amplicon de la 1° PCR fue de 1 μ l. La mezcla se completó con el Taq Master Mix abm™ y se ajustó el volumen final a 25 μ l. Se introdujeron los ciclajes al termociclador como están descritos en la Tabla 11.

Tabla 10

Componentes de PCR multiplex semianidada de VP7

Componentes PCR multiplex semianidada VP7		
Componentes	Concentración stock	Vol 1x reacción
H₂O	---	9,0 ul
Primer Beg 9	20 mM	0,5 ul
Primer G3	20 mM	0,5 ul
Primer G4	20 mM	0,5 ul
Primer G8	20 mM	0,5 ul
Primer G10	20 mM	0,5 ul
2X PCR Taq MasterMix	---	12,5 ul
Amplicon de 1ª PCR	---	1 ul
Volumen final		25 ul

Tabla 11

Condiciones de PCR multiplex semianidada de VP7

Condiciones PCR multiplex semianidada VP7			
Ciclo de PCR	Temperatura	Tiempo	N° de Ciclos
Activación inicial de PCR	96 ° C	10 min	1X
Desnaturalizar	94°C	30 seg	
Hibridación/alineamiento	50 °C	30 seg	35X
Polimerización/extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	2 min	1X
Mantener	4°C	Indefinidamente	

Los productos de esta segunda amplificación se almacenaron a -20°C hasta su proceso de electroforesis.

2.4.7 Electroforesis

- Se prepararon geles al 1.5% y 1.8 % de agarosa con buffer TAE 1X, en un matraz de 250 ml.
- La solución se calentó hasta que la agarosa se disolvió completamente y cuando la temperatura se aproxima a 45°C, añadimos 1 µL de bromuro de etidio.
- Se vertió la solución de agarosa caliente en un molde de gel, con un peine para formar los pocillos y se dejó enfriar hasta que solidifique.
- El gel se llevó a la cámara de electroforesis y se cubrió con tampón buffer TAE 1X.
- Para la preparación de muestras se mezclaron 10 µL de los productos de PCR, con 3 µL de buffer de carga (Azul de bromofenol), y se inoculó 10 µL de la mezcla en los pocillos.
- Se tomó 10 µL del marcador de peso molecular (100 pb a 5000 pb) y se puso a los carriles externos como referencia
- Se programó la fuente de poder a 120v por 90 minutos en los geles a concentración de 1,8% y a 90v por 70 minutos al gel de concentración de 1,5%.
- Finalmente, los geles fueron puestos en el fotodocumentador, con luz ultravioleta para visualizar las bandas de ADN fluorescentes.

2.4.8 Controles.

En el presente estudio, se consideraron controles reportados a partir de una investigación previa, realizada por Garmendia A. (2015); estos controles consistieron en muestras que contenían el genoma viral de ARN específico de rotavirus y para la amplificación mediante PCR, se utilizaron las proteínas VP6, VP7 y VP4. Adicionalmente, se incluyeron controles negativos de no plantilla, en cada etapa del proceso, con el propósito de identificar posibles contaminaciones cruzadas. La implementación de estos controles fue esencial para la comparación de los resultados obtenidos en el estudio de genotipificación del rotavirus en las crías de alpacas.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 De la detección de rotavirus, mediante VP6 por RT-PCR.

3.1.1 Extracción de ARN viral.

Se llevó a cabo la extracción de ARN viral a partir de 22 muestras diarreicas de alpacas menores de tres meses, positivas a rotavirus, descritos en un estudio anterior (Salguero, 2017). Se utilizó el método trizol y el kit Purelink ARN Mini kit de extracción de ácidos nucleicos. La pureza y calidad de la extracción se evaluaron mediante la cuantificación del ARN en el nanoespectrofotometro Denovix.

Tabla 12

Concentración y absorbancia de ARN rotaviral

Nº	ng/ul	260/230	260/280	Nº	ng/ul	260/230	260/280
M1	24,08	1,84	1,98	M12	25,79	1,86	2,09
M2	21,56	1,72	2,01	M13	27,67	1,72	2,07
M3	38,17	1,82	2,10	M14	34,14	1,86	2,17
M4	23,01	1,79	2,29	M15	65,21	1,72	2,03
M5	33,82	1,83	2,07	M16	24,54	1,86	1,89
M6	34,91	1,95	2,11	M17	31,97	1,91	2,02
M7	29,23	1,87	2,06	M18	42,78	1,81	2,14
M8	25,96	1,92	1,92	M19	45,17	1,86	2,17
M9	27,09	1,86	2,97	M20	26,30	1,87	2,14
M10	19,72	2,01	2,18	M21	36,07	2,02	2,08
M11	48,81	1,95	2,12	M22	45,70	1,78	2,39

Los resultados mostraron una eficiente extracción de ARN viral de las muestras fecales de alpacas. Siendo la media de 33,25 ng/μl, con una pureza promedio de 2.1 según la relación 260/280, y de 1.85 en relación 260/230.

Se observó una variabilidad en la concentración de ARN entre las muestras, lo que sugiere posibles diferencias en la carga viral entre los individuos. Sin embargo, todas las muestras mostraron concentraciones de ARN dentro del rango adecuado para análisis posteriores. Por lo que la extracción de ARN viral fue de alta calidad y pureza.

3.1.2 Amplificación de la proteína VP6

En este estudio, se llevó a cabo la amplificación de la región codificante del gen que codifica la proteína VP6 del rotavirus mediante la técnica de RT-PCR y PCR de un solo paso. Los primers específicos Rot 3 y Rot 5, se dirigieron a secuencias conservadas de la proteína VP6 obtenidas de bases de datos genéticos.

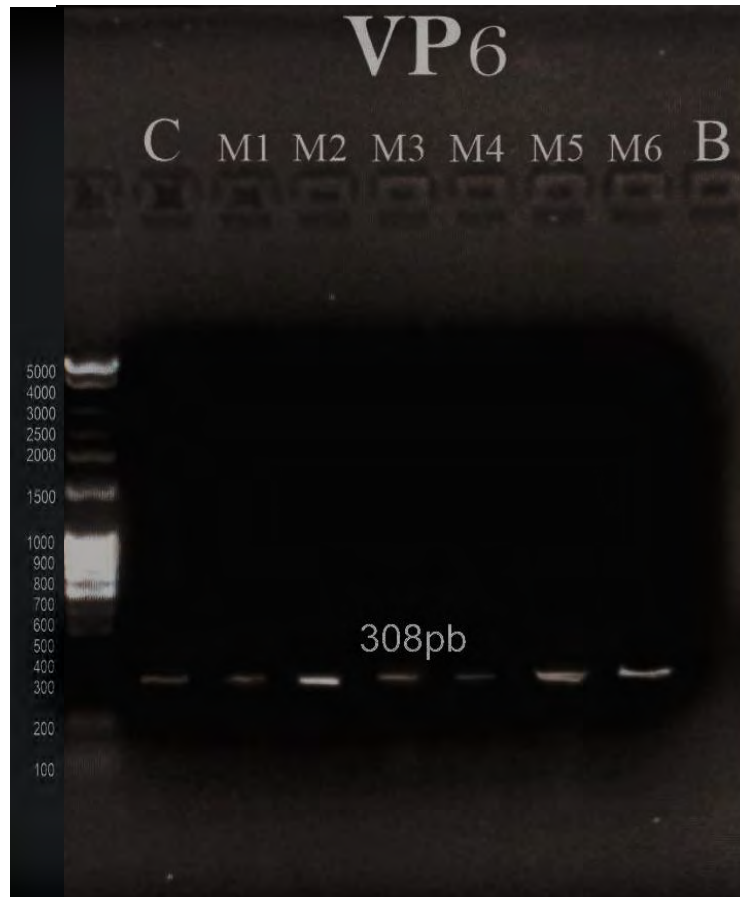
Los resultados de la amplificación de la proteína VP6 mostraron la presencia de bandas de 308 pb. en las muestras analizadas. Las bandas de PCR obtenidas fueron visualizadas mediante electroforesis en gel de agarosa y revelaron la amplificación exitosa de la región codificante de la proteína VP6 en todas las muestras.

También se tomó un control positivo de proteína VP6 en la reacción de PCR y como control negativo los reactivos de la PCR exceptuando material genético. Los resultados confirmaron la ausencia de contaminación y la eficacia de la amplificación específica de la proteína VP6 en las muestras de alpacas analizadas.

Se observó una variación en la intensidad de las bandas de PCR entre las muestras, lo que sugiere posibles diferencias en la carga viral o la eficiencia de la amplificación entre los individuos. Sin embargo, las 22 muestras analizadas mostraron la presencia de la banda específica de la proteína VP6, indicando la presencia del rotavirus en las muestras analizadas.

