

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE AGRONOMIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



TESIS

**CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA BACTERIANA FECAL
EN CRÍAS DE LLAMAS (*Lama glama*) SANAS Y CON PROCESO DE
DIARREA**

PRESENTADO POR:

Br. JULIO CESAR ALARCON MARAS

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL
DE MÉDICO VETERINARIO**

ASESORES:

PhD. MVZ. CAROLA MELO ROJAS.

Dra. FRANCISCA CALLAÑAUPA
MENDOZA.

MSc. MVZ. CELSO ZAPATA COACALLA.

FINANCIADO POR:

FONDOS CANON – UNSAAC

CUSCO – PERÚ

2025



Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

INFORME DE SIMILITUD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-321-2025-UNSAAC)

El que suscribe, el **Asesor** Carola Trinidad Melo Rojas
..... quien aplica el software de detección de similitud al
trabajo de investigación/tesis titulada: Caracterización de la microbrota
..... bacteriana fecal en crías de llamas (Lama glama) sanas y
..... con proceso de diarrea

Presentado por: Bach. Julio Cesar Alarcon Naran DNI N° 47779939;
presentado por: DNI N°:
Para optar el título Profesional/Grado Académico de Médico Veterinario

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

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

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No sobrepasa el porcentaje aceptado de similitud.	<u>X</u>
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las subsanaciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, conforme al reglamento, quien a su vez eleva el informe al Vicerrectorado de Investigación para que tome las acciones correspondientes; Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de Asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto**
las primeras páginas del reporte del Sistema de Detección de Similitud.

Cusco, 31 de Julio de 2026

[Firma]
Firma

[Firma]
Francisca Callañaupa M.
23910514
ORCID: 0000-0002-0935-
4046



Firmado digitalmente por:
ZAPATA COACALLA Celso FAD
20145406170 hard
Motivo: Soy el autor del
documento
Fecha: 22/08/2026 29:29:00-0800

Post firma Carola Trinidad Melo Rojas
Nro. de DNI 41821317
ORCID del Asesor 0000-0001-9626-6791

Se adjunta:

- Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
- Enlace del Reporte Generado por el Sistema de Detección de Similitud: **oid:** 27259:611009955

Julio César Alarcón Maras

CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA BACTERIANA FECAL EN CRÍAS DE LLAMAS (*Lama glama*) SANAS Y CON PROCESO ...

 Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::27259:611009955

Fecha de entrega

28 jul 2026, 8:45 p.m. GMT-5

Fecha de descarga

28 jul 2026, 9:02 p.m. GMT-5

Nombre del archivo

Tesis modificada para repositorio.docx

Tamaño del archivo

4.5 MB

133 páginas

25.492 palabras

144.685 caracteres

8% 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 12 palabras)
- Trabajos entregados

Fuentes principales

- 8%  Fuentes de Internet
- 2%  Publicaciones
- 0%  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.

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico con todo mi amor y cariño a mis familiares, en especial a mi madre Sra. Jacinta Paula Maras y también mi hermana Yeziela pues sin ellos no lo habría logrado, su apoyo incondicional tanto moralmente y económicamente han sido pilar fundamental en mi formación académica para poder llegar a ser un profesional en esta rama. Estoy infinitamente agradecido por que gracias a ellos que me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, principios y toda mi formación. Y a mi pareja Damaris Jael Cjuno ya que me brindó su apoyo incondicional y ejemplo de perseverancia y lucha para alcanzar mis metas, y en especial a mi hijo IZAM MANOLO por ser mi mayor motivación y fortaleza, que gracias a ti mi pequeño sé que no existen barreras agradecida infinitamente por enseñarme a ser fuerte y siempre seré feliz de ser tu padre.

Julio Cesar Alarcon.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco-filial Canchis por haberme acogido en sus aulas y ser parte de ella para poder profesionalizarme en la carrera de Medicina Veterinaria, también agradezco a los diferentes docentes que me brindaron su conocimiento para seguir adelante con mis estudios día a día. De la misma forma se agradece al personal del Centro experimental la Raya de la UNA Puno y del Centro experimental CICAS la Raya de la UNSAAC Cusco por haber permitido realizar el recojo de muestras, importante para llevar a cabo nuestro trabajo de investigación. También a mis asesores de tesis, Dra. MVZ. CAROLA MELO ROJAS, Dra. FRANCISCA CALLAÑAUPA MENDOZA, M.Sc. MVZ. CELSO ZAPATA COACALLA por su apoyo y asesoramiento en el desarrollo del trabajo de investigación, demostrando paciencia y guía durante el tiempo de desarrollo de la tesis. Finalmente agradezco a Dios y a mis familiares, por su fuerza, su lucha y su amor incondicional ya que han sido pilar fundamental para la culminación de mi carrera profesional.

Julio Cesar Alarcon

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
GLOSARIO.....	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1. Descripción del problema.....	3
1.2. Formulación del problema.....	4
1.2.1. Problema general	4
1.2.2. Problemas específicos	4
CAPÍTULO II.....	5
HIPÓTESIS.....	5
CAPÍTULO III	6
OBJETIVOS	6

3.1.	Objetivo general	6
3.2.	Objetivos específicos:.....	6
CAPÍTULO IV.....		7
MARCO TEÓRICO.....		7
4.1.	Antecedentes.....	7
4.2.	Bases teóricas	11
4.2.1.	<i>Importancia de los camélidos sudamericanos.....</i>	<i>11</i>
4.2.2.	<i>Anatomía y fisiología digestiva de los camélidos sudamericanos</i>	<i>13</i>
4.2.3.	<i>Microbiota gastrointestinal en camélidos sudamericanos</i>	<i>18</i>
4.2.4.	<i>Diarrea en crías de llamas</i>	<i>21</i>
4.2.5.	<i>Secuenciación y análisis bioinformático</i>	<i>23</i>
4.2.6.	<i>Gen ARNr 16S</i>	<i>24</i>
CAPÍTULO V		29
METODOLOGIA DE INVESTIGACION		29
5.1.	Ubicación.....	29
5.2.	Duración del estudio.....	29
5.3.	Población de estudio	29
5.4.	Materiales	30
5.4.1.	<i>Materiales para el muestreo de heces</i>	<i>30</i>
5.4.2.	<i>Materiales para la extracción y cuantificación de ADN.....</i>	<i>30</i>
5.4.3.	<i>Equipos para la extracción de ADN.....</i>	<i>31</i>
5.4.4.	<i>Equipos para la cuantificación del ADN.....</i>	<i>31</i>

5.4.5.	<i>Reactivos de la secuenciación.</i>	32
5.4.6.	<i>Equipos para la secuenciación de ADN</i>	32
5.5.	Metodología	33
5.5.1.	<i>Flujograma de trabajo</i>	33
5.5.2.	<i>Obtención de muestras fecales</i>	34
5.5.3.	<i>Extracción de ADN</i>	35
5.5.4.	<i>Cuantificación de ADN purificado</i>	36
5.5.5.	<i>Preparación de amplicones</i>	37
5.5.6.	<i>Cálculo de la concentración de ADN</i>	40
5.5.7.	<i>Preparación de librerías</i>	40
5.5.8.	<i>Cuantificación de librerías por qPCR</i>	45
5.5.9.	<i>Enriquecimiento de librería</i>	49
5.5.10.	<i>Secuenciación de las librerías</i>	58
5.5.11.	<i>Análisis bioinformático</i>	62
CAPÍTULO VI		63
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		63
6.1.	Análisis de los resultados de la composición de la microbiota fecal en crías de llamas sanas	63
6.1.1.	Según Phylum	63
6.1.2.	Según clase	66
6.1.3.	Según orden	69
6.1.4.	Según familia	70

6.1.5.	Según género	73
6.2.	Análisis de resultados de la composición de la microbiota bacteriana fecal en crías de llamas con proceso de diarrea	78
6.2.1.	Según phylum	78
6.2.2.	Según clase	79
6.1.3.	Según orden	80
6.2.3.	Según familia	81
6.2.4.	Según género	82
CAPITULO VII		89
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		89
CAPÍTULO VIII		91
BIBLIOGRAFÍA		91
ANEXOS		111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Cebadores (primers) directos e inversos específicos de la región V y temperatura de hibridación para la PCR</i>	28
Tabla 2 <i>Preparación y amplificación de muestras</i>	38
Tabla 3 <i>Programación del termociclador</i>	38
Tabla 4 <i>Reparación y purificación de pool de amplicones</i>	41
Tabla 5. <i>Ligación y reparación.</i>	43
Tabla 6. <i>Programación del termociclador.</i>	44
Tabla 7. <i>Diluciones seriadas de ADN control.</i>	46
Tabla 8. <i>Dilución de muestras de ADN.</i>	47
Tabla 9. <i>Máster mix para qPCR.</i>	48
Tabla 10. <i>Ejecución del qPCR en el equipo Quant Studio.</i>	48
Tabla 11. <i>Preparación de la solución de amplificación.</i>	50
Tabla 12. <i>Solución de MELT OFF</i>	55
Tabla 13. <i>Llenado de pocillos (8 well strip tube)</i>	56
Tabla 14. <i>Composición de la microbiota bacteriana fecal en crías de llamas sanas</i>	75
Tabla 15. <i>Composición de la microbiota bacteriana fecal en crías de llamas sanas (Continuación)</i>	76
Tabla 16. <i>Composición de la Microbiota bacteriana fecal en crías de llamas sanas (Continuación)</i>	77
Tabla 17. <i>Composición de la microbiota bacteriana fecal en crías de llamas con diarrea.</i>	86

Tabla 18. <i>Composición de la microbiota bacteriana fecal en crías de llamas con diarrea</i> (continuación).....	87
Tabla 19. <i>Composición de la microbiota bacteriana fecal en crías de llamas con diarrea</i> (continuación).....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Subunidades del ribosoma bacteriano.</i>	25
Figura 2. <i>Regiones conservadas y regiones variables del gen ARNr 16s</i>	27
Figura 3. <i>Diagrama de flujo de la metodología de trabajo.</i>	33
Figura 4. <i>Plan de corrida del equipo ion one touch 2</i>	49
Figura 5. <i>Fin de la corrida del equipo OT2.</i>	51
Figura 6. <i>Tubo de recuperación con la muestra.</i>	52
Figura 7. <i>Tira de 8 pocillos (8-well-strip tube)</i>	55
Figura 8. <i>Colocado de 8-strip tube en el instrumento ES.</i>	56
Figura 9. <i>Abundancia relativa (%) consensuada de los principales phylum de bacterias en muestras fecales de cría de llama sana.</i>	63
Figura 10. <i>Abundancia relativa (%) consensuada de las principales clases de bacterias en muestras fecales de cría de llama sana.</i>	67
Figura 11. <i>Abundancia relativa (%) consensuada a nivel de orden de las principales bacterias en muestras fecales de cría de llama sana.</i>	69
Figura 12. <i>Abundancia relativa (%) consensuada de las principales familias de bacterias en muestras fecales de crías de llamas sanas.</i>	71
Figura 13. <i>Abundancia relativa (%) consensuada de los principales géneros de bacterias en muestras fecales de cría de llama sana.</i>	73
Figura 14. <i>Abundancia relativa (%) consensuada de los principales phylum de bacterias en muestras fecales de cría de llama con diarrea.</i>	78
Figura 15. <i>Abundancia relativa (%) consensuada de las principales clases de bacterias en muestras fecales de cría de llama con diarrea.</i>	80

Figura 16. <i>Abundancia relativa (%) consensuada a nivel de orden de las principales bacterias en muestras fecales de cría de llama con diarrea.</i>	81
Figura 17. <i>Abundancia relativa (%) consensuada de las principales familias de bacterias en muestras fecales de cría de llama con diarrea.</i>	82
Figura 18. <i>Abundancia relativa (%) consensuada de los principales géneros de bacterias en muestras fecales de cría de llama con diarrea.</i>	83

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. <i>Tabla de datos de animales muestreados (muestras fecales de crías de llamas de 1 a 3 meses de edad).</i>	111
Anexo 2. <i>Foto de trabajo en campo, majada de llamas sector de "Machuhuasi" en el centro experimental la Raya Puno. Para recojo de muestras.</i>	112
Anexo 3. <i>Foto de trabajo en campo, majada de llamas sector de "tambo" del centro experimental la Raya UNSAAC. Para recojo de muestras.</i>	112
Anexo 4. <i>Foto. método de extracción de muestras fecales diarreicas en crías de llamas.</i>	112
Anexo 5. <i>Foto de identificación y almacenamiento de las muestras a -20C.</i>	112
Anexo 6. <i>Foto esterilización de los materiales para la extracción de ADN genómico, en la campana extractora.</i>	113
Anexo 7. <i>Foto del Kit de extracción de ADN genómico pure link TM.</i>	113
ANEXO 8. <i>Bead Tubes for PureLinkTM Microbiome DNA Purification Kit</i>	113
Anexo 9. <i>Foto de equipo heat o baño seco a 65°C.</i>	113
Anexo 10. <i>Foto de equipo qubit® 2.0 fluorometer (fluorómetro).</i>	113
Anexo 11. <i>Foto de laboratorio. Extracción de ADN genómico de las muestras de heces, en el laboratorio de genética molecular de medicina veterinaria UNSAAC.</i>	114
Anexo 12. <i>Foto corrida del termociclador para las librerías.</i>	114
Anexo 13. <i>Foto qpcr en el equipo quant studio para Cuantificación de librerías.</i>	114
Anexo 14. <i>Foto encendido del equipo ion one touch 2 para Enriquecimiento de las librerías:</i>	114
Anexo 15. <i>Foto de trabajo de laboratorio, preparación de librerías genómicas.</i>	115

Anexo 16. <i>Foto de recuperación de las librerías en el equipo de Ion ONE TOUCH ES.</i>	115
Anexo 17. <i>Foto de Chip 520 usado retirado del secuenciador para cambiar el nuevo. ..</i>	115
Anexo 18. <i>Foto del equipo centrifuga con el que se centrifugó el chip con el adaptador de chips ion minifuge.....</i>	115
Anexo 19. <i>Foto de preparación del secuenciador ion S5.....</i>	116
Anexo 20. <i>Foto del secuenciador S5 encendido.</i>	116
Anexo 21. <i>Foto trabajo de laboratorio. secuenciación de librerías en curso en el S5. ...</i>	116
Anexo 22. <i>Foto. Cargado de archivos en el servidor de ion reporter con el secuenciador encendido.....</i>	116
Anexo 23 <i>Tabla de abundancias OTU de muestras de crías de llamas con diarrea.....</i>	117

GLOSARIO

CICAS:	Centro de investigación de Camélidos sudamericanos de la universidad nacional de San Antonio Abad del Cusco.
ARNr16S:	Ácido ribonucleico ribosomal 16S
CLC Genomic Workbench:	Programa para analizar y visualizar datos de secuenciación de próxima generación.
CSA:	Camélidos Sudamericanos
C1, C2 y C3:	Indica los tres compartimientos del estómago de la llama
NGS:	Secuenciación de nueva generación.
PCR en emulsión:	Método para la amplificación de uno o más ácidos nucleicos sobre una perla.
ASM:	Sociedad Americana de Microbiología.
bp:	Pares de bases (base pairs en inglés)
Pool:	Conjunto
Bead tubes:	Tubos de microesferas usados en el kit de purificación de ADN del microbioma PureLink™

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue caracterizar la microbiota bacteriana fecal en crías de llamas sanas y con proceso de diarrea, identificando microorganismos en mayor abundancia bajo esas dos condiciones. La investigación se realizó en el Centro experimental La Raya de la UNA Puno y del Centro de investigación de Camélidos sudamericanos (CICAS) de la UNSAAC Cusco. Se colectaron muestras fecales de 11 crías de llamas (6 sanas y 5 con diarrea, crías nacidas en diciembre 2021 a abril de 2022) y se realizó la secuenciación del gen ARNr16S utilizando la tecnología de secuenciación masiva (Ion Torrent). El análisis bioinformático se realizó con el software CLC Genomic Workbench 24.0.2, utilizando el flujo de trabajo de CLC Microbial genomic Module 23.1.1. En crías de llamas sanas, se observó una mayor abundancia de Phylum Firmicutes (86.2%) y Bacteroidota (8.6%), mientras en crías con diarrea hubo un aumento significativo de proteobacteria (30%) y una disminución de Firmicutes (42%). Los resultados sugieren que la diarrea en crías de llamas está asociada con una disbiosis intestinal, caracterizada por una reducción de bacterias beneficiosas y un aumento de bacterias patógenas

Palabras clave: Microbiota fecal, Bacterias, Diarrea, Llamas.

