



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA



**CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA VAGINAL DE LA
LLAMA (*Lama glama*) MEDIANTE EL ANÁLISIS DEL GEN 16S**

TESIS

PRESENTADA POR:

ALAN ALEX HUARILLOCLLA TICONA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2024



ALAN ALEX HUARILLOCLA TICONA

CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA VAGINAL DE LA LLAMA (*Lama glama*) MEDIANTE EL ANÁLISIS DEL GEN 16S

My Files

My Files

Universidad Nacional del Altiplano

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::8254:411793159

Fecha de entrega

2 dic 2024, 1:20 p.m. GMT-5

Fecha de descarga

3 dic 2024, 12:14 p.m. GMT-5

Nombre de archivo

Borrador de Tesis_correcciones-20-11-2024-ALAN_RH (1) (1).docx

Tamaño de archivo

9.5 MB

65 Páginas

11,215 Palabras

63,179 Caracteres



4% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Texto citado
- ▶ Texto mencionado
- ▶ Coincidencias menores (menos de 20 palabras)

Fuentes principales

- 3% Fuentes de Internet
- 0% Publicaciones
- 1% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.



UNA
PUNO

Firmado digitalmente por
RODRIGUEZ HUANCA Francisco
Halley FAU 20145496170 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 03.12.2024 15:32:05 -05:00

Universidad
Nacional
del Altiplano



Firmado digitalmente por RUELAS
CALLOAPÁZA Domingo Alberto FAU
20145496170 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 03.12.2024 13:28:05 -05:00





DEDICATORIA

Agradezco a mi hermano Lic. Ray Donick Huarilloclla Ticona que está en el cielo, especialmente en este momento de culminación de mi tesis, tu amor y motivación fueron mi apoyo y mi mayor fortaleza, la perseverancia y la lealtad siempre será nuestro lema gracias por las buenas lecciones, y por a ver confiado siempre en mí, nuestros proyectos y nuestros planes están en pie y uno de ellos es este trabajo de investigación, el comando nunca muere.

A mi madre Vicentina Ticona que fue el motor y motivo de mi vida que desde un principio me tuvo fé, confiando siempre en mi capacidad, ante ello culmino este trabajo de investigación de manera satisfactoria, quedo profundamente agradecido por la gran persona que formo para la sociedad.

A mis hermanas por ser tan especiales por cuidarme siempre y por darme esta única etapa maravillosa que fue de mucha valentía, esfuerzo y dedicación.

A mis sobrinos para que siempre me tengan de ejemplo y que sigan haciendo ciencia e investigación por que es la única forma de salvar al país.

A mi tierra de pantomimos y turcos que me permitió ser un gran hombre de bien.

Alan Alex Huarilloclla Ticona



AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que contribuyeron de alguna manera en la realización de esta tesis.

A la Universidad Nacional del Altiplano, por a verme permitido formarme en ella y brindarme las oportunidades y abrirme las puertas de su seno científico para poder estudiar mi carrera.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, a la escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, bastión de excelencia académica, a mis docentes que me compartieron sus conocimientos y brindarme su apoyo durante mi formación profesional

Agradezco a mis jurados de tesis por su guía constante que contribuyeron su experiencia y comprensión en este gratificante camino de la investigación.

Agradezco a mi director de tesis Mg. Francisco Halley Rodríguez Huanca por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como también haberme guiado durante el desarrollo de mi tesis.

Mi sincero y profundo agradecimiento al Dr. Celso Zapata por el apoyo incondicional en este trabajo de investigación.

Alan Alex Huarilloclla Ticona



ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
ACRÓNIMOS	
RESUMEN	13
ABSTRACT.....	14
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	
1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	16
1.1.1. Objetivo general.....	16
1.1.2. Objetivos específicos	16
CAPÍTULO II	
REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	17
2.1.1. Antecedentes internacionales.....	17
2.1.2. Antecedentes nacionales	21
2.1.3. Antecedentes locales.....	22
2.2. MARCO TEÓRICO	22
2.2.1. La llama (<i>Lama glama</i>).....	22
2.2.2. Sistema reproductivo de la hembra de la Llama (<i>Lama glama</i>).....	24



2.2.3. Microbiota de la vagina de la Llama (<i>Lama glama</i>).....	27
2.2.4. El análisis metagenómico para microbiotas.....	30
2.2.5. Principios del análisis metagenómico.....	31
2.2.6. Metodologías en análisis metagenómico	32
2.2.7. Importancia y aplicaciones	34
2.3. MARCO CONCEPTUAL	34

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. AMBITO DEL ESTUDIO	37
3.2. DISEÑO DE ESTUDIO.....	37
3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA DEL ESTUDIO	37
3.3.1. Población	37
3.3.2. Tamaño de la Muestra.....	38
3.4. METODOLOGIA	38
3.4.1. Diagnóstico de preñez.....	38
3.4.2. Hisopado vaginal de la llama.....	38
3.4.3. Procedimiento de la Extracción de ADN.....	39
3.4.4. Revelado de ADN por electroforesis para evaluar la integridad	40
3.4.5. Cuantificación del ADN	40
3.4.6. Proceso de secuenciamiento	40
3.4.7. Análisis bioinformático de datos	41

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Identificación de la microbiota vaginal en llamas hembra (vacías) de dos años.....	42
--	-----------



4.2. Identificación de la microbiota vaginal en llamas (preñadas) de dos años..	46
V. CONCLUSIONES.....	50
VI. RECOMENDACIONES	51
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	52
ANEXOS.....	58

ÁREA: Salud animal

TEMA: Sistema reproductivo de la llama hembra.

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 16 DE DICIEMBRE DEL 2024



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Microbiota vaginal de mayor abundancia en llamas hembras vacías de dos años	43
Tabla 2 Microbiota vaginal de mayor abundancia en llamas hembras preñadas de dos años.	48



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	Composición taxonómica para el grupo de llamas vacías de dos años 42
Figura 4	Composición taxonómica para el grupo de llamas preñadas de dos años.. 47



ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. Microbiota vaginal en llamas En hembras de dos años.....	58
ANEXO 2. Revelado del ADN	62
ANEXO 3. Informe de resultados de análisis metagenómico.....	63
ANEXO 4. Declaración jurada de autenticidad de tesis.	64
ANEXO 5. Autorización para el depósito de tesis o trabajo de investigación en el Repositorio institucional.....	65



ACRÓNIMOS

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico.
ARN:	Ácido Ribonucleico.
CS:	Camélidos Sudamericanos.
UNAP:	Universidad Nacional del Altiplano Puno.
ARNr:	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNm:	ARN mensajero
CIP:	Centro de Investigación y Producción
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
ARNt:	ARN de transferencia



RESUMEN

Con el fin de determinar la variedad de microorganismos vaginales poco estudiados en la llama se planteó el siguiente objetivo: Caracterizar la microbiota vaginal de la llama (*Lama glama*) mediante el análisis del gen 16S. En la metodología se realizó el análisis metagenómico, se inició con la toma de muestras mediante el hisopado vaginal en llamas del Centro Experimental la Raya, seleccionando cinco animales por grupo (vacías y preñadas) de dos años de edad, se realizó la extracción del ADN bacteriano utilizando un kit comercial Genomic DNA from tissue (marca: Macherey-Nagel, Lote: 2208-004), se realizó el secuenciamiento mediante el kit 16 S Barcoding KIT 24V14 (SQK-16S114.24) siguiendo las instrucciones y para el análisis bioinformático se utilizó el software libre epi2melabs/wf-16S (v1.3.0) desarrollado por Metrichor Ltd., filial de Oxford Nanopore Technologies, en cuyo flujo de trabajo incluye uso de pysam 0.21.0, pandas 2.0.3, fastcat 0.15.1, minimap2 2.26-r1175, samtools 1.18, taxonkit v0.15.1, kraken 2.1.3. Los resultados indican que la microbiota vaginal en las llamas vacías se halló 91 géneros de bacterias, las de mayor abundancia fueron *Pseudomonas* con 43.06%, *Bacteroides* con 18.80%, *Stenotrophomonas* con 4.68%, *Mycoplasmopsis* con 3.65%, el componente no clasificado fue de 11.43% de las lecturas. Y en las llamas preñadas, se halló 72 géneros de bacterias, las de mayor abundancia fueron *Shigella* con 19.47%, seguido de *Escherichia* con 18.71%, *Mycoplasmopsis* con 12.78%, *Prolinoborus* con 11.19%, el componente no clasificado fue de 11.81% de las lecturas. Se concluye que la abundancia bacteriana de la microbiota vaginal presenta diferencias entre llamas vacías y preñadas, sin embargo, la composición presenta variaciones mínimas.

Palabras clave: Bacterias, Camélidos, Microbiota vaginal, Microorganismos.



ABSTRACT

In order to determine the variety of vaginal microorganisms little studied in the llama, the following objective was raised: Characterize the vaginal microbiota of the llama (*Lama Glama*) by analysis of the 16S gene. In the methodology, the metagenomic analysis was performed, the samples began through the vaginal swab in the llamas of the La Raya Experimental Center, selecting five animals per group (empty and pregnant) of two years of age, the extraction of the DNA was performed Bacterial using a Genomic DNA From Tissue (brand: Machey-Nagel, lot: 2208-004) commercial commercial kit, sequencing was performed using Kit 16 S Barcoding Kit 24v14 (SQK-16s114.24) following the instructions and for bioinformatic analysis Free Software Epi2melabs/WF-16s (V1.3.0) developed by Metrichor Ltd., Oxford Nanopore Technologies, in whose workflow includes use of Pysam 0.21.0, Pandas 2.0.3, Fastcat 0.15.1, in which MINIMAP2 2.26-R1175, SAMTOOLS 1.18, TAXONKIT V0.15.1, KRAKEN 2.1.3. The results indicate that the vaginal microbiota in the empty llamas was found 91 genera of bacteria, the most abundance were *pseudomonas* with 43.06%, *bacteroids* with 18.80%, *Stenotrophomonas* with 4.68%, *mycoplasmopsis* with 3.65%, the un classified component was 11.43 % of the readings. And in the pregnant llamas, 72 genera of bacteria were found, the ones with the greatest abundance were *Shigella* with 19.47%, followed by *Escherichia* with 18.71%, *Mycoplasmopsis* with 12.78%, *prolinoborus* with 11.19%, the un classified component was 11.81% of the Readings It is concluded that the bacterial abundance of the vaginal microbiota has differences between empty and pregnant llamas, however, the composition presents minimal variations.

Keywords: Bacteria, Camelids, Vaginal microbiota, Microorganisms.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La llama (*Lama glama*) es una especie de camélidos sudamericanos (Morán et al., 2010). La población de llamas en el Perú es de 1 462 730 animales, de los cuales el 35 % pertenece a la región de Puno (J. Quispe et al., 2015). Las llamas se alimentan sobre todo de forrajes fibrosos de baja calidad (Ceron et al., 2013). La introducción y crianza de camélidos aumentó en diversos países y zonas altoandinas (Mulsow, 2008).

En las llamas generalmente existe una baja tasa de casos patológicos a nivel de su tracto reproductivo, todos estos cambios producen disbiosis del microbiota del tracto reproductivo de la llama hembra. La microbiota vaginal, está formado por una gran cantidad de microorganismos, cuya presencia está asociada al mantenimiento de un ecosistema vaginal dinámico que previene la colonización y la infección de patógenos oportunistas, este ecosistema vaginal puede verse alterado por diversos factores (Mora, 2019).