Figura 5

Electroforesis Análisis de RT-PCR y PCR de VP6



Nota: *gel de agarosa al 1,5%, el primer carril es el marcador de peso molecular. C: muestra control positivo, M1-M6: genes VP6 de 308 pb, B: control negativo.*

Los resultados de la amplificación de la proteína VP6 demuestran la presencia y amplificación exitosa del gen que codifica esta proteína estructural de rotavirus, en las muestras de alpacas menores de tres meses. Estos hallazgos proporcionan evidencia adicional de la presencia del rotavirus en la población estudiada y respaldan los análisis posteriores de genotipificación

3.2 De la identificación de genes antigénicos VP7 y VP4, por RT-PCR y PCR.

3.2.1 Amplificación de la proteína VP7 y VP4

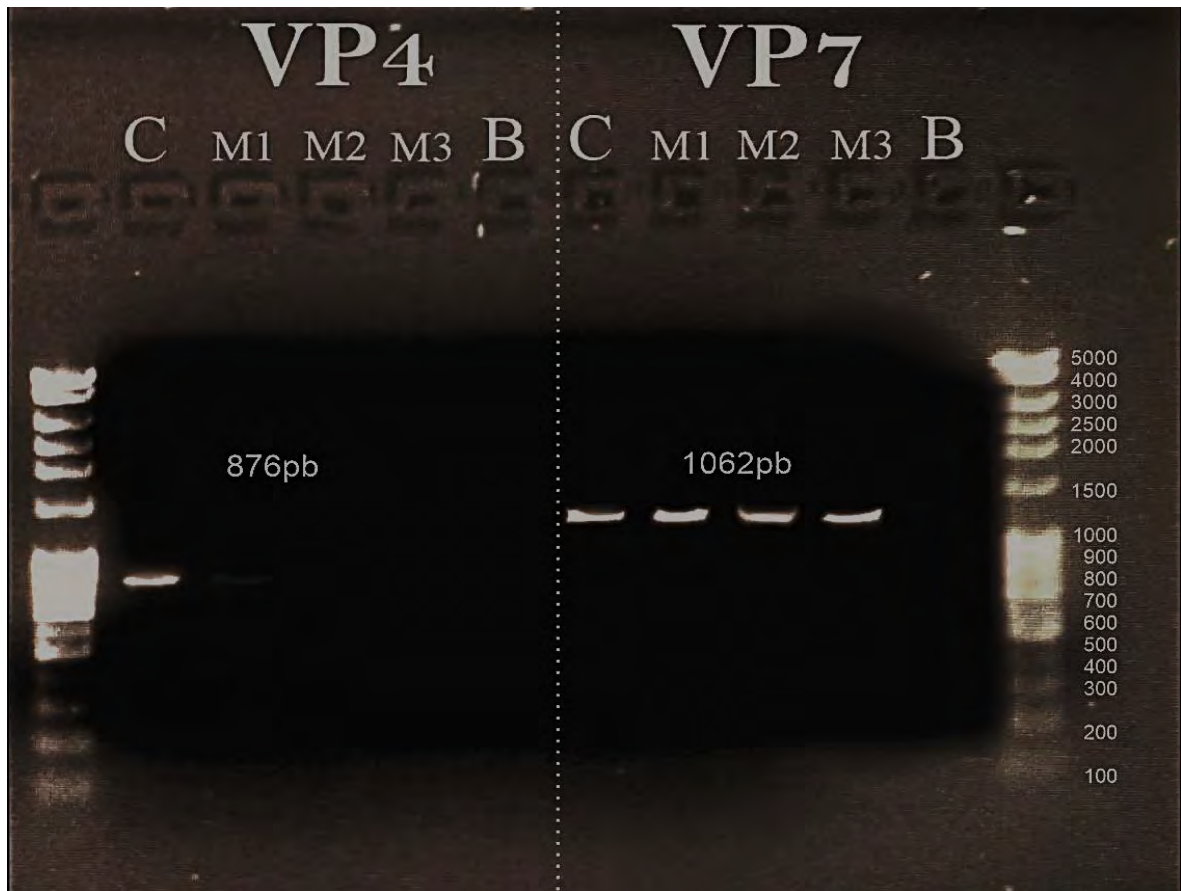
En este estudio, se amplificaron las regiones codificantes de los genes que codifican las proteínas VP4 y VP7 del rotavirus, utilizando primers específicos diseñados para cada proteína. Para la proteína VP4, se utilizaron los primers Con2 y Con3, diseñados para reconocer una región de 876 pb, mientras que para la proteína VP7, se emplearon los primers Beg9 y End9, con el objetivo de amplificar una región de 1062 pb. Posteriormente, las muestras amplificadas fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% a 70 V durante 120 minutos. La visualización de las bandas de PCR en el gel de agarosa fue realizada en el fotodocumentador, confirmando la amplificación exitosa de ambas proteínas en todas las muestras analizadas, respaldando la presencia del rotavirus en la población de alpacas estudiada.

Además de la amplificación exitosa de las proteínas VP4 y VP7, se realizaron controles de PCR negativos y positivos mencionados anteriormente. Los resultados de estos controles confirmaron la ausencia de contaminación y la amplificación específica de las proteínas VP4 y VP7 en las muestras de alpacas analizadas.

Este enfoque de retrotranscripción y amplificación permitió la generación eficiente de ADNc de VP4 a partir de ARN viral, proporcionando los productos amplificados necesarios para el posterior análisis y genotipificación de los genotipos P y G del rotavirus, en las muestras de heces.

Figura 6

Electroforesis de proteínas VP4 y VP7



Nota: Gel de agarosa al 1,5%, el primer y último carril son los marcadores de pesos molecular. C: muestra de control positivo para VP4 y VP7, M1-M3: productos de la PCR para VP4 y VP7, B: el control negativo. Las muestras M2 y M3 no se amplificaron en la primera reacción realizándose una repetición comprobando posibles errores de pipeteo donde si llegaron a amplificar. Todas las muestras dieron como resultado visible las proteínas VP7 y VP4.

3.3 De la determinación de genotipos en rotavirus por PCR Multiplex semianidada.

3.3.1 Genotipificación de VP7 (G-tipo) y VP4 (P-tipo)

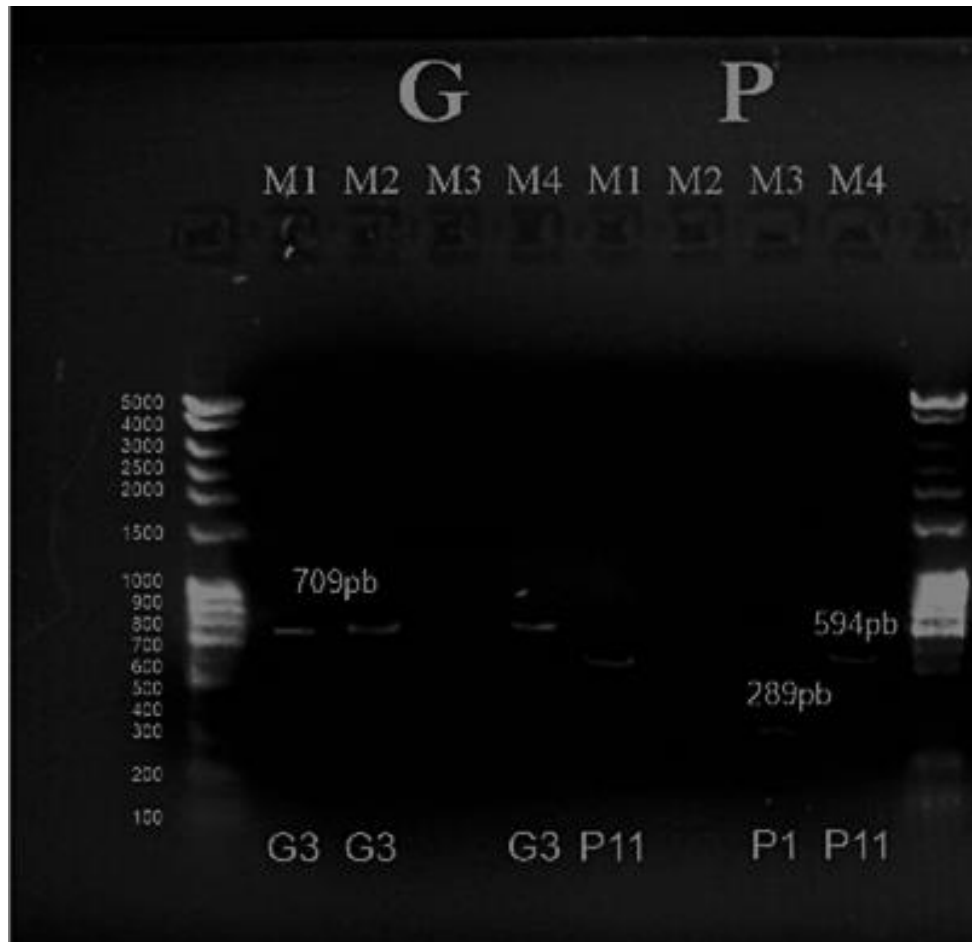
Para el genotipado se usó la PCR multiplex semianidada tomando como base los productos de la proteína VP7, que determina el tipo G, se usó los primers G3, G4, G8 y G10 y como primer consenso Beg 9, mientras que para el genotipado del tipo P, se emplearon los productos de la proteína VP4 con los primers P[1], P[5], P[11] y como primer consenso Con3, para amplificar los genotipos presentes en la proteína VP4.

Los productos de la amplificación por PCR multiplex semianidada fueron visualizados previa electroforesis en el fotodocumentador. Para el genotipo viral G (VP7) pertenecen al genotipo G3, con un total de 5 muestras. Para el genotipo P (VP4) se identificaron los genotipos P[1] con 3 muestras y P[11] con 4 muestras. Se observó la presencia de muestras que presentaron una combinación de genotipos G3P[11] en M1, M9 y M20.

Sin embargo, 13 de 22 muestras no pudieron ser determinadas con algún genotipo en este estudio, estas fueron M5, M6, M8, M10, M11, M12, M13, M14, M15, M16, M19, M21 y M22. Estas muestras posiblemente pertenecen a otros genotipos no identificados y podrían requerir análisis adicionales para su clasificación definitiva. presentes en las muestras de alpacas menores de tres meses.

Figura 7

Electroforesis de genotipos de rotavirus



Nota: Gel de agarosa tras electroforesis de 120v por 50 minutos, podemos visualizar la combinación de genotipos. Pertenecientes una segunda amplificación de VP7 observando una banda de 709pb perteneciente al genotipo G3. En la parte derecha VP4 con bandas de 594pb y 289pb pertenecientes a P11 y P1 respectivamente.

Tabla 13*Resultados del genotipado G-tipo y P-tipo*

	<i>G-tipo</i>	<i>P-tipo</i>		<i>G-tipo</i>	<i>P-tipo</i>
<i>M1</i>	<i>G3</i>	<i>P11</i>	<i>M12</i>	-	-
<i>M2</i>	<i>G3</i>	-	<i>M13</i>	-	-
<i>M3</i>	-	<i>P1</i>	<i>M14</i>	-	-
<i>M4</i>	<i>G3</i>	-	<i>M15</i>	-	-
<i>M5</i>	-	-	<i>M16</i>	-	-
<i>M6</i>	-	-	<i>M17</i>	-	<i>P1</i>
<i>M7</i>	-	<i>P1</i>	<i>M18</i>	-	<i>P11</i>
<i>M8</i>	-	-	<i>M19</i>	-	-
<i>M9</i>	<i>G3</i>	<i>P11</i>	<i>M20</i>	<i>G3</i>	<i>P11</i>
<i>M10</i>	-	-	<i>M21</i>	-	-
<i>M11</i>	-	-	<i>M22</i>	-	-

Nota: Tabla de resultados de los genotipos obtenidos destacando la distribución de los genotipos G y P en la población de alpacas menores de tres meses analizadas.