ABSTRACT

The objective of this research was to characterize the fecal bacterial microbiota in healthy llama crias and those with diarrhea, identifying microorganisms with greater abundance under these two conditions. The research was conducted at the La Raya Experimental Center of UNA Puno and the South American Camelid Research Center (CICAS) of UNSAAC Cusco. Fecal samples were collected from 11 llama crias (6 healthy and 5 with diarrhea, crias born from December 2021 to April 2022), and 16S rRNA gene sequencing was performed using massive parallel sequencing technology (Ion Torrent). Bioinformatic analysis was carried out with CLC Genomic Workbench 24.0.2 software, using the CLC Microbial Genomics Module 23.1.1 workflow. In healthy llama crias, a higher abundance of Phylum Firmicutes (86.2%) and Bacteroidota (8.6%) was observed, while in crias with diarrhea there was a significant increase in Proteobacteria (30%) and a decrease in Firmicutes (42%). The results suggest that diarrhea in llama crias is associated with intestinal dysbiosis, characterized by a reduction of beneficial bacteria and an increase of pathogenic bacteria.

Keywords: Fecal microbiota, Bacteria, Diarrhea, Llamas.

INTRODUCCIÓN

En el Perú por encima de los 4000 msnm. la actividad agrícola es casi imposible por la reducida capa de suelo, la población de llamas juega un rol importante como medio de transporte y fuente de proteína. En el Cusco la población de llamas ha venido reduciéndose, es así que la Dirección Regional de Agricultura de Cusco indica que entre 1994 y 2018 se muestra una reducción de 67% (Minaya, 2023). Una de las causas son la elevada morbilidad y mortalidad de crías según varios estudios (Espada et al., 2010; Jiménez et al., 2010).

A nivel fisiopatológico la llama, como camélido, presenta un sistema digestivo altamente eficiente que depende de microorganismos que desempeñan un papel crucial en la degradación de forrajes fibrosos, lo que mejora la eficiencia alimentaria y permite el acceso a la energía y los nutrientes del material vegetal que consumen (Carhuapoma-Delacruz et al., 2022). Estos microorganismos son denominados microbiota, en donde la microbiota intestinal normal desempeña funciones específicas en el metabolismo de nutrientes del huésped, el metabolismo de xenobióticos y fármacos, el mantenimiento de la integridad estructural de la barrera de la mucosa intestinal, la inmunorregulación y la protección frente a patógenos. Su estudio es complicado con las técnicas convencionales; sin embargo, con los avances en la tecnología de secuenciación del genoma y la bioinformática, ha permitido a los científicos estudiar exhaustivamente estos microorganismos y sus funciones, así como las interacciones microbio-huésped tanto en la salud como en la enfermedad. (Jandhyala, 2015).

La evidencia científica indica que la microbiota digestiva en rumiantes no solo influye directamente en el equilibrio energético del animal (Shabat et al., 2016), sino que también se han descrito una mayor actividad microbiana en llamas en comparación con otros rumiantes en el ámbito de la fisiología digestiva (Dulphy et al., 1997). Se sabe además por

otra parte, que la microbiota de crías de rumiantes durante eventos diarreicos presenta características distintivas que difieren significativamente de las de individuos sanos (Xi et al., 2021; Zhong et al., 2022; Wang et al., 2023). Pese a estos avances, la mayoría de la investigación se ha centrado en rumiantes (vacunos, ovinos). Existe, por lo tanto, una brecha de conocimientos crítica en la microbiota intestinal en crías de llamas (*Lama glama*).

En este contexto, la presente investigación plantea caracterizar la microbiota fecal en crías de llamas (*Lama glama*) sanas y con procesos diarreicos.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción del problema

La crianza de los camélidos sudamericanos es una parte fundamental para la economía de los pueblos andinos, gracias a la variedad de productos y subproductos que estos ofrecen a sus criadores (Avilés et al., 2018).

La alta mortalidad en crías de camélidos sudamericanos (CSA), también tiene un gran impacto económico, ya que el 85% está en manos de comunidades campesinas en extrema pobreza (Morales et al., 2016) y que son el único medio de subsistencia para muchas familias andinas (Rosadio et al., 2012; Ameghino y De Martini, 1991). Por lo que Las pérdidas se traducen directamente en inseguridad alimentaria y perpetuación de la pobreza (FAO, 2005).

La mortalidad neonatal en camélidos sudamericanos (CSA) constituye uno de los principales factores limitantes para la productividad de estos animales, que representan el único medio de subsistencia para comunidades andinas que habitan por encima de los 3,500 metros sobre el nivel del mar (Rosadio et al., 2012; Ameghino y De Martini, 1991)

Existen datos epidemiológicos críticos que indican una Mortalidad del 50-80% en crías durante los primeros 3-4 meses de vida en condiciones del altiplano (Espada et al., 2010; Jiménez et al., 2010), en contraste dramático con la mortalidad del 2.1% reportada en condiciones controladas de países desarrollados (Keane et al., 2022), y pérdidas cíclicas cada 5-6 años, con variaciones del 15-20% hasta más del 50% (Rosadio et al., 2012).

Las enfermedades infecciosas constituyen la principal causa de mortalidad neonatal, asociadas principalmente a fallos en la transferencia de inmunidad maternal (Espada et al., 2010; Jiménez et al., 2010). Las tres causas más importantes son la enterotoxemia, diarrea neonatal y procesos respiratorios agudos como segunda causa más importante (Cirilo et al.,

2012). La diarrea es una de las enfermedades más comunes y críticas, con un impacto considerable en la salud de las crías y en la economía de los pequeños productores (Pinto et al., 1010).

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general

¿Como está compuesto la microbiota bacteriana fecal en crías de llamas sanas y con proceso de diarrea?

1.2.2. Problemas específicos

¿Cuáles son los principales microorganismos presentes en la microbiota bacteriana fecal de crías de llamas sanas?

¿Cuáles son los principales microorganismos presentes en la microbiota bacteriana fecal de crías de llamas con proceso de diarrea?

CAPITULO II

HIPÓTESIS

La microbiota bacteriana fecal de crías de llamas sanas será diferente a la microbiota bacteriana fecal de crías de llamas con proceso de diarrea.

CAPITULO III

OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Caracterizar la microbiota bacteriana fecal en crías de llamas, tanto sanas y con proceso de diarrea.

3.2. Objetivos específicos:

Determinar la composición de la microbiota bacteriana fecal en crías de llamas sanas.

Determinar composición de la microbiota bacteriana fecal en crías de llamas con proceso de diarrea.

CAPÍTULO IV

MARCO TEÓRICO

4.1. Antecedentes

Samsudin et al. (2011) investigaron la diversidad de la comunidad bacteriana del intestino anterior (C1, C2 y C3) en camellos dromedarios (*Camelus dromedarius*) en Australia Central. Utilizando análisis de secuencias de genes de ARNr 16S del contenido del intestino anterior de 12 camellos salvajes adultos alimentados con vegetación nativa, encontraron que la mayoría de las bacterias pertenecían al Phylum Firmicutes (67% del total de clones), particularmente en las clases Clostridia, Bacilli y Mollicutes. Los Bacteroidetes representaron el 25% de las bacterias, mayoritariamente de la familia Prevotellaceae. Otros filos identificados incluyeron Actinobacteria, Chloroflexi, Cynophyta, Lentisphaerae, Planctomycetes, Proteobacteria y Spirochaetes. Además, se identificaron 11 géneros de bacterias cultivadas como *Brevundimonas sp.*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella sp.* y *Ruminococcus flavefaciens*. Un hallazgo importante fue que el 97% de las unidades taxonómicas operativas (OTU) estaban solo débilmente relacionadas con secuencias conocidas en bases de datos públicas, indicando una alta novedad en el entorno del intestino anterior.

Cerón (2014) investigó la diversidad microbiana del primer compartimento (C1) del sistema digestivo de la llama (*Lama glama*), con el objetivo de conocer los microorganismos presentes en C1 provenientes de dos zonas geográficas distintas. Para su estudio utilizó varias estrategias, como la cuantificación de bacterias anaerobias totales, bacterias celulolíticas y amilolíticas, así como ácidos grasos volátiles y amoníaco. Se aislaron bacterias anaerobias estrictas mediante el método de "roll tube", realizaron secuencias parciales y pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para detectar bacterias principales en el C1. La composición bacteriana se determinó mediante genotecas de clones

ARNr 16S y para bacterias fibrolíticas. La diversidad de arqueas metanogénicas se analizó a través de genotecas ARNr 16S y del gen *mcrA*. Los resultados mostraron que las llamas de Jujuy presentaron valores superiores de bacterias y amoníaco en comparación con las de Buenos Aires, y que los aislamientos bacterianos correspondían principalmente al filum Firmicutes. Se identificaron nuevas especies bacterianas y se encontró una alta diversidad de microorganismos anaerobios en C1 que puede explicar la supervivencia de las llamas en condiciones adversas, especialmente con pasturas fibrosas de baja calidad.

Siever et al. (2017) aislaron e identificaron en agar MacConkey y mediante pruebas bioquímicas convencionales a la bacteria *Escherichia coli* con un porcentaje de 52% de la población total de crías de alpaca menores de un año con y sin diarrea; 43 cepas de individuos con diarrea (55%) y 35 cepas de individuos sin diarrea (45%) a partir de hisopados rectales de 150 crías de alpaca con y sin diarrea provenientes de Huancavelica.

Carroll et al. (2019) realizaron tres estudios utilizando genes de ARNr 16S, mediante secuenciación de Illumina para estudiar la microbiota intestinal de alpacas alimentadas con diferentes forrajes, a partir de muestras directas de digestión. Primero, examinaron el compartimento 1 (C1), duodeno, yeyuno, íleon, ciego e intestino grueso (LI) de alpacas alimentadas con una dieta de heno de pasto (GH; festuca alta) o heno de alfalfa (AH) durante 30 días. Segundo, realizaron un estudio del C1 de alpacas alimentadas con unas dietas de 2 semanas de heno de pasto mixto (MGH) suplementadas con ~25% cebada seca, quinua, amaranto o harina de soja. Tercero, examinaron diferencias microbianas de alpacas con condición corporal normal versus mala condición corporal. Sus resultados indican, mayor abundancia de Firmicutes en el compartimento (C1), duodeno, yeyuno, íleon, ciego e intestino grueso (LI); Bacteroidetes en el C1 y el intestino distal; Fibrobacteres y Spirochaetes en el C1; y Actinobacteria en el intestino delgado. La alimentación con suplemento dietético de dos semanas con MGH fue insuficiente para alterar

significativamente su composición de microbiota del C1. No se encontraron evidencia de que la presencia o abundancia de OTU microbianos varíe con la condición corporal de la alpaca.

Klein-Jöbstl et al. (2019) examinaron repetidamente muestras fecales de terneros durante los dos primeros días de vida mediante secuenciación NGS del gen ARNr 16S. Además, muestras de la boca de los terneros y de la vagina, el calostro y las heces de las madres para evaluar las posibles fuentes de la microbiota fecal de los terneros. La microbiota fecal del ternero presentó una alta variabilidad durante las primeras 48 horas posparto. Durante los dos primeros días de vida, la microbiota fecal del ternero fue claramente distinta de la microbiota fecal y del calostro de la madre. En contraste, la microbiota vaginal de la vaca y la microbiota fecal del ternero fueron más similares, lo que sugiere que parte de la microbiota fecal del ternero podría provenir de la inoculación a través del canal del parto.

Sicha et al. (2020) determinaron la presencia de *Escherichia coli* en 150 muestras de heces diarreicas recolectadas de crías de alpaca (*Vicugna pacos*) en la sierra central del Perú. Los aislamientos se realizaron directamente en agar MacConkey, las cepas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas estándar y se determinó la distribución de grupos filogenéticos mediante el método de Clermont. Sus resultados indican que *E. coli* estuvo presente en el 79,3% (119/150) de los animales con diarrea. Las cepas se clasificaron en grupos filogenéticos A, B1, B2 y D. 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.

Wang et al. (2022) realizó la caracterización de las comunidades microbianas a lo largo del tracto gastrointestinal en ganado cruzado. En este estudio, se recolectaron la digesta en diez regiones (incluyendo el rumen, retículo, omaso, abomaso, duodeno, yeyuno, íleon,

ciego, colon y recto) del tracto gastrointestinal (TGI) en tres novillas cruzadas Simmental × Holstein de 17 meses de edad, se extrajeron y amplificaron ADN microbiano para la secuenciación de las regiones V3-V4 del gen ARNr 16S. Sus resultados a nivel de composición taxonómica de la microbiota en el tracto gastrointestinal indican a nivel de filo, los filos bacterianos más dominantes en el estómago y el intestino grueso fueron Firmicutes y Bacteroidetes. Firmicutes también fue el filo más dominante en el intestino delgado, mientras que Bacteroidetes se encontró escasamente en el intestino delgado. A nivel de familia, Prevotellaceae, Peptostreptococcaceae y Ruminococcus fueron las bacterias más predominantes en el estómago, intestino delgado e intestino grueso, respectivamente. Además, Ruminococcaceae, junto con Lachnospiraceae y Christensenellaceae, se encontraron en todas las regiones del tracto gastrointestinal con una abundancia considerable.

Pacheco-Torres et al. (2022) describieron la diversidad y abundancia de bacterias en muestras fecales de bovinos en pastizales, recolectadas en la Reserva de la Biosfera de Mapimí en la parte central del desierto chihuahuense. Las muestras fecales se analizaron mediante secuenciación masiva de siguiente generación de alto rendimiento utilizando la V3-V4 del ARNr 16S en Miseq de Illumina. En sus resultados identificaron un total de 17 filos, 24 clases, 33 órdenes, 50 familias, 281 géneros y 297 especies. Firmicutes (88.9%) y Verrucomicrobia (6.4%) fueron los filos más abundantes. Los géneros más abundantes fueron Sporobacter, PAC000748_g (géneros de la familia Ruminococcaceae) y Eubacterium_g23. También registraron tres géneros (*Clostridium*, *Corynebacterium* y *Fusobacterium*) y una especie (*Campylobacter fetus*) de bacterias bovinas potencialmente patógenas.

Frias (2023), estudió el microbioma cecal en cuyes de las razas Inti, Perú y Andina mediante metagenómica (regiones V3-V4 del ARNr 16S), analizando el efecto de la raza y

el ayuno (24 h). No hubo diferencias por raza, pero el ayuno afectó la diversidad microbiana. Dominaron Firmicutes (58,37%) y Bacteroidetes (27,99%), con géneros (*Ruminococcus*, *Prevotella*, *Fibrobacter*) y especies (*R. flavefaciens*, *R. albus*, *P. ruminicola*, etc.) clave en la degradación de fibra.

Coila et al. (2023) aislaron y caracterizaron las bacterias anaerobias del compartimento 1 (C1) del tracto digestivo de la alpaca a través de pruebas convencionales (cultivos en jarras de anaerobiosis) y bioquímicas (catalasa, oxidasa, prueba Kliger, prueba citrato de Simmons y prueba de medio SIM), para lo cual se utilizaron 34 muestras del contenido del compartimento C1, procedente de cuatro alpacas machos, raza Huacaya destinadas a camal. Como resultado del estudio, se lograron aislar e identificar cinco cepas anaeróbicas: dos cepas a *Ruminococcus sp.*, dos cepas a *Fibrobacter sp.* y una cepa a *Butyrivibrio sp.*

Zapata et al. (2024) asociaron diarrea en crías de alpaca con alteraciones en la microbiota fecal (secuenciación V3-V4 del ARNr 16S). Las alpacas diarreicas mostraron menor diversidad microbiana y mayor presencia de Verrucomicrobiae, junto con patógenos como *Clostridium spiroforme* y *Bacteroides fragilis*. Los filos dominantes fueron Firmicutes, Verrucomicrobiota y Bacteroidota (80% de la microbiota).

