ANEXO 1

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

1. Título del proyecto

Análisis genómico de la *Escherichia coli* de crías de alpacas con procesos diarreicos

2. Área de Investigación

Área de investigación	Línea de Investigación	Disciplina OCDE
Biología Molecular	Ciencia y producción animal	Salud Animal

3. Duración del proyecto (meses)

12 meses

4. Tipo de proyecto

Individual	○
Multidisciplinario	X
Director de tesis pregrado	○

4. Datos de los integrantes del proyecto

Apellidos y Nombres	ZAPATA COACALLA CELSO
Escuela Profesional	MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
Celular	984295354
Correo Electrónico	czapata@unap.edu.pe

Apellidos y Nombres	COILA AÑASCO PEDRO UBALDO
Escuela Profesional	MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
Celular	951965410
Correo Electrónico	pcoila@unap.edu.pe

Apellidos y Nombres	HAÑARI QUISPE RENAN DILTON
Escuela Profesional	MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
Celular	979444400
Correo Electrónico	rhanari@unap.edu.pe

Apellidos y Nombres	OROS BUTRON OSCAR
Escuela Profesional	MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
Celular	951679484
Correo Electrónico	odoros@unap.edu.pe

Apellidos y Nombres	ZANABRIA HUISA VICTOR MELITON
Escuela Profesional	MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
Celular	951650808
Correo Electrónico	vzanabria@unap.edu.pe

I. Título

Análisis genómico de la *Escherichia coli* de crías de alpacas con procesos diarreicos

II. Resumen del Proyecto de Tesis

Las diarreas neonatales, de alpacas causantes de muertes y pérdidas económicas para los alpaqueros, han sido poco abordadas. Por otra parte, se sabe que la bacteria *Escherichia coli* está implicada en enfermedades que van desde infecciones entéricas hasta septicemias, y que se explican por la presencia de un diversidad de genes virulentos que poseen. En ese marco, el presente estudio tiene el objetivo de caracterizar convencional y molecularmente la *E. coli* involucrada en el proceso diarreico de crías de alpacas mediante el secuenciamiento completo de su genoma, lo que permitirá realizar un análisis filogenético e identificar los genes implicados en su virulencia. Para ello, se tomarán muestras fecales de dos crías de alpacas con procesos diarreicos las cuales se sembrarán en agar MacConkey y resembradas para su purificación en agar EMB. Se realizarán la caracterización morfológicas de las colonias y las pruebas bioquímicas confirmatorias (prueba cromogénica TBX y la prueba con citrato de Simmons); para finalmente identificar mediante la prueba API 20E. De la cepa identificada se extraerá ADN utilizando el Kit innuPREP Bacteria DNA de Life Science & Assay Analytik Jena, el ADN extraído se cuantificará con Nanodrop de Thermo Fisher Científic. Las muestras de ADN purificado, serán remitidas para su secuenciamiento a la empresa Novogene, con sede en Hong Kong, que utiliza la plataforma de ILLUMINA Hiseq. Para el análisis filogenético se utilizarán el software Excoffier, L. y HEL Lischer Arlequin suite ver 3.5; y, para caracterizar los genes implicados en los factores de virulencia, los contigs serán procesados por el software VirulenceFinder Versión 2.0.3 de https://cge.food.dtu.dk/services/VirulenceFinder/ con una similitud del 98%. Los resultados, contribuirán en el conocimiento génico y molecular enteropatogénico de la *E. coli*.

III. Palabras clave (Keywords)

Diarrea, crías, alpaca, *E. coli*, genoma, virulencia

IV. Justificación del proyecto

La crianza de alpacas, es una de las actividades más importantes del poblador altoandino. Su población en el Perú se estima en 3'685,500 alpacas, siendo el departamento de Puno donde se concentra la mayor parte (INEI, 2012). El rol en la seguridad alimentaria es proporcionar carne de gran valor nutritivo; además, produce fibra que es fuente de ingresos económicos. Se estima que el 90% de las alpacas se encuentra en manos de pequeños productores de subsistencia, caracterizadas por un pobre rendimiento productivo, con reducidas tasas de fertilidad y elevadas pérdidas neonatales que desgraciadamente no pueden ser analizadas por carencia de registros productivos y sanitarios (Rosadio et al, 2012).