Tabla 14*Distribución de genotipos por código, sexo y genotipos*

Nº CÓDIGO	SEXO CRIA DE	CODIGO DE	G-TIPO	P-TIPO
ALPACA	ALPACAS	MUESTRA		
H-8009	CRÍA MACHO	M1	G3	P11
H-7818	CRÍA HEMBRA	M2	G3	-
H-8102	CRÍA MACHO	M3	-	P1
H-7565	CRÍA HEMBRA	M4	G3	-
H-7346	CRÍA HEMBRA	M5	-	-
H-7863	CRÍA HEMBRA	M6	-	-
H-5058	CRÍA HEMBRA	M7	-	P1
H-7892	CRÍA HEMBRA	M8	-	-
H-8054	CRÍA HEMBRA	M9	G3	P11
H-3368	CRÍA MACHO	M10	-	-
H-7969	CRÍA MACHO	M11	-	-
H-7834	CRÍA MACHO	M12	-	-
H-7688	CRÍA HEMBRA	M13	-	-
H-7912	CRÍA HEMBRA	M14	-	-
H-7817	CRÍA HEMBRA	M15	-	-
H-7712	CRÍA HEMBRA	M16	-	-
H-6239	CRÍA HEMBRA	M17	-	P1
H-8104	CRÍA MACHO	M18	-	P11
H-5170	CRÍA MACHO	M19	-	-
H-7367	CRÍA HEMBRA	M20	G3	P11
H-7140	CRÍA HEMBRA	M21	-	-
H-3472	CRÍA HEMBRA	M22	-	-

En las 22 muestras de crías de alpacas, se identificaron genotipos G3 y P11 como los más frecuentes, observándose en 4 y 3 muestras respectivamente. Las crías machos y hembras mostraron una distribución similar de genotipos, sin evidencia significativa de asociación entre el sexo y los genotipos (G y P-tipo) de rotavirus. La mayoría de las muestras (81.8%) no presentaron genotipos específicos, destacando la necesidad de un análisis más detallado.

3.4 Distribución de Genotipos por Sexo

Tabla 15

Genotipos por sexo de crías de alpacas.

G-tipo	CRIA MACHO		CRIA HEMBRA	
G3	1	14.3%	4	26.6%
-	6	85.7%	11	73.3%
TOTAL	7	100%	15	100%
P-tipo	CRIA MACHO		CRIA HEMBRA	
P1	1	14.2%	2	13.3%
P11	2	28.5%	2	13.3%
-	4	57.1%	11	73.3%
TOTAL	7	100%	15	100%

3.4.1 Análisis de Proporciones

Proporción de G-tipo en Machos

- Presente G3: $1/7 = 14.3\%$
- Ausente: $6/7 = 85.7\%$

Proporción de G-tipo en Hembras

- Presente G3: $4/15 = 26.6\%$
- Ausente: $11/15 = 73.3\%$

Proporción de P-tipo en Machos

- Presente P1: $1/7 = 14.2\%$
- Presente P11: $2/7 = 28.5\%$
- Ausente: $4/7 = 57.1\%$

Proporción de P-tipo en Hembras

- Presente P1: $2/15 = 13.3\%$
- Presente P11: $2/15 = 13.3\%$
- Ausente: $11/15 = 73.3\%$

3.4.2 Tablas de contingencia

Tabla 16

G-tipo por Sexo

G-tipo	CRIA MACHO	CRIA HEMBRA	Total
G3	1	4	5
-	6	11	17
Total	7	15	22

Figura 8

G-tipo por Sexo

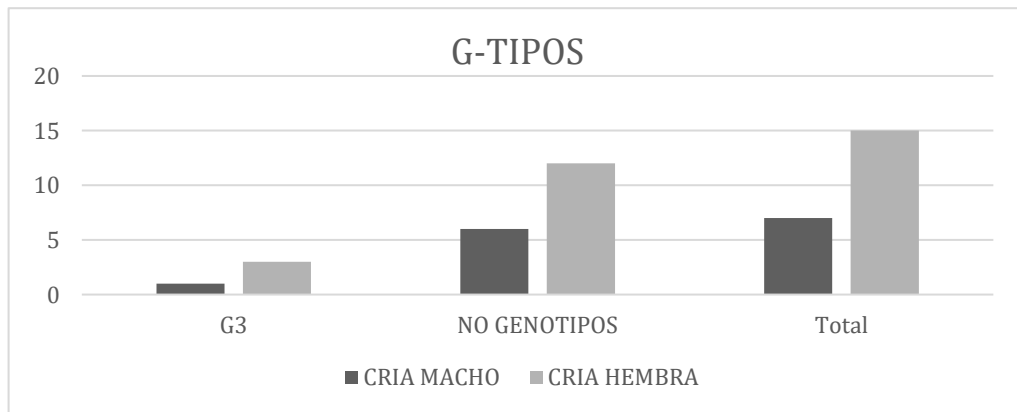


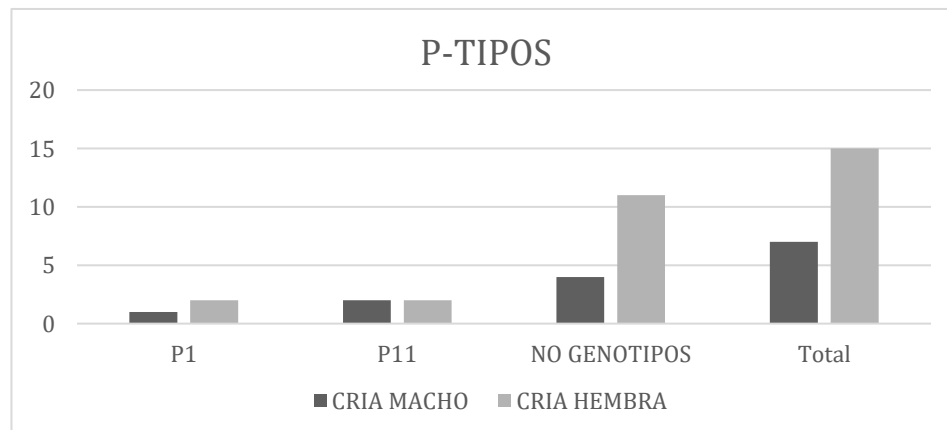
Tabla 17

P-tipo por Sexo

P-tipo	CRIA MACHO	CRIA HEMBRA	Total
P1	1	2	3
P11	2	2	4
-	4	11	15
Total	7	15	22

Figura 9

P-tipo por Sexo



DISCUSIÓN

El rotavirus es reconocido como una causa importante de enfermedades entéricas en diversas especies animales, incluidas las alpacas (*Vicugna pacos*), y puede tener graves implicaciones para la salud y la producción ganadera. En este estudio, se investigó los genotipos del rotavirus en alpacas del (CICAS) La Raya, provincia de Canchis, Cusco. Se emplearon técnicas de extracción de ARN viral y amplificación mediante RT-PCR para identificar los genotipos G y P predominantes en las muestras diarreicas analizadas en alpacas menores de tres meses lo que sugiere una susceptibilidad particular de esta población joven a la infección por rotavirus, como se ha observado en estudios previos (Smith et al., 2019).

El desequilibrio en la proporción de género observado en las muestras, con un 68,2% de hembras y un 31,8% de machos, es un hallazgo interesante que podría indicar una posible predisposición de las hembras a la infección por rotavirus. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para investigar esta posible asociación en profundidad. Aunque estudios previos han demostrado diferencias en la susceptibilidad a la infección por rotavirus entre sexos en otras especies animales (Sánchez-Fauquier et al., 2018).

La concentración de casos entre los meses de diciembre de 2016 y marzo de 2017 coincide con la temporada de lluvias en la región, durante la cual se observan cambios significativos en la humedad y la temperatura ambiental. Estas condiciones climáticas podrían influir en la transmisión y la propagación del rotavirus, ya que se ha demostrado que la estabilidad del virus está influenciada por la humedad y la temperatura (González-Galán et al., 2018).

Además, la falta de condiciones higiénicas adecuadas en las zonas de pastoreo podría estar contribuyendo a la prevalencia de la infección por rotavirus en las alpacas. La

contaminación fecal en el ambiente aumenta el riesgo de transmisión del virus entre los animales y favorece la persistencia del virus en el entorno (Umer et al., 2021).

La aplicación de técnicas de detección molecular como RT-PCR y PCR permitió la identificación específica del rotavirus en las 22 muestras examinadas. Estas técnicas son ampliamente reconocidas por su sensibilidad y especificidad en la detección de material genético viral en muestras diarreicas (Wei et al., 2022).

Se logró identificar los genotipos G y P en 9 de ellas mediante la técnica de PCR multiplex semianidada. Se observó el genotipo G3 en 5 muestras, el genotipo P[1] en 3 muestras, el genotipo P[11] en 4 muestras, y se detectó una combinación mixta de genotipos G3P[11] en 3 muestras. Estos resultados indican la presencia circulante de estos genotipos, en consonancia con estudios previos. Por ejemplo, en Brasil, constelaciones genéticas comunes como G3-P[40]-I8-E3-H6 en alpacas fueron documentadas (Rojas et al., 2019), mientras que en Argentina se identificó el genotipo G3/8 P[1/14] en el año 2021 (Badaracco et al., 2021). Se ha observado que el genotipo G3 se asocia con diferentes genotipos G en diferentes regiones.

Respecto al genotipo P[1], se ha encontrado asociado a P[1]/P[8] en ovejas en Brasil en 2019. En Argentina, se ha detectado el genotipo P[1] de manera aislada y asociado a P[14] en diferentes años, desde 2004 hasta 2021, lo que subraya la necesidad de estudiar su persistencia en el tiempo. Por otro lado, el genotipo P[11] se determinó en Argentina en 2016, sin mostrar asociaciones evidentes hasta la fecha. Resultados filogenéticos revelaron homologías parciales del genotipo G3P[11] con cepas encontradas en cerdos y humanos (Garmendia et al., 2015), confirmando su presencia y circulación en la región y un posible incremento con el tiempo.