Existen algunos trabajos que han tratado de describir la presencia de microorganismos tanto benéficos como patógenos del tracto reproductivo de la hembra, utilizando técnicas convencionales de la microbiología (Valenzuela et al., 2015) pero a veces estas metodologías no detectan la totalidad de agentes por los medios específicos que requieren para que estos agentes desarrollen, por lo mismo, es que se tiene reportes que han demostrado que el gen 16S es de gran utilidad para describir y caracterizar las comunidades microbianas de los organismos denominados no cultivables (Martinez, 2020), se estima que sólo el 50% de las bacterias son cultivables, y que entre 10 a 20% de los aislados son organismos nuevos para la ciencia (Rodicio et al., 2004).



La comparación de las secuencias de los 16S permite establecer las relaciones filogenéticas y es importante en la taxonomía bacteriana, permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias (Rodicio et al., 2004), permitiendo conocer la verdadera identidad del género y la especie (Suarez, 2020). Pero en camélidos y especialmente en llamas no se cuenta con información sobre esta variabilidad de microorganismos presentes en la mucosa vaginal de acuerdo a la clase reproductiva, siendo de mucha importancia tener conocimiento de este aspecto para así plantear futuras estrategias de manejo en el periodo productivo y reproductivo.

Por lo antes mencionado el trabajo pretende describir la microbiota vaginal de las llamas hembra vacías y preñadas de dos años de edad, utilizando el secuenciamiento masivo del gen 16S, que nos permitirá conocer la diversidad y abundancia bacteriana, en la mucosa vaginal, con un alcance del género bacteriano.

1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.1.1. Objetivo general

- Caracterizar la microbiota vaginal de la llama (*Lama glama*) mediante el análisis del gen 16S.

1.1.2. Objetivos específicos

- Identificar la microbiota vaginal en llamas vacías de dos años.
- Identificar la microbiota vaginal en llamas preñadas de dos años.



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1. Antecedentes internacionales

Dellepiane y Morales, (2018), realizó un estudio sobre la identificación de bacterias en alpacas, donde se identificaron bacterias con mayor frecuencia: *Escherichia coli* (24.9%), *Providencia stuartii* (16.5%), *Shigella sp.* (16.5%), *Hafnia alvei* (5.9%), *Serratia rubidae* (5.9%) y levaduras (14.8%).

Jimenes (2020), reporta que se tomaron 32 muestras de vagina en camélidos hembras no preñadas, y 43 en hembras preñadas, donde se aisló a *Escherichia coli* (8,1%); *Staphylococcus aureus* (8,1%), *Acinetobacter spp.* (2,4%) y una especie de *Haemophilus spp.* (3,2%) como patógenas y se aislaron *Enterobacter aerogenes* (4,0%) y *Micrococcus spp.* (6,5%) como no patógenas.

Pacheco (2014), identificó especies de bacterias como *Escherichia coli*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus β-hemolíticos*, *Enterococcus*, *Staphylococcus coagulasa* negativo, *Proteus spp.*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y *Arcanobacter pyogenes* mediante un frotis vaginal en alpacas gestantes.

Mshelia et al. (2014), en el noreste de Nigeria, realizaron investigaciones donde aislaron bacterias vaginales en camellos y vacas, encontrando *Escherichia coli* en (73%), *Estreptococcus pyogenes* en (18%) en camellos y *Staphylococcus aureus* en (11%) en las vacas.



Tibary (2001), indica que los microorganismos microbiológicos en las llamas son muy difíciles de identificar dada la amplia gama de bacterias que se pueden aislar, como *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.* *Escherichia coli*; Algunos de estos gérmenes son parte de la flora vaginal normal mientras que otros son oportunistas y pueden volverse patógenos si se dan las condiciones adecuadas.

Espinoza (2018), menciona que los *Lactobacillus sp.*, son considerados como flora bacteriana normal de la vagina, que genera un beneficio, debido a la producción de ácido láctico que reduce el pH, contribuyendo a la disminución y retraso del crecimiento de otro tipo de flora potencialmente patógena.

Chekole, (2021), realizó un estudio en camellos donde identifico ocho especies diferentes de bacterias de los órganos reproductores muestreados: 29 (58%) del útero, 7 (14%) del cuello uterino, 7 (14%) de la vagina, y 3 (6%) del ovario, del total de bacterias aisladas, coagulasa negativas fueron *Staphylococcus* 25 (50 %), *Staphylococcus aureus* 18 (36 %), *Escherichia coli* 12 (24 %), especies de *Streptococcus* 11 (22 %), especies de *Salmonella* 6 (12 %), especies de *Proteus* 8 (16 %), *Shigella* y la especie 1 de *Klebsiella* (2%).

Fernandez et al. (2006), Refiere que el microbiota residente, está compuesta de gérmenes fijos, los cuales se encuentran en un sitio dado a una edad dada; si se trastorna, se restablece espontáneamente con rapidez y el microbiota transitorio está formada por miembros no patógeno, dentro de ellas se menciona a *Escherichia coli*, *A. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *P. multocida* y varias especies anaerobias como *Clostridium sp.*, *Bacteroides sp.* y *Fusobacterium sp.*



Appiah et al. (2020), el objetivo del estudio fue investigar la microbiota del tracto reproductivo en bovinos y su relación con la salud reproductiva. Se realizó una revisión de la literatura existente, analizando estudios sobre la composición microbiana y su impacto en enfermedades uterinas como la metritis y la endometritis. Los resultados indican que la microbiota desempeña un papel crucial en la salud reproductiva, desafiando la noción de que el útero es un ambiente estéril. Se encontró una diversidad microbiana, de especies *Prevotella*, *Fusobacterium necrophorum*, *Escherichia coli*, *Arcanobacterium pyogenes*. La conclusión sugiere que una mejor comprensión de la microbiota reproductiva podría mejorar las estrategias de manejo y tratamiento en la ganadería, promoviendo la salud animal y la productividad.

Wang et al. (2018), caracterizó la comunidad bacteriana cervical en vacas lecheras en diferentes etapas fisiológicas y en aquellas con metritis. Se utilizó la secuenciación de amplicones de 16SrDNA en 40 vacas seleccionadas de un total de 573 examinadas. Los resultados mostraron que Firmicutes fue el filo predominante, con una disminución de la diversidad bacteriana en vacas con metritis, destacando los géneros *Porphyromonas* y *Fusobacterium*. Se concluyó que la microbiota cervical está relacionada con la salud de las vacas, sugiriendo que la conexión entre las comunidades bacterianas y la metritis es multifactorial, lo que requiere más investigación sobre su impacto en la salud reproductiva.

Ghoneim et al. (2021), caracterizaron los microbios asociados a la adhesión cervicovaginal en el sistema reproductivo de camellos (*Camelus dromedarius*) mediante cultivos bacteriológicos y micológicos de hisopos vaginales y uterinos, identificando estafilococos coagulasa negativos,



Staphylococcus aureus, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, y *Pseudomonas spp.*

Nascimento et al. (2015), el objetivo fue caracterizar el microbioma vaginal del ganado Nellore mediante análisis metagenómico identificando los filos bacterianos Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria como los más abundantes y géneros como *Aeribacillus* y *Bacillus*, con una notable diversidad en vacas no preñadas concluyendo que la microbiota vaginal presenta una gran diversidad y está influenciada por el manejo y la dieta, sugiriendo la necesidad de estudios adicionales para comprender mejor su impacto en la salud del ganado.

Gonzalez et al. (2022), el objetivo fue evaluar la microbiota vaginal de novillas sanas, se realizaron secuencias del gen Ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) 16S en 28 muestras vaginales, analizando la abundancia relativa de filos y géneros bacterianos mediante pruebas estadísticas y se identificaron 28 taxones, destacando Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Tenericutes, Fusobacteria y Actinobacteria.

Santos et al. (2023), el objetivo de este estudio fue identificar el perfil de la microbiota bacteriana y las resistencias bacterianas en llamas (*Lama glama*). Se recolectaron hisopos de diferentes partes del cuerpo de cuatro llamas sanas y se realizaron cultivos en medios específicos para aislar bacterias. Se identificaron 19 aislados de *Escherichia coli*, 5 de *Staphylococcus spp.* coagulase positiva, 19 de *Staphylococcus spp.* coagulase negativa, 2 de *Pantoea agglomerans*, 1 de *Koserella trabulsii*, 1 de *Enterobacter aerogenes* y 1 de *Klebsiella pneumoniae*. Los resultados mostraron una alta resistencia a varios antibióticos, incluyendo la confirmación del gen *mecA* en un aislado resistente a oxacilina. Se concluye que



existen microorganismos resistentes en llamas que no habían estado expuestas a antibióticos, lo que resalta la importancia de estudiar la microbiota en animales cercanos a humanos y su potencial impacto en la salud pública.

Huang et al. (2017), el estudio tiene como objetivo analizar la dinámica del microbioma vaginal en mujeres en relación con la salud urogenital y el embarazo. Se emplearon métodos de secuenciación del gen 16S ARNr y cultivo para identificar las bacterias presentes. Entre los resultados, se hallaron especies como *Lactobacillus iners*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Prevotella*, y *Mobiluncus*. Se observó que las alteraciones en la microbiota, como la disminución de *Lactobacillus*, están asociadas con vaginosis bacteriana y partos prematuros. La conclusión es que un microbioma vaginal saludable es crucial para la prevención de enfermedades y complicaciones en el embarazo

Quereda et al. (2020), el objetivo del estudio fue analizar la microbiota vaginal en novillas lecheras durante el ciclo estral y su variación en las fases folicular y lútea. Se utilizó secuenciación del ARNr 16S para identificar las bacterias presentes en 20 novillas. Los filos bacterianos más abundantes fueron Tenericutes, Firmicutes y Bacteroidetes, representando más del 75% de la microbiota. También se identificaron *Ureaplasma*, *Histophilus*, y *Mycoplasma*. Se concluyó que la microbiota vaginal cambia significativamente entre fases del ciclo estral, con una baja presencia de *Lactobacillus*.

2.1.2. Antecedentes nacionales

Jimenes (2020), con respecto al tipo de aislamiento, indica que *Escherichia coli* es uno de los principales gérmenes bacterianos oportunistas que forma parte de la flora normal de la vagina, pudiendo colonizar útero si se le da las



condiciones. Por otro lado, se asume que tanto los géneros de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus megaterium* son microorganismos relacionados con la endometritis en camélidos.

2.1.3. Antecedentes locales

Limachi (2017), realizó un estudio en el Centro de Investigación y producción (CIP) Chuquibambilla donde identifico especies bacterianas residentes en alpacas tuis de dos años, encontrando la especie *Bacillus lechiniformis* en un 30%, seguido por *Enterobacter spp* y *Staphylococcus saprophyticus* 20%, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* 10%.

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. La llama (*Lama glama*)

La llama (*Lama glama*) es un mamífero doméstico de la familia Camelidae, reconocida por su cuerpo robusto y esbelto, cuello largo y pelaje denso y lanudo, que puede presentar una variedad de colores como blanco, negro, marrón, gris y combinaciones de estos. Mide entre 1.7 y 1.8 metros de altura hasta la cabeza y pesa entre 130 y 200 kg. Posee orejas largas y curvas, una expresión facial característica y grandes ojos oscuros, lo que le da una apariencia distintiva y amigable (Cortez et al., 2017).

Son originarias de las regiones montañosas del continente de Sudamérica, fueron domesticadas a partir del guanaco (*Lama guanicoe*), un proceso que se estima ocurrió hace unos 4,000 a 5,000 años en las altiplanicies andinas, principalmente en áreas que hoy corresponden a Perú y Bolivia. La domesticación



de las llamas fue un hito crucial en el desarrollo de las civilizaciones andinas, como la Inca, que dependieron de estos animales para transporte, lana y como recurso alimenticio (Machaca et al., 2020).