Uno de los problemas que se tiene en la crianza de alpacas son las elevadas tasas de mortalidad por causas infecciosas, principalmente en las crías de las alpacas (Ameghino, 1991) Muchos estudios se encaminaron a elucidar las causas de mortalidad de las crías, identificar los agentes causales, describir signos clínicos y alteraciones patológicas, así como recomendar posibles tratamientos y medidas de control (Rosadio et al, 2012). Actualmente, una nueva generación de investigadores, utilizando tecnología moleculares modernas, se propone intenta identificar los posibles factores de virulencia responsables de los procesos entéricos causantes de las mayores pérdidas económicas de los neonatos en los primeros meses de edad, entre los cuales se ubica el presente estudio.

Las diarreas neonatales, causantes de muertes y reportadas como colibacilosis o enteritis (Ameghino y DeMartini, 1991), han sido pocos estudiadas en el Perú. La poca información existente evidencia la presencia de numerosos agentes e incluyen al *C. perfringens, Eimeria*

spp, Cryptosporidium spp y Escherichia coli como potenciales patógenos productores de alteraciones entéricas (Ramírez et al., 1985; Rosadio y Ameghino, 1994; Palacios et al., 2006). Por otra parte, es conocido que en la mayoría de animales, incluido el hombre, *la E. coli* es la causa de una variedad de enfermedades que van desde infecciones entéricas restringidas hasta septicemias, y que se explican por la presencia de un diversidad de genes virulentos.

En ese contexto, el presente estudio tiene el objetivo de caracterizar una de las cepas de *E. coli* involucradas en el proceso diarreico mediante técnicas convencionales y moleculares (secuenciamiento de su genoma completo) que permita realizar un análisis filogenético e identificar los genes implicados en los factores de virulencia.

Los resultados, contribuirán en el conocimiento enteropatogénico de la *E. coli* involucrado en los procesos diarreicos de las crías de alpacas, el cual a su vez contribuirá en el adecuado manejo y tratamiento de la enfermedad.

V. Antecedentes del proyecto

5.1. La *Escherichia coli*

La *Escherichia coli* forma parte del microbiota intestinal de la mayoría de las especies animales y es uno de los organismos modelo más explorados para la investigación de la evolución y adaptación bacteriana en diferentes condiciones de crecimiento. Este microorganismo puede desarrollarse en diferentes nichos, pudiendo encontrase en los hospederos vivos, el medio ambiente y los alimentos, por lo que también se le considera un indicador de contaminación fecal y, por ende, de prácticas deficientes de higiene (Corzo-Ariyama et al., 2019).

La *E. coli* es una causa importante de infecciones adquiridas en los animales y es uno de los organismos más comunes asociados con la infección del sistema digestivo. La E. coli es la bacteria patógena que se aísla con mayor frecuencia del sistema digestivo, reproductor urogenital y se asocia con la endotoxina lipopolisacárido (LPS), que libera. coli (Williams et al., 2008).

Es una de las especies bacterianas más versátiles, ya que además de las cepas comensales, presenta cepas específicas que tienen el potencial de causar numerosas patologías intestinales y extraintestinales (Alteri y Mobley, 2012).

La gran versatilidad de E. coli se explica en su alto potencial de recombinación lo que resulta, además, en una enorme variabilidad genética, por lo que su tipificación es crucial en la comprensión de su capacidad de causar enfermedades (Tenaillon et al., 2010). La tipificación molecular de *E. coli* puede ser realizada mediante metodologías como la electroforesis de enzimas multilocus (multilocus enzyme electrophoresis, MLEE), tipificación multilocus de secuencias (Multilocus sequence typing, MLST), por reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction, PCR) y por la secuenciación del genoma (Clermont et al., 2015).