Es probable que la dificultad para determinar los genotipos en algunas muestras se deba a la diversidad genética en los sitios de unión de los oligonucleótidos utilizados en el genotipado. Esta diversidad genética puede dificultar la amplificación y la detección de ciertos genotipos del rotavirus. Además, la constante combinación de genotipos en la diversidad de rotavirus, impulsada por mutaciones puntuales, eventos de recombinación y rearrreglos en los genes no estructurales, también puede contribuir a esta dificultad (Woods et al., 1991). Además, la presencia de coinfecciones con diferentes cepas de rotavirus puede aumentar aún más la diversidad genética y complicar la genotipificación de las muestras. Estos factores subrayan la complejidad de estudiar la diversidad genética del rotavirus y resaltan la importancia de utilizar enfoques más avanzados y sensibles en futuros estudios para abordar esta diversidad y comprender mejor la epidemiología y evolución del virus.

Por lo que el genotipado del rotavirus en crías de alpacas es crucial para comprender la diversidad y la posible transmisión zoonótica del virus. Estudios en Perú han detectado RVA en alpacas, con constelaciones de genotipos como G3/8 P[1/14]-I2-R2/5-C2/3-M2/3-A17-N2/3-T6-E3-H3, lo que indica genogrupos tanto de tipo bovino como de tipo AU-1 (Badaracco et al., 2021; Rojas et al., 2019). Además, la investigación en Brasil ha resaltado la importancia de monitorear genotipos inusuales como G12P[6] y G12P[9], mostrando relaciones genéticas con cepas animales y enfatizando el papel de los animales en la ecología y evolución del RVA, lo que podría afectar la eficacia y la eficacia de la vacuna. requieren una vigilancia continua (Melo, 2015). Comprender los genotipos que circulan en las crías de alpacas es esencial para implementar estrategias de salud preventiva efectivas y reducir las tasas de mortalidad neonatal.

CONCLUSIONES

- Se determinó mediante PCR multiplex semianidada, la presencia de los genotipos G3 en 5 muestras, P[1] en 3 muestras y P[11] en 4 muestras de rotavirus, así también se detectó la combinación genotípica G3P[11] en 3 muestras, lo que evidencia la circulación de estos genotipos en muestras diarreicas de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) menores de tres meses.
- La presencia de rotavirus se detectó en las 22 muestras analizadas, mediante la amplificación de la proteína estructural VP6, analizadas mediante RT-PCR.
- Se identificaron los genes antigénicos de rotavirus VP7(G) y VP4(P) en la totalidad de las muestras analizadas los cuales definen los genotipos de rotavirus, mediante técnicas de RT-PCR y PCR.

RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio detallado de la combinación mixta del genotipo G3P[11], así como de los genotipos G1, P[1] y P[11], ya que proporcionarán información crucial para el diseño de una vacuna específica. Esta investigación podría ayudar a desarrollar estrategias de inmunización dirigidas que sean más efectivas contra las cepas circulantes del rotavirus en alpacas.
- Implementar un genotipado utilizando nuevos primers o realizar un estudio a mayor escala, como un análisis metagenómico, para identificar y caracterizar nuevas cepas circulantes del rotavirus. Este enfoque ampliado permitirá una comprensión más completa de la diversidad genética del virus y facilitará la detección temprana de posibles variantes emergentes, lo que es fundamental para la implementación de medidas de control eficaces.
- Realizar un estudio longitudinal para seguir la evolución de la diversidad genética del rotavirus en alpacas a lo largo del tiempo. Esto permitiría comprender mejor cómo cambian los genotipos y su impacto en la salud de las alpacas en diferentes temporadas y condiciones ambientales. Se observó que no fue posible tipificar algunas muestras, lo cual pone de manifiesto genotipos diferentes presentes en las muestras diarreicas de crías de alpaca.
- Llevar a cabo investigaciones específicas para identificar los principales factores de transmisión del rotavirus entre las alpacas, incluyendo la evaluación de prácticas de manejo, condiciones ambientales y contacto entre animales. Estas investigaciones ayudarían a desarrollar estrategias de prevención más efectivas.

BIBLIOGRAFÍA

- Allcarima, B. G. (2021). Parasitismo gastrointestinal de alpacas (*Vicugna pacos*) en época de lluvia del anexo Santa Fé, distrito Paras-Ayacucho 2020. UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA.
- Arnoldi, F., & Burrone, O. R. (2014). Role of viral nonstructural proteins in rotavirus replication. *Future Virology*, 4(2), 185–196. doi:10.2217/17460794.4.2.185
- Ayala-Breton, C., Arias, M., Espinosa, R., Romero, P., Arias, C. F., & López, S. (2009). Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference. *Journal of virology*, 83(17), 8819–8831. <https://doi.org/10.1128/JVI.02308-08>
- Badaracco, A., Cordero, A., Vega, C., Bok, M., Zeller, M., Heylen, E., Fernández, G., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Guevara, H., Matthijnsens, J., & Parreno, V. (2021). Molecular characterization of group A rotavirus strains detected in alpacas (*Vicugna pacos*) from Peru. *The Journal of general virology*, 102(4), 10.1099/jgv.0.001501. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001501>
- Badaracco, A., Matthijnsens, J., Romero, S., Heylen, E., Zeller, M., Garaicoechea, L., Van Ranst, M., & Parreño, V. (2013). Discovery and molecular characterization of a group A rotavirus strain detected in an Argentinean vicuña (*Vicugna vicugna*). *Veterinary microbiology*, 161(3-4), 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.035>
- Barbieri, E. S., Rodríguez, D.V., Marin, R. E., Setti, W., Romero, S., Barrandeguy, M., & Parreño, V. (2014). Relevamiento serológico de anticuerpos contra enfermedades virales de interés sanitario en llamas (*Lama glama*) de la provincia de Jujuy, Argentina. *Revista argentina de microbiología*, 46(1), 53-57. Recuperado el 18 de agosto de 2022,

http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412014000100011&lng=es&tlng=es.

Berkova, Z., Crawford, S. E., Trugnan, G., Yoshimori, T., Morris, A. P., & Estes, M. K.

(2006). Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasm. *Journal of virology*, 80(12), 6061-6071.

Berois, M., Libersou, S., Russi, J., Arbiza, J., & Cohen, J. (2003). Genetic variation in the VP7 gene of human rotavirus isolated in Montevideo-Uruguay from 1996-1999. *Journal of medical virology*, 71(3), 456-462.
<https://doi.org/10.1002/jmv.10511>

Borodavka, A., Dykeman, E. C., Schrimpf, W., & Lamb, D. C. (2017). Protein-mediated RNA folding governs sequence-specific interactions between rotavirus genome segments. *eLife*, 6, e27453. <https://doi.org/10.7554/eLife.27453>

Boudreaux, C. E., Vile, D. C., Gilmore, B. L., Tanner, J. R., Kelly, D. F., & McDonald, S. M. (2013). Rotavirus core shell subdomains involved in polymerase encapsidation into virus-like particles. *The Journal of general virology*, 94(Pt 8), 1818-1826.
<https://doi.org/10.1099/vir.0.052951-0>

Broome R.L., Vo P.T., Ward R.L., Clark H.F., Greenberg H.B. (1993) Murine rotavirus genes encoding outer capsid proteins VP4 and VP7 are not major determinants of host range restriction and virulence *J. Virol.*, 67 , 2448-2455.

Browne, E. P., Bellamy, A. R., & Taylor, J. A. (2000). Membrane-destabilizing activity of rotavirus NSP4 is mediated by a membrane-proximal amphipathic domain. *Journal of General Virology*, 81(8), 1955-1959.

Carballal, G., & Oubiña, J. R. (2014) *Virología Médica Ed.4 por.* ISBN: 9789871860104 - Tema: Rotavirus.

- Cherepushkin, S. A., V, V, Tsibezov., A, G, Yuzhakov., Oleg, Latyshev., K, P, Alekseev., E, G, Altayeva., Kizkhalum, M., Khametova., G, K, Vorkunova., K, A, Yuzhakova., T., V., Grebennikova. (2021). [Synthesis and characterization of human rotavirus A (Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A) virus-like particles].. *Voprosy virusologii*, doi: 10.36233/0507-4088-27-
- Cilla, G., Montes, M., Gomariz, M., Alkorta, M., Iturzaeta, A., Perez Yarza, E., & Perez-Trallero, E. (2013). Rotavirus genotypes in children in the Basque Country (North of Spain): Rapid and intense emergence of the G12[P8] genotype. *Epidemiology and Infection*, 141(4), 868-874. doi:10.1017/S0950268812001306
- Coulson, B. S., & Kirkwood, C. (1991). Relation of VP7 amino acid sequence to monoclonal antibody neutralization of rotavirus and rotavirus monotype. *Journal of virology*, 65(11), 5968–5974. <https://doi.org/10.1128/JVI.65.11.5968-5974.1991>
- Crawford S.E., Utama B., Hyser J.M., Broughman J.R., Estes M.K. (2013) Rotavirus exploits lipid metabolism and energy production for replication. American Society for Virology Annual Meeting, Pennsylvania State University, University Park, PA, p. 74 (W2–6)
- Crawford, S. E., Ramani, S., Tate, J. E., Parashar, U. D., Svensson, L., Hagbom, M., Franco, M. A., Greenberg, H. B., O’Ryan, M., Kang, G., Desselberger, U., & Estes, M. K. (2017). Rotavirus infection. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>
- Criglar, J. M., Hu, L., Crawford, S. E., Hyser, J. M., Broughman, J. R., Prasad, B. V., & Estes, M. K. (2014). A novel form of rotavirus NSP2 and phosphorylation-dependent NSP2-NSP5 interactions are associated with viroplasm assembly. *Journal of Virology*, 88(2), 786-798.