Su distribución y su hábitat natural, las llamas se encontraban predominantemente en la región de los Andes, en países como Bolivia, Perú, Ecuador, Chile y Argentina. Con la expansión de las civilizaciones andinas y posteriormente con la colonización europea, la distribución de las llamas se ha extendido a otras partes del mundo. Actualmente, las llamas también se crían en América del Norte, Europa, Australia y algunas regiones de Asia, donde se utilizan tanto para la producción de lana como para actividades recreativas y turismo (Quispe et al., 2020).

Respecto a su reproducción las llamas tienen un sistema de reproducción polígamo. La ovulación en las hembras es inducida por la cópula, lo que significa que pueden reproducirse en cualquier momento del año (Quispe et al., 2023) El período de gestación es de aproximadamente 350 días, casi 11 meses, y típicamente nace una sola cría, conocida como "ch'aku" o "cría". Al nacer, las crías pesan entre 9 y 14 kg y son capaces de ponerse de pie y caminar en pocas horas. Las hembras amamantan a sus crías durante unos 4 a 6 meses, aunque las crías comienzan a consumir alimento sólido a partir de las pocas semanas de vida (Quispe et al., 2023).

Las llamas son herbívoras y se alimentan principalmente de pastos, hojas y plantas herbáceas. Son animales rumiantes, lo que significa que tienen un sistema digestivo especializado que les permite fermentar y digerir eficientemente



la fibra vegetal en su estómago dividido en tres compartimentos (De la Torre, 2010).

Las llamas son conocidas por su comportamiento social y suelen vivir en grupos familiares. Son animales curiosos e inteligentes, con una notable capacidad de aprendizaje y adaptación. Además, tienen una serie de vocalizaciones y comportamientos de comunicación, como la "vocalización de alarma" para alertar a otros miembros del grupo sobre posibles peligros (Renieri et al., 2009).

2.2.2. Sistema reproductivo de la hembra de la Llama (*Lama glama*)

El sistema reproductivo de la hembra de la llama está diseñado para facilitar la reproducción interna, con estructuras especializadas que permiten no solo la fertilización y el desarrollo del embrión. A continuación, se detalla la anatomía de este sistema (Quispe et al., 2023).

- **Ovarios:**

Los ovarios son los órganos reproductores primarios de la hembra de la llama, responsables de la producción de óvulos (gametos femeninos) y la secreción de hormonas sexuales como el estrógeno y la progesterona. Las llamas tienen dos ovarios, situados cerca de la región lumbar, que alternan la liberación de óvulos en cada ciclo reproductivo. Los ovarios son pequeños, ovalados y están suspendidos por un ligamento en la cavidad abdominal (León et al., 2011).

- **Oviductos (Trompas de Falopio):**

Los oviductos, también conocidos como trompas de Falopio, son tubos delgados que conectan los ovarios con el útero. Son los sitios donde ocurre la fertilización del óvulo por el espermatozoide. En las llamas, los oviductos tienen una

región llamada infundíbulo, que está cerca del ovario y tiene una forma de embudo para captar el óvulo liberado. A medida que el óvulo fertilizado se mueve a través del oviducto, se dirige hacia el útero (Mayta et al., 2016).

Útero:

El útero de la hembra de la llama es bicorne, lo que significa que tiene dos cuernos uterinos que se unen en un cuerpo uterino común. Cada cuerno uterino es una extensión tubular que se extiende hacia un ovario. El útero es el sitio donde se implanta el embrión y se desarrolla durante la gestación. La mucosa uterina, o endometrio, proporciona el entorno nutritivo necesario para el crecimiento del feto (Mayta et al., 2016).

- **Cérvix:**

El cérvix es un canal estrecho que conecta el útero con la vagina. Actúa como una barrera física y biológica que protege el útero de infecciones y, durante la gestación, mantiene cerrado el canal cervical para proteger al feto en desarrollo. Durante el parto, el cérvix se dilata para permitir el paso del feto (Rodríguez y Moresco, 2019).

- **Vagina:**

La vagina es un tubo muscular y elástico que conecta el cérvix con el exterior del cuerpo. En las llamas, la vagina es el sitio de recepción del esperma durante la cópula y también forma el canal de parto a través del cual la cría nace. La longitud de la vagina proporciona un ambiente adecuado para la deposición del semen y el transporte de espermatozoides hacia el cérvix y el útero (Quispe et al., 2023).

- **Vulva:**

La vulva es la parte externa del sistema reproductivo de la hembra de la llama. Consiste en dos labios externos que protegen la abertura vaginal y la uretra. La vulva también contiene glándulas que secretan moco, lo cual ayuda a lubricar el canal vaginal durante la cópula y el parto (Quispe et al., 2023).

- **Clítoris:**

El clítoris es una pequeña estructura eréctil situada en la parte anterior de la vulva. Está compuesto por tejido eréctil y tiene una alta densidad de terminaciones nerviosas, lo que lo hace sensible al tacto. Aunque su función exacta en la reproducción no está completamente clara, se cree que puede contribuir a la respuesta sexual y la cópula (León et al., 2011).

- **Proceso de Reproducción:**

Ovulación: Las llamas son ovuladoras inducidas, lo que significa que la ovulación es estimulada por la cópula. La estimulación física y la presencia de una sustancia en el semen del macho desencadenan la liberación del óvulo del ovario (Rodríguez y Moresco, 2019).

Al respecto Machaca et al. (2020), realizaron la siguiente descripción de las etapas reproductivas:

Fertilización: Una vez liberado, el óvulo se desplaza hacia el oviducto, donde puede ser fertilizado por el esperma.

Implantación: Si ocurre la fertilización, el embrión se mueve hacia el útero, donde se implanta en el endometrio y comienza a desarrollarse.



Gestación: La gestación en las llamas dura aproximadamente 350 días, durante los cuales el feto se desarrolla en el útero.

Parto: Al final del período de gestación, la hembra da a luz a una cría, generalmente una sola, aunque ocasionalmente pueden nacer gemelos.

En resumen, el sistema reproductivo de la hembra de la Llama está altamente especializado para asegurar la fertilización interna y el desarrollo exitoso del embrión hasta el nacimiento. Este sistema complejo y bien adaptado permite a las llamas reproducirse eficazmente en las duras condiciones ambientales de los Andes.

2.2.3. Microbiota de la vagina de la Llama (*Lama glama*)

La microbiota vaginal de la llama comprende una comunidad diversa de microorganismos que incluye bacterias, hongos y posiblemente virus. Esta microbiota juega un papel crucial en la salud reproductiva y general del animal. La composición y función de la microbiota vaginal en llamas pueden variar en función de varios factores, como la edad, el estado hormonal, la dieta y el entorno. A continuación se presenta una descripción científica de esta microbiota (Zapata et al., 2015).

- **Composición bacteriana:**

La microbiota vaginal de la llama está dominada por bacterias, aunque la investigación específica sobre la microbiota vaginal de la llama es limitada, se pueden extrapolar datos de estudios en otros rumiantes y camélidos (Jimenes, 2016).



Al respecto Mayta et al. (2016), señala que las bacterias comunes que se encuentran en la vagina de los rumiantes menores incluyen:

Lactobacillus spp.: Estos son bacterias ácido-lácticas que juegan un papel crucial en mantener un pH vaginal bajo (ácido), lo que inhibe el crecimiento de patógenos.

Staphylococcus spp.: Estas bacterias se encuentran en la piel y mucosas y son parte de la microbiota normal.

Streptococcus spp.: Presentes en muchas partes del cuerpo, incluyendo la vagina, y participan en la protección contra patógenos.

Bacteroides spp.: Anaerobios que participan en la digestión de material orgánico y la protección contra patógenos.

Corynebacterium spp.: Son parte de la microbiota normal de la piel y mucosas.

- **Composición fúngica:**

Los hongos también forman parte de la microbiota vaginal, aunque en menor proporción que las bacterias. Los géneros más comunes incluyen a *Candida spp.*, aunque generalmente son comensales, algunas especies pueden causar infecciones si el equilibrio microbiano se altera (Mayta et al., 2016).

- **Factores que afectan la microbiota vaginal:**

Al respecto Rodríguez y Moresco (2019), indican que la composición de la microbiota vaginal puede verse afectada por diversos factores, entre ellos menciona como relevantes al estado hormonal, puesto que los cambios



hormonales durante el ciclo estral, la gestación y la lactancia pueden alterar la microbiota vaginal. Así mismo se tiene a la edad, considerando que la microbiota vaginal cambia con la edad, desde el nacimiento hasta la madurez sexual y la vejez, con fuertes cambios tanto en la composición como en la abundancia. También se reconoce que la dieta es un factor que modifica esta microbiota tanto en su composición como en el predominio de algunas especies. Otro factor es el entorno, en donde se tiene que las condiciones ambientales, como la higiene, el clima y la exposición a patógenos, pueden afectar la microbiota vaginal.

- **Funciones de la Microbiota Vaginal:**

Al respecto Zapata et al. (2015), menciona que las funciones de esta microbiota es básicamente las siguientes:

Protección contra patógenos: Mantiene un equilibrio que impide la colonización de microorganismos patógenos.

Regulación del pH: La producción de ácido láctico por *Lactobacillus spp.* ayuda a mantener un pH ácido, creando un ambiente hostil para muchos patógenos.

Estímulo del sistema inmunitario: La presencia de microorganismos comensales estimula el sistema inmunitario local, mejorando la capacidad del cuerpo para responder a infecciones.

- **Alteraciones y enfermedades asociadas:**

Zapata et al. (2015) reconoce alteraciones en la microbiota vaginal pueden llevar a infecciones y otras condiciones patológicas:



Vaginosis bacteriana: Un desequilibrio en la microbiota vaginal que puede llevar a una proliferación excesiva de bacterias patógenas.

Infecciones por Candida: Pueden ocurrir si hay un desequilibrio en la microbiota vaginal.

Enfermedades inflamatorias: La inflamación crónica puede ser el resultado de un desequilibrio microbiano.

En resumen, la microbiota vaginal de la llama es una comunidad compleja y dinámica que desempeña un papel fundamental en la salud reproductiva y general del animal. Comprender su composición y función es esencial para mejorar las prácticas de manejo y bienestar de estos animales (Jimenes, 2016).

2.2.4. El análisis metagenómico para microbiotas

El análisis metagenómico es una metodología avanzada para estudiar comunidades microbianas en su totalidad, sin la necesidad de aislar y cultivar organismos individuales. Esta técnica permite la caracterización exhaustiva de la diversidad y las funciones de los microorganismos en diversos entornos, incluyendo el suelo, el agua, el intestino y la vagina de los animales. A continuación se expone la teoría que sustenta el análisis metagenómico para microbiotas (Genti, 2018).

- **Metagenómica:**

La metagenómica es el estudio del material genético recuperado directamente de muestras ambientales. A diferencia de la microbiología tradicional, que se basa en el cultivo de microorganismos, la metagenómica



permite el estudio de la totalidad de la comunidad microbiana, incluidos los microorganismos que no se pueden cultivar en laboratorio (Hernandez, 2014).

- **Microbiota:**

La microbiota se refiere a la comunidad de microorganismos (bacterias, arqueas, hongos, virus y otros) que habitan en un entorno específico. En los animales, la microbiota desempeña roles cruciales en la salud y la enfermedad, afectando procesos como la digestión, la inmunidad y la reproducción (López, 2019).

2.2.5. Principios del análisis metagenómico

- **Muestreo:**

La representatividad de las muestras es crítica. Las muestras deben ser recolectadas de manera que reflejen adecuadamente la diversidad y abundancia de la microbiota en el entorno estudiado (Lorenzana, 2020).

- **Extracción de ADN:**

La calidad y cantidad del ácido desoxirribonucleico (ADN) extraído son fundamentales para el éxito del análisis metagenómico. El ADN debe ser purificado para eliminar contaminantes y obtener material genético suficiente y de alta integridad (Lorenzana, 2020).