5.2. Genoma de *E. coli*

El genoma completo de *E. coli* (*E. coli* K12) se publicó por primera vez en septiembre de 1997. Desde entonces, se han secuenciado y registrado en las bases de datos públicas varios miles de genomas de E. coli de orígenes muy variados. Teniendo en cuenta estos datos se calcula que el tamaño del genoma completo de esta especie varía ampliamente entre 4,6 y 5,9 Mpb, y contiene de 4200 a 5500 genes (Robins-Browne et al, 2016).

El genoma de *E. coli* está compuesto por 4,639,221 pares de bases y hasta el momento se sabe que codifica para 4288 proteínas, de las cuales el 38% no se les ha podido asignar una función clara o bien, son pseudo genes que potencialmente podrían tener una función en una condición determinada (Aguillón et al, 2021).

El estudio de la dinámica de los genomas en relación con la patogenicidad es uno de los

temas centrales en genómica funcional y el estudio de cepas y especies del género *Escherichia*, sin embargo, poca atención se ha puesto a elementos genómicos como son los genes de función desconocida, principalmente por la ausencia de evidencia experimental que sugiera cuál puede ser su papel fisiológico. Muchas de las proteínas que hasta el momento han sido caracterizadas extensamente son proteínas involucradas en procesos metabólicos, de transporte, señalización y regulación, pero es mucho más complicado rastrear la función molecular de proteínas de función desconocida, especialmente si las mutantes de estas no presentan un fenotipo evidente bajo condiciones experimentales del laboratorio (Yamamoto et al., 2009).

Se ha demostrado que las cepas de E. coli pueden dividirse en cuatro grupos filogenéticos principales: A, B1, B2 y D. Esta tipificación, además, se relaciona con el carácter virulento de las cepas de *E. coli*, pues las cepas virulentas extraintestinales (ExPEC) pertenecen principalmente al filogrupo B2 y, en menor medida, al grupo D; y, por otro lado, están las cepas que pertenecen a los grupos B1 y A, descritas normalmente como cepas comensales (Bok et al., 2020).

Durante su co-evolución con los animales, la E. coli ha desarrollado una gran capacidad para generar combinaciones de genes de virulencia aumentando su capacidad para colonizar diferentes hábitats de la anatomía animal. Actualmente se acepta que existen variedades patogénicas de *E. coli*. Algunos están asociados a infecciones diarreogénicas y otros que ejercen su patogenicidad de modo extra-intestinal. Es así que se reconocen diversos patotipos diarreogénicos y unos pocos extra-intestinales (Bielaszewska et al, 2007).

El advenimiento tecnológico en la secuenciación del genoma completo ha revolucionado la microbiología clínica y la investigación de la genómica poblacional de la evolución de patógenos. Sin embargo, sigue siendo un desafío debido a la incertidumbre con respecto al potencial de transmisión de unos pocos clones epidémicos distribuidos globalmente frente a un conjunto diverso de linajes que causan enfermedades y los genes que contribuyen a la virulencia (Levy et al., 2022).

5.3. Antecedentes

La diarrea es una causa importante de morbilidad en llamas y alpacas neonatales. La diarrea puede tener una etiología multifactorial, incluido el manejo y factores nutricionales, así como una variedad de patógenos. La mayoría de los patógenos involucrados afectan a otras especies y algunos tienen cepas adaptadas al huésped. Sin embargo, los signos clínicos, la gravedad esperada y la edad de aparición de la enfermedad varían entre especies en algunos casos. Los patógenos más comunes que causan diarrea en camélidos neonatales son coronavirus, E. coli, *Cryptosporidium spp*., *Giardia spp*. y coccidios (Whitehead & Anderson, 2006).