- Cunliffe, N., Zaman, K., Rodrigo, C., Debrus, S., Benninghoff, B., Pemmaraju Venkata, S., & Han, H. H. (2014). Early exposure of infants to natural rotavirus infection: a review of studies with human rotavirus vaccine RIX4414. *BMC pediatrics*, *14*, 295. <https://doi.org/10.1186/s12887-014-0295-2>
- De Lamo, D. (2011). Camélidos sudamericanos. Historia, usos y sanidad animal. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Servicio Nacional de Sanidad y calidad agroalimentaria. SENASA.
- Desselberger U. (2014). Rotaviruses. *Virus research*, *190*, 75–96. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.06.016>
- Díaz-Salinas, M. A., Silva-Ayala, D., López, S., & Arias, C. F. (2014). Rotaviruses reach late endosomes and require the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor and the activity of cathepsin proteases to enter the cell. *Journal of virology*, *88*(8), 4389–4402. <https://doi.org/10.1128/JVI.03457-13>
- Dong, Y., Zeng, C. Q., Ball, J. M., Estes, M. K., & Morris, A. P. (1997). The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(8), 3960–3965. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.8.3960>
- Dormitzer, P. R., Sun, Z. Y., Wagner, G., & Harrison, S. C. (2002). The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *The EMBO journal*, *21*(5), 885–897. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.885>
- Espada C. M., Jiménez CE, Vázquez MD. (2010). Camélidos sudamericanos: estado sanitario de sus crías. *Rev Complutense Cienc Vet* *4*(1): 37-50.

- Estes, M. K., Kang, G., Zeng, C. Q. Y., Crawford, S. E., & Ciarlet, M. (2001, May). Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis. In *Gastroenteritis Viruses: Novartis Foundation Symposium 238* (Vol. 238, pp. 82-100). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Estes, M.K., Greenberg, H.B., (2013). Rotaviruses, 6th ed. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Cohen, J.I., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Racaniello, V.R., Roizman, B.(Eds.), *Fields Virology*, vol. 2. Walters Kluwer Health Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 1347–1401.
- Fabbretti E., Afrikanova I., Vascotto F., Burrone O.R. (1999). Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J. Gen. Virol.*, 80, 333-339.
- Fabian Michelangeli, Marie-Christine Ruiz, Jesus R. Del Castillo, Juan Ernesto Ludert,
- FAO. (2005). Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina 60.
- Feng, N., Yasukawa, L. L., Sen, A., & Greenberg, H. B. (2013). Permissive replication of homologous Murine Rotavirus in the mouse intestine is primarily regulated by VP4 and NSP1. *Journal of Virology*, 87(15), 8307–8316.
<https://doi.org/10.1128/jvi.00619-13>
- Figuroa, D., Corredor, F., Mamani-Cato, R. H., Gallegos-Acero, R. F., Condori-Rojas, N., Estrada, R., Heredia, L., Salazar, W., Quilcate, C., & Arbizu, C. I. (2023). Microsatellite-Based Genetic Diversity and Population Structure of Huacaya Alpacas (*Vicugna pacos*) in Southern Peru. *Animals*, 13(9), 1552.
<https://doi.org/10.3390/ani13091552>

- Filatov, I. E., Tsibezov, M. V., Svetlana, B., Oleg, N., Latyshev, O. E., Cherepushkin, A., Verkhovsky, A. (2023). [Virus-like particles based on rotavirus A recombinant VP2/VP6 proteins for assessment the antibody immune response by ELISA]. *Voprosy virusologii*, doi: 10.36233/0507-4088-169
- Fiore, L., Harry, B., Greenberg B, Mackow, E.R (1991) The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin, *Virology*, Volume 181, Issue 2, 553-563, [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90888-I](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90888-I).
- Fleming F.E., Böhm R., Dang V.T., Holloway G., Haselhorst T., Madge P.D., Deveryshetty J., Yu X. (2014). Relative roles of GM1 ganglioside, N-acylneuraminic acids and $\alpha 2\beta 1$ integrin in mediating rotavirus infection. *J. Virol.*
- Flores, T., Ulises, S., Quispe-Gutiérrez., Gizely, Alva-Villavicencio., Miluska, Beatriz, Navarrete-Zamora. (2022). Evaluación morfológica del estómago fetal en alpaca (*Vicugna pacos*). doi: 10.52973/rcfcv-e32101.
- Gardet, A., Breton, M., Fontanges, P., Trugnan, G., & Chwetzoff, S. (2006). Rotavirus spike protein VP4 binds to and remodels actin bundles of the epithelial brush border into actin bodies. *Journal of virology*, 80(8), 3947-3956.
- Garmendia, A.E., Lopez, W., Ortega, N., Chamorro, M.J., (2015). Molecular characterization of rotavirus isolated from alpaca (*Vicugna pacos*) crias with diarrhea in the Andean Region of Cusco, Peru. *Vet. Microbiol.*, 180, 109-112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.022>.
- Gastañaduy, P. A., Hall, A. J., & Parashar, U. D. (2013). Rotavirus. In *Foodborne infections and intoxications* (pp. 303-311). Academic Press. 303 - 311
- Gentsch, J. R., Laird, A. R., Bielfelt, B., Griffin, D. D., Banyai, K., Ramachandran, M., Jain, V., Cunliffe, N. A., Nakagomi, O., Kirkwood, C. D., Fischer, T. K., Parashar, U. D., Bresee, J. S., Jiang, B., & Glass, R. I. (2005). Serotype diversity and reassortment

- between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *The Journal of infectious diseases*, 192 Suppl 1, S146–S159. <https://doi.org/10.1086/431499>
- Gomez, J. A., Sordo, M. E., & Gentile, A. (2002). Epidemiologic patterns of diarrheal disease in Argentina: estimation of rotavirus disease burden. *The Pediatric infectious disease journal*, 21(9), 843-850.
- González-Galán et al. (2018). "Effect of environmental factors on rotavirus stability and infectivity." *Food Environ Virol.* 10: 63-72.
- Gouvea, V., Glass, R. I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H. F., Forrester, B., & Fang, Z. Y. (1990). Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *Journal of clinical microbiology*, 28(2), 276–282. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.2.276-282.1990>
- Greenberg, H. B., & Estes, M. K. (2009). Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*, 136(6), 1939–1951. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.02.076>
- Groft, C. M., & Burley, S. K. (2002). Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Molecular cell*, 9(6), 1273–1283. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00555-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00555-5)
- Gutiérrez, M., Isa, P., Sánchez-San Martín, C., Pérez-Vargas, J., Espinosa, R., Arias, C. F., & López, S. (2010). Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *Journal of virology*, 84(18), 9161–9169. <https://doi.org/10.1128/JVI.00731-10>
- Gutierrez-Flores., I, R., Canales-Gutiérrez, Á. (2023). Ancestral knowledge on the use of wild plants for the treatment of diseases in alpacas. *Latin American and Caribbean Bulletin of Medicinal and Aromatic Plants*, doi: 10.37360/blacpma.23.22.5.46

- Hoxie, I., & Dennehy, J. (2021). Rotavirus A Genome Segments Show Distinct Segregation and Codon Usage Patterns.. *Viruses*, doi: 10.3390/V13081460
- Huang, P., Xia, M., Tan, M., Zhong, W., Wei, C., Wang, L., Morrow, A., & Jiang, X. (2012). Spike protein VP8* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *Journal of virology*, 86(9), 4833–4843. <https://doi.org/10.1128/JVI.05507-11>
- Infante, R., Miranda, D. G., Reye, A. B. T., Cisneros, H. E., Cruz, Q. R., Cendón, T. S., & Vega, G. E. D. La. (2007). Rotavirus y vacunas. *Synthesis*, 1–7.
- Isa, P., Realpe, M., Romero, P., López, S., & Arias, C. F. (2004). Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology*, 322(2), 370–381. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.02.018>
- Kapikian, A. Z. (2001). A rotavirus vaccine for prevention of severe diarrhoea of infants and young children: development, utilization and withdrawal. In *Gastroenteritis Viruses: Novartis Foundation Symposium 238* (Vol. 238, pp. 153-179). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Keswick, B. H., Pickering, L. K., DuPont, H. L., & Woodward, W. E. (1983). Survival and detection of rotaviruses on environmental surfaces in day care centers. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(4), 813-816.
- Le Mercier C, P., (content), P., & Edouard de Castro (software). (2022). Sedoreoviridae ~ ViralZone. Expasy.org. Recuperado el 27 de mayo de 2024, de <https://viralzone.expasy.org/104>
- Leena, Maunula., C.-H., Von, Bonsdorff. (1998). Short sequences define genetic lineages: phylogenetic analysis of group A rotaviruses based on partial sequences of genome segments 4 and 9.. *Journal of General Virology*, doi: 10.1099/0022-1317-79-2-321

- López P, W., Chamorro L, M., & Garmendia B, A. E. (2011). Detección rápida de rotavirus y coronavirus en crías de alpaca (*Vicugna pacos*) con diarrea en la región del Cusco, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22(4), 407-411. Recuperado en 18 de agosto de 2022, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172011000400016&lng=es&tlng=es.
- Louge Uriarte, E. (2016). Circulación y caracterización molecular de Rotavirus y Escherichia coli asociados a diarrea neonatal y septicemia en terneros. Repositorio.inta.gob.ar. Recuperado el 19 de Agosto del 2022, from <https://repositorio.inta.gob.ar/xmlui/handle/20.500.12123/5218>.
- Lu, X., McDonald, S. M., Tortorici, M. A., Tao, Y. J., Vasquez-Del Carpio, R., Nibert, M. L., ... & Harrison, S. C. (2008). Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Structure*, 16(11), 1678-1688.
- Lucas, J., Morales, C., Barrios, A., Rodríguez, G., Vásquez, J., Lira, M., Torres, B., Casas, A., & Espinoza, B. (2016). Patógenos Involucrados en Casos Fatales de Diarrea en Crías de Alpaca de la Sierra Central del Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 27(1), 169-175. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v27i1.11465>
- Ludert, J. E., Michelangeli, F., Gil, F., Liprandi, F., & Esparza, J. (1987). Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology*, 27(2), 95–101. <https://doi.org/10.1159/000149726>
- Lupton C.J., McColl A., & Stobart R.H. (2006). Fiber Characteristics of the Huacaya Alpaca. *Small Ruminant Research* 64,211-224.
- Marín, J.C., B. Zapata, B.A. González, C. Bonacic, J.C. Wheeler, C. Casey, M.W. Bruford, R.E. Palma, E. Poulin, M.A. Alliende y A.E. Spotorno. (2007). «Sistemática,

- taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular». *Revista Chilena de Historia Natural* 80: 121-140.
- Matthijnssens, J., Attoui, H., Bányai, K., Brussaard, C.P.D., Danthi, P., del Vas, M., Dermody, T.S., Duncan, R., Fāng, Q., Johne, R., Mertens, P.P.C., Jaafar, F.M., Patton, J., Sasaya T., Suzuki, N., Wei, T. & ICTV (2022). Report Consortium., ICTV Virus Taxonomy Profile: Sedoreoviridae 2022, *Journal of General Virology*. 103:001782
- Matthijnssens, J., & Van Ranst, M. (2012). Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Current opinion in virology*, 2(4), 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.04.007>
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S. M., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J. R., Buesa, J., Esona, M. D., Estes, M. K., Gentsch, J. R., Iturriza-Gómara, M., Johne, R., Kirkwood, C. D., Martella, V., Mertens, P. P., Nakagomi, O., Parreño, V., Rahman, M., Ruggeri, F. M., Saif, L. J., ... Van Ranst, M. (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of virology*, 156(8), 1397–1413. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1006-z>
- Melo, B. D. (2015). Estudio molecular de genótipos não usuais de rotavírus A em crianças com gastroenterite aguda da Região Metropolitana de Belém, Pará-Brasil (2008 a 2011).
- Miño, S. O., Badaracco, A., Louge Uriarte, E., Ciarlet, M., & Parreño, V. (2022). Evolution of Animal South American RVA Told by the NSP4 Gene E12 Genotype. *Viruses*, 14(11), 2506. <https://doi.org/10.3390/v14112506>
- Moreno-Morales, G., Maximiliano G., J., Siuce M., J., Chero O., A., Medina S., G., Luna E., L., Rosadio A., R., & Maturrano H., L. (2021). Evaluación de la inmunogenicidad de una proteína recombinante de *Pasteurella multocida* para la prevención de la neumonía

- aguda en alpacas (*Vicugna pacos*). Revista de investigaciones veterinarias del Peru, 32(4), e20924. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i4.20924>
- Nair, N., Feng, N., Blum, L. K., Sanyal, M., Ding, S., Jiang, B., Sen, A., Morton, J. M., He, X., Robinson, W. H., & Greenberg, H. B. (2017). VP4- and VP7-specific antibodies mediate heterotypic immunity to rotavirus in humans. Science Translational Medicine, 9(395). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aam5434>
- Nakagomi. O., Nakagomi. T., Arisawa. K. (2006). A lack of significant association between the electropherotype or G-serotype of the infecting strain and disease severity of rotavirus gastroenteritis. Archives of Virology, doi: 10.1007/S00705-006-0774-3
- Oyola Lozada, M. G. (2015). Diversidad de Rotavirus A en niños con gastroenteritis aguda en Lima-Perú. Universidad Ricardo Palma. <https://repositorio.urp.edu.pe/handle/20.500.14138/590>
- Parreño, V., Bok, K., Fernandez, F., & Gomez, J. (2004). Molecular characterization of the first isolation of rotavirus in guanacos (*Lama guanicoe*). Archives of Virology, 149(12), 2465–2471. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0371-2>
- Patel, M., Richardson, V., Hernandez-Pichardo, J., Quintanar-Solares, M., Esparza-Aguilar, M., Johnson, B., Gomez-Altamirano, C. M., & Parashar, U. (2010). Effect of Rotavirus Vaccination on Death from Childhood Diarrhea in Mexico. New England Journal Of Medicine/ The New England Journal Of Medicine, 362(4), 299-305. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0905211>
- Pedro, H., Zavaleta, G., Espejo, H., Quintero, A., Segundo, Jáuregui, R., Mejía, E., Saldaña-Jiménez, K., Trujillo, A. (2022). antimicrobial effect of *vicugna pacos* “alpaca” fibers functionalized with silver nanoparticles. Rebiol, doi: 10.17268/rebiol.2022.42.01.04

- Pérez-Vargas, J., Isa, P., López, S., & Arias, C. F. (2006). Rotavirus vaccine: early introduction in Latin America-risks and benefits. *Archives of medical research*, 37(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.06.004>
- Prasad, B. V., Rothnagel, R., Zeng, C. Q., Jakana, J., Lawton, J. A., Chiu, W., & Estes, M. K. (1996). Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature*, 382(6590), 471–473. <https://doi.org/10.1038/382471a0>
- Prasad, B. V., Hardy, M. E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M. G., & Estes, M. K. (1999). X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5438), 287–290. <https://doi.org/10.1126/science.286.5438.287>
- Ramig R.F., Ciarlet M., Mertens P.P.C., Dermody T.S. C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L.A. (2005) *Virus Taxonomy. Eighth Report of the ICTV*, Elsevier Academic Press, Amsterdam, 484-496
- Rodríguez, J. M., Chichón, F. J., Martín-Forero, E., González-Camacho, F., Carrascosa, J. L., Castón, J. R., & Luque, D. (2014). New insights into rotavirus entry machinery: stabilization of rotavirus spike conformation is independent of trypsin cleavage. *PLoS pathogens*, 10(5), e1004157. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004157>
- Rojas, M., Dias, H. G., Gonçalves, J. L. S., Manchego, A., Rosadio, R., Pezo, D., & Santos, N. (2019). Genetic diversity and zoonotic potential of rotavirus A strains in the southern Andean highlands, Peru. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(4), 1718–1726. <https://doi.org/10.1111/tbed.13207>
- Rojas, M., Gonçalves, J. L. S., Dias, H. G., Manchego, A., Pezo, D., & Santos, N. (2016a). Whole-genome characterization of a Peruvian alpaca rotavirus isolate expressing a

- novel VP4 genotype. *Veterinary Microbiology*, 196, 27–35.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.10.005>
- Rojas, M., Manchego, A., Rocha, C. B., Fornells, L. A., Silva, R. C., Mendes, G. S., ... Santos, N. (2016b). Outbreak of diarrhea among preweaning alpacas (*Vicugna pacos*) in the southern peruvian highland. *Journal of Infection in Developing Countries*, 10(3), 269–274. <https://doi.org/10.3855/jidc.7398>
- Rubio, R. M., Mora, S. I., Romero, P., Arias, C. F., & López, S. (2013). Rotavirus prevents the expression of host responses by blocking the nucleocytoplasmic transport of polyadenylated mRNAs. *Journal of Virology*, 87(11), 6336-6345.
- Salguero, N. (2017). “Detección de antígenos en rotavirus en el CICAS- La Raya, provincia de Canchis-Cusco”. Repositorio de la Facultad de Ciencias Biológicas. UNSAAC.
- Sánchez-Fauquier A., González-Galán V., Arroyo S., Cabornero A. (2018). "Molecular Epidemiology of Rotavirus Strains Circulating in the Autonomous Region of Madrid, Spain, during the Winter of 2018." *J Clin Microbiol*. 56(9): e00363-18.
- Sepúlveda N. (2011). Manual para el manejo de Camélidos Sudamericanos Domésticos. Fundación para la Innovación Agraria. Santiago, Chile 55.
- Settembre, E. C., Chen, J. Z., Dormitzer, P. R., Grigorieff, N., & Harrison, S. C. (2011). Atomic model of an infectious rotavirus particle. *The EMBO journal*, 30(2), 408–416. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.322>
- Silva-Ayala, D., López, T., Gutiérrez, M., Perrimon, N., López, S., & Arias, C. F. (2013). Genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in rotavirus cell entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(25), 10270–10275. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304932110>

- Silvestri, L. S., Taraporewala, Z. F., & Patton, J. T. (2004). Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *Journal of virology*, 78(14), 7763–7774. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.14.7763-7774.2004>
- Sirok, A., & Pera, V. L. (2008). Agentes virales de gastroenteritis Rotavirus. In *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (pp. 519– 534).
- Siuce, M. J. (2012). Expresión de Defensinas en Yeyuno de crías de Alpacas (*Vicugna pacos*) con Enteropatías. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS.
- Smith, A.B., Brown R.J., Slifka M.K., Smith A.L. (2019). "Genetic Diversity of Rotavirus A in Bats, Brazil." *Emerg Infect Dis.* 25(3): 608-611.
- Sung, P. Y., Zhou, Y., Kao, C. C., Aburigh, A. A., Routh, A., & Roy, P. (2023). A multidisciplinary approach to the identification of the protein-RNA connectome in double-stranded RNA virus capsids. *Nucleic acids research*, 51(10), 5210–5227. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad274>
- Taylor, J. A., O'Brien, J. A., & Yeager, M. (1996). The cytoplasmic tail of NSP4, the endoplasmic reticulum-localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains. *EMBO Journal*, 15(17), 4469-4476. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00824.x>
- Tongyao, M., Mengxuan, W., Jindong, W., Yalin, M., Xiafei, L., Mingwen, W., Xiaoman, S., Lili, L., Huiying, L., Qin, Z., Dandi, L., Zhaojun, D. (2022). Análisis filogenético de las proteínas virales VP4/VP7 de cepas de rotavirus humanos circulantes en China de 2016 a 2019 y comparación de sus epítomos antigénicos con los de las cepas vacunales. *Fronteras en microbiología celular y de infecciones*, doi: 10.3389/fcimb.2022.927490
- Umer, Seid, Geletu., Munera, Ahmednur, Usmael., Fufa, Dawo, Bari. (2021). Rotavirus en terneros y su importancia zoonótica. *Veterinary Medicine International*, doi: 10.1155/2021/6639701