- **Secuenciación de ADN:**

Existen dos enfoques principales para la secuenciación metagenómica:



Secuenciación de amplicones: Se amplifican regiones específicas del ADN ribosomal (16S rRNA para bacterias, 18S rRNA o ITS para hongos) para identificar y cuantificar taxones microbianos (Mantilla y Torres, 2019).

Secuenciación Shotgun Metagenómica: Se secuencia la totalidad del ADN presente en la muestra, proporcionando una visión más completa de la diversidad taxonómica y funcional.

- **Bioinformática:**

El análisis de los datos de secuenciación requiere herramientas bioinformáticas avanzadas para:

Preprocesamiento: Filtrado de secuencias de baja calidad y eliminación de contaminantes.

Análisis Taxonómico: Clasificación de secuencias en taxones microbianos usando bases de datos de referencia.

Análisis Funcional: Identificación de genes y vías metabólicas presentes en las secuencias, utilizando bases de datos funcionales.

Análisis Estadístico: Evaluación de la diversidad y la abundancia de taxones y genes, así como la comparación entre diferentes muestras o condiciones (Pizarro, 2019).

2.2.6. Metodologías en análisis metagenómico

- **Recolección y procesamiento de muestras:**

Muestreo estratificado: Recolección de muestras de diferentes estratos o microhábitats para capturar la heterogeneidad de la microbiota.



Almacenamiento adecuado: Uso de condiciones de almacenamiento que preserven la integridad del ADN, como congelación a -80°C (Genti, 2018).

- **Técnicas de extracción de ADN:**

Métodos Mecánicos y Químicos: Combinación de bead-beating, lisis enzimática y detergentes para romper las paredes celulares y liberar el ADN.

Purificación: Uso de columnas de sílice, precipitaciones con alcohol o kits comerciales para eliminar contaminantes y purificar el ADN (Hernandez, 2014).

- **Estrategias de secuenciación:**

Amplificón 16S/18S/ITS: PCR para amplificar regiones ribosomales específicas, seguida de secuenciación por técnicas de Nanopore se basa en la utilización de poros de diámetro de 1nanómetro.

Shotgun Metagenómica: Fragmentación del ADN total, preparación de bibliotecas y secuenciación en plataformas de alta capacidad como Nanopre o NovaSeq (Hernandez, 2014).

- **Análisis bioinformático:**

Preprocesamiento de datos: Uso de herramientas como Trimmomatic o FastQC para evaluar y mejorar la calidad de las secuencias.

Análisis taxonómico: Uso de QIIME2, MOTHUR, Kraken o similares para clasificar secuencias en taxones basados en bases de datos de referencia (Greengenes, SILVA, RDP).



Análisis funcional: Uso de Prokka, MetaGeneMark, HUMAnN2 y bases de datos como KEGG, COG, MetaCyc para anotar y evaluar genes y vías metabólicas (Lorenzana, 2020).

2.2.7. Importancia y aplicaciones

El análisis metagenómico tiene numerosas aplicaciones en diversas áreas, como en medicina y salud, estudio de la microbiota humana para entender su papel en la salud y la enfermedad, desarrollo de probióticos y terapias microbiológicas.

Agricultura y veterinaria, mejora de la salud animal y vegetal mediante el manejo de la microbiota, desarrollo de suplementos probióticos.

Biotecnología: Descubrimiento de nuevos genes y rutas metabólicas con potencial biotecnológico, como enzimas industriales y antibióticos.

El análisis metagenómico es una herramienta poderosa y versátil que permite una comprensión profunda de la microbiota en diversos entornos. Al estudiar tanto la composición taxonómica como las capacidades funcionales de estas comunidades microbianas, los científicos pueden avanzar en múltiples campos, desde la salud humana y animal hasta la biotecnología y la ecología (Lorenzana, 2020).

2.3. MARCO CONCEPTUAL

ADN: El ADN es una molécula que contiene la información genética necesaria para el desarrollo, funcionamiento y reproducción de los organismos vivos. Está compuesto por dos cadenas de nucleótidos enrolladas en una doble hélice. Cada nucleótido consta de una base nitrogenada (adenina, timina, citosina o guanina), un azúcar



(desoxirribosa) y un grupo fosfato. El orden de las bases nitrogenadas en el ADN determina las instrucciones genéticas (Copelli, 2010).

Amplicón: Un amplicón es un fragmento de ADN que ha sido amplificado mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En estudios metagenómicos, los amplicones de regiones específicas, como el gen 16S rRNA en bacterias, son secuenciados para identificar y cuantificar microorganismos presentes en una muestra (Copelli, 2010).

ARN: El ARN es una molécula similar al ADN, pero generalmente de cadena simple. Desempeña un papel crucial en la transcripción y traducción de la información genética del ADN para sintetizar proteínas. El ARN contiene la base uracilo en lugar de timina y su azúcar es la ribosa. Existen varios tipos de ARN, incluyendo ARN mensajero (ARNm), ARNr y ARN de transferencia (ARNt) (Rodríguez et al., 2016).

Bioinformática: La bioinformática es una disciplina científica que combina la biología, la informática y la tecnología de la información para analizar y comprender datos biológicos. Se utilizan herramientas computacionales y técnicas estadísticas para gestionar, analizar e interpretar grandes volúmenes de datos biológicos, como secuencias de ADN y proteínas, estructuras moleculares y datos de expresión génica (Rodríguez et al., 2016).

Metagenómica: La metagenómica es el estudio del material genético recuperado directamente de muestras ambientales, sin necesidad de cultivar los organismos presentes. Esta técnica permite el análisis completo de la diversidad y función de las comunidades microbianas en su entorno natural. Utiliza la secuenciación de ADN para identificar y caracterizar los microorganismos y sus genes en diversas muestras, como suelos, agua y tejidos (Hernandez, 2014).



Microbiota: La microbiota se refiere a la comunidad de microorganismos que habitan en un entorno específico, como el cuerpo humano, el suelo o el agua. Esta comunidad incluye bacterias, arqueas, hongos, virus y otros microbios. La microbiota desempeña roles cruciales en la salud y el funcionamiento de los organismos, influenciando procesos como la digestión, la inmunidad y la resistencia a enfermedades (Choque y Ayala, 2017).



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

El estudio se realizó en el centro experimental y producción la Raya de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno, ubicado en el Distrito de Santa Rosa de la Provincia de Melgar, Departamento de Puno, a una latitud de $-14^{\circ}36'27''S$, longitud de $-70^{\circ}47'10''O$ y una altitud de 4100 a 5000 msnm, temperatura de 9.5 a 4.2 °C y una precipitación pluvial de 684 mm promedio (Aybar y Lavado, 2017). El proceso de purificación de ADN y el secuenciamiento metagenómico se hizo mediante un servicio externo a cargo del laboratorio de Umbrella Genomics Company ubicado en Emilio Althaus 576, Lince, Lima.

3.2. DISEÑO DE ESTUDIO

La investigación tiene un diseño de estudio descriptivo explicativo, no experimental, con muestreo no probabilístico, considerando que su intención no es la de medir el efecto de una acción, sino que busca describir y caracterizar la microbiota vaginal de la llama, por tanto, trata de identificar, por métodos modernos, la composición y estructura de dicha microbiota en la vagina de la llama (*Lama glama*).

3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA DEL ESTUDIO

3.3.1. Población

Para el presente estudio se consideró la población de llamas que existe en el centro Experimental La Raya de la UNA Puno, que al momento de ejecutar la investigación eran de aproximadamente 800 animales.



3.3.2. Tamaño de la Muestra

Para esta investigación el muestreo por conveniencia, donde los criterios de inclusión fueron animales que cumplan los requisitos de ser de dos años de edad, aparentemente sanas, utilizando llamas distribuidos de la siguiente manera:

Distribución de llamas (dos años de edad) según estado fisiológico:

- 05 llamas preñadas (las llamas fueron de la campaña de empadre del 2024, teniendo aproximadamente dos meses de gestación, la cual fue corroborado por medio de ecografía).
- 05 llamas vacías (se tomaron muestras de las llamas que resultaron vacías de la campaña de empadre 2024, diagnosticado por medio de ecografía).

3.4. METODOLOGIA

3.4.1. Diagnóstico de preñez

Antes de realizar la toma de muestra se sujetaron las llamas con ayuda del personal del Centro Experimental La Raya e inmediatamente se procede a diagnosticar mediante la ecografía, para lo cual se realiza la limpieza en la zona perianal, se administra 20 ml de gel por medio de una jeringa directamente al recto del animal, se utilizó un ecógrafo de marca DUS 60 con transductor lineal, se considera animal preñada aquella que evidencia el saco gestacional con líquido amniótico y otras estructuras en el útero.

3.4.2. Hisopado vaginal de la llama

Después del diagnóstico por ecografía, se realiza el hisopado vaginal, se procede con la limpieza de la vulva de manera manual, se separan los labios de la vulva luego se introduce el hisopo estéril en la vagina, se procede a frotar



suavemente las paredes de la vagina, luego se retira el hisopo y se lleva el medio de transporte, en una caja de poliestireno con refrigerante e inmediatamente se envía al laboratorio de Umbrella Genomics Company, Lima - Perú para su conservación a menos de 20°C y procesamiento.

3.4.3. Extracción de ADN

- Se colocó el material del hisopo en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
- Luego se añadió 180 µL de tampón T1 y 25 µL de proteinasa K a cada muestra, enseguida se centrifugo durante 15 s a 1500 x g.
- Luego se incubó a temperatura ambiente durante 5 min.
- Después se agitó con fuerza el tubo durante 15 s y se volvió a centrifugar durante 15 s a 1500 x g.
- Se colocó un peso en la tapa del tubo luego se incubo los tubos a 70 °C en una incubadora durante 10 min, se cambió la temperatura a 95 °C durante 5 min y se volvió a centrifugar durante 15 s a 1500 x g.
- Luego se transfirió la solución lisada a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml (no suministrado), se desechó el hisopo y continuo con la solución recuperada.
- Se agitó el tubo en seguida se añadió 200 µL de Buffer B3 luego se agito e incubo a 70°C por 10 minutos.
- Se llevó a Centrifugar durante 5 min a 11000 x g,
- Después de añadió 210 µL de etanol (96 - 100 %) a la muestra y se agito.
- Se colocó una columna NucleoSpin® Tissue en un tubo colector, luego se trasladó la muestra a la columna y se centrifugo por 1 minuto a 11000 x g, luego se descartó el tubo colector y se colocó a uno nuevo.



- Luego se añadió 500 μ L de tampón BW a la columna, se centrifugo por 1 minuto a 11000 x g, después se descartó el flujo del tubo colector.
- Luego se añadió 600 μ L de tampón B5 a la columna se volvió a centrifugar por 1 minuto a 11000 x g y se descartó el flujo del tubo colector.
- Después se llevó a centrifugar a 11000 x g por 1 minuto.
- Luego se colocó la columna en un tubo de 1.5 mL de microcentrífuga.
- Se añadió 50 o 100 μ L de tampón de elución, se incubo a temperatura ambiente por 1 minuto, se centrifugo a 11000 x g por 1 minuto, finalmente se preservó el ADN a -20 °C.

3.4.4. Revelado de ADN por electroforesis para evaluar la integridad

El revelado del ADN se realizó mediante electroforesis en agarosa al 1,5 % utilizando Buffer TAE. Se utilizó 8 μ L de ADN.

3.4.5. Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN se realizó utilizando QuDye ds DNA HS Assay kit. La cantidad de ADN utilizada fue 2 μ L.

3.4.6. Proceso de secuenciamiento

En la secuenciación se siguió las instrucciones del fabricante del kit 16 S Barcoding KIT 24V14 (SQK-16S114.24), realizando los siguientes pasos:

- **Preparación de bibliotecas**

Se realizó la amplificación mediante el PCR convencional los barcoding del 16S, luego se realizó el lavado utilizando perlas magnéticas, después se ligó



con el adaptador por 5 min aproximadamente y se realiza el proceso de cebado y carga en la celda del flujo del MinION Mk1C.