Se estudio la etiología de las enteropatías en 50 crías de alpaca, encontrándose que el 80 % presentaba *Eimeria spp*., 40% coronavirus, 34% *E. coli*., 32 % rotavirus con *clostridium* y 20% con *Criptosporidium sp*., a su vez también indica que 20 crías presentaron una sola infección y el 60% de las muestras presentaron coinfecciones de hasta cuatro patógenos (Rojas et al, 2016).

En su estudio de enteropatógenos con cuadros mortales de diarrea en crías de alpaca, se encuentra que el 80% está relacionado a *E. coli* y el 18.3 % relacionado con *Salmonela sp.* entre otros patógenos (Lucas et al, 2016).

Las diarreas en crías de alpacas son multifactoriales, generalmente a crías de 7 días de nacido su diarrea es causada por bacterias gram negativas, en especial las que no tomaron calostro adecuadamente (Whitehead & Anderson, 2006).

Con el objetivo de determinar grupos filogenéticos de *Escherichia coli* obtenidos de alpacas con diarrea, se determinó la presencia de *E. coli* en 150 muestras de heces diarreicas recolectadas de crías de alpaca de la sierra central del Perú, y se determinó la distribución de los grupos filogenéticos mediante el método de Clermont. *E. coli* estuvo presente en el

79.3% (119/150) de los animales con diarrea, pudiendo clasificarse en los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D, los cuales mostraron una frecuencia de 13.5% (16/119), 65.5% (78/119), 1.68% (2/119) y 19.33% (23/119), respectivamente. El 21% (25/119) de cepas aisladas de *E. coli* pertenecen a los grupos filogenéticos B2 y D, principalmente cepas patógenas extraintestinales, y el 79% (94/119) a los grupos B1 y A, que son principalmente cepas comensales (Sicha et al, 2020).

Se estudio la diarrea neonatal en terneros lecheros, identificándose en la microbiota fecal a los filos *Firmicutes* y *Proteobacteria* como los más predominantes, a nivel de géneros sobresalen la *Escherichia* y Bacteroides, sin embargo a medida que los terneros crecen la microbiota cambia (Chang et al, 2020).

Se estudió la relación de rotavirus en diarreas de terneros y la microbiota intestinal y se describe que los géneros Lactobacillus , Subdoligranulum , Blautia y Bacteroides son representativos en animales sanos y los géneros Escherichia y Clostridium se relacionan con animales infectados con rotavirus por lo que concluye que la presencia del rotavirus altera la microbiota intestinal (Jang et al, 2019).

La *E. coli* es capaz de producir diferentes infecciones en humanos. Se desconoce su patogenicidad en el tracto genital femenino. Objetivo: Determinar la presencia de genes de virulencia (VG) en cepas de *E. coli* aisladas del tracto genital femenino. Material y Métodos: Se caracterizaron genéticamente 146 cepas de *E. coli* aisladas como cultivos monomicrobianos de infecciones vaginales mediante la búsqueda de VG hly, iucC, afa, fimH, neuC, sfa/foc, cnF1, papC, usp e ibeA. Los estudios se realizaron mediante PFGE y PCR. Resultados: El análisis genético de las cepas mostró dos grupos con una similitud de aproximadamente el 80%. La similitud genética intragrupo fue de aproximadamente 95%. Los resultados mostraron cepas con un alto número de VG y las más comunes fueron cnf1 y fimH. No se detectó el gen afa. Se identificaron ocho combinaciones de VG y la más común fue papC+ hly+ iucC+ afa- neuC- fimH+ sfa/foc+ cnf1+ usp+ ibeA-. Discusión: Las cepas estudiadas se concentran en dos grupos genéticos. La mayoría de las cepas contienen un gran número de VG presentes en *E. coli* aisladas de infecciones extraintestinales. Conclusión: Es importante desarrollar nuevas estrategias de investigación en esta área, para profundizar en el conocimiento filogenético de estas cepas y confirmar su verdadero papel en la infección vaginal (Lobos et al, 2013).