- Wei, L., Weiwei, L., Lin, L., Ya-jing, G., Jie, C., Shiqiang, S., Jianhua, M. (2022). Multiplex detection of eight different viral enteropathogens in clinical samples, combining RT-PCR technology with melting curve analysis. *Virology Journal*, doi: 10.1186/s12985-022-01789-z
- Woode, G.N. (1976). Pathogenic Rotaviruses Isolated from Pigs and Calves. In *Ciba Foundation Symposium 42 - Acute Diarrhoea in Childhood* (eds K. Elliott and J. Knight). <https://doi.org/10.1002/9780470720240.ch15>
- Woods, P.A., Ing, D.J., Glass, R.I. (1991). Immunogenicity of tetravalent rhesus Rotavirus vaccine administered with buffer and oral polio vaccine. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 145(8), 892. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1991.02160080070023>
- World Health Organization. (2013). Rotavirus vaccines: WHO position paper, January 2013. *Weekly Epidemiological Record*, 88(5), 49-64.
- Wurzinger M., Delgado J., Nürnberg M., Valle Zárate A., Stemmer A., Ugarte G., & Sölkner J. (2006). Genetic and non-genetic factors influencing fibre quality of Bolivian llamas. *Small Ruminant Research* 61(2-3), 131-139. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.004>.
- Xu, S., McGinnis, K. R., Liu, Y., Huang, P., Tan, M., Stuckert, M. R., Burnside, R. E., Jacob, E. G., Ni, S., Jiang, X., & Kennedy, M. A. (2021). Structural basis of P[II] rotavirus evolution and host ranges under selection of histo-blood group antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(36), e2107963118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2107963118>

ANEXOS

Tabla 18

Primers, secuencia y producto

<i>Nombre</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Producto/Genotipo</i>
CON 3	5'TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A 3'	VP4 (nt 876)
CON 2	5'ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC 3'	Gentsch et al, 1992
BEG 9	5'GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G 3'	VP7 (nt 1062)
END 9	5'GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG 3'	Gouvea et al, 1990
ROT 3	5'AAAGATGCTAGGGACAAAATTG 3'	VP6 (nt 308)
ROT 5	5'TTCAGATTGTGGAGCTATTCCA 3'	Elschner et al, 2002
AET 3	5'CGT TTG AAG AAG TTG CAA CAG 3'	G3 (nt 689-709)
ADT 4	5'CGT TTC TGG TGA GGA GTT G 3'	G4 (nt 480-498)
AAT 8	5'GTC ACA CCA TTT GTA AAT TCG 3'	G8 (nt 178-198)
G 10	5'ATG TCA GAC TAC ARA TAC TGG 3'	G10 (nt 666-687)
PNC DV	5'CGA ACG CGG GGG TGG TAG TTG 3'	P[1] (nt 269-289)
PUK	5'GCC AGG TGT CGC ATC AGA G 3'	P[5] (nt 336-354)
PB 223	5'GGA ACG TAT TCT AAT CCG GTG 3'	P[11] (nt 574-594)

Los primers dirigidos a los genes VP6 (rot 3 y rot 5), VP4 (con 3 y con 2) y VP7 (beg 9 y end 9). primers específicos para los genotipos G3, G4, G8, G10, P1, P5 y P11. para una PCR multiplex semi anidada.

Tabla 19*Tabla codificada de alpacas*

N° CÓDIGO ALPACA	SEXO CRIA DE ALPACAS	CODIGO DE MUESTRA
H-8009	CRIA MACHO	M1
H-7818	CRIA HEMBRA	M2
H-8102	CRIA MACHO	M3
H-7565	CRIA HEMBRA	M4
H-7346	CRIA HEMBRA	M5
H-7863	CRIA HEMBRA	M6
H-5058	CRIA HEMBRA	M7
H-7892	CRIA HEMBRA	M8
H- 8054	CRIA HEMBRA	M9
H-3368	CRIA MACHO	M10
H-7969	CRIA MACHO	M11
H-7834	CRIA MACHO	M12
H-7688	CRIA HEMBRA	M13
H-7912	CRIA HEMBRA	M14
H-7817	CRIA HEMBRA	M15
H-7712	CRIA HEMBRA	M16
H-6239	CRIA HEMBRA	M17
H-8104	CRIA MACHO	M18
H-5170	CRIA MACHO	M19
H-7367	CRIA HEMBRA	M20
H-7140	CRIA HEMBRA	M21
H-3472	CRIA HEMBRA	M22

Tabla 20

Reactivos del Kit SuperScript™ III RT con Platinum™ Taq

REACTIVOS	CONTENIDO
Mezcla SuperScript™ III RT / Platinum™ Taq	50 µl
Mezcla de reacción 2X (un tampón que contiene 0,4 mM de cada dNTP, 3,2 mM MgSO 4)	1 ml
5 mM Sulfato de magnesio	500 µl