4.2. Bases teóricas

4.2.1. Importancia de los camélidos sudamericanos

La familia Camelidae son animales herbívoros, se incluye a los camélidos del viejo mundo, representados por el camello dromedario (de una joroba) (*Camelus dromedarius*) y el camello bactriano (de dos jorobas) (*Camelus bactrianus*), así como a los camélidos del Nuevo Mundo, también conocidos como camélidos sudamericanos (CSA), que consisten en llamas (*Lama glama*), alpacas (*Vicugna pacos*), guanacos (*Lama guanicoe*) y vicuñas (*Vicugna vicugna*) (Kishore et al., 2024). Taxonómicamente, los camélidos pertenecen al

reino animal Phylum chordata, Subphylum vertebrata, Clase Mammalia, subclase Eutherios, orden Artiodactyla, suborden Tylopoda, y familia *Camelidae* (Vilá, 2012).

El Perú es el principal país con la mayor población de alpacas y vicuñas y, el segundo en población de llamas (Yucra, 2017). Si bien las llamas y alpacas están siendo valorados en sus países de origen, por los recursos que estos ofrecen, no siempre esta valoración incluye a los pastores andinos como los genuinos beneficiarios del uso de la especie. En los años ochenta y noventa los gobiernos neoliberales, han exportado numerosos camélidos domésticos desde los países andinos a los países centrales, generando hasta hoy, una creciente presencia extranjera de camélidos sudamericanos. Por ejemplo, en Estados Unidos ya hay más de 400 mil con números equivalentes de llamas y alpacas; en Australia y Nueva Zelanda habitan alrededor de 200 mil camélidos domésticos, 75% de llamas; en Asia aproximadamente 30 mil con números semejantes de llamas y alpacas, y una cantidad menor en Europa (Vilá, 2015).

También es importante indicar que la población de llamas en el Cusco ha venido reduciéndose. Los datos de la Dirección Regional de Agricultura de Cusco entre 1994 y 2018 muestran una reducción de 67%, se puede atribuir a varios factores, como las altas tasas de mortalidad de crías y el impacto de la construcción de carreteras en zonas rurales que permitió el vínculo entre los mercados locales con mercados más grandes como los regionales (Minaya, 2023).

La población de llamas (*Lama glama*) juega un rol importante especialmente como medio de transporte y como principal fuente de proteína, variedad de productos y subproductos, siendo ésta la principal actividad económica de las familias altoandinas y ocupando un importante lugar en la economía nacional del Perú (Minaya, 2023; Yucra, 2017; Avilés et al., 2018). Es importante en la actividad de la economía nacional por que la actividad agrícola es casi imposible en zonas agrestes como la puna, sobre 4000 msnm, como

tampoco es posible la ganadería bovina y ovina, en forma eficiente y rentable. Como consecuencia de ello, el hábitat ecológico del altiplano determina que la ganadería esté constituida fundamentalmente por alpacas y llamas, y en pequeña escala ovinos y bovinos (Minaya, 2023). También las llamas son criadas para producción de fibra, animales de compañía, para llevar cargas en excursionismo, trabajar de cargador de palos de golf, como animales de tiro en carritos especialmente diseñados y como guardas de rebaños de ovejas.

4.2.2. Anatomía y fisiología digestiva de los camélidos sudamericanos

Los camélidos sudamericanos son animales que están mejor adaptados al duro ambiente de la región andina que otros rumiantes. Las llamas y las alpacas son pseudorrumiantes y se diferencian de los rumiantes en la morfología del estómago, la digestión, la selectividad de la dieta y la ingesta (San Martín & Bryant, 1989). El sistema digestivo comienza con la cavidad oral e incluye los labios, los dientes, las glándulas salivales y las estructuras faríngeas. Hay tres pares de glándulas salivales mayores (parótida, mandibular y sublingual) (Niehaus & Mora, 2022). La anatomía gástrica (estómago) de la alpaca (*Vicugna pacos*) está adaptada en gran medida al proceso fisiológico de rumia y a la degradación del contenido de las paredes celulares de las plantas (Vater et al., 2021). Los tractos gastrointestinales de todos los camélidos son básicamente los mismos excepto por el tamaño (Niehaus & Mora, 2022).

a) El estómago

El estómago se divide en tres compartimentos (C1, C2, C3): el proximal y el intermedio se asemejan al rumen y al retículo, respectivamente, mientras que el distal funciona de forma similar al abomaso, presentando regiones glandulares y no glandulares (Alzola et al., 2004)

El primer compartimiento se divide en saco craneal y caudal, con sáculos glandulares retraídos, mientras que el segundo compartimiento es reniforme, con paredes gruesas y una

mucosa glandular revestida por células profundas (Vallenas et al., 1971). El tercer compartimento es alargado y tubular, compuesto principalmente por glándulas gástricas y pilóricas (Alzola et al., 2004; Vallenas et al., 1971). Histológicamente, los compartimentos C1 y C2 presentan áreas con y sin glándulas, mientras que las regiones no glandulares están cubiertas por epitelio escamoso estratificado (Alzola et al., 2004). La motilidad del estómago de la llama se caracteriza por contracciones rítmicas que facilitan el movimiento de la digesta a través de los compartimentos, con una notable disminución del pH del compartimento C2 al C3, lo que indica una digestión eficaz (Heller et al., 1984). Esta singular estructura anatómica permite a las llamas procesar eficientemente su dieta fibrosa, lo que las distingue de los rumiantes (Vallenas et al., 1971).

Las llamas están mejor adaptadas a un clima árido que las alpacas, lo que se refleja en las proporciones de su sistema digestivo. Las cámaras de fermentación son más espaciales en comparación con las de las alpacas, esto permite una fermentación más eficiente de carbohidratos de difícil digestión (Vater et al., 2021).

b) Desarrollo del estómago de los camelidos sudamericanos

El desarrollo de los compartimentos estomacales en los camélidos sudamericanos es un proceso gradual que define la transición de una dieta láctea a una herbívora. Durante las primeras semanas de vida, el sistema digestivo de la cría está adaptado principalmente para el aprovechamiento de la leche materna; sin embargo, investigaciones indican que la superficie luminal y el pH de la mucosa gastrointestinal en crías de alpacas muestran cambios significativos durante este periodo para preparar el ambiente hacia la fermentación. Según Vásquez. et al. (2012), este ajuste en el pH de la mucosa es crítico para el establecimiento temprano de la microbiota, permitiendo que a medida que el animal comienza a ingerir pequeñas cantidades de forraje sólido, los compartimentos C1 y C2 incrementen su volumen y capacidad funcional, facilitando así la degradación de carbohidratos complejos que el

animal adulto procesará eficientemente mediante fermentación pregástrica (Vásquez. et al., 2012).

La maduración funcional de estos compartimentos no solo implica un crecimiento morfométrico, sino también una especialización celular y el establecimiento de la microbiota para la supervivencia del animal en ambientes altoandinos. En crías jóvenes, el desarrollo del estómago anterior (específicamente C1 y C2) influye directamente en la tasa de supervivencia, ya que un desarrollo temprano y saludable de estos compartimentos permite una colonización más diversa de arqueas metanogénicas y bacterias celulolíticas. De acuerdo con Ccanccapa et al. (2024), el líquido proveniente del estómago anterior juega un papel vital en el desarrollo y la supervivencia de las crías de alpaca Suri, sugiriendo que la madurez de estos compartimentos actúa como un catalizador para la estabilización de la microbiota intestinal, lo que a su vez permite que la cría alcance la autonomía nutricional del adulto al optimizar la extracción de energía a partir de pastos fibrosos de baja digestibilidad (Ccanccapa et al., 2024).

c) Intestino delgado

Las características anatómicas del duodeno, íleon y yeyuno de la llama están específicamente adaptadas para facilitar la digestión de una dieta herbívora. El duodeno presenta una ampolla única y un conducto hepatopancreático común, lo que mejora la eficiencia del transporte de bilis y enzimas pancreáticas, crucial para la descomposición de la materia vegetal fibrosa (Ghezzi et al., 2000). El yeyuno y el íleon poseen un mesenterio diferenciado, lo que les permite mayor movilidad y flexibilidad, esencial para el procesamiento de forraje voluminoso (Vater y Maierl, 2018). Además, la estructura del yeyuno se caracteriza por una gran superficie debido a la abundancia de vellosidades y microvellosidades, lo que favorece la absorción de nutrientes (Dehority, 2002). La morfología general del intestino de la llama, que incluye un colon espiral relativamente

grande, favorece un proceso de fermentación prolongado, lo que permite la descomposición y absorción eficaz de los carbohidratos complejos presentes en la materia vegetal (Chivers, 1989; Vater y Maierl, 2018).

El desarrollo del duodeno, íleon y yeyuno en neonatos de llama (*Lama glama*) exhibe características morfológicas y funcionales distintivas. Estudios indican que el duodeno presenta una estructura única del conducto hepatopancreático, que difiere de la de los rumiantes domésticos, lo que facilita procesos digestivos eficientes (Ghezzi et al., 2000). Las evaluaciones radiográficas revelan que el tiempo de tránsito gastrointestinal en las llamas neonatales es prolongado, con el contraste de bario moviéndose rápidamente a través del estómago y el intestino delgado proximal, pero mostrando un vaciamiento retardado en el colon ascendente (Timm et al., 1999). Además, el intestino delgado experimenta un desarrollo posnatal significativo, influenciado por factores hormonales como la tiroxina y los corticosteroides, que aumentan la actividad enzimática y la superficie mucosa (Thomson y Keelan, 1986). Esta fase del desarrollo es crucial, ya que el tracto gastrointestinal se adapta a los ambientes externos y comienza a procesar los nutrientes orales. La colonización microbiana desempeña un papel vital en la configuración de la función intestinal (Buddington y Sangild, 2011). En general, estos estudios subrayan la complejidad de la maduración gastrointestinal en los neonatos de llama, destacando la interacción entre la estructura anatómica, la regulación hormonal y las interacciones microbianas.

d) Intestino grueso

Las investigaciones indican que el tracto gastrointestinal de las llamas, incluyendo el intestino grueso, comparte similitudes funcionales con los rumiantes, como la absorción de líquidos y la secreción de enzimas, cruciales para una digestión eficaz y la absorción de nutrientes (Idalan et al., 2019). El intestino grueso desempeña un papel importante en la reabsorción de agua, vital para mantener la hidratación en estos animales, especialmente en

ambientes áridos (Idalan et al., 2019). Además, la estructura anatómica del sistema gastrointestinal, incluyendo el intestino grueso, está adaptada para procesar eficientemente el material vegetal fibroso, mostrando una reducción gradual del tamaño de las partículas de la digesta a medida que avanza por el tracto digestivo (Idalan et al., 2019). Esta adaptación es esencial para la dieta herbívora de la llama, ya que permite una óptima extracción de nutrientes y utilización de energía (Idalan et al., 2019).

El intestino grueso comprende el ciego, el colon y el recto, con funciones específicas en la digestión y la absorción de nutrientes. En las llamas neonatales, el tracto gastrointestinal, incluido el intestino grueso, presenta un tiempo de tránsito más largo para la digesta en comparación con los adultos, lo que indica una fase de desarrollo única en la que el sistema digestivo aún está madurando (Timm et al., 1999).

El ciego, en los camélidos es bastante pequeño (alrededor de 7 a 10 cm de largo en las alpacas adultas y de 15 a 20 cm en las llamas adultas) y suele contener un poco de material pastoso (Cebra, 2014).

El colon, en su porción ascendente suele ser tan grande como el ciego y, a menudo, más prominente. El recorrido del colon ascendente forma un espiral, que generalmente se centra sobre el abdomen ventral caudal a los compartimentos gástricos, o se extiende hasta el abdomen lateral derecho. El colon espiral tiene cinco asas centrípetas que progresan hacia adentro y luego se repliega sobre sí mismo en la flexura central. El inicio de las cinco asas centrífugas tiende a penetrar en la grasa y el tejido conectivo profundo de las asas internas, por lo que estas asas centrífugas suelen ser difíciles de visualizar. Si bien el colon espiral en su conjunto es muy móvil, el mesenterio entre las asas individuales mide solo de 0,5 a 1 cm de largo. A lo largo del colon ascendente, el diámetro luminal disminuye a aproximadamente el 20 % de su anchura original (de 5 cm en la unión cecocólica a 1 cm al final de la espiral

en una llama adulta). La reabsorción de agua en el colon espiral conduce a la producción de bolitas fecales formadas, que pueden palparse en las asas centrífugas distales (Cebra, 2014).

El colon transversal invierte su dirección cuatro veces más al discurrir dorsalmente, formando otra pequeña espiral y envolviendo la raíz mesentérica (de izquierda a derecha alrededor del frente) para entrelazarse con el duodeno. El colon descendente discurre caudalmente hacia el recto. Estas secciones del colon y el recto se sostienen sobre una inserción mesentérica muy corta. La porción craneal del colon generalmente está llena de material alimenticio pastoso que se deshidrata gradualmente para formar heces. Las heces pueden encontrarse hasta las asas centrífugas del colon espiral, pero con mayor frecuencia se encuentran solo en el colon transversal y descendente, y en el recto (Cebra, 2014).

4.2.3. *Microbiota gastrointestinal en camélidos sudamericanos*

a) Microbiota gastrointestinal

Stanchi (2009) indica que para entender a los microorganismos que causan las enfermedades hay que comprender el concepto de microbiota (microorganismo nativo o flora bacteriana). La microbiota es una comunidad diversa de microorganismos que juega un papel crucial en el mantenimiento del sistema inmunológico (Mejía et al., 2024). En el caso de la microbiota intestinal estaría conformado por microorganismos que habitan normalmente en el intestino y que están en constante interacción dinámica entre hospedador y microorganismo obteniendo un beneficio mutuo, por ejemplo: *E. coli* secreta vitamina K y ciertas vitaminas del grupo B, además previene la colonización de la mucosa intestinal por ciertos patógenos, compitiendo así por los sitios de adhesión o por los nutrientes esenciales. De esta manera la microbiota establece una relación estrecha con su hospedador, al que proporciona beneficios nutricionales, metabólicos e inmunológicos, entre otros (Margolles Barros, 2018).

Los microorganismos que forman parte de la microbiota intestinal cohabitan con los enterocitos en una relación simbiótica. Estos comensales intestinales ayudan predominantemente en el metabolismo de los nutrientes, el metabolismo de los fármacos, la prevención de la colonización de microorganismos patógenos y en la función de la barrera intestinal. Al mismo tiempo, el sistema inmunológico ha co-evolucionado para vivir en una relación de colaboración con la microbiota sana, al mismo tiempo que cumple su función de combatir los microorganismos patógenos invasivos (Jandhyala, 2015). La colonización de la capa externa de la mucosa del tracto gastrointestinal se da porque esta capa contiene glicanos que son una fuente de nutrientes necesaria para llevar a cabo el metabolismo bacteriano. Así mismo, la capa interna de la mucosa limita el hábitat de la microbiota mediante la producción de proteínas antimicrobianas y la protege de ser eliminada por la peristalsis. Este equilibrio delicado, puede ser alterado por mecanismos intrínsecos o extrínsecos, permite que las bacterias estimulen al sistema inmunológico, desencadenando respuesta inflamatoria que contribuye a patologías como las enfermedades inflamatorias intestinales y el desarrollo de cáncer, entre otras (Rescigno, 2017).

La microbiota gastrointestinal es esencial para mantener la salud general del huésped, en otras palabras, existe la capacidad para soportar cambios de estrés fisiológico que determinan el equilibrio de la microbiota intestinal. Un desequilibrio en la microbiota evento conocido como la disbiosis (cambio en la composición de las comunidades comensales y residentes en relación con la comunidad encontrada en individuos sanos), reduce la inmunidad, en lo que puede ocasionar a enfermedades del tracto gastrointestinal y a alteraciones sistémicas (Naranjo et al., 2021; Petersen & Round, 2014). La pérdida de microbios beneficiosos, la expansión de patobiontes (microorganismos patógenos) y la pérdida de diversidad son eventos que comprenden la disbiosis (Petersen & Round, 2014).