VI. Hipótesis del trabajo

La *E. coli* que participa en los proceso diarreicos en crías de alpacas es diferente al de otras especies y contiene distintos genes implicados en su virulencia.

VII. Objetivo general

Analizar el Genoma completo de la *Escherichia coli* procedente de crías de Alpacas con Procesos Diarreicos

VIII. Objetivos específicos

1. Caracterizar la cepa de *E. coli* mediante técnicas microbiológicas convencionales
2. Realizar el análisis filogenético de la cepa de *E. coli*
3. Caracterizar los genes implicados en los factores de virulencia de la cepa de *E. coli*

IX. Metodología de investigación

9.1. Población

Para el estudio se utilizarán las crías nacidas en la campaña de parición 2022 del C.E. La Raya, los cuales provienen de la campaña de empadre del año 2021.

9.2. Animales

De la población de crías nacidas, se seleccionarán, según criterio, dos animales tomando

en consideración los siguientes criterios:

1ro. Crías nacidas desde el 1 de febrero a 30 de marzo

2do. Crías con procesos diarreicos.

3ro. Las muestras se tomarán una vez que se produzca el brote de diarrea tomando en cuenta la fecha de nacimiento.

9.3. Métodos

Objetivo específico 1: Caracterizar la cepa de *Escherichia coli* mediante técnicas microbiológicas convencionales

- **Colección de muestras**

Las muestras serán tomadas directamente de la ampolla rectal utilizando hisopos estériles. Los hisopos serán conservados en tubos conteniendo medios de transporte bacteriano Stuard a 4ºC hasta su procesamiento en laboratorio.

- **Aislamiento y purificación de *E. coli***

El aislamiento de las cepas de *E. coli* se realizarán de manera convencional. Las muestras se sembrarán directamente en agar MacConkey a 37ºC por 24 horas para la multiplicación y separación de los microorganismos presentes.

Después del desarrollo bacteriano en agar MacConkey, se procederá a la resiembra en agar EMB, el cual se incubará por 24 horas a una temperatura de 37°C para el desarrollo de las bacterias correspondientes.

- **Caracterización fenotípica**

La determinación presuntiva del aislamiento de *E. coli* se realizará seleccionando las colonias que presenten las siguientes características en el agar EMB: Colonias grandes, color negro azulado y brillo verde metálico.

- **Pruebas bioquímicas**

- **Prueba de confirmación cromogénica TBX**

Para confirmar que las colonias aisladas en el agar EMB sean E. coli se utilizará el medio Triptona Bilis X-Glucoronida – TBX. El medio TBX contiene un agente cromogénico, X-glucoronida, el cual detecta la actividad de la glucoronidasa. La presencia de glucoronidasa diferencia la mayoría de cepas E. coli de otros coliformes.

- **Prueba de confirmación bioquímica con Citrato de Simmons**

Después de realizar la prueba de confirmación cromogénica con TBX, se elegirá la cepa con actividad positiva de la enzima glucoronidasa al azar. Esta prueba se utilizará para la diferenciación de enterobacterias en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía. Para ellos se prepararán tubos con agar citrato de Simmons en posición inclinada y se incubará a 37ºC por 24 h.

- **Identificación Bioquímica mediante API 20E**

A partir del cepario obtenido en las etapas previas, se preparará un cultivo joven en agar nutritivo de 18 horas, el cual sirve para inocular los pocillos de la galería API20E. Para ello, se tomará una colonia bien aislada de la bacteria y se resuspenderá en 5 Ml de solución salina (1% de NaCl) estéril. Luego, se realizará la siembra en la galería API 20E. La galería API 20E se caracteriza porque contiene pocillos y cada pocillo tiene un tubo y una cúpula; se llenará con la suspensión de bacterias los tubos, no la cúpula, de todos los pocillos. Solo se llenarán las cúpulas de los pocillos CIT, VP, GEL con la suspensión de bacterias.