- **Secuenciamiento**

Se realizo utilizando un equipo MinION Mk1C, una vez cargado en la celda se procede la corrida por medio del software MinKNOW.

3.4.7. Análisis bioinformático de datos

Para este procedimiento se utilizó el software libre epi2melabs/wf-16S (v1.3.0) desarrollado por Metrichor Ltd., filial de Oxford nanopore Technologies, en cuyo flujo de trabajo incluye uso de pysam 0.21.0, pandas 2.0.3, fastcat 0.15.1, minimap2 2.26-r1175, samtools 1.18, taxonkit v0.15.1, kraken 2.1.3.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. IDENTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA VAGINAL EN LLAMAS HEMBRA VACÍAS DE DOS AÑOS.

La figura 1 muestra la identificación de la microbiota vaginal en llamas hembra vacías con dos años de edad en las que se pudo identificar bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Stenotrophomonas*, *Mycoplasmopsis*, *Shigella*, *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Kaistella*, *Clostridium* y *Fusobacterium* las mismas que serán descritas mas adelante.

Figura 1

Composición taxonómica para el grupo de llamas vacías de dos años



En la Figura 1, se expone la composición taxonómica de la microbiota vaginal en llamas vacías de dos años de edad, donde el reino bacteria corresponde al 77.04% de la muestra, mientras el restante 22.96% no fue clasificado. El phylum Pseudomonadota fue el 54.77% y el phylum Bacteroidota el 19.52%. Respecto a las clases se obtuvo la clase Gammaproteobacteria con el 53.76% y Bacteroidia con 18.49%, El orden con mayor representación fue Pseudomonadales con el 41.93%. La familia con mayor representación fue Pseudomonadaceae con 41.93%.

Tabla 1

Microbiota vaginal de mayor abundancia en llamas hembras vacías de dos años

N	Género	Lecturas (unidades)	Porcentaje
70	<i>Pseudomonas</i>	32760.60	43.06
10	<i>Bacteroides</i>	14302.00	18.80
85	<i>Stenotrophomonas</i>	3557.75	4.68
52	<i>Mycoplasmopsis</i>	2774.00	3.65
82	<i>Shigella</i>	2495.60	3.28
32	<i>Escherichia</i>	2242.20	2.95
2	<i>Acinetobacter</i>	996.00	1.31
43	<i>Kaistella</i>	981.50	1.29
21	<i>Clostridium</i>	769.67	1.01
38	<i>Fusobacterium</i>	526.40	0.69
88	<i>Unknown</i>	8693.20	11.43

En la Tabla 1, se observa la abundancia a nivel de género de la microbiota de la vagina de llamas vacías de dos años donde se consideró las 10 más abundantes, como representativas de dicha composición, se debe considerar que el análisis metagenómico identificó un total de 91 géneros (Anexo 1). El género de mayor representación es



Pseudomonas con 43.06%, *Bacteroides* con 18.80%, *Stenotrophomonas* con 4.68%, *Mycoplasmopsis* con 3.65%, *Shigella* con 3.28%, *Escherichia* con 2.95%, *Acinetobacter* con 1.31%, *Kaistella* con 1.29, *Clostridium* con 1.01% y *Fusobacterium* con 0.69%, Mshelia et al. (2014) realizó hisopados de la vagina de camellas (*Camelus dromedarius*) con aparente buen estado de salud aísla bacterias que no están relacionadas con el género *Lactobacillus*, donde predominan el *Streptococcus pyogenes* (31,3%), *E. coli* (23,8%), *Staphylococcus aureus* (20%), *Proteus spp.* (6,3%) y *Corynebacterium spp.* (1,3%), las cuales posiblemente se deban a que la vagina se contamina constantemente con bacterias del medio ambiente y de heces que manchan la vagina durante las temporadas de cría, así como los genitales del macho que al ser introducidos en la vagina de la hembra pueden cambiar su microbiota (Singh et al., 2008). De igual forma Dellepiane y Morales (2018), aíslan a la *Escherichia* y *Shiguella* como conformantes de la microbiota vaginal en alpacas y Jimenes (2020) también reporta a *Escherichia*, *Acinetobacter* y *Staphylococcus* en los aislados de vagina de llamas no preñadas.

Los resultados también resaltan que para el Phylum Pseudomonadota, se tiene 1 clase, 4 familias y los siguientes géneros *Pseudomonas* la más abundante, *Stenotrophomonas*, *Shigella*, *Escherichia* las tres en menor proporción. Se ha observado que cuando incrementa la abundancia de la clase Proteobacterias y la familia Pseudomonadaceae se hipotetiza que está relacionado a los cambios hormonales (Ault et al., 2019), también se identificó bacterias de la familia Pseudomonadaceae las cuales estaban en baja proporción a nivel de la mucosa vaginal (Serrano et al., 2020). Así mismo la presencia del género *Pseudomona* a nivel de la vagina no es raro, se tiene reporte que el género *Pseudomona* ha sido identificado en muestras de vagina y uretra de cerdas en buen estado de salud (Torres et al., 2021), en vacunos se ha identificado a los géneros *Pseudomona* a nivel vaginal, aunque no muy abundante (Brulin et al., 2024). Con respecto



a los géneros *Shigella* y *Escherichia*, (Mshelia et al., 2014) reconoce al género *Escherichia* como el más frecuente en camellas, de igual manera (Santos et al., 2023) confirma la presencia de *Escherichia coli* en bovinos (Appiah et al., 2020) menciona entre otras especies a *Escherichia coli* como conformantes de la flora bacteriana de la zona vaginal, finalmente (Chekole, 2021) aísla a *Shigella* de la vagina de camellas. Nuestros hallazgos pueden indicar que la presencia de algunas Gammaproteobacterias podría constituir un factor determinante en la fertilidad de la hembra al considerarse como patógenos del tracto reproductivo.

En el presente estudio también se ha identificado al Phylum Bacteroidota con 1 clase, 1 familia y el género Bacteroides, en los estudios realizados en bovinos sanos se ha identificado a Bacteroides como uno de los géneros más abundantes (29.3%) a nivel de la vagina en animales sanos (Rodrigues et al., 2015).

Mientras que Tibary et al. (2006) menciona que *Escherichia* es responsable de endometritis y metritis en hembras multíparas, sin embargo, en el presente estudio reportamos este género, pero con una baja abundancia.

Así también Jimenes (2020) reporta a *Escherichia*, *Acinetobacter* y *Staphylococcus*, en el presente estudio se confirma la presencia de las dos primeras, sin embargo, la última no fue identificada como conformante de la microbiota vaginal de llamas de dos años. De manera similar en camellos Mshelia et al. (2014) reconoce al género *Escherichia* como el más frecuente y Chekole, (2021) también en camellos identificó a *Shigella*. Además, Espinoza (2018) menciona que *Lactobacillus* estuvo presente, pero en los presentes resultados no se identificó este género.

Por otro lado, Fernandez, et al. (2006), refiere que el microbiota residente está conformado por numerosas bacterias, entre ellas los géneros *Escherichia*, *Clostridium*,



Bacteroides y *Fusobacterium*, los cuales también fueron identificados como conformantes de la microbiota vaginal de llamas vacías de dos años. Así también Jimenes (2020) con respecto a *Escherichia* confirma su presencia en individuos sanos, pero como un oportunista que bajo ciertas condiciones pudiera coloniza otras estructuras dentro del sistema reproductivo.

Otro estudio en bovinos Appiah et al. (2020), menciona entre otras especies a *Escherichia coli* y *Fusobacterium* como conformantes de la flora bacteriana de la zona vaginal, coincidiendo con lo hallado en este estudio en llamas vacías. Mientras que Wang et al. (2018), en vacas lecheras, también identificó a *Fusobacterium* como conformante de dicha microbiota vaginal. Así también Ghoneim et al. (2021) en camellos halló como integrantes de la microbiota vaginal a *Pseudomonas* y *Escherichia coli*, por tanto, se confirma que los mismos fueron identificados también en llamas vacías de dos años.

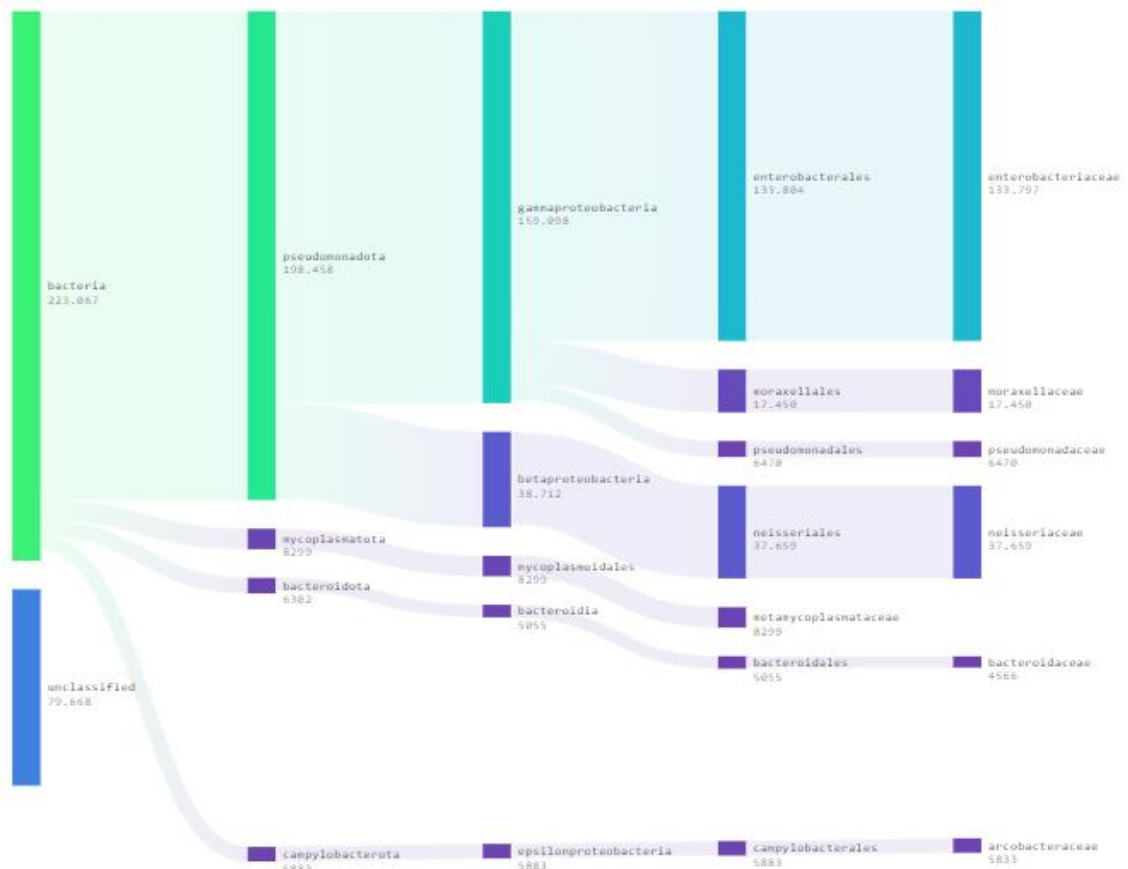
Sin embargo, Nascimento et al. (2015) en hisopados vaginales de ganado Nellore, indica géneros distintos a los reportados en el presente estudio, lo que indica una amplia variedad de bacterias conformantes de este bioma. Mientras que en llamas Santos et al. (2023), confirma la presencia de *Escherichia coli*, por tanto, este género cosmopolita es reportado en diversos microbiotas.