La microbiota intestinal de alpacas y llamas presenta una variación significativa influenciada por la edad, la dieta y las condiciones ambientales. Las investigaciones indican que la composición de la microbiota está estrechamente relacionada con la ingesta dietética, identificándose comunidades microbianas diferenciadas en diferentes compartimentos gastrointestinales según si los animales se alimentaron con pasto o heno de alfalfa (Carroll et al., 2019). Además, la edad juega un papel crucial, ya que las alpacas mayores muestran una composición de microbiota más estable, siendo la edad un predictor significativo de la variación taxonómica, afectando particularmente el equilibrio de Bacteroidetes y Firmicutes (Bedenice et al., 2022). Factores ambientales, como los cambios estacionales, también impactan las preferencias dietéticas y, en consecuencia, la microbiota, observándose diferencias entre las estaciones secas y húmedas (Castellano et al., 2004) (García et al., 2002). En general, estos hallazgos subrayan la compleja interacción entre la edad del huésped, la dieta y las condiciones ambientales en la configuración de la microbiota intestinal de estos camélidos.

La caracterización de la microbiota intestinal es el primer paso para comprender su papel en la salud y la enfermedad (Eckburg et al., 2005). La microbiota presente en las heces, representa a todas las comunidades bacterianas que viven en el tracto gastrointestinal. por lo que suele ser la muestra elegida para la mayoría de los estudios, siendo además una muestra de fácil recolección y no invasiva, también la mayoría de los microorganismos no crecen en medios de cultivo convencionales, por lo que se debe realizarse un estudio genómico para caracterizar esta microbiota (Suárez, 2017).

Los avances en la tecnología de secuenciación del genoma y la bioinformática han permitido a los científicos estudiar exhaustivamente estos microbios y sus funciones, así como las interacciones microbio-huésped tanto en la salud como en la enfermedad (Jandhyala, 2015). Así, por ejemplo, Velasco et al. (2018) en su estudio sobre la microbiota

intestinal del conejo, utilizo la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS), logrando la caracterización taxonómica de muestras cecales de 451 gazapos de conejo, el cual reveló la existencia de 8 filos bacterianos, predominando Firmicutes (75,9%), Tenericutes (7,1%) y Bacteroidetes (6,7%). Esta metodología avanzada ha transformado el campo de la investigación, permitiendo un análisis más detallado y preciso de la microbiota intestinal (Jandhyala, 2015).

b) Diversidad biológica de la microbiota gastrointestinal

La diversidad de la microbiota intestinal comprende Billones de microorganismos, entre las que se incluyen, protozoos, virus, bacterias y hongos que están en nuestro cuerpo y en su superficie, como ya describimos, a pesar de que la relación microbiota-ser humano sigue siendo motivo de diversas investigaciones en diferentes ámbitos, hoy en día se tiene evidencia de que la microbiota intestinal representa un rol esencial en la fisiología y fisiopatología de diversas enfermedades (Anwar et al., 2021; Merino et al., 2021).

Por ejemplo, la diversidad biológica de la microbiota del primer compartimiento (C1) de la llama, incluye bacterias, protozoos, arqueas y hongos, esta abundancia de microorganismos anaerobios, sobre todo su diversidad de bacterias degradadoras de fibra, pueden explicar parcialmente la supervivencia de estos animales en condiciones climáticas adversas donde se alimentan con pasturas fibrosas de baja calidad nutricional (Cerón, 2014). Hay muchos aislamientos de cepas de bacterias anaerobias del C1 de la alpaca, entre ellos *Ruminococcus sp.*, *Fibrobacter sp.* y *Butyrivibrio sp.*, las tres cepas, cumplen un rol fundamental en la degradación de carbohidratos complejos como la celulosa y otros polisacáridos fibrosos de difícil digestión (Coila et al., 2023).

4.2.4. Diarrea en crías de llamas

La diarrea es una enfermedad importante en llamas (*Lama glama*) y alpacas (*Vicugna pacos*) neonatales. las crías de llamas y alpacas son susceptibles a la diarrea causada por una

gama similar de patógenos a los que afectan a otras especies domésticas. Las principales causas de diarrea en crías de llamas y alpacas son *Escherichia coli* (*E. coli*), rotavirus, coronavirus, *Giardia*, especies de criptosporidio, salmonela, septicemia, nutricional, nematodos y otras causas (Whitehead & Anderson, 2006). En la sierra sur del Perú se mencionan los principales patógenos causantes de brotes de diarrea en crías de alpacas de cinco semanas de edad son, *Eimeria spp.* (80%), *Coronavirus* (40%), *E. coli* (34%), *Rotavirus* (32%), *Clostridium spp.* (22%) y *Cryptosporidium spp.* (20%) (Rojas et al., 2016).

La diarrea neonatal en llamas y alpacas se caracteriza por signos clínicos como distensión abdominal, letargo, deshidratación y septicemia potencialmente mortal, causada principalmente por cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas, incluyendo *E. coli* enteropatógena (EPEC) y productora de verotoxina (VTEC) (Siuze et al., 2020; Hierro et al., 2011). Los neonatos afectados a menudo presentan un aumento de la frecuencia cardíaca y pueden mostrar signos de acidosis metabólica, con diarrea que dura de uno a tres días (Cebra et al., 1996; Rodríguez et al., 2015). En las crías nacidas de 7 días, es más probable que la diarrea sea causada por factores nutricionales en los neonatos alimentados con biberón o por infecciones gramnegativas, especialmente cuando la ingestión de calostro ha sido inadecuada. En esta última situación, es probable que la diarrea esté acompañada de septicemia y las crías afectadas estarán bastante enfermas (Whitehead & Anderson, 2006). Las coinfecciones de múltiples patógenos en la mayoría de los casos (60%) aumentan la gravedad de la enfermedad coincidiendo con casos de enteritis necrótica y/o hemorrágica (Rojas et al., 2016).

El diagnóstico generalmente implica el análisis molecular de hisopos rectales para identificar genes de virulencia asociados con *E. coli*, junto con evaluaciones clínicas de parámetros fisiológicos como la frecuencia cardíaca y el estado de hidratación (Siuze et al., 2020; Hierro et al., 2011; Rodríguez et al., 2015). Las medidas preventivas, incluida la

mejora de la higiene y la vacunación, son cruciales para mitigar el impacto de esta afección en la salud neonatal (Hierro et al., 2011).

4.2.5. Secuenciación y análisis bioinformático

Desde que se secuenció por completo el primer genoma humano, la secuenciación experimentó un cambio de paradigma con el avance de nuevas tecnologías de secuenciación que permiten la producción masiva de datos (Hu et al., 2021). Las tecnologías de secuenciación se clasifican en secuenciación de primera generación (por ejemplo, Sanger), secuenciación de segunda generación (por ejemplo, NGS) y secuenciación de tercera generación (por ejemplo, secuenciación de nanoporos) (Nafea et al., 2024).

Las secuenciaciones de próxima o de nueva generación (NGS) se pueden clasificar en función de la longitud de lectura (tecnologías de lectura corta, o "segunda generación", y tecnologías de lectura larga, o "tercera generación"). Los enfoques de secuenciación de lectura corta están representados por las tecnologías más prevalentes, Illumina e Ion Torrent y los enfoques de secuenciación de lectura larga están representados por las tecnologías Pacific Biosciences y Oxford Nanopore (Hu et al., 2021).

La plataforma de Ion Torrent emplea una secuenciación basada en semiconductores para detectar cambios de PH durante la adición de nucleótidos de ADN en crecimiento. Además de ser rápida y relativamente económica permite la secuenciación de grandes volúmenes de datos (Krishnan et al., 2017; Perkel, 2011).

La secuenciación comprende: la preparación de bibliotecas, enriquecimiento del blanco, amplificación del templado y secuenciación. La secuenciación en la plataforma de ion Torrent, se genera una PCR en emulsión con perlas para amplificar clonalmente cada hebra de la biblioteca. Luego de romper la emulsión y enriquecer las perlas recubiertas de ADN clonalmente amplificado (templado) estas son cargadas en un chip (semiconductor) que contiene millones de pocillos. De un modo optimo cada perla se alojará dentro de un

pocillo. Durante la reacción de secuenciación por semiconductor se observan flujos secuenciales de cada uno de los nucleótidos sobre el chip. Al incorporarse un nucleótido a la cadena, se genera la liberación de un protón (ion hidrogeno). El cambio de pH se traduce en una señal eléctrica (cambio de voltaje), indicando que en ese flujo fue añadido un nucleótido en cuestión. Si durante un flujo no se adiciona un nucleótido, no existe diferencia de pH y por lo tanto tampoco señal eléctrica. La señal eléctrica captada de cada pocillo es el dato crudo necesario para obtener la secuencia de cada lectura. (Jauk, 2019)

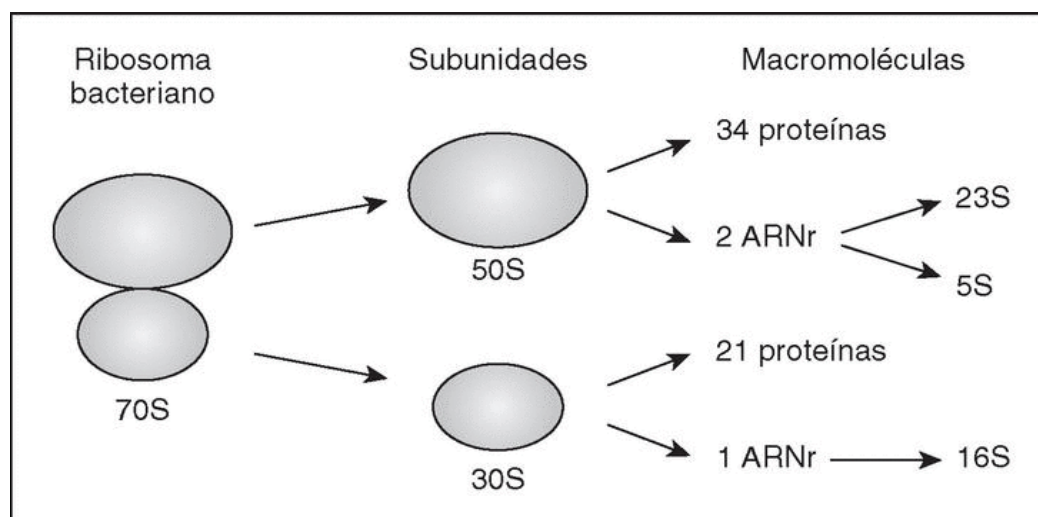
El procesamiento de datos comienza con la señal cruda obtenida por el secuenciador y finaliza con la interpretación de las variantes según el objetivo del investigador (Jauk, 2019). Los datos obtenidos de la secuenciación suelen ser voluminosos, fragmentados, ruidosos, superpuestos y contaminados. El análisis bioinformático permite depurar los datos e identificar los taxones bacterianos. Esto también se puede ampliar para obtener información también sobre funciones metabólicas utilizando una amplia gama de plataformas bioinformáticas. Además, el análisis estadístico de los datos de la secuencia también ayuda a identificar la diversidad alfa (diversidad de especies dentro del mismo individuo), la diversidad beta (diversidad de especies interindividuales), la abundancia relativa y varios otros parámetros relacionados con los organismos (Jandhyala, 2015).

4.2.6. *Gen ARNr 16S*

El gen del ARNr 16S también se designa como ADNr 16S, y los términos se han usado indistintamente, pero según la ASM (American society for microbiology) sugiere que se use “gen del ARNr 16S” (Clarridge, 2004). El gen ARNr 16S se utiliza ampliamente en la filogenética bacteriana, en la delimitación de especies y ahora ampliamente en estudios de microbioma, es el estándar establecido para dilucidar la composición de las comunidades microbianas (Curry et al., 2022; Hassler et al., 2022). El gen del ARNr 16S codifica el componente de ARN de la subunidad 30S de un ribosoma procariota (los ribosomas

bacterianos se componen de una subunidad grande [50S] y una pequeña [30S]) (Weinroth et al., 2022). Estos ribosomas son orgánulos complejos, altamente especializados, que son utilizados en el proceso de síntesis de proteínas. El ribosoma bacteriano tiene un coeficiente de sedimentación de 70S (expresado en unidades Svedberg), y puede disociarse en dos subunidades, la subunidad grande (50S) y la subunidad pequeña (30S) (Figura 1). Cada subunidad ribosomal es un complejo ribonucleoproteico constituido por proteínas ribosómicas y moléculas de ARNr específicas. La subunidad 30S contiene el ARNr 16S y 21 proteínas diferentes (numeradas desde S1-S21, donde S procede de small), mientras que la subunidad 50S contiene los ARNr 5S y 23S junto con unas 34 proteínas (L1-L34; L, large) (Rodicio & Mendoza, 2004).

Figura 1. Subunidades del ribosoma bacteriano.



Nota. Tomado de "Estructura y función de los ribosomas bacterianos", por Rodicio & Mendoza (2004). Se muestra un esquema de la estructura del ribosoma 70S con sus subunidades (50S y 30S) y las macromoléculas que las componen (2 ARNr y 34 proteínas en la subunidad 50S; 1 ARNr y 21 proteínas en la subunidad 30S).

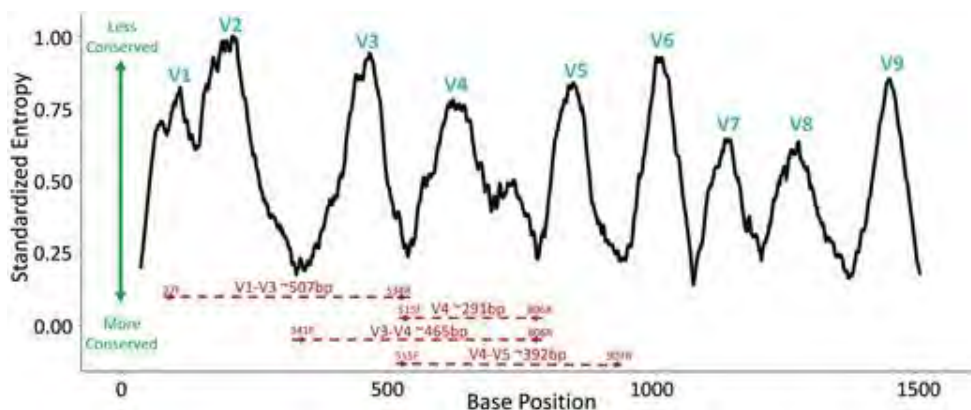
El gen ARNr 16S tiene alrededor de ~1,550 pares de bases (pb) de longitud, compuesto de ocho regiones altamente conservadas y nueve regiones hipervariables (con

estas regiones denominadas V1 a V9) (Clarridge, 2004). Al realizar un estudio de secuenciación del gen ARNr 16S, se amplifican una o varias regiones hipervariables utilizando cebadores de amplio rango (figura 2) que se unen cada uno a una región conservada y se secuencian. Luego, la información en estas regiones se utiliza para reconstruir la composición taxonómica (hecho mediante la comparación de las secuencias con bases de datos de organismos conocidos) y la diversidad presente dentro de la muestra (Weinroth et al., 2022).

Los cebadores o primers más utilizados en estudios de secuenciación del ARNr 16S se une a las regiones conservadas y amplifican una o más regiones hipervariables. Algunos de ellos son, 27F-338R (V1-V2), 27F-534R (V1-V3), 341F-785R (V3-V4), 515F-806R (V4), 515F-944R (V4-V5), 939F-1378R (V6-V8) y 1115F-1492R (V7-V9) (Tabla 1). Algunos taxones bacterianos son únicos para ciertos pares de cebadores. Por ejemplo, al analizar la muestra humana, Verrucomicrobia se detectó solo cuando se usaron los cebadores 341F-785R (V3-V4), 515F-806R (V4), 939F-1378R (V6-V8) y 1115F-1492R (V7-V9) y no 27F-338R (V1-V2), 27F-534R (V1-V3) o 515F-944R (V4-V5) (Abellan-Schneyder et al., 2021).

La secuenciación del gen ARNr 16S se usa para determinar grupos filogenéticos de comunidades microbianas, mas no puede describir el potencial metabólico o la actividad de una comunidad microbiana. Esto se debe a que el gen ARNr 16S es un gen de mantenimiento que se encuentra en todos los procariotas y cualquier variabilidad de secuencia solo indica divergencia filogenética, que puede o no correlacionarse con el potencial metabólico, la virulencia, la resistencia a los antibióticos, etc.(Weinroth et al., 2022).