Objetivo específico 2: Realizar el análisis filogenético de la cepa de *E. coli*

- **Extracción de ADN**

LA cepa aislada de *E. coli* de las crías de alpaca, se extraerá su ADN utilizando el Kit innuPREP Bacteria DNA Kit de Life Science Kits & Assay Analytik Jena siguiendo las instrucciones del fabricante, es un kit utilizado para la extracción de Adn bacteriano de cultivo en agar o en pellets, su procedimiento combina pasos de lisis con lisozima y digestión con proteinasa K, posterior a ello se utiliza el filtro spin, se realiza el lavado y por último el elution buffer.

- **Cuantificación de ADN**

La cuantificación del ADN extraído se realizará utilizado un espectrofotómetro Nanodrop de Thermo Fisher Scientific utilizando un micro volúmen de 1 a 2 microlitros de ADN con elution buffer, incluyendo las lecturas con longitudes de onda de A260/A280 y A260/A230 obteniendo resultados de cantidad y calidad del ADN extraído.

- **Secuenciamiento**

El secuenciamiento se realizará en la empresa Novogene con sede en Hong Kong utilizando plataforma de ILLUMINA Hiseq, en cada paso del proceso es necesario realizar un procedimiento de control de calidad, el proceso incluye amplificación de PCR, cuantificación de los productos de PCR y mixing, purificación de productos de PCR, preparación de librerías, secuenciamiento, los reactivos de secuenciamiento incluye el portafolio de Illumina DNAprep el genoma tendrá una profundidad de 100X.

- **Análisis filogenético**

para realizar el análisis filogenético primero se tiene los reads crudos en formato fastq.gz, los scallofds en formato fasta, la anotación GFF en formato .txt, archivos CDSs y el análisis filogenético se utilizará el software Excoffier, L. y HEL Arlequin suite ver 3.5.

Objetivo específico 3: Caracterizar los genes implicados en los factores de virulencia de la cepa de *E. coli*

Los contigs serán procesados por medio del software VirulenceFinder Versión 2.0.3 ubicado en https://cge.food.dtu.dk/services/VirulenceFinder/ con una similitud del 98%.

X. Referencias

Aguillón A., Duarte I., Tornero F., Cordero E., Vargas N., Padilla F., Franco B. (2021). Análisis filogenético y estructural de factores transcripcionales de *Escherichia coli* de función desconocida. Jóvenes en la Ciencia Vol. 10. ISSN 2395-9797.

Alteri C.J., Mobley H.L.T. (2012). *Escherichia coli* physiology and metabolism dictates adaptation to diverse host microenvironments. Curr Opin Microbiol 15: 3-9. doi: 10.1016/j.mib.2011.12.004

Ameghino E, DeMartini J. (1991). Mortalidad de crías de alpacas. Bol Div IVITA, Lima. p 71-80

Bielaszewska M., Dobrindt U., Gärtner J., Gallitz I., Hacker J., Karch H. (2007). Aspects of genome plasticity in pathogenic *Escherichia coli*. Int J Med Microbiol 97: 625-39.

Bok E, Ko¿añska A, MazurekPopczyk J, Wojciech M, BaldyChudzik K. (2020). Extended phylogeny and extraintestinal virulence potential of commensal *Escherichia coli* from piglets and sows. Int J Environ Res Public Health 17: 366. doi: 10.3390/ijerph17010366.

Chang, M. N., Wei, J. Y., Hao, L. Y., Ma, F. T., Li, H. Y., Zhao, S. G., & Sun, P. (2020). Effects of different types of zinc supplement on the growth, incidence of diarrhea, immune function,

and rectal microbiota of newborn dairy calves. Journal of Dairy Science, 103(7), 6100–6113. https://doi.org/10.3168/jds.2019-17610.

Clermont O, Gordon D, Denamur E. (2015). Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. Microbiology 161: 980-988. doi: 10.1099/mic.0.000063.