4.2. Identificación de la microbiota vaginal en llamas preñadas de dos años

La figura 2 muestra la identificación de la microbiota vaginal en llamas hembra vacías con dos años de edad en las que se pudo identificar bacterias de los géneros *Shigella*, *Escherichia*, *Mycoplasma*, *Prolinoborus*, *Aliarcobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Fusobacterium*, *Bacteroides* las mismas que serán descritas más adelante.

Figura 2

Composición taxonómica para el grupo de llamas preñadas de dos años.



En la Figura 2, se expone la composición taxonómica de la microbiota vaginal en llamas preñadas, el reino bacteria corresponde al 73.68% de la muestra, mientras el restante 26.32% no fue clasificado. El phylum Pseudomonadota 65.56% y el phylum Mycoplasmatota el 2.74%. Respecto a las clases se obtuvo la clase Gammaproteobacteria con 52.55%, Betaproteobacteria con 12.79%. El orden con mayor representación fue Enterobacteriales con el 44.20%. La familia con mayor representación fue Enterobacteriaceae con 44.20%.

Tabla 2

Microbiota vaginal de mayor abundancia en llamas hembras preñadas de dos años.

N	Género	Lectura	Porcentaje
65	<i>Shigella</i>	12531.80	19.47
25	<i>Escherichia</i>	12040.80	18.71
43	<i>Mycoplasmopsis</i>	8225.00	12.78
58	<i>Prolinoborus</i>	7200.00	11.19
4	<i>Aliarcobacter</i>	5559.00	8.64
3	<i>Acinetobacter</i>	3079.60	4.79
60	<i>Pseudomonas</i>	2002.33	3.11
68	<i>Stenotrophomonas</i>	1143.00	1.78
29	<i>Fusobacterium</i>	841.00	1.31
7	<i>Bacteroides</i>	829.80	1.29
71	<i>Unknown</i>	7600.00	11.81

En la Tabla 2, se muestran los resultados de la microbiota vaginal bacteriana de mayor abundancia en llamas hembras preñadas, se consideró las 10 más abundantes, como representativas de dicha composición, se debe considerar que el análisis metagenómico identificó un total de 72 géneros (Anexo 1). El género de mayor representación es *Shigella* con 19.47%, *Escherichia* con 18.71%, *Mycoplasmopsis* con 12.78%, *Prolinuborus* con 11.19%, *Aliarcobacter* con 8.64%, *Pseudomonas* con 3.11%, *Stenotrophomonas* con 1.78%, *Fusobacterium* con 1.31%, *Bacteroides* con 1.29.

Si bien se cuenta con poca información respecto a la microbiota vaginal de llamas preñadas, Dellepiane y Morales (2018) menciona las bacterias más importantes y frecuentes en la mucosa uterina de las alpacas fue *Shigella sp* 17.5 y 13.3%, *E. coli* 26.0 y 21.7%, respectivamente *Shigella* como integrante de la microbiota, en el presente



estudio también reportamos este género que además fueron los más abundantes en este grupo de llamas. Mientras que Art et al. (2021) reporta a *Pseudomonas* como un género causante de infecciones, sin embargo, en el presente estudio lo identificamos como conformante de la microbiota vaginal.

Mientras que Jimenes (2020) en camélidos hembras preñadas identificó a *Escherichia* como el de mayor frecuencia, además de otros géneros, confirmando la amplia distribución del mismo en diferentes órganos. Como también Mshelia et al. (2014) confirma que *Escherichia* se halla también en la zona vaginal de camellos. Tibary, (2001) vuelve a identificar a *Escherichia* en llamas como parte de su flora vaginal.

Al respecto Chekole, (2021) realizó un estudio en camellos y entre los integrantes de la microbiota vaginal reporta a *Shigella*, como también ha sido mencionado en los presentes resultados. En el mismo sentido Fernandez, et al. (2006) identificó a los géneros *Clostridium*, *Bacteroides* y *Fusobacterium*, los mismos que también fueron identificados en llamas hembras preñadas.

Por otro lado, Huang et al. (2017) identificó en mujeres a *Fusobacterium* y *Bacteroides*, concordante con lo hallado en llamas preñadas, de lo cual se reconoce una microbiota con una amplia riqueza de especies. Así también Santos et al. (2023) indica la presencia de *Escherichia* como género frecuente en la microbiota vaginal. Así también Ghoneim et al. (2021), confirma la presencia de *Escherichia* en hisopados vaginales de camellos.

Finalmente, en bovinos Appiah et al. (2020) señala al género *Escherichia* como una de los más frecuentes en la microbiota vaginal de bovinos.



V. CONCLUSIONES

- Se identificó la microbiota vaginal en llamas hembra de dos años, según el análisis metagenómico se halló 91 géneros de bacterias, las de mayor abundancia fueron *Pseudomonas* con 43.06%, *Bacteroides* con 18.80%, *Stenotrophomonas* con 4.68%, *Mycoplasmopsis* con 3.65%, el componente no clasificado fue de 11.43% de las lecturas.
- Se identificó la microbiota vaginal en llamas preñadas, según el análisis metagenómico se halló 72 géneros de bacterias, las de mayor abundancia fueron *Shigella* con 19.47%, seguido de *Escherichia* con 18.71%, *Mycoplasmopsis* con 12.78%, *Prolinoborus* con 11.19%, el componente no clasificado fue de 11.81% de las lecturas.



VI. RECOMENDACIONES

- Ejecutar investigaciones en llamas con presencia de infecciones urinarias, utilizando el análisis metagenómico, para identificar si los agentes causales son los que se han descrito en el presente estudio como parte de una microbiota en llamas sanas.
- Ampliar los grupos etarios de llamas con análisis metagenómico de la microbiota vaginal, considerando que se hallaron diferencias importantes en la abundancia para dos grupos de edad.
- Profundizar con otras investigaciones hasta identificar especies, considerando que las bacterias están compuesta por un numeroso grupo de taxones evolutivos.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Appiah, M., Wang, J., & Lu, W. (2020). Microflora in the reproductive tract of cattle: A review (running title: The microflora and bovine reproductive tract). *Agriculture (Switzerland)*, 10(6), 1–27. <https://doi.org/10.3390/agriculture10060232>
- Ault, T. B., Clemmons, B. A., & Reese, S. T. (2019). *Composición taxonómica bacteriana del útero y la vagina de vacas posparto antes de la inseminación artificial Abstracto*. 1–27. <https://doi.org/10.1093/jas/skz212>
- Aybar, C., & Lavado, W. (2017). *Atlas de zonas de vida del Perú guía explicativa*.
- Brulin, L., Ducrocq, S., Incluso, G., Martel, S., & Audebert, C. (2024). *Caracterización de la microbiota vaginal bovina mediante secuenciación del ARNr 16S: asociaciones con la fertilidad , la longevidad , la salud y la producción del huésped*. 1–48.
- Ceron, M., Marcoppido, G., Trangoni, M., & Cravero, S. (2013). *Detection of fibrolytic bacteria in the forestomach contents of llamas (Lama glama) by PCR*.
- Chekole, A. (2021). *Pathological and Bacteriological Assessment of Reproductive Organ Disorders in She Camels in Somali , Eastern Ethiopia*. 371–379.
- Choque, D., & Ayala, C. (2017). Comparación de tres métodos de diagnóstico de preñez en llamas (Lama glama) de la Estación Experimental Choquenaira. *Revista de La Carrera de Ingeniería Agronómica-UMSA*, 3(1), 1–10.
- Copelli, S. (2010). Genética: Desde la herencia a la manipulación de los genes. In *Genética desde la herencia a la manipulación de genes* (Primera, Vol. 1). Fundación de Historia Natural.
- Cortez, M., Vides, H., Jurado, A., & Ruiz, M. (2017). *Manual Técnico de Llamas* (p. 68). PROMETA.
- De la Torre, A. (2010). Manual de sanidad de alpacas y llamas. In *Fundacion Suyana* (p. 68). Suyana.
- Dellepiane, H., & Morales, S. (2018). Identificación de bacterias patógenas oportunistas en útero de alpaca pre y poscópula. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del*



Perú, 29(2), 602–610. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14478>

- Espinoza Paz, J. (2018). *Determinación de las características morfológicas de llamas (Lama glama L.), alpacas (Vicugna pacos L.) e híbrido en zonas del municipio de Catacora provincia José Manuel Pando del Departamento de la Paz.* 1–133.
- Fernandez, A., Silveira, E., & Lopez, O. (2006). *Las infecciones uterinas en la hembra bovina.*
- Genti, S. (2018). Metagenómica: más allá del genoma de los microorganismos. *Bitácora Digital*, 1(2), 1–6.
- Ghoneim, S., Ahmad, J., & Sabagh, M. (2021). Caracterización de microbios asociados a la adhesión cérvico-vaginal en el aparato reproductor de camellos (*Camelus dromedaries*). *Springer Link*, 53(132), 1–44.
- Gonzalez, C., Torres, A., Galvão, K., & Otero, M. C. (2022). Comunidades bacterianas de la vagina de novillas lecheras sanas y vacas con desempeño reproductivo deteriorado. *ScienceDirect*, 142, 1–24.
- Hernandez, I. (2014). Metagenómica: Concepto y aplicaciones en el mundo microbiano. *Fronteras En Microbiología Aplicada.*, 66(November), 37–39.
- Huang, B., Fettweis, M., Brooks, P., Jefferson, K., & Buck, A. (2017). El panorama cambiante del microbioma vaginal. *Clinics in Laboratory Medicine*, 2712(14), 124.
- Jimenes, J. (2016). *Determinación de la flora bacteriana de la vagina y útero, y la relación con la fertilidad en camélidos sudamericanos domésticos (Lama glama) del centro experimental agropecuario Condoriri.* Universidad mayor de San Andrés.
- Jimenes, J. (2020). Determinacion de la flora bacteriana de la vagina y utero, y la relacion con la fertilidad en camelidos sudamericanos domesticos (Lama glama) del “Centro Experimental Agropecuario Condoriri.” In *Estadística I* (Issue 4). <http://www.zonaeconomica.com/analisis-financiero/cuentas-cobrar%0Ahttp://www.redalyc.org/pdf/290/29012059009.pdf%0Ahttps://www.faeditorial.es/capitulos/gestion->



morosidad.pdf%0Ahttps://unadmexico.blackboard.com/bbcswebdav/institution/
DCSBA/Bloque 1/NA/02/N

- León, E., Sato, A., Navarrete, M., & Cisneros, J. (2011). Anatomía macroscópica, irrigación y drenaje venoso del aparato reproductor femenino de la llama (*Lama glama*). *Rev Inv Vet Perú*, 22(1), 1–8.
- López, C., & Palma, J. (2019). Revisión en metagenómica: aplicaciones y técnicas moleculares. *Centro de Investigación de Graduados e Investigación TECNOMÉRIDA*, June, 1–100.
- Lorenzana, E. (2020). *Flujo de trabajo bioinformático para el análisis de secuencias de microbioma derivadas de un enfoque metagenómico: Metabiome*. Universidad de Antioquia.
- Machaca, V., Dueñas, L., Bustinza, V., Machaca, R., Escobedo, M., & Quispe, J. (2020). Caracterización morfológica de las llamas (*Lama glama*) de la raza Ch'acu de Cusco, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 31(2), e17821. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17821>
- Mantilla, M., & Torres, R. (2019). Enfoque metagenómico para la caracterización del microbioma de aves corral. Revisión. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(2), 77–97. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.78390>
- Martinez, J. (2020). *Metagenomica de rna ribosomal 16S (16SrRNA) como herramienta diagnostica en microbiologia: metodos y aplicaciones basados en next-generation sequencing*.
- Mayta, C., Loza, M., & Delgado, P. (2016). Caracterización del aparato reproductor de llamas (*Lama glama*, Linnaeus 1758) machos en Turco Provincia Sajama Departamento de Oruro. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 3(1), 22–42.
- Mora, sofia de los angeles. (2019). *Microbiota y disbiosis vaginal*. 4(1), 3–13.
- Morán, P., Di Santo, M., Becaluba, H., & Gogorza, L. (2010). Detección de anticuerpos para BVDV y BoHV-1 en llamas de la región de Tandil - Provincia de Buenos Aires. *InVet*, 12(2), 131–137.