GALERÍA DE FOTOS

Figura 10

Electroforesis en gel de agarosa de la proteína VP6, con productos de 308pb

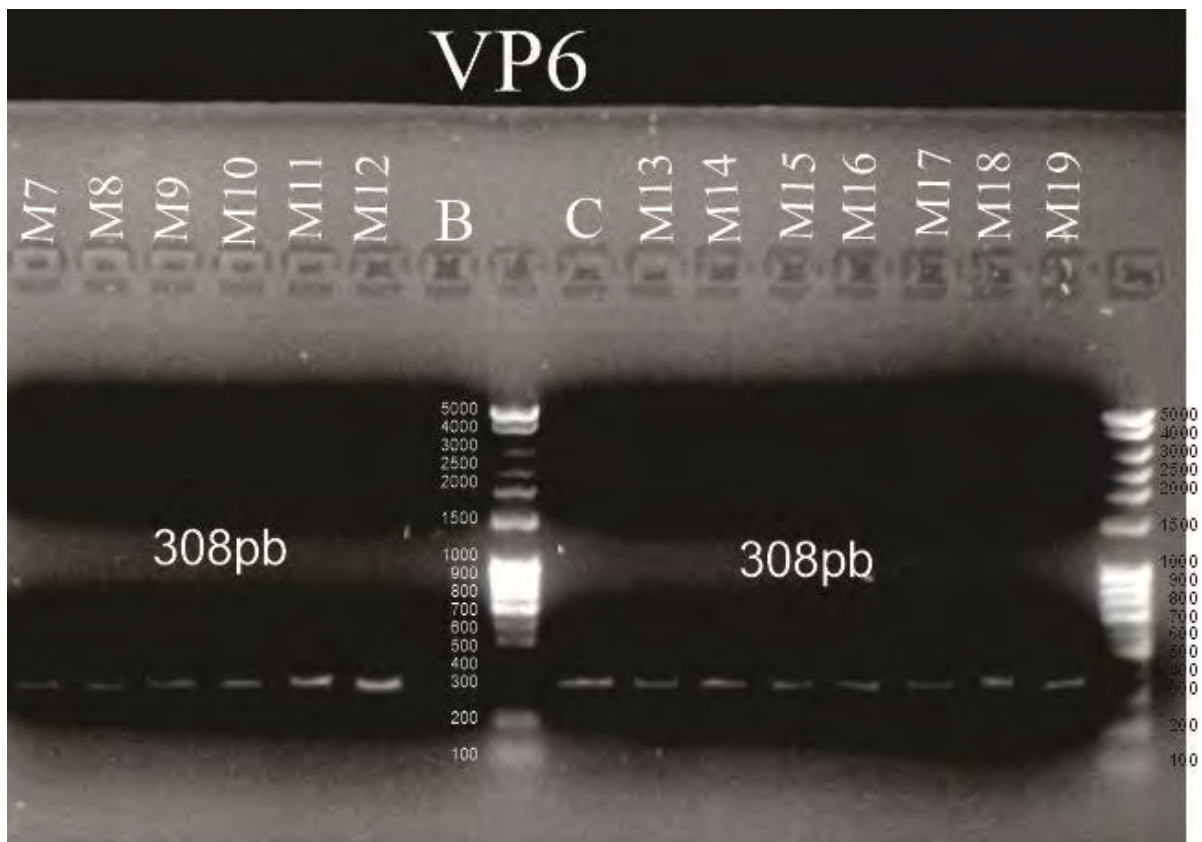


Figura 11

Electroforesis en gel de agarosa de la proteína VP4, con productos de 876pb

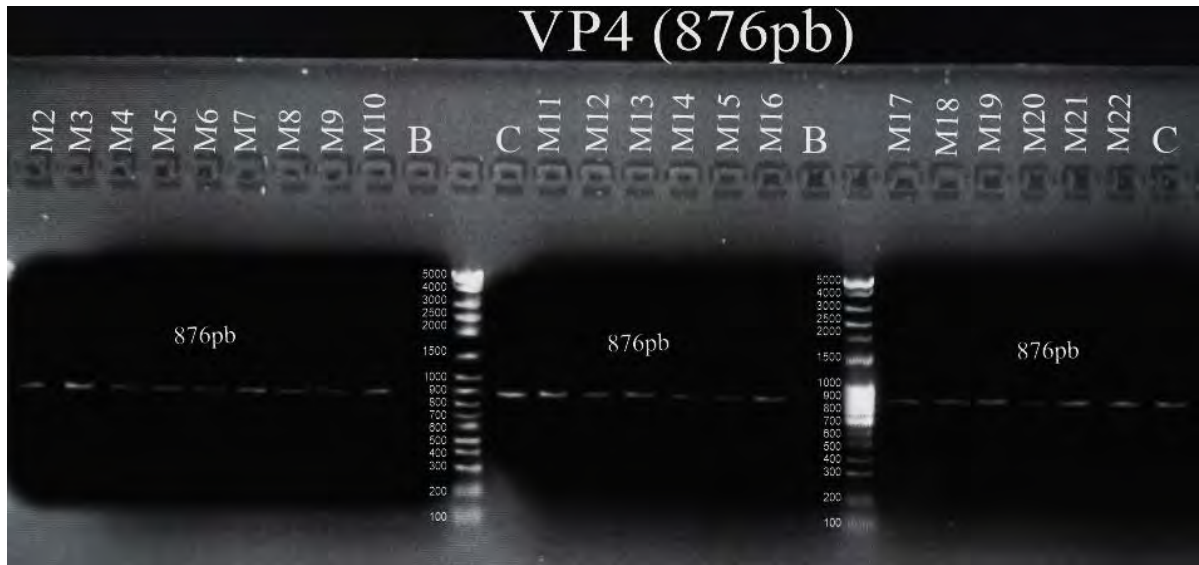


Figura 12

Electroforesis en gel de agarosa de la proteína VP7, con productos de 1062pb

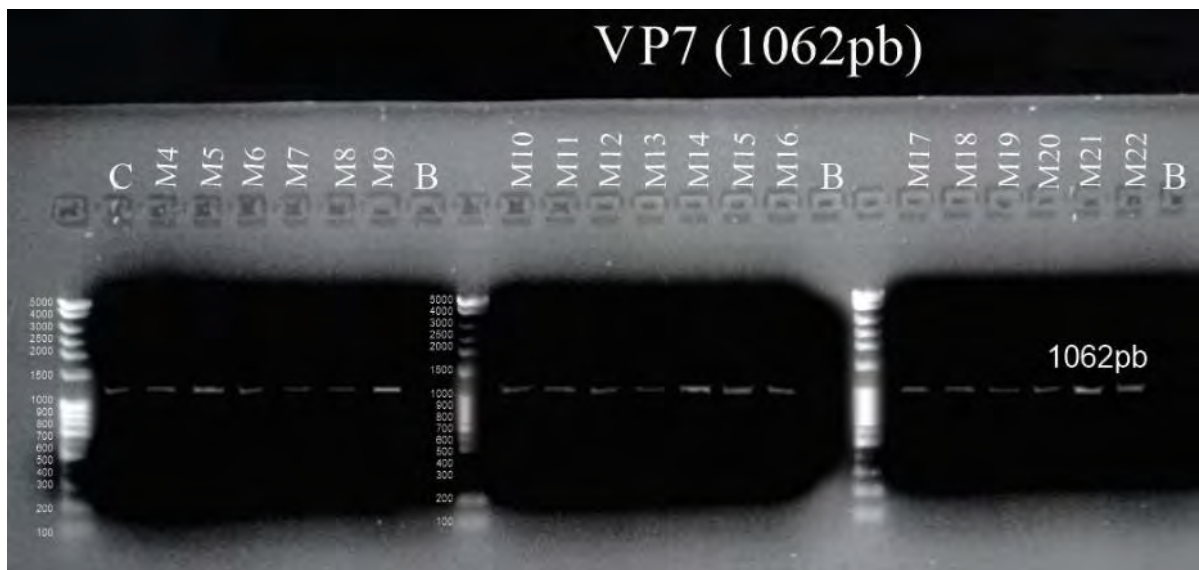


Figura 13

Electroforesis en gel de agarosa de genotipos G y P, con productos de 709pb, 289pb, 594pb

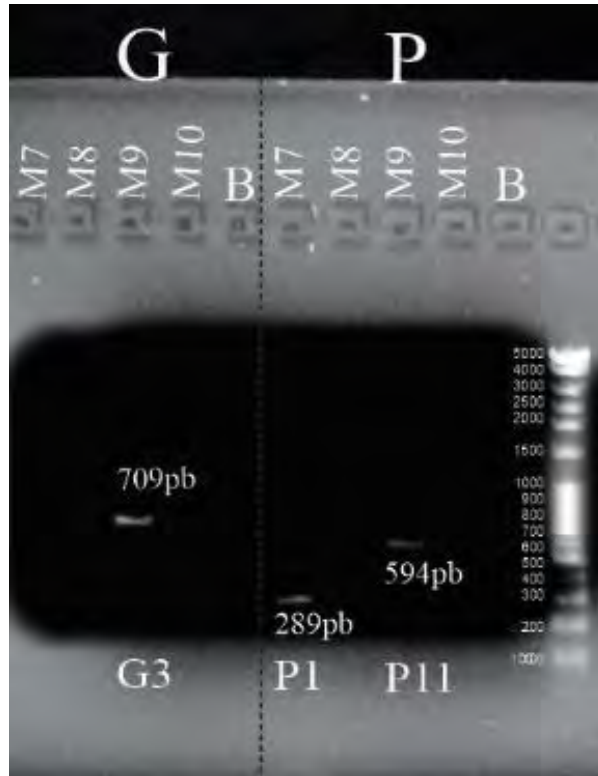


Figura 14

Electroforesis en gel de agarosa de genotipos, G3, P1 y P11

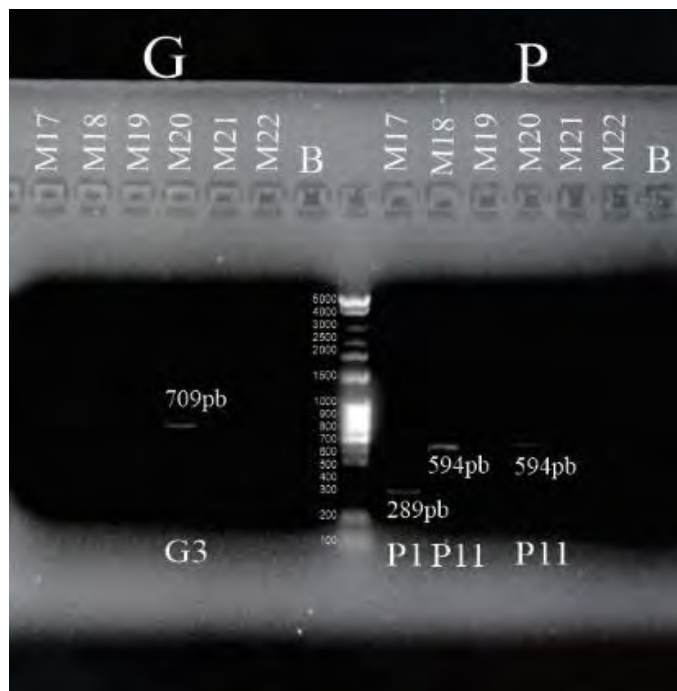


Figura 15

Muestras diarreicas con reactivo trizol

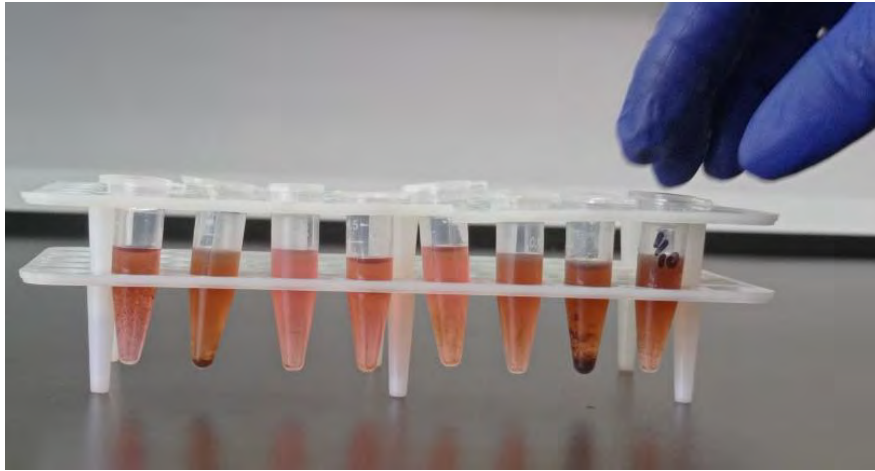


Figura 16

Kit de Reactivos para extracción de ARN viral



Figura 17

Cuantificación de ARN previo a la RT-PCR y PCR



Figura 18

Ciclajes insertados en el termociclador



Figura 19

Reactivos SuperScript™ III RT / Platinum™ Taq (Retrotranscripción y PCR de un solo paso)

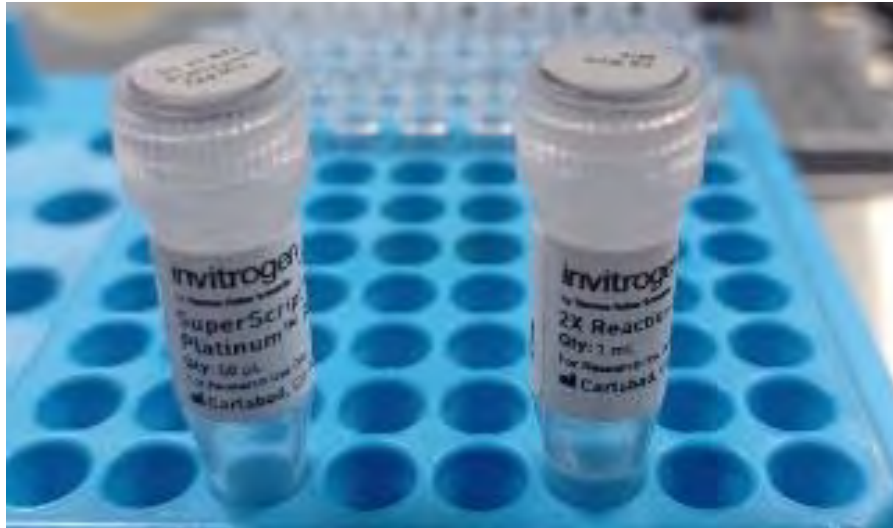


Figura 20

Geles puestos en cámara electroforética listos para la electroforesis

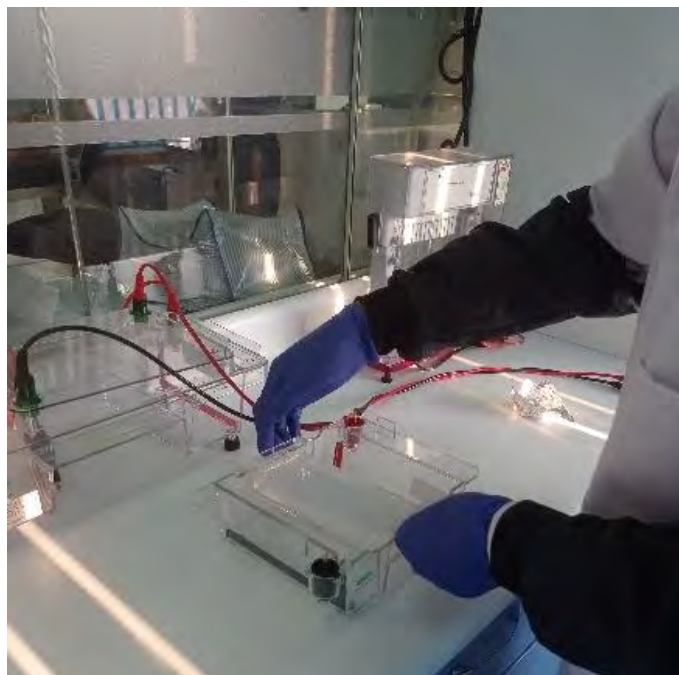


Figura 21

Visualización de geles en el transiluminador



Figura 22

Área de PCR en el laboratorio de Genética y Genética molecular C-321