Corzo-Ariyama HA, García-Heredia A, Heredia N, García S, León J, Jaykus L, Solís-Soto L. (2019). Phylogroups, pathotypes, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates in farms and packing facilities of tomato, jalapeño pepper and cantaloupe from Northern Mexico. Int J Food Microbiol 290: 96-104. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.006

INEI. (2012). Instituto Nacional de Estadística e Informática. IV Censo Nacional Agropecuario (IV CENAGRO).

Jang, J. Y., Kim, S., Kwon, M. S., Lee, J., Yu, D. H., Song, R. H., Choi, H. J., & Park, J. (2019). Rotavirus-mediated alteration of gut microbiota and its correlation with physiological characteristics in neonatal calves. Journal of Microbiology, 57(2), 113–121. https://doi.org/10.1007/s12275-019-8549-1.

Levy, S., Hoque, M. N., Islam, M. S., Sobur, M. A., Ballah, F. M., Rahman, M. S., Rahman, M. B., Hassan, J., Khan, M. F. R., & Rahman, M. T. (2022). Genomic characteristics, virulence, and antimicrobial resistance in avian pathogenic Escherichia coli MTR_BAU02 strain isolated from layer farm in Bangladesh. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 30, 155–162. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.06.001.

Lobos O., Padilla A. y Padilla C. (2013). Análisis genético y propiedades virulentas de cepas de *Escherichia coli* aisladas desde infección vaginal. Rev Chilena Infectol 30 (4): 381-38.

Lucas, J., Morales, S., Barrios.M, Rodríguez, J., Vásquez, M., Lira, B., Torres, B., Casas, E., & Espinoza, J. (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), 159. https://doi.org/10.15381/rivep.v27i1.11465.

Palacios C, Perales R, Chavera A, López M, Braga W, Moro M. (2006). *Eimeria macusaniensis* and *Eimeria ivitaensis* co-infection in fatal cases of diarrhea in young alpacas (*Lama pacos*) in Peru. Vet Rec 158: 344-345.

Ramírez A, Huamán D, Ellis RP. (1985). Enterotoxemia de la alpaca. Programa colaborativo de apoyo a la investigación en rumiantes menores. Serie Reporte Técnico. Lima 63: 1-17

Robins-Browne, R.M., Holt, K.E., Ingle, D.J., Hocking, D.M., Yang, J., Tauschek, M. (2016). Are *Escherichia coli* pathotypes still relevant in the era of whole-genome sequencing? Front. Cell. Infect. Microbiol. 18, 141.

Rojas, M., Manchego, A., Rocha, C. B., Fornells, L. A., Silva, R. C., Mendes, G. S., Dias, H. G., Sandoval, N., Pezo, D., & Santos, N. (2016). 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.

Rosadio R, Ameghino E. (1994). Coccidial infections in neonatal Peruvian alpacas. Vet Rec 135: 459-460

Rosadio R., Maturrano L, Pérez D. y Luna L. (2012). El complejo entérico neonatal en alpacas andinas. Rev Inv Vet Perú 2012; 23 (3):261-271.

Sicha F., Morales-Caut S., Lucas J., Eslava C., Vásquez M., Barrios M., Rodríguez J., Lira B. (2020). Análisis filogenético de cepas de *Escherichia coli* aisladas de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) con diarrea en la sierra central del Perú. Rev Inv Vet Perú 31(2): e17826 http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17826.

Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 8: 207. doi: 10.1038/nrmicro2298.

Whitehead, C. E., & Anderson, D. E. (2006). Neonatal diarrhea in llamas and alpacas. Small Ruminant Research, 61(2-3 SPEC. ISS.), 207–215. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.012.

Williams, E. J., Herath, S., England, G. C. W., Dobson, H., Bryant, C. E., & Sheldon, I. M. (2008). Effect of Escherichia coli infection of the bovine uterus from the whole animal to the cell. Animal, 2(8), 1153–1157. https://doi.org/10.1017/S1751731108002413.