- Mshelia, G. D., Okpaje, G., Voltaire, Y. A. C., & Egwu, G. O. (2014). Comparative studies on genital infections and antimicrobial susceptibility patterns of isolates from camels (*Camelus dromedarius*) and cows (*Bos indicus*) in Maiduguri, north-eastern Nigeria. *SpringerPlus*, 3(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-91>
- Mulsow, S. (2008). fistulacion y canulacion permanente del compartimiento 1 (rumen) en llamas (lama glama). *Archivos de Medicina Veterinaria*, 40(1), 5–6.
- Nascimento, M., Moreira, K., Ribeiro, G., Gasparini, M., & Giannattasio, S. (2015). Caracterización del microbioma vaginal del ganado Nellore mediante análisis metagenómico. *Plos ONE*, 10(11), 1–14.
- Pacheco, J. I. (2014). *Descripcion de la citologia vaginal en alpacas gestantes (Vicugna pacos)*. 4(1), 102–104.
- Pizarro, D. (2019). *Secuenciación metagenómica y nuevos procedimientos bioinformáticos para entender la evolución de hongos liquenizados*. Universidad Complutense de Madrid.
- Quereda, J., Barba, M., Mocé, M. L., Gomis, J., Jiménez, E., García, A., Gómez, A., González, P., Carbonetto, B., & García, P. (2020). Cambios en la microbiota vaginal durante el ciclo estral en novillas de leche. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(1), 124–135.
- Quispe, J., Apaza Zúñiga, E., Ibáñez Quispe, V., Villalta Ticona, R., Calsín Calsín, B., & Vilca Castro, C. (2015). Caracterización morfológica índices corporales de llamas (Lama glama) Ch'acu y k'ara de la puna húmeda de la Región Puno. *Revista Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Investigation*, 17(2), 183. <https://doi.org/10.18271/ria.2015.111>
- Quispe, J., Dueñas, L., Bustinza, V., Machaca, R., Bolívar, N. A., & Machaca, V. (2020). Morfología de las llamas (Lama glama) K'ara de Checacupe, Cusco, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 31(2), v. 3112.17855.
- Quispe, L., Aparicio, J., & Choque, D. (2023). Caracterización del sistema de producción de llamas (Lama glama) en tres ayllus del municipio de Calacoto, La Paz-Bolivia. *Cibum Scientia*, 2(2), 74–81. <https://doi.org/10.53287/gkwb4387qf97s>



- Renieri, C., Frank, E. ., Rosati, A. ., & Antonini, M. (2009). Definición de razas en llamas y alpacas. *Animal Genetic Resources Information*, 45(October), 45–54. <https://doi.org/10.1017/s1014233909990319>
- Rodicio, R., Biología, D. De, Área, F., Universidad, D. M., & España, D. O. (2004). *Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento , metodología y aplicaciones en microbiología clínica*. 22(4), 238–245.
- Rodrigues, N. F., Kästle, J., Coutinho, T. J. D., Amorim, A. T., & Campos, G. B. (2015). *Qualitative analysis of the vaginal microbiota of healthy cattle and cattle with genital-tract disease*. 14(2), 6518–6528.
- Rodriguez, R., Sortibrán, A., Guadalupe, M., & Téllez, O. (2016). *Conceptos básico de la genética* (Primera). Facultad de Ciencias.
- Rodriguez, S., & Moresco, A. (2019). Evaluacion clinica de la funcion reproductiva de los camelidos del nuevo mundo. *Zoológica Neotropical*, 4(1), 15.
- Santos, I. C., Barbosa, L. N., Belettini, S. T., Boscarato, A. G., Iukava, L. K., Zaniolo, M. M., Rubio, K. A. J., Del Vecchio, M. A. C., Santos, M. C., & Gonçalves, D. D. (2023). Resistance profile of bacterial isolates from different llama microbiotas (Lama glama Linnaeus 1758). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 75(3), 525–530. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12805>
- Serrano, M., Climent, E., Freire, F., & Martinez, J. (2020). *influencia de la microbiota del tracto genital ovino en los resultados de la inseminacion artificial de la especie. un estudio piloto en granjas ovinas comerciales*.
- Singh, J., Mshelia, G., & Woldehiwet, Z. (2008). *El estado inmunológico del útero bovino durante el período periparto*. 4, 1–7.
- Suarez, L. (2020). *ARNr 16S como herramienta aplicada en la caracterización molecular de géneros y especies de bacterias*. 25(April), 127–136.
- Tibary, A. (2001). Uterine infections in Camelidae. *Veterinary Sciences Tomorrow*, 3, 12.
- Torres, A., Fontana, C., Paster, S. E., Bassi, D., & Cocconcelli, P. S. (2021). *Diversidad bacteriana vaginal de cerdas jóvenes y gestantes sanas sometidas a monta natural*



o inseminación artificial . C, 1–29.

- Valenzuela, F., Casillas, R., Villalpando, E., & Vargas, F. (2015). *The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas*. 41, 297–313.
- Wang, Y., Jifang, R., Li, H., Kaiqiang, F., Pang, B., Yang, Y., Liu, Y., Wenru, T., & Rongfeng, C. (2018). *Caracterización de la comunidad bacteriana cervical en vacas lecheras con metritis y durante diferentes fases fisiológicas*. 1–22.
- Zapata, C., Ccama, A., Olivera, L., & Bravo, P. (2015). *Caracterización de metritis en alpacas y el uso de Bacillus subtilis en su tratamiento*. *Rev. Investig. Altoandin.*, 1, 9–12.



ANEXOS

ANEXO 1. *Microbiota vaginal en llamas En hembras de dos años*

N	Genero	Abundancia	Porcentaje
1	Acidovorax	483.00	0.63
2	Acinetobacter	996.00	1.31
3	Akkermansia	4.00	0.01
4	Alistipes	11.00	0.01
5	Alkanindiges	275.00	0.36
6	Aminobacter	3.00	0.00
7	Anaerosporomusa	2.00	0.00
8	Aquamicrobium	6.00	0.01
9	Atlantibacter	4.00	0.01
10	Bacteroides	14302.00	18.80
11	Bilophila	19.33	0.03
12	Blautia	13.00	0.02
13	Bosea	62.00	0.08
14	Brevundimonas	127.67	0.17
15	Butyricimonas	25.00	0.03
16	Campylobacter	25.00	0.03
17	Casaltella	3.00	0.00
18	Chryseobacterium	453.00	0.60
19	Citrobacter	4.00	0.01
20	Citroniella	45.67	0.06
21	Clostridium	769.67	1.01
22	Comamonas	435.67	0.57
23	Corynebacterium	6.00	0.01
24	Cronobacter	8.00	0.01
25	Desulfitobacterium	6.00	0.01
26	Devosia	39.67	0.05
27	Enterobacter	3.50	0.00
28	Enterocloster	27.00	0.04
29	Enterococcus	58.40	0.08
30	Epilithonimonas	310.50	0.41
31	Erysipelatoclostridium	31.67	0.04
32	Escherichia	2242.20	2.95
33	Eubacterium	28.25	0.04
34	Ewingella	16.25	0.02
35	Flaviflagellibacter	9.00	0.01
36	Flavobacterium	12.00	0.02
37	Frigoriflavimonas	4.00	0.01
38	Fusobacterium	526.40	0.69
39	Gemella	139.00	0.18
40	Hafnia	3.00	0.00
41	Halpernia	30.00	0.04
42	Hungatella	216.00	0.28
43	Kaistella	981.50	1.29



44	Lachnoclostridium	17.50	0.02
45	Lacrimispora	211.50	0.28
46	Lelliottia	2.00	0.00
47	Luteimonas	6.50	0.01
48	Lysobacter	35.00	0.05
49	Microvirga	2.00	0.00
50	Mobiluncus	7.00	0.01
51	Moraxella	32.00	0.04
52	Mycoplasmopsis	2774.00	3.65
53	Neorhizobium	70.50	0.09
54	Nitratireductor	4.00	0.01
55	Noviherbaspirillum	4.00	0.01
56	Oxalicibacterium	4.00	0.01
57	Paenibacillus	447.00	0.59
58	Parabacteroides	209.33	0.28
59	Paraburkholderia	102.80	0.14
60	Paracoccus	30.33	0.04
61	Pectobacterium	3.00	0.00
62	Pelosinus	44.50	0.06
63	Peptostreptococcus	6.00	0.01
64	Phascolarctobacterium	52.00	0.07
65	Phocaeicola	6.00	0.01
66	Porphyromonas	199.00	0.26
67	Prolinoborus	175.00	0.23
68	Pseudoscherichia	2.00	0.00
69	Pseudocitrobacter	18.00	0.02
70	Pseudomonas	32760.60	43.06
71	Psychrobacter	80.00	0.11
72	Rahnella	406.80	0.53
73	Ramlibacter	48.00	0.06
74	Raoultella	2.00	0.00
75	Rhizobium	25.00	0.03
76	Robbsia	27.00	0.04
77	Roseomonas	31.00	0.04
78	Rouxiella	43.25	0.06
79	Ruthenibacterium	15.33	0.02
80	Salmonella	4.00	0.01
81	Serratia	394.00	0.52
82	Shigella	2495.60	3.28
83	Simplicispira	35.00	0.05
84	Sphingobacterium	128.00	0.17
85	Stenotrophomonas	3557.75	4.68
86	Streptococcus	2.00	0.00
87	Thermomonas	9.00	0.01
88	Unknown	8693.20	11.43
89	Variovorax	75.50	0.10
90	Xanthomonas	3.00	0.00
91	Yersinia	5.00	0.01
	Total	76073.33	100.00



En llamas hembras preñadas

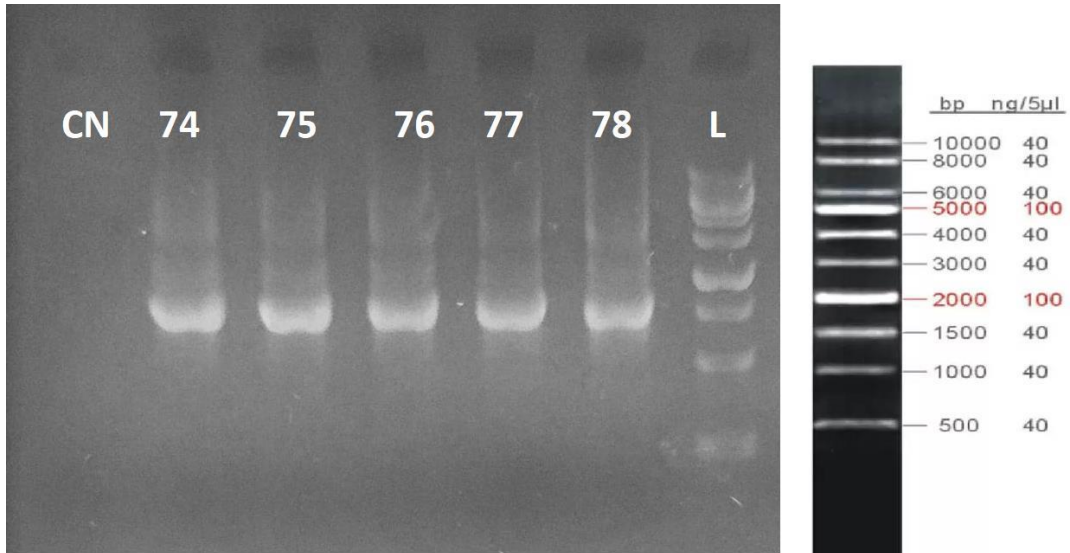
N	Genero	Abundancia	Porcentaje
1	Achromobacter	3.00	0.00
2	Acidovorax	18.00	0.03
3	Acinetobacter	3079.60	4.79
4	Aliarcobacter	5559.00	8.64
5	Alistipes	4.00	0.01
6	Atlantibacter	4.00	0.01
7	Bacteroides	829.80	1.29
8	Bilophila	48.00	0.07
9	Bordetella	3.00	0.00
10	Bosea	6.00	0.01
11	Brevundimonas	15.00	0.02
12	Campylobacter	46.00	0.07
13	Candidimonas	8.00	0.01
14	Chryseobacterium	137.50	0.21
15	Citrobacter	5.00	0.01
16	Citroniella	32.00	0.05
17	Clostridium	32.00	0.05
18	Comamonas	488.00	0.76
19	Corticibacterium	2.00	0.00
20	Devosia	22.00	0.03
21	Enterocloster	6.00	0.01
22	Enterococcus	5.75	0.01
23	Epilithonimonas	86.67	0.13
24	Erysipelatoclostridium	4.75	0.01
25	Escherichia	12040.80	18.71
26	Eubacterium	5.00	0.01
27	Exiguobacterium	257.00	0.40
28	Flaviflagellibacter	7.00	0.01
29	Fusobacterium	841.00	1.31
30	Gemella	115.00	0.18
31	Halopseudomonas	3.00	0.00
32	Hutsoniella	3.00	0.00
33	Intestinimonas	2.00	0.00
34	Intestinirhabdus	4.00	0.01
35	Kaistella	99.50	0.15
36	Lachnoclostridium	16.00	0.02
37	Lacrimispora	6.50	0.01
38	Luteimonas	23.00	0.04
39	Methylobacterium	3.00	0.00
40	Microvirga	4.00	0.01
41	Mobiluncus	4.00	0.01
42	Moraxella	379.00	0.59
43	Mycoplasma	8225.00	12.78
44	Neorhizobium	87.75	0.14
45	Nitratireductor	4.00	0.01
46	Paenibacillus	307.00	0.48



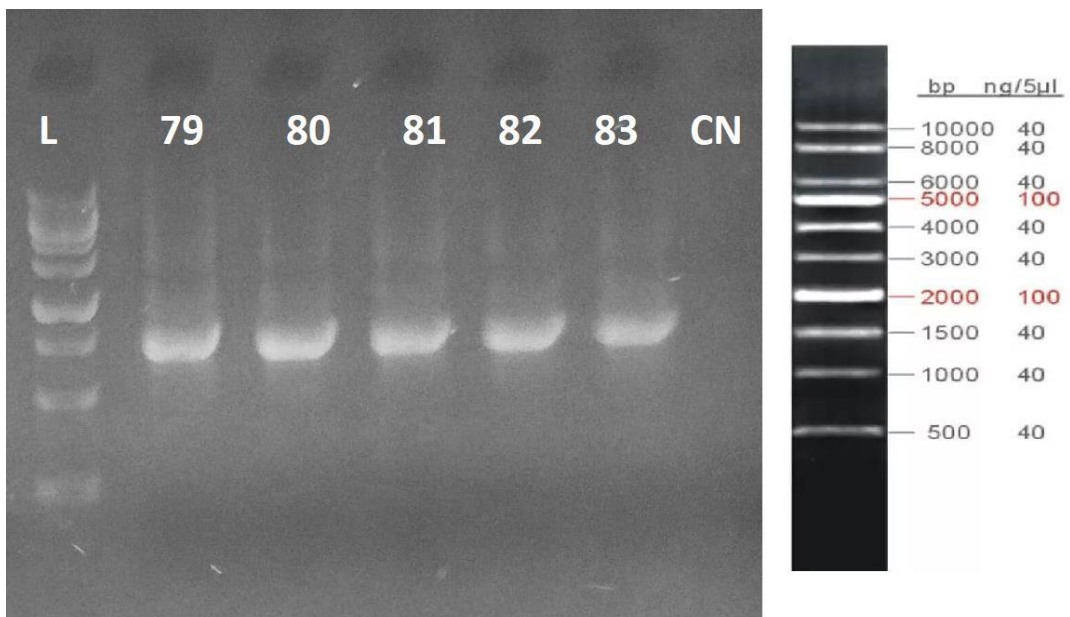
47	Parabacteroides	99.33	0.15
48	Paraburkholderia	96.00	0.15
49	Paracoccus	2.00	0.00
50	Parvimonas	145.00	0.23
51	Pectobacterium	2.00	0.00
52	Peptococcus	21.00	0.03
53	Peptoniphilus	2.00	0.00
54	Phascolarctobacterium	42.00	0.07
55	Phocaeicola	10.80	0.02
56	Phyllobacterium	64.00	0.10
57	Porphyromonas	83.50	0.13
58	Prolinoborus	7200.00	11.19
59	Pseudescherichia	7.75	0.01
60	Pseudomonas	2002.33	3.11
61	Pusillimonas	209.00	0.32
62	Rhizobium	14.33	0.02
63	Rhodanobacter	81.00	0.13
64	Salmonella	3.00	0.00
65	Shigella	12531.80	19.47
66	Simplicispira	84.00	0.13
67	Sphingomonas	6.00	0.01
68	Stenotrophomonas	1143.00	1.78
69	Streptococcus	4.50	0.01
70	Stutzerimonas	17.00	0.03
71	Unknown	7600.00	11.81
72	Verticiella	2.00	0.00
	Total	64354.97	100.00

ANEXO 2. Revelado del ADN

Revelado de ADN para el grupo de llamas preñadas



Revelado de ADN para el grupo de llamas vacías (2 años)



ANEXO 3. Informe de resultados de análisis metagenómico



INFORME DE RESULTADOS N°004-2024

Muestra	Hisopado de fluidos vaginales de llama	Tipo de Servicio	Extracción de ADN
Código de Muestras	1) A 2) B 3) C 4) D 5) E	6) 1 7) 2 8) 3 9) 4 10) 5	

1. Materiales y reactivos:

- Etanol grado molecular
- Kit de extracción: Genomic DNA from tissue (Marca: Macherey-Nagel, Lote: 2208-004)
- Microtubos de 1.5 mL y 0.2 mL
- Micropipeta de 10, 100, 200 y 1000 uL
- Tips para micropipeta de 10, 100, 200 y 1000 uL
- Agitador vórtex (Marca: DLab, código: MX-S)
- Centrifuga (Marca: AHN myLab® 15000 rpm)
- Cabina de Bioseguridad A2 tipo II (Marca: BIOBASE)
- Baño seco digital (Marca: Dlab)
- Kit para PCR (Producto: 5X Green GoTaq™ Flexi Buffer, Marca: Promega)
- Agua grado molecular
- Mini centrifuga/agitador vórtex FVL-2400N Combi-Spin (Marca: BioSan)
- Termociclador MiniPCR16 (Marca: Amplyus LLC)
- Sistema de Electroforesis Gelato (Marca: Amplyus LLC)
- GRS DNA Loading Buffer Blue (Marca: GRISP)
- Marcador molecular 1k pb (Marca: GRISP)
- Buffer TAE (Marca: Grisp)
- Agua Destilada.
- Horno microonda
- Balanza analítica (Marca: Biobase)

Luis Alberto Salcedo Mejía
Lic. en Biología
C.B.P. 16195

Emilio Althaus 576, Lince // proyectos@ugenomics.pe // 925 708 785 // www.ugenomics.pe



ANEXO 4. Declaración jurada de autenticidad de tesis.



Universidad Nacional
del Altiplano Puno



Vicerrectorado
de Investigación



Repositorio
Institucional

DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD DE TESIS

Por el presente documento, Yo Alan Alex Huarillocla Ticona,
identificado con DNI 70547501 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado
Medicina Veterinaria y Zootecnia

informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:
“ Caracterización de la Microbiota Vaginal de la
LLama (Lama glama) Mediante el Analisis
del Gen 16S ”

Es un tema original.

Declaro que el presente trabajo de tesis es elaborado por mi persona y **no existe plagio/copia** de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación (tesis, revista, texto, congreso, o similar) presentado por persona natural o jurídica alguna ante instituciones académicas, profesionales, de investigación o similares, en el país o en el extranjero.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el trabajo de investigación, por lo que no asumiré como tuyas las opiniones vertidas por terceros, ya sea de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o Internet.

Asimismo, ratifico que soy plenamente consciente de todo el contenido de la tesis y asumo la responsabilidad de cualquier error u omisión en el documento, así como de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a las disposiciones legales vigentes y a las sanciones correspondientes de igual forma me someto a las sanciones establecidas en las Directivas y otras normas internas, así como las que me alcancen del Código Civil y Normas Legales conexas por el incumplimiento del presente compromiso

Puno 02 de Diciembre del 2024


FIRMA (obligatoria)



Huella



ANEXO 5. Autorización para el depósito de tesis o trabajo de investigación en el Repositorio institucional.



Universidad Nacional
del Altiplano Puno



Vicerrectorado
de Investigación



Repositorio
Institucional

AUTORIZACIÓN PARA EL DEPÓSITO DE TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Por el presente documento, Yo Alan Alex Huarillolla Ticona,
identificado con DNI 70547501 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado

Medicina Veterinaria y Zootecnia

informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:

“ Caracterización de la Microbiota Vaginal de la Llama (Lama glama) Mediante el Análisis del 6 em 16 S ”

para la obtención de Grado, Título Profesional o Segunda Especialidad.

Por medio del presente documento, afirmo y garantizo ser el legítimo, único y exclusivo titular de todos los derechos de propiedad intelectual sobre los documentos arriba mencionados, las obras, los contenidos, los productos y/o las creaciones en general (en adelante, los “Contenidos”) que serán incluidos en el repositorio institucional de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

También, doy seguridad de que los contenidos entregados se encuentran libres de toda contraseña, restricción o medida tecnológica de protección, con la finalidad de permitir que se puedan leer, descargar, reproducir, distribuir, imprimir, buscar y enlazar los textos completos, sin limitación alguna.

Autorizo a la Universidad Nacional del Altiplano de Puno a publicar los Contenidos en el Repositorio Institucional y, en consecuencia, en el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto, sobre la base de lo establecido en la Ley N° 30035, sus normas reglamentarias, modificatorias, sustitutorias y conexas, y de acuerdo con las políticas de acceso abierto que la Universidad aplique en relación con sus Repositorios Institucionales. Autorizo expresamente toda consulta y uso de los Contenidos, por parte de cualquier persona, por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales de autor y derechos conexos, a título gratuito y a nivel mundial.

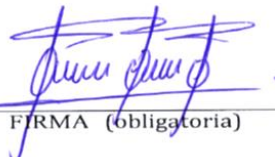
En consecuencia, la Universidad tendrá la posibilidad de divulgar y difundir los Contenidos, de manera total o parcial, sin limitación alguna y sin derecho a pago de contraprestación, remuneración ni regalía alguna a favor mío; en los medios, canales y plataformas que la Universidad y/o el Estado de la República del Perú determinen, a nivel mundial, sin restricción geográfica alguna y de manera indefinida, pudiendo crear y/o extraer los metadatos sobre los Contenidos, e incluir los Contenidos en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.

Autorizo que los Contenidos sean puestos a disposición del público a través de la siguiente licencia:

Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. Para ver una copia de esta licencia, visita: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

En señal de conformidad, suscribo el presente documento.

Puno 02 de Diciembre del 2024


FIRMA (obligatoria)



Huella