Figura 2. Regiones conservadas y regiones variables del gen ARNr 16s



Nota. Tomado de "Las regiones hipervariables del ARNr 16s para identificación bacteriana", por Weinroth et al. (2022). Las regiones hipervariables se muestran en azul, las conservadas con baja entropía, y en rojo se indican cuatro pares de cebadores comunes. Los datos de entropía de Shannon fueron generados a partir de Johnson et al. (2019). (https://github.com/TheJacksonLaboratory/weinstock_full_length_16s)

Tabla 1. Cebadores (primers) directos e inversos específicos de la región V y temperatura de hibridación para la PCR

Región V	Primer avance	Primer inverso	Secuencia hacia adelante (5'–3')	Secuencia inversa (5'–3')	Especificidad	Temperatura de hibridación (°C)	Referencia
V1-V2	27F	338R	AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG	GCT CCG CCT CGT AGG AGT	Universal ^a	57	Salter et al. (2014)
V1-V3	27F	534R	AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG	ATT ACC GCG GCT GCT GG	Universal	57	Walker et al. (2015)
V3-V4	341F	785R	CCT ACG GGN GGC WGC AG	GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC	Universal	55	Klindworth et al. (2013)
V4	515F	806R	GTG CCA GCM GCC GCG GTA A	GGA CTA CHV GGG TWT CTA EN	Universal	53	Caporaso et al. (2011)
V4-V5	515F	944R	GTG CCA GCM GCC GCG GTA A	GAA TTA AAC CAC ATG CTC	Bacteriano	53	Fuks et al. (2018)
V6-V8	939F	1378R	GAA TTG ACG GGG GCC CGC ACA AG	CGG TGT GTA CAA Bacteriano GGC CCG GGA ACG	Bacteriano	58	Lebuhn et al. (2014)
V7-V9	1115F	1492R	CAA CGA GCG CAA CCC T	TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T	Bacteriano	51	TURNER et al. (1999)

Nota. ^a indica que el cebador se une tanto a arqueas como a bacterias. Adaptado de (Abellan-Schneyder et al., 2021).

CAPÍTULO V

METODOLOGIA DE INVESTIGACION

5.1. Ubicación

El presente trabajo se realizó en el centro de Investigación La Raya de la Universidad Nacional del Altiplano ubicado en el distrito de Santa Rosa, provincia de Melgar – Puno, a 14°29'41" Latitud Sur, 70°56'20" Latitud Oeste y 4200 m.s.n.m. aproximadamente y en el Centro Experimental La Raya – UNSAAC, ubicado en "LA RAYA", del distrito Marangani, provincia de Canchis – Cusco , a una latitud de 13.9916° S y una longitud de 71.4511° W. y unos 4,300 m.s.n.m.

5.2. Duración del estudio

El estudio se desarrolló desde febrero de 2022 hasta noviembre de 2024. El periodo de muestreo para la conformación inicial de los grupos se realizó durante febrero y marzo de 2022, que corresponde a la época de lluvias en el altiplano. El desarrollo posterior de la investigación incluyó fases de análisis de laboratorio, procesamiento y análisis de datos.

5.3. Población de estudio

Para el presente estudio se utilizó como población de referencia a las crías de llamas nacidas entre los meses de diciembre del 2021 - abril de 2022 en el Centro de investigación La Raya de la UNA Puno y en el Centro experimental de Camélidos Sudamericanos (CICAS) de la UNSAAC Cusco. La muestra se seleccionó mediante un muestreo no probabilístico por criterio. Intencionalmente, se conformaron dos grupos a partir de 11 crías menores a 3 meses de edad, las muestras se recogieron en los meses de febrero y marzo 2022 correspondientes a la época de lluvias (puna húmeda), período caracterizado por alta disponibilidad de forraje. Los grupos se definieron de la siguiente manera:

Grupo de crías sanas (n=6): Seleccionadas por presentar constantes clínicas (temperatura, frecuencia cardíaca y respiratoria) dentro de rangos normales, ausencia de signos clínicos de enfermedad, comportamiento activo y un estado general aparentemente saludable.

Grupo de crías con proceso diarreico (n=5): Seleccionadas por presentar signos clínicos evidentes de diarrea.

La asignación a los grupos se basó únicamente en el criterio clínico de salud o enfermedad (diarrea), sin considerar de manera formal la edad específica, el sexo o la condición corporal al interior de cada grupo.

5.4. Materiales

5.4.1. *Materiales para el muestreo de heces*

- ✓ Botas de hule.
- ✓ Marcador Spray.
- ✓ Recipiente para transporte de muestra.
- ✓ Guantes de exploración.
- ✓ Bolsas de plástico.
- ✓ Plumón indeleble.
- ✓ Cinta masking.
- ✓ Termo de transporte con bolsas de gel congelado.
- ✓ Soga.

5.4.2. *Materiales para la extracción y cuantificación de ADN*

- ✓ Mandil descartable.
- ✓ Guantes de nitrilo.
- ✓ Barbijo.
- ✓ Lentes.

- ✓ Cronómetro.
- ✓ Puntas descartables de 2, 10, 20, 100, 200, 1000 microlitros.
- ✓ Tubos de 2 y 1.5 mL.
- ✓ Materiales de plástico.
- ✓ Tubos de microesferas (Bead Tubes for PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit)
- ✓ Reactivos del kit comercial.
- ✓ Kit de purificación de ADN genómico (PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit).
 - Tampón de lisis.
 - Potenciador de lisis.
 - Tampón de limpieza.
 - Tampón de unión.
 - Tampón de lavado concentrado.
 - Tampón de elución.

5.4.3. Equipos para la extracción de ADN

- ✓ Congeladora a -20°C (Thermo Fisher TSX).
- ✓ Refrigeradora a 2 a 8°C (Thermo Fisher TSX).
- ✓ Cámara de flujo laminar (Biobase Modelo BBS-H1100).21
- ✓ Centrífuga 16'000 gravedades (Spectrafuge 24D Labnet).
- ✓ Vortex (Thermo Scientific™).
- ✓ Calentador de bloques (heat block)
- ✓ Micropipetas de varios volúmenes (Thermo Scientific™ Kits)
- ✓ Termociclador (Thermo Fisher Applied Biosystems).

5.4.4. Equipos para la cuantificación del ADN.

- ✓ Calentador de bloques para tubos de ensayo.
- ✓ Vortex (Thermo Scientific™ LP y USA Scientific).
- ✓ Microcentrifuga (mySPINTM 12 Mini centrifuge – Thermo Fisher).
- ✓ Cuantificador del ADN (Qubit™ Fluorometro - Thermo Fisher).

5.4.5. *Reactivos de la secuenciación.*

- ✓ Ion 16s TM metagenomic kit (cat.no. A26216)
- ✓ Ion plus fragment library kit (cat.no. 4471252)
- ✓ Ion universal library quantitation kit (cat.no. A26217)
- ✓ Ion PGM TM Hi-QTM OT2 kit (cat.no. A27739)
- ✓ Ion PGM TM Hi-QTM sequencing kit (cat. No. A25592)

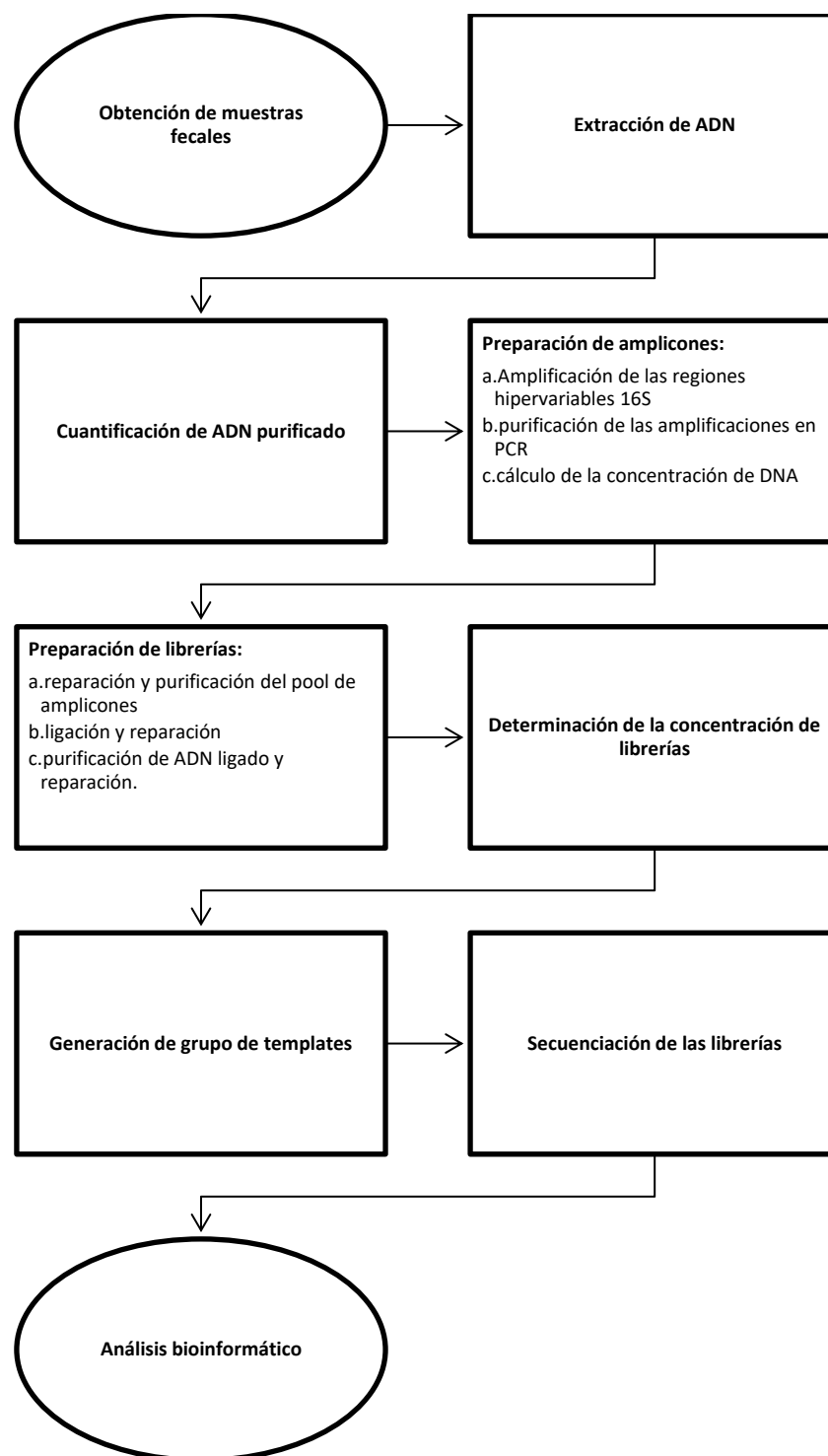
5.4.6. *Equipos para la secuenciación de ADN*

- ✓ Centrifuga (Thermo Fisher de placa).
- ✓ Congeladora (Thermo Fisher TSX).
- ✓ Refrigeradora (Thermo Fisher TSX).
- ✓ Vórtex (USA Scientific).
- ✓ Rack magnético (DynaMag™-2)
- ✓ Cámara de flujo laminar (Biobase Modelo BBS-H1100).
- ✓ Agitador (Vortex LP Thermo Fisher).
- ✓ Microcentrifuga (mySPINTM 12 Mini centrifuge – Thermo Fisher).
- ✓ Microcentrifuga de chip (Ion Chip Minifuge – Thermo Fisher)
- ✓ Micropipetas (Thermo Scientific™ Kits Finnpiptette™ F2 GLP).
- ✓ Termociclador (Thermo Fisher Applied Biosystems).
- ✓ Preparación de librerías y amplicones (Ion ToCh 2 Thermo Scientific™, Ion ToCh E1 Thermo Scientific™)
- ✓ Secuenciador (ION S5TM2 Thermo Scientific™)

5.5. Metodología

5.5.1. Flujograma de trabajo

Figura 3. Diagrama de flujo de la metodología de trabajo.



Nota. Elaboración propia.

5.5.2. Obtención de muestras fecales

Las muestras de heces fueron obtenidas mediante extracción directa del recto de 11 crías de llama, las cuales fueron clasificadas en dos grupos según su estado de salud: crías clínicamente sanas (n=6) y crías con proceso diarreico activo (n=5). La evaluación para determinar el estado de salud se realizó mediante un examen clínico completo y estructurado, aplicado a cada animal antes de la toma de muestras. Dicho examen incluyó el registro de las constantes fisiológicas (temperatura rectal, frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria), la observación del comportamiento (actitud, nivel de alerta y postura), un examen físico general que consideró el estado de hidratación mediante la evaluación del pliegue cutáneo y la humedad de mucosas, y una inspección específica de las heces y la zona perianal.

Para la asignación al grupo de crías con proceso diarreico (n=5), se incluyeron únicamente aquellos animales que presentaban evidencia clínica de diarrea activa al momento del examen, definida por heces de consistencia líquida o semilíquida, con o sin presencia de mucus o sangre, y que además mostraban al menos un signo clínico adicional compatible con enfermedad entérica, como decaimiento, deshidratación leve, fiebre o hipotermia, o presencia de escaras de heces secas alrededor del ano. Se verificó también que no hubieran recibido tratamiento antimicrobiano o antidiarreico en los 7 días previos a la toma de muestra.

Para el grupo de crías clínicamente sanas (n=6), se seleccionaron animales que presentaban constantes fisiológicas dentro de los rangos normales para la especie y la edad, comportamiento normal, examen físico general sin hallazgos patológicos, heces de consistencia normal (formadas o pastosas), ausencia de sangre, mucus o parásitos visibles en las heces, y ausencia de escaras de heces secas alrededor del ano, sin antecedentes de signos digestivos o sistémicos en los 7 días previos.

La asignación a los grupos se basó exclusivamente en los criterios clínicos descritos. Una vez clasificados los animales, las muestras se recolectaron directamente de la ampolla rectal, utilizando instrumentos estériles para evitar contaminación. Se empleó una jeringa modificada para la extracción y bolsas de polipropileno para su transporte inicial. Obtenidas las muestras, estas se colocaron inmediatamente en tubos Falcon estériles de 50 mL (aproximadamente 5 mL por muestra), se transportaron en una nevera con bloques de gel para mantener una temperatura de refrigeración y se almacenaron en un congelador a -20 °C hasta su posterior procesamiento para la extracción de ADN bacteriano.

5.5.3. Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN genómico microbiano a partir 0.2 g y 0.2 mL de muestra de heces secas y diarreicas, respectivamente, procesándose un total de 11 muestras (6 sanos y 5 con diarrea de 1 a 3 meses). La extracción de ADN del contenido intestinal se realizó con el kit de purificación de ADN del microbioma PureLink™, siguiendo el protocolo del fabricante.

El procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente (20–25 °C) e incluyó los siguientes pasos:

a) Preparación del lisado

- ✓ Se mezcló 0.2g de la muestra fecal y 600 µL de tampón de lisis (S1—Lysis Buffer) en un tubo de microesferas (bead tube) y se vortexeó para homogeneizar la suspensión.
- ✓ Se añadió 100 µL de potenciador de lisis (S2—Lysis Enhancer), se mezcló en vórtex y se incubó a 65 °C durante 10 minutos en el heat block.
- ✓ Se homogenizó en vórtex a velocidad máxima durante 10 minutos.
- ✓ Se centrifugó a 14,000 × g durante 5 minutos usando un adaptador horizontal.

- ✓ Se transfirió 400 μL del sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio.
- ✓ Se agregó 250 μL de Tampón de limpieza (S3—Cleanup Buffer), se mezcló en vórtex y se centrifugó a $14,000 \times g$ durante 2 minutos.
- ✓ Se recuperó 500 μL del sobrenadante en un tubo de microcentrífuga limpio, sin tocar el sedimento.

b) Unión del ADN a la columna

- ✓ Se añadió 900 μL de Tampón de unión (S4—Binding Buffer) y se agitó brevemente.
- ✓ Se centrifugó 700 μL de la mezcla en un conjunto columna-tubo de centrifugación (spin column) a $14,000 \times g$ durante 1 minuto.
- ✓ Se desechó el flujo y se volvió a centrifugar los 700 μL restantes.

c) Lavado y elución del ADN

- ✓ Se colocó la columna de centrifugación (spin column) en un nuevo tubo de recolección, se añadió 500 μL de tampón de lavado (S5—Wash Buffer) y se centrifugó a $14,000 \times g$ durante 1 minuto.
- ✓ Se desechó el flujo y se centrifugó nuevamente a $14,000 \times g$ durante 30 segundos para eliminar residuos.
- ✓ Se transfirió la columna (spin column) a un tubo nuevo de recuperación, se agregó 100 μL de tampón de elución (S6—Elution Buffer) y se incubó 1 minuto a temperatura ambiente.
- ✓ Se centrifugó a $14,000 \times g$ durante 1 minuto y se descartó la columna (spin column).
- ✓ El ADN purificado (presente en el tubo de recolección) se almacenó a -20°C para su uso posterior.

5.5.4. Cuantificación de ADN purificado

Para evaluar la calidad del ADN extraído, se procedió a la cuantificación, mediante el Qubit® 2.0 Fluorometer (fluorómetro), utilizando para ello el kit Qubit™ dsDNA HS Assay Kit de Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific (Anexo), utilizándose sólo muestras que tengan como mínimo 10ng/μL de ADN según instrucciones del fabricante.

5.5.5. Preparación de amplicones

La preparación de amplicones tuvo como objetivo principal amplificar las regiones hipervariables (V2–V4–V8, V3–V6, V7–V9) del gen ARNr 16S, que luego se utilizaron para construir librerías de secuenciación. Para ello, se empleó kit de metagenómica Ion 16S™. Se usaron entre 1 y 3 ng de ADN bacteriano eluido, y para la amplificación de targets se trabajó con 18 ciclos.

a) Amplificación de regiones hipervariables 16S

- ✓ Se temperó el Ion 16S Metagenomics Kit y sus componentes en un rack congelado o un gel pack.
- ✓ Se utilizaron dos pools de primers (cebadores), por lo que se prepararon dos tubos de PCR para cada muestra de ADN purificado, cada uno con un grupo de primers diferente (tabla 2).
- ✓ Una vez finalizada la preparación de la placa de PCR, se procedió al termociclado de las muestras (Tabla 3).

Tabla 2 *Preparación y amplificación de muestras*

Componente	Volumen de muestra o control positivo	Volumen de control negativo
2x Enviromental Master mix	15uL	15uL
16S Primer Set (10x) (1)	3uL	3uL
ADN (muestra o control de ADN de E. coli diluido)	2 – 12uL sample or 2uL diluted control (2)	N/A
Control negativo (Agua)	Para 30uL	Para 30uL
Total	30uL	30uL

Nota. ⁽¹⁾ Los cebadores utilizados corresponden a dos pools: el primero incluye las regiones V2, V4 y V8; el segundo incluye las regiones V3, V6, V7 y V9. (2) El control positivo consistió en ADN de Escherichia coli diluido 1:20 (1.5 ng/μL), utilizando 2 μL (3 ng de ADN de entrada) en la reacción. Adaptado de Ion 16S™ Metagenomics Kit User Guide (Pub. No. MAN0010799), por Thermo Fisher Scientific, (2015).

Tabla 3 *Programación del termociclador*

Etapas	Temperatura	Tiempo
Mantenimiento (Hold)	95°C	10 min
Ciclo 18 ciclos	95°C	30s
	58°C	30s
	72°C	20s
	72°C	7 min
Mantenimiento (Hold)	4°C	∞ (1)

Nota. ⁽¹⁾ indica que la muestra se mantiene a 4 °C indefinidamente hasta su procesamiento. Adaptado de Ion 16S™ Metagenomics Kit User Guide (Pub. No. MAN0010799), por Thermo Fisher Scientific, (2015).

Se retiró las muestras dentro de las 24 horas

- ✓ Se Procedió a temperar el reactivo de Agencourt® AMPure® XP media hora antes, para usar en los lavados de ADN.
- ✓ Se preparó 6600 µL de alcohol al 70% (v/v). Para ello, se mezclaron 4620 µL de etanol absoluto (100%) y 1980 µL de agua libre de nucleasas, según la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de alcohol al 100\%} = \left[\frac{\text{concentracion deseada}}{\text{concentracion inicial}} \right] * \text{volumen final}$$

- ✓ Se realizo la combinación de amplicones en cada tubo de microcentrífuga (tubo lobind de 1.5mL): se combinaron 20uL de los amplicones del primer pool de primers y 20 uL del segundo pool de primers (obtenidos del termociclador, tablas 2 y 3).
- ✓ Se procedió a la unión con perlas magnéticas: Se añadieron 72 uL de reactivo Agencourt® AMPure® XP a cada tubo (tubo lobind) (que contenía 40 ul de muestra). Se mezcló brevemente en vórtex, verificando que la mezcla fuera homogénea (sin fases líquidas transparentes ni perlas marrones separadas). Se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
- ✓ Separación magnética: Se colocaron los tubos en el rack magnético DynaMag™-2. Se dejaron reposar 5 minutos, tiempo durante el cual: La solución se clarificó progresivamente. Se formó un pellet marrón adherido a la pared del tubo (lado del imán).
- ✓ Remoción de sobrenadante: Transcurrido el tiempo, se retiró el sobrenadante (aproximadamente 100 µL).
- ✓ Se realizaron dos veces el lavado con etanol 70%:

- ✓ Primer lavado: Se añadieron 100 μL de etanol 70% (v/v). Se rotaron los tubos 180° (dos veces) para permitir la migración de las perlas. Inmediatamente, se retiraron 120 μL de líquido para descarte.
- ✓ Segundo lavado: Se repitió el mismo protocolo (tiempo máximo por lavado: 30 segundos).
- ✓ Secado del pellet: En un tiempo máximo de 5 minutos, se eliminaron las microgotas residuales de etanol. Se observó que el pellet húmedo presentaba un brillo característico, el cual: Se opacó gradualmente. Se compactó (evitando resecado, rotura o arrastre).
- ✓ Elución: Una vez alcanzada la desecación óptima: Se retiraron los tubos del rack magnético. Se añadieron 15 μL de agua grado molecular. Se resuspendió el pellet pipeteando suavemente (sin contacto con las paredes del tubo).
- ✓ Recuperación de ADN: Los tubos se volvieron a colocar en el rack magnético durante 1 minuto (hasta que la solución se aclaró). Finalmente, el sobrenadante (que contenía los fragmentos para secuenciar) se transfirió a un nuevo tubo LoBind.

5.5.6. Cálculo de la concentración de ADN

Para determinar la concentración de ADN, se utilizó el kit Qubit™ dsDNA HS Assay. Se emplearon 2 μL de cada producto de PCR purificado, de acuerdo con lo indicado en el protocolo. El promedio de concentración de ADN fue de 30ng/ μL .

5.5.7. Preparación de librerías

Después de amplificar las regiones hipervariables (llamados amplicones), se procedió a prepararlas y agregar códigos de barras (barcodes) a los amplicones para su posterior secuenciación. Para ello, se utilizó el kit de librerías Ion Plus (Ion Plus Fragment Library Kit)

a) Reparación y purificación del pool de amplicones

Las amplificaciones se combinaron con el tampón de reparación final y la enzima de reparación en un tubo (tubo LoBind de 1.5 mL) (Tabla 4).

Tabla 4 *Reparación y purificación de pool de amplicones*

Componente	Volumen
Pooled short amplicons (Amplicones cortos agrupados), 10–100 ng	79uL
5X End Repair Buffer (Tampón de reparación final)	20uL
Enzima de reparación final	1uL
Total	100uL

Nota. La cantidad de amplicones utilizada fue de 10–100 ng. Adaptado de Ion 16S™ Metagenomics Kit User Guide (Pub. No. MAN0010799), por Thermo Fisher Scientific, (2015).

- ✓ Se pusieron el reactivo de Agencourt AMPure XP a temperatura ambiente por 30 minutos y se descongeló la solución tampón Tris-EDTA (buffer LowTE).
- ✓ Se homogenizó el volumen por pipeteo, se incubaron las muestras por 20 minutos a temperatura ambiente.
- ✓ Se unieron cada muestra con las perlas. Cada muestra se homogenizó con 180 uL del reactivo de Agencourt AMPure XP. se homogenizó por vórtex, se realizó un spin breve, luego se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.
- ✓ Separación magnética: se colocaron los tubos en el rack magnético DynaMag-2. Se dejaron reposar durante 3 minutos, observando: clarificación

progresiva de la solución, formación de pellet marrón en la pared del tubo cercana al magneto y se procedió a la remoción del sobrenadante (aproximadamente 280ul) cuidando la integridad del pellet.

- ✓ Después de la remoción se realizó el lavado con alcohol al 70% dos veces (tiempo máximo de 30 segundos). Se añadieron 500 uL de alcohol al 70%, se retiró inmediatamente el líquido (500 uL), segundo lavado se repite.
- ✓ A continuación, en el segundo lavado se retiraron todas las microgotas y gotas de alcohol que hayan quedado en las paredes del tubo (tubo lobind), se monitoreó el pellet hasta la pérdida del brillo y compactación completa. Se tuvo mucho cuidado que no se reseque, cuarteo, lastime, rompa, arrastre los pellets, pues estos debían estar completamente intactos.
- ✓ Elución: Una vez se alcanzó el grado de desecación óptimo, se retiraron los tubos del rack magnético para colocarlos en un soporte y se añadieron 25 uL de la solución de tampón TE (buffer LowTE), se resuspendió el pellet pipeteando suavemente para no lastimar los fragmentos y comprometer la calidad del genoma a secuenciar.
- ✓ Recuperación y almacenamiento: Se colocaron nuevamente los tubos en el rack magnético durante 1 minuto o hasta que la solución esté transparente, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo LoBind (tubo de recuperación) para luego ser almacenados hasta el momento de la cuantificación a -20 °C.

b) Ligación y reparación.

- ✓ Se descongelaron las muestras, para realizar los lavados con alcohol. Asimismo, se descongeló el buffer LowTE.
- ✓ En un tubo de PCR se combinaron los siguientes reactivos para cada muestra en el orden indicado en la Tabla 5, la mezcla se realizó por pipeteo.

- ✓ Los códigos de barras (barcode) se pusieron una diferente por cada muestra a incorporar en la secuenciación.
- ✓ Se colocaron los tubos en el termociclador y se empleó el programa del ciclado descrito en la Tabla 6.

Tabla 5. *Ligación y reparación.*

Componente	Volumen para librerías sin Barcode	Volumen para librerías con Barcode
ADN	~25 µL	~25 µL
10x Tampón de ligasa	10 µL	10 µL
Adaptadores (bibliotecas sin código de barras) o Adaptador Ion P1 (bibliotecas con código de barras)	2 uL	2 ul
Ion Xpress™ Código de barras X ^[1]	-	2 µL
Mix de dNTPs	2 µL	2 µL
Agua libre de nucleasas	51 µL	49 µL
Ligasa de ADN	2 µL	2 µL
Polimerasa de reparación Nick	8 µL	8 µL
Total	100 µL	100 µL

Nota. ^X = código de barras elegido. Adaptado de Ion 16S™ Metagenomics Kit User Guide (Pub. No. MAN0010799), por Thermo Fisher Scientific, (2015).

Tabla 6. Programación del termociclador.

Etapas	Temperatura	Tiempo
Mantenimiento (Hold)	25°C	15 min
Mantenimiento (Hold)	72°C	5 min
Mantenimiento (Hold)	4°C	∞ ⁽¹⁾

Nota. ⁽¹⁾ se mantiene a esta temperatura por un tiempo, para continuar los siguientes pasos.

Adaptado de Ion 16S™ Metagenomics Kit User Guide (Pub. No. MAN0010799), por Thermo Fisher Scientific, (2015).

- ✓ Se transfirió cada reacción a un nuevo tubo LoBind de 1.5 mL.
- ✓ Se procedió a la unión con perlas magnéticas: Se Añadieron 140 uL del reactivo Agencourt AMPure XP a cada tubo, se homogenizó mediante vórtex, se realizó un spin breve y se aseguró que todo se encuentre en una única fase, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.
- ✓ Se colocaron los tubos en el rack magnético (DynaMag-2), se dejaron reposar durante 3 minutos, en este tiempo se observó como la solución se iba clarificando y se generó un pellet marrón hacia la pared del tubo cercana al magneto.
- ✓ Una vez cumplido el tiempo, se removió el sobrenadante (100uL), teniendo en cuenta que el pellet se mantuviera íntegro.
- ✓ Se procedió al lavado con alcohol 70% dos veces (tiempo máximo de 30 segundos): se añadieron 500 uL de alcohol, se rotaron los tubos a 180° para que las perlas migren de un extremo al otro dentro del tubo LoBind (dos veces), se retiró inmediatamente los 500 uL de líquido para descarte.
- ✓ Secado del pellet: A continuación, se contó con un máximo de 4 minutos. Se retiraron todas las microgotas y gotas de alcohol que hayan quedado en las

paredes del tubo, se monitoreó el pellet hasta la pérdida del brillo y compactación completa. Se evitó que no se reseque, cuartee, lastime, rompa, y arrastre los pellets que debían estar completamente intactos.

- ✓ **Elución:** Una vez se alcanzó el grado de desecación óptimo, se retiraron los tubos del rack magnético para colocarlos en un soporte, se añadieron 20 uL de LowTE, con la micropipeta se resuspendió todo el pellet sin rascar la pared del pellet, en algunas muestras se aplicó un vórtex por 5 a 10 segundos para ayudar a la resuspensión del pellet.
- ✓ **Recuperación y almacenamiento:** Se colocaron nuevamente los tubos en el rack magnético durante 1 minuto o hasta que la solución estuvo transparente, se rescató el sobrenadante a un nuevo tubo LoBind y se almacenaron las muestras hasta el momento de la cuantificación a -20 °C hasta un máximo de 02 semanas.

5.5.8. Cuantificación de librerías por qPCR

El siguiente paso tuvo como objetivo confirmar que las librerías contenían suficiente cantidad de ADN para proceder con la secuenciación. Para la cuantificación se utilizó el kit de cuantificación de librerías (Ion Universal Library Quantitation Kit).

a) Preparacion diluciones seriadas de Liberia control de iones E. coli DH10B

Se temperó el E. coli DH10B Ion Control Library en hielo o en un gel pack, se aplicó vórtex y un spin breve para recolectar las alícuotas que pudieron quedar en las paredes del tubo.

- ✓ Se utilizó una hilera de 8 pocillos (8-strip) para realizar las diluciones. Se colocaron 45 uL de agua de grado molecular en todos los tubos para tener curva estándar por duplicado.

- ✓ Se tomaron 5 uL de la librería control de E. coli y se colocaron en el primer pocillo con 45 uL de agua, homogenizando la mezcla. Posteriormente, se tomaron 5 uL del pocillo uno y se transfirieron al pocillo dos homogenizando nuevamente, luego se tomaron 5 uL del pocillo dos y se transfirieron al pocillo tres y se repitió la misma operación para el cuarto pocillo, se repitió para los siguientes 4 pocillos. Cada mitad del 8-strip quedó distribuida como se muestra en la tabla 7.
- ✓ Cada estándar correspondió a una concentración que fue ingresada en el programa del termociclador en tiempo real.

Tabla 7. *Diluciones seriadas de ADN control.*

Estándar	Librería control	Agua libre de nucleasas (1)	Factor de dilución	Concentración
1	5 µL de biblioteca de control sin diluir	45 ul	1:10	6.8 pM
2	5 µL Estándar 1	45 ul	1:100	0.68 pM
3	5 µL estándar 2	45 µL	1:1000	0.068 pM
4	5 µL estándar 3	45 ul	1:10000	0.0068 pM

Nota. ⁽¹⁾ Agua no tratado con DEPC. Adaptado de Ion 16S™ Metagenomics Kit User Guide (Pub. No. MAN0010799), por Thermo Fisher Scientific, (2015).

b) Diluciones seriadas de las muestras

- ✓ Se prepararon diluciones seriadas, 4 tubos por muestra, con 18 uL de agua libre de nucleasas (o de grado molecular) en el tubo 1 y 45 uL en los demás tubos. Según lo indicado en la Tabla 8.
- ✓ El tubo número 4 fue seleccionado como tubo evaluado.

Tabla 8. *Dilución de muestras de ADN.*

Dilución	Entrada de la biblioteca (library input)	Agua libre de nucleasas (1)
1:10	2 ul de stock de biblioteca de muestras	18 ul
1:100	5 ul de 1:10	45 ul
1:1000(2)	5 ul de 1:100	45ul
1:10000(2)	5 ul de 1:1000	45 ul

Notas. (1) Agua no tratado con DEPC. (2) Diluciones a ensayar. Adaptado de Ion 16S™ Metagenomics Kit User Guide (Pub. No. MAN0010799), por Thermo Fisher Scientific, (2015).

c) Preparación de las reacciones de qPCR

- ✓ Se descongelaron los reactivos de TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix sobre un gel pack, sin vortexeado.
- ✓ En un tubo (tubo lobind de 1.5 mL) se preparó un máster mix con los tres componentes especificados en la Tabla 9, el cual se distribuyó posteriormente en la placa de PCR, recordando que son 15 uL por cada pocillo.
- ✓ Los componentes fueron añadidos en ese orden según el número de tubos evaluados (al incluir controles y estándares, se consideraron los pocillos adicionales a las muestras).
- ✓ Se añadieron 5 uL de la librería de la muestra o de los estándares o de los controles, según correspondiera, se verificó cuidadosamente la ubicación de cada estándar y cada muestra, el volumen final de cada pocillo fue de 20 uL (vol. De máster mix + vol. De muestra, control o estándar).
- ✓ La placa se selló y se centrifugó brevemente para eliminar alícuotas residuales en las paredes y no existen burbujas en la parte final de los pocillos.

Tabla 9. *Máster mix para qPCR.*

Componente	Máster de reacción por 20 ul
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), sin AmpErase® UNG	10 ul
Ion Library TaqMan® Quantitation Assay, 20X (Ensayo de cuantificación TaqMan® de la biblioteca iónica, 20X)	1.0 ul
Agua libre de nucleasas	4.0 uL

Nota. Adaptado de Ion 16S™ Metagenomics Kit User Guide (Pub. No. MAN0010799), por Thermo Fisher Scientific, (2015).

d) Programación de las reacciones de qPCR

- ✓ Se programó el equipo Quant Studio según los parámetros establecidos en la Tabla 10.
- ✓ Se inicio la qPCR, se utilizó la configuración 7500 fast para la ejecución.

Tabla 10. *Ejecución del qPCR en el equipo Quant Studio.*

Sistema de PCR en tiempo real.	Bloque de muestra y placa de reacción	Modo de ejecución.	Etapas	Temperatura	Tiempo
7500 Fast	96 – well fast	Fast	Mantenimiento (Hold)	95°C	20 s
			Ciclo (40 ciclos)	95°C	3 s
				60°C	30s

Nota. Adaptado de Ion 16S™ Metagenomics Kit User Guide (Pub. No. MAN0010799), por Thermo Fisher Scientific, (2015).

5.5.9. Enriquecimiento de librería

Este proceso constituyó el paso previo a la secuenciación. Mediante este protocolo se seleccionaron y enriquecieron los fragmentos de ADN que contenían los adaptadores específicos de Ion Torrent, asegurando que solo las secuencias de interés fueran secuenciadas. Para ello se utilizó el kit de secuenciación y el equipo OT2 (Ion PGM™Hi-Q™ OT2).

- ✓ Se creó un plan de corrida en el servidor del secuenciador S5 con los nombres de los kits utilizados para el OT2 y el secuenciador, también los fragmentos a secuenciar 400bp y también el nombre de las muestras con su respectivo barcode.
- ✓ Una vez creado el plan de corrida, en el equipo OT2 se seleccionó la corrida con el nombre ION S5: Ion 520/530 kit – OT2 400bp para después cargar las muestras al equipo.

Figura 4. Plan de corrida del equipo ion one touch 2



Nota. Tomado de Thermo Fisher Scientific. (2017). Ion 520™ & Ion 530™ Kit – OT2 user guide (Pub. No. MAN0010844). Ion Torrent.

a) Preparación de la solución de amplificación

- ✓ Se usaron los siguientes reactivos: Ion S5 reagent mix, Ion S5 enzyme mix y el Ion S5 Sphere particles (ISPs).
- ✓ Se verificó que las librerías de las muestras estuvieran previamente diluidas a 10 pM (paso final con los datos del qPCR), en un único tubo de 1.5 mL LoBind se mezclaron volúmenes suficiente de cada librería para alcanzar un volumen final de mezcla de 100 uL, aunque fue posible preparar volúmenes mayores, solamente se utilizaron 100 uL en el siguiente paso.
- ✓ Se tomó el tubo que contenía 2 mL del Ion S5 Reagent Mix y se añadieron los componentes especificados en la Tabla 11.
- ✓ Se colocaron los 100 uL del pool de muestras diluidas y mezclados previamente (Tabla 11). Y se mantuvieron a temperatura ambiente el tubo con la mezcla.

Tabla 11. *Preparación de la solución de amplificación.*

Orden	Reactivo	Color de tapa	Volumen
1	Agua sin nucleasas	-	80uL
2	Ion S5TM Enzyme mix (Mezcla de enzimas Ion S5 TM)	Brow	120uL
3	Ion Sphere TM particles (Partículas Ion Sphere TM)	Black	100uL
4	Biblioteca diluida (no la biblioteca de reserva)	-	100uL
-	Volumen total (incluido el reagent mix)	-	2400uL

Nota. Tomado de Thermo Fisher Scientific. (2017). Ion 520TM & Ion 530TM Kit – OT2 user guide (Pub. No. MAN0010844). Ion Torrent.

b) Cargado de las muestras al equipo Ion One Touch 2

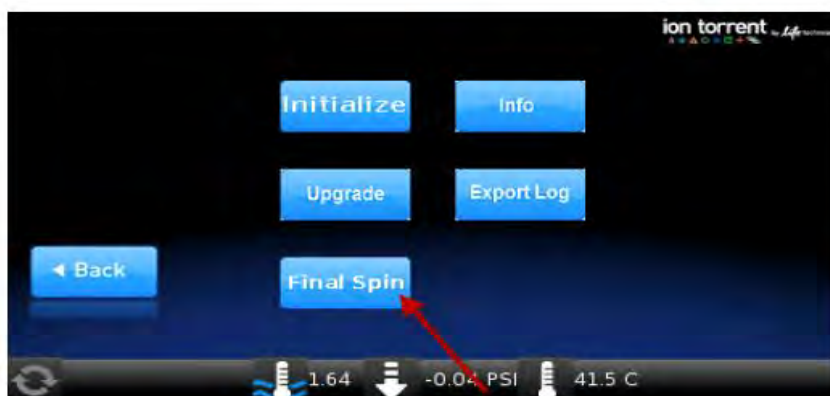
- ✓ Se cargaron los 2400 µl en el SAMPLE PORT del Ion One Touch 2. .

- ✓ Después se añadió 200 μL del Ion OneTouch™ Reaction Oil a través del SAMPLE PORT. Y se continuo con el protocolo según las indicaciones del manual.
- ✓ Finalmente se colocó la Breaking Solution en los Recovery Tubes. Le dimos continuar y esperar. Normalmente el instrumento demora de 5 horas a 7 horas para que el equipo pueda realizar la PCR por emulsión y generar partículas Ion Sphere (ISP) positivas.

c) Recuperación de las librerías enriquecidas y uso del INSTRUMENTO ES:

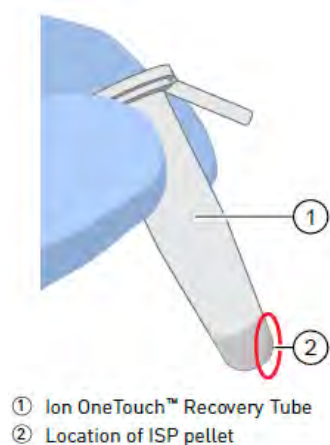
- ✓ Transcurrido el tiempo desde el inicio del funcionamiento del instrumento OT2 se finalizó la corrida (figura 5) y se procedió a retirar la muestra.

Figura 5. *Fin de la corrida del equipo OT2.*



Nota. Tomado de Thermo Fisher Scientific. (s.f.). *Ion 520™ & Ion 530™ Kit – OT2 user guide* (Pub. No. MAN0010844). Ion Torrent.

Figura 6. *Tubo de recuperación con la muestra.*



Nota. Tomado de Thermo Fisher Scientific. (2017). Ion 520™ & Ion 530™ Kit – OT2 user guide (Pub. No. MAN0010844). Ion Torrent.

- ✓ Se retiró casi todo el sobrenadante, dejando aproximadamente 100 μ L (utilizando un tubo de 1.5 mL con 100 μ L como referencia). Este paso se realizó alejado del pellet de ISPs, teniendo cuidado de no tocar el pellet (figura 6).
- ✓ Se resuspendió el pellet de ISPs mediante pipeteo dentro del volumen de 100 μ L.
- ✓ Se procedió de la misma forma con el segundo tubo que contenía otro pellet de ISPs.
- ✓ Se combinaron los dos volúmenes en un tubo de 1.5 mL LoBind.
- ✓ Se añadieron 100 μ L de agua libre de nucleasas a cada Recovery Tube y se pipeteó repetidamente para resuspender y homogeneizar cualquier residuo de perlas que hubiera quedado.
- ✓ Se transfirieron los volúmenes al mismo tubo de 1.5 mL LoBind-.
- ✓ Se completó hasta 1 mL con agua libre de nucleasas (aproximadamente 600 μ L).

- ✓ Se agitó la suspensión en vortex durante 30 segundos y se centrifugó por 2 segundos.
- ✓ Se centrifugó el tubo a $15,500 \times g$ durante 8 minutos.
- ✓ Se removió todo el sobrenadante dejando 20 μL (usando un tubo de 1.5 mL con 20 μL como referencia), teniendo especial cuidado con la posición del tubo para evitar tocar el pellet.
- ✓ Se adicionaron 80 μL de ISP solución de suspensión.
- ✓ Se realizó vórtex durante 30 segundos para resuspender completamente y se centrifugó por 2 segundos.
- ✓ Se mantuvo a temperatura ambiente y posteriormente se realizó la limpieza del equipo OT2.

d) Enriquecimiento de las ISPs

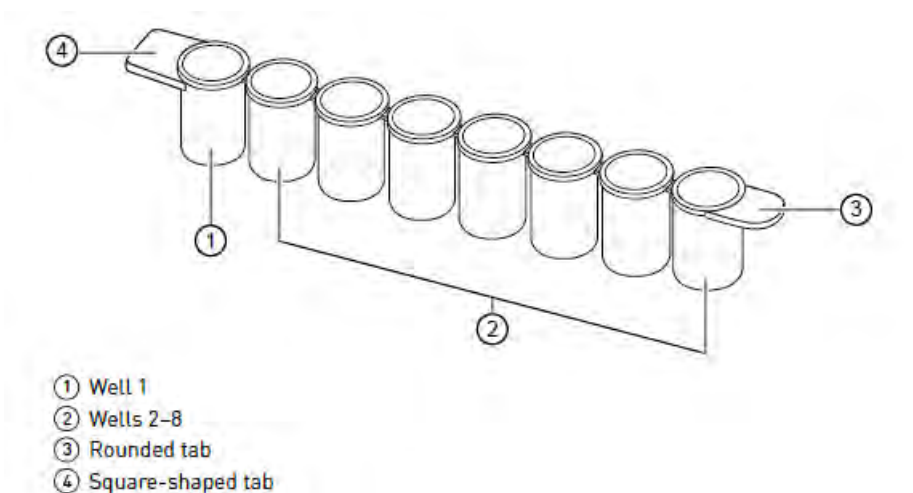
- ✓ El tubo que contenía 100 μL de las ISPs se mantuvo a temperatura ambiente.
- ✓ Se preparó una solución MELT OFF, se mantuvo a temperatura ambiente y se rotulo (según Tabla 12).
- ✓ Se realizó el vórtex del tubo de Dynabeads MyOne Streptavidin C1 Beads durante 30 segundos para resuspender las perlas, evitando confundirlas con las perlas utilizadas durante la fabricación de la librería.
- ✓ Se transfirieron 100 μL de las Dynabeads MyOne Streptavidin C1 Beads a un tubo de 1.5 mL LoBind.
- ✓ Se colocó el tubo en el rack magnético durante 2 minutos.
- ✓ Sin tocar el pellet, se removió y se descartó el sobrenadante.
- ✓ Se añadieron 1 mL de Ion One Touch Wash Solution a las Dynabeads MyOne Streptavidin C1 Beads que se encontraban en forma de pellet en el magneto.

- ✓ Se retiró el tubo del magneto y se vortexeó durante 30 segundos, asegurando una resuspensión total.
- ✓ Se colocó el tubo en el magneto durante 2 minutos para remover y descartar el sobrenadante.
- ✓ Se añadieron 130 μ L de MyOne Beads Capture Solution al pellet formado.
- ✓ Se retiró el tubo del magneto y se vortexeó durante 30 segundos para garantizar una resuspensión total.
- ✓ Se tomó el 8-well strip tube correspondiente al kit y se verificó la posición correcta del pocillo número 1 (orientado hacia el extremo cuadrado, como se muestra en la figura 7).
- ✓ Se resuspendieron las ISPs en los 100 μ L que permanecieron en el tubo LoBind del paso anterior, mediante pipeteo, y se transfirió el volumen completo al pocillo número 1.
- ✓ Se llenaron los pocillos siguientes como se indicaba en la Tabla 13.
- ✓ Posteriormente, se llenaron los pocillos restantes del 8-strip tube (well 3 a well 8).
- ✓ La solución Melt Off fue preparada al inicio de este protocolo. Los pocillos 6 y 8 permanecieron vacíos (empty).
- ✓ Colocamos el 8-strip tube en su posición correspondiente en el instrumento ES, como se muestra en la Figura 8.

Tabla 12. *Solución de MELT OFF*

Orden	Componente	Volumen
1	Solución Tween TM	280 U1
2	1 M NaOH	40 U1
-	Total	320 U1

Nota. Thermo Fisher Scientific. (2017). *Ion 520™ & Ion 530™ Kit – OT2 user guide* (Pub. No. MAN0010844). Ion Torrent.

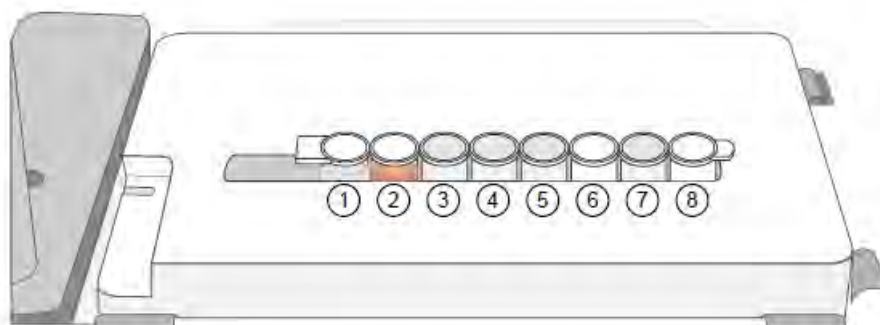
Figura 7. *Tira de 8 pocillos (8-well-strip tube)*

Nota. Tomado de Thermo Fisher Scientific. (2017). *Ion 520™ & Ion 530™ Kit – OT2 user guide* (Pub. No. MAN0010844). Ion Torrent.

Tabla 13. *Llenado de pocillos (8 well strip tube)*

Numero de pocillo (well number)	Reactivos a dispensar en el pocillo
Well 1	Muestra completa de ISP con plantilla positiva (100 μ L; preparada en el procedimiento anterior)
Well 2	130 μ L de Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads resuspendidas en solución de captura MyOne™ Beads (preparada en “Lavado y resuspensión de Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads”)
Well 3	300 μ L de solución de lavado Ion One Touch™ ES
Well 4	300 μ L de solución de lavado Ion One Touch™ ES
Well 5	300 μ L de solución de lavado Ion One Touch™ ES
Well 6	Vacío
Well 7	300 μ L de solución Melt-Off recién preparada (preparada anteriormente)
Well 8	Vacío

Nota. Adaptado de Thermo Fisher Scientific. (2017). Ion 520™ & Ion 530™ Kit – OT2 user guide (Pub. No. MAN0010844). Ion Torrent.

Figura 8. *Colocado de 8-strip tube en el instrumento ES*

Nota. Adaptado de Thermo Fisher Scientific. (2017). Ion 520™ & Ion 530™ Kit – OT2 user guide (Pub. No. MAN0010844). Ion Torrent.

e) Preparación del ION ONE TOUCH ES:

- ✓ Se procedió a colocar un tubo de PCR de 0.2 mL en el pocillo de la base cercana al soporte del brazo del equipo ES.
- ✓ Una vez lista el equipo ES, en la pantalla aparecieron las letras RDY, mostrando que el equipo estaba listo (ready) para iniciar.
- ✓ Se presionó START en la pantalla para dar inicio al procedimiento, lo cual tomó aproximadamente 35 minutos.
- ✓ Una vez terminado, el equipo mostró el mensaje END y sonó cada 60 segundos para indicar que había finalizado. Se retiró las ISPs enriquecidas antes de que transcurrieran los 15 minutos posteriores al final del procedimiento, teniendo cuidado con el tubo de PCR de 0.2 mL, ya que contenía más de 200 μ L de solución.

f) Retiro y lavado de las ISPs enriquecidas:

- ✓ Se centrifugó el tubo de PCR de 0.2 mL obtenido del ES a $15,500 \times g$ durante 5 minutos.
- ✓ Se tuvo cuidado con la posición del tubo, ya que en esta ocasión el pellet fue difícil de visualizar. Se retiró el sobrenadante, dejando 10 μ L (utilizando un tubo de PCR con 10 μ L de líquido como referencia).
- ✓ Se añadió 200 μ L de agua libre de nucleasas. Se pipeteó la solución repetidamente para homogeneizarla, suavemente, hasta lograr una resuspensión completa.
- ✓ Se centrifugó nuevamente el tubo a $15,500 \times g$ durante 5 minutos. Al finalizar, revisamos si existía alguna mancha marrón, por mínima que fuera, pudiendo ocurrir una de dos situaciones:

- ✓ SI EXISTIÓ: Se Resuspendió la solución, colocándose el tubo en el rack magnético durante 4 minutos, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de PCR y se centrifugó durante 5 minutos a $15,500 \times g$. Luego, se retiró el sobrenadante, dejando 10 μL , y se añadió 90 μL de agua libre de nucleasas para un volumen final de 100 μL . Se pipeteó repetidamente para homogeneizar la solución.
- ✓ SI NO EXISTIÓ: Se retiró el sobrenadante, dejando 10 μL , y se añadió 90 μL de agua libre de nucleasas para un volumen final de 100 μL . Se pipeteó repetidamente para homogeneizar la solución.
- ✓ Se mantuvo el tubo a temperatura ambiente.

5.5.10. Secuenciación de las librerías

En esta etapa se cargó el chip y se colocó en el secuenciador S5 del Ion Torrent iniciando la secuenciación. Durante la secuenciación, la ADN polimerasa sintetizó una nueva cadena de ADN, incorporando nucleótidos complementarios a la plantilla. Cada incorporación de nucleótido liberó un ion de hidrógeno (H^+), que fue detectado por un sensor de pH en el chip. El procedimiento se realizó según el kit de secuenciación (Ion PGM™ Hi-Q™).

- ✓ Para este procedimiento se utilizó los siguientes reactivos que se encontraban en refrigeración:
 - Ion S5™ Annealing Buffer
 - Ion S5™ Foaming Solution
 - Ion S5™ Loading Buffer
 - Ion S5™ Sequencing Polymerase
 - Ion 520™ y Ion 530™ Control Ion Spheres

- a) Se preparó el Tampón de templado (Annealing Buffer) al 50%. Se utilizó 1 mL de este tampón y 1 mL de agua libre de nucleasas.
- b) Se preparó las ISPs para la carga del chip:
- ✓ Se hizo el vórtex de las Control Ion Spheres durante 5 segundos y se centrifugó por 2 segundos.
 - ✓ Se añadió 5 μL de las Control Ion Spheres al tubo de PCR que contenía las ISPs enriquecidas. Se homogenizó la solución mediante pipeteo.
 - ✓ Se centrifugó el tubo durante 5 minutos a $15,500 \times g$.
 - ✓ Se retiró cuidadosamente el sobrenadante, dejando 10 μL (utilizando un tubo de PCR con 10 μL de líquido como referencia), y se eliminó el líquido del extremo opuesto al pellet.
 - ✓ Se añadió 15 μL del tampón de templado sin diluir para obtener un volumen final de 25 μL .
 - ✓ Se añadió 20 μL del Ion S5 Sequencing Primer para alcanzar un volumen final de 45 μL . Se realizó un vórtex brevemente de la solución y se procedió al centrifugado durante 2 segundos.
 - ✓ Se programó el termociclador a 95 °C durante 2 minutos y luego a 37 °C durante 2 minutos, utilizando la opción Heated Lid. Se colocó el tubo en el termociclador y se ejecutó el programa. Se retiró el tubo cuidadosamente del termociclador.
 - ✓ Se añadió 6 μL de Ion S5 Sequencing Polymerase y 10 μL del Ion S5 Loading Buffer, se hizo el vórtex brevemente y se centrifugó durante 2 segundos. Se incubó la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- c) Carga del chip 530 para la secuenciación:
- ✓ Se colocó el chip en una superficie plana.

- ✓ Se dispensó 40 μL de la muestra directamente en el Loading Port del chip, seguido de 20 μL en el pocillo que rodea el puerto de entrada de muestra.
 - ✓ Se centrifugó el chip durante 5 minutos en la centrífuga con el adaptador Ion Minifuge.
 - ✓ Mientras transcurría la centrifugación, en un tubo de 1.5 mL, se combinó 900 μL del tampón de templado al 50% (preparado previamente) con 100 μL de solución espumosa (Foaming Solution) y se homogenizó mediante pipeteo vigoroso para generar espuma. Dado que esta espuma era temporal, en algunos casos fue necesario generarla nuevamente.
 - ✓ Al finalizar la centrifugación, se colocó el chip sobre una superficie plana e inyectó 100 μL de la espuma a través del puerto de carga (Loading Port), eliminando el exceso de líquido del puerto de salida (a la derecha del chip).
 - ✓ Utilizando una pipeta nueva en cada paso, se repitió este proceso 3 veces más, para un total de 4 inyecciones de espuma.
 - ✓ Se inyectó 100 μL del tampón de templado al 50% (preparado previamente) en el puerto de carga y se retiró el exceso de líquido de la bandeja de salida (no del puerto de salida).
 - ✓ Empleando una pipeta nueva cada vez, se repitió la inyección de 100 μL del tampón de templado al 50% 3 veces más.
 - ✓ Una vez completado este proceso, el chip estuvo listo para ser colocado en el secuenciador.
- d) Preparando el secuenciador S5 SYSTEM
- ✓ Para inicializar el secuenciador se necesitó:

- ✓ ION S5 WASH SOLUTION (botella grande, 1 por cada procedimiento, por lo cual se tuvo que cambiar. Tenía un seguro de color rojo; sin retirar dicho seguro, la botella debía ser invertida 5 veces para homogenizar su contenido. Luego de eso se retiró el seguro y se instaló en el secuenciador en su posición correspondiente).
- ✓ ION S5 CLEANING SOLUTION (botella pequeña, suficiente volumen para 4 procedimientos. Se verificó que existía más de la mitad del volumen dentro de la botella).
- ✓ Ion S5™ Sequencing Reagents cartridge: cartucho que se guardó congelado. Debió ser temperado por 45 minutos antes de su uso. Se utilizó uno por cada procedimiento y, mientras estaba temperando, no debía ser retirado de su cubierta plástica. Al pasar los 45 minutos, recién pudo instalarse dentro del equipo.
- ✓ Se realizó la instalación de las botellas en sus lugares correspondientes. Se verificó la posición que tenía el chip usado para que, al reemplazarlo por un chip nuevo, tuviera la misma orientación.

e) Iniciando la secuenciación

- ✓ Una vez cargado el nuevo chip en el S5, se cerró las puertas correctamente y se presionó RUN en la pantalla del secuenciador. El secuenciador solicitó que se reemplace el chip que ya se había reemplazado en el paso previo, se continuó presionando NEXT.
- ✓ Se eligió el nombre del PLANNED RUN que había sido programado para este procedimiento y el BARCODE del chip que había sido cargado correctamente.

- ✓ Una vez seleccionado todo, se colocó REVIEW para ver el resumen de la corrida programada y se presionó START RUN.
- ✓ El procedimiento duró aproximadamente 3.5 a 4 horas, luego de lo cual el equipo S5 comenzó el análisis de los datos generados para crear los archivos UBAM.
- ✓ Una vez finalizada la generación de los archivos UBAM, se procedió a descargarlos para cargarlos en el servidor de ION REPORTER. En este paso era necesario que el secuenciador estuviera encendido, de lo contrario no se podía acceder a la memoria del servidor.

5.5.11. Análisis bioinformático

Para el análisis de los datos se utilizó el software CLC Genomics Workbench v. 24.0.2 siguiendo el siguiente flujo de trabajo de Data QC and Taxonomic profiling, se utilizó los archivos del secuenciamiento .fastq y la metadata .cvs, los datos se procede a “QC for Sequencing reads” el cual nos dá como resultado un “graphical Report”, seguidamente iniciamos con “Trim reads”, procedemos a la “trimmed sequences” para luego realizar el “taxonomic profiling” el cual nos da como informe “OTU abundance table” (ANEXO 23). La tabla de abundancia, muestra los nombres de los taxones (ensamblajes) identificados, junto con su taxonomía completa, una estimación de cobertura, la cantidad total de lecturas encontradas en la muestra asociadas a este taxón y el índice de confianza de la asignación taxonómica. La tabla se puede visualizar mediante las funciones de gráficos de barras apiladas. La base de datos consultada fue Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov>)

CAPÍTULO VI

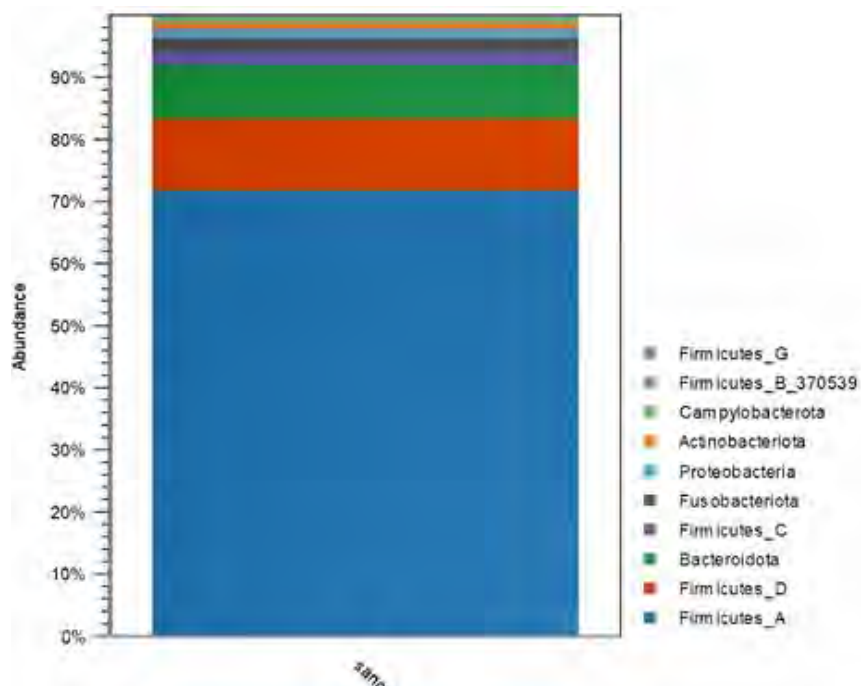
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis de los resultados de la composición de la microbiota fecal en crías de llamas sanas

6.1.1. Según Phylum

Resultados respecto a la categoría phylum en la Figura 9, se registraron los 10 Phylum de bacterias más abundantes, teniendo a Firmicutes_A (72%), Firmicutes_D (12%), Bacteroidota (8.6%), Firmicutes_C (2.2%), Fusobacteriota (2.1%), Proteobacteria (1.5%), Actinobacteriota (1.0%), y Campylobacterota (0.78%) que fueron los taxones más abundantes y también Firmicutes_B_370539 y Firmicutes_G en menor abundancia (ambos menores a 1%) en las muestras analizadas.

Figura 9. Abundancia relativa (%) consensuada de los principales phylum de bacterias en muestras fecales de cría de llama sana.



Los resultados mostrados en este trabajo indican un alto grado de similitud con la literatura que existe, se tiene gran cantidad de investigaciones en el análisis de la microbiota que describen la composición de la microbiota intestinal en animales domesticos, alpacas (*Vicugna pacos*) (Carroll et al., 2019; Zapata et al., 2024), llama (Cerón, 2014), camellos dromedarios (Sansudin et al., 2011), terneros (Klein-Jöbstl et al., 2019), ganado criollo (Wang et al., 2022), y en estudios relacionados a la microbiota del rumen de ovejas (Wang et al., 2016; Zhang et al., 2021), ganado vacuno, ciervo (Kittelmann et al., 2013), aunque es importante mencionar la poca literatura relacionada a la comunidad microbiana en llamas.

A nivel de phylum (Figura 9) los taxones mas abundantes en este estudio, son Firmicutes y Bacteroidota. Este hallazgo es consistente con un estudio en alpacas peruanas neonatales que reveló que estos filos, junto con Verrucomicrobiota, representaban aproximadamente el 80% de la población bacteriana intestinal, con diferencias significativas en la diversidad microbiana observadas entre animales sanos y con diarrea (Zapata et al., 2024). Asimismo, diversos estudios reportan mayor abundancia de Firmicutes en el tracto digestivo de llamas y alpacas, vinculado a dietas fibrosas (Cerón, 2014; Carroll et al., 2019). Cabe destacar que el phylum Firmicutes presenta miembros que se han caracterizado como bacterias beneficiosas que tienen una participación activa en un adecuado entorno intestinal y evitan la infiltración de patógenos (Li et al., 2019).

Adicionalmente, la mayor abundancia de los phylum Firmicutes y de Bacteroidota en las muestras de heces de cría de llama sana también coinciden con reportes en otras especies rumiantes, tal como los datos reportados por Klein-Jöbstl et al. (2019) en terneros recién nacidos al destete, y con los resultados de Wang et al. (2022) hallados en muestras de digesta de varias regiones del tracto gastrointestinal en novillas. En dichos estudios se

indica que los filos bacterianos más dominantes en el estómago, intestino delgado e intestino grueso fueron Firmicutes y Bacteroidota, lo cual enfatiza la importancia de estos filos en el tracto gastrointestinal. Esta distribución sugiere que estos comensales intestinales ayudan predominantemente en el metabolismo de los nutrientes, el metabolismo de los fármacos, la prevención de la colonización de microorganismos patógenos y en la función de la barrera intestinal (Jandhyala, 2015). Por otra parte, una mayor abundancia de Firmicutes y Bacteroidota a nivel intestinal puede contribuir a entornos con gran requerimiento de energía y nutrición en el hospedador (Spence et al., 2006).

Si bien no se dispone de evidencia funcional directa que vincule a Firmicutes con la degradación de nutrientes en el tracto gastrointestinal de llamas y alpacas, estudios existentes muestran que Firmicutes son abundantes y responden a la dieta en el compartimiento 1 (C1) y el intestino distal (Carroll et al., 2019). En este contexto, los Firmicutes son conocidos por su papel en el metabolismo de los nutrientes y el mantenimiento de la salud intestinal, mientras que Bacteroidota contribuye a la estabilidad y diversidad del microbioma intestinal (Zhang et al., 2021).

Los phylum Fusobacteriota (2.1%) y Proteobacteria (1.5%) encontrados en este estudio, sugiere una microbiota intestinal compleja que podría desempeñar un papel en la inmunomodulación y la protección contra patógenos (Ganguly y Chandrasekhara, 2019). Cabe destacar que el phylum Fusobacteriota está compuesto por bacterias gramnegativas, bacilos e inmóviles que prosperan tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Estos microorganismos, que suelen tener forma fusiforme, son conocidos por fermentar azúcares (Nalage et al., 2024). Estructuralmente, este filo se compone de una sola clase (Fusobacteriia) y un orden (Fusobacteriales), que incluye dos familias: Leptotrichiaceae y Fusobacteriaceae (Nalage et al., 2024). En cuanto a su distribución, se encuentran