Yamamoto, K., Hirao, K., Oshima, T., Aiba, H., Utsumi, R., Ishihama, A. (2005) Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. J Biol Chem. 14;280(2):1448-56. doi: 10.1074/jbc.M410104200.

XI. Uso de los resultados y contribuciones del proyecto

Los resultados de la investigación científica sobre Análisis genómico de la cepa *E. coli* nos permitirá identificar los mecanismos de patogénesis de la *E. coli* en crías de alpacas y su posible influencia en los tejidos del sistema gastrointestinal.

XII. Impactos esperados

i. Impactos en Ciencia y Tecnología

El conocimiento técnico científico permitirá conocer las bases moleculares y los factores asociados a los procesos diarreicos en crías de alpacas, para un control y tratamiento adecuado.

ii. Impactos económicos

Este conocimiento repercutirá en un futuro disminuir el costo del tratamiento de las enfermedades infecciosas en la producción de camélidos sudamericanos domésticos.

iii. Impactos sociales

El análisis y conocimiento genómico de la E. coli involucrada en los procesos diarreicos de alpacas tendrá un impacto positivo en los productores alpaqueros, docentes y estudiantes. Asimismo, el artículo generado a partir de la presente investigación, repercutirá en la visibilidad de la UNA-Puno.

iv. Impactos ambientales

El estudio no tiene impacto negativo alguno en el medio ambiente.

XIII. Recursos necesarios

Materiales de campo
- Hisopos estériles
- Frasco con conservante Stuard
- Material de bioseguridad
- Bolsas de polietileno
- Cámara fotográfica
- Termo refrigerado

Materiales de laboratorio
- Medios de cultivo (agares)
- Asa de siembra
- Estufa a 37 ºC
- Kit de extracción de ADN
- Eppendorf de 1,5 ml estériles
- Pipetas y puntas desechables estériles

- Placa calefactora con capacidad de alcanzar 100ºC
- Centrífuga
- Nanodrop

Servicios
- Secuenciamiento genómico
- Análisis bioinformático

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

Centro Experimental "LA RAYA", ubicado en el distrito e Santa Rosa, provincia de Melgar, departamento de Puno, a una altitud de 4200 m.

XV. Cronograma de actividades

Actividad	Meses-2023											
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Elaboración del proyecto	■											
OE1. Caracterizar la cepa de *E. coli* mediante técnicas microbiológicas convencionales												
Obtención de muestras		■										
Cultivo y purificación de la cepa de *E. coli*		■	■									
Caracterización fenotípica o morfologica de la cepa *E. coli*		■	■	■								
Caracterización bioquímica de la cepa *E. coli*				■								
OE2. Realizar el análisis filogenético de la cepa de *E. coli*												
Extracción y purificación de ADN				■								
Secuenciamiento del genoma					■	■	■	■				
Alineamiento del genoma completo de *E. coli*							■	■				
Análisis filogenético de la cepa *E. coli*								■	■			
OE3. Caracterizar los genes implicados en los factores de virulencia de la cepa de *E. coli*												
Análisis bioinformático para identificación de genes implicados en los factores de virulencia								■	■	■		
Redacción del articulo científico									■	■	■	
Presentación del artículo a la revista indizada											■	■

XVI. Presupuesto

Descripción	Unidad de medida	Costo Unitario (S/.)	Cantidad	Costo total (S/.)
OE1.				
Material para toma de muestra	Unidad	100.00	1	100.00
Viáticos	Unidad	100.00	5	500.00
Medios de cultivo	Unidad	300.00	2	600.00
Pruebas bioquímicas	Unidad	100.00	6	600.00
OE2.				
Kit de extracción de ADN bacteriano	Unidad	1300.00	1	1300.00
Servicio de secuenciamiento genómico	Unidad	2400	2	4800.00
OE3.				
Alquiler de servidor	Meses	160.00	3	480.00
		Total	**S/.**	**8380.00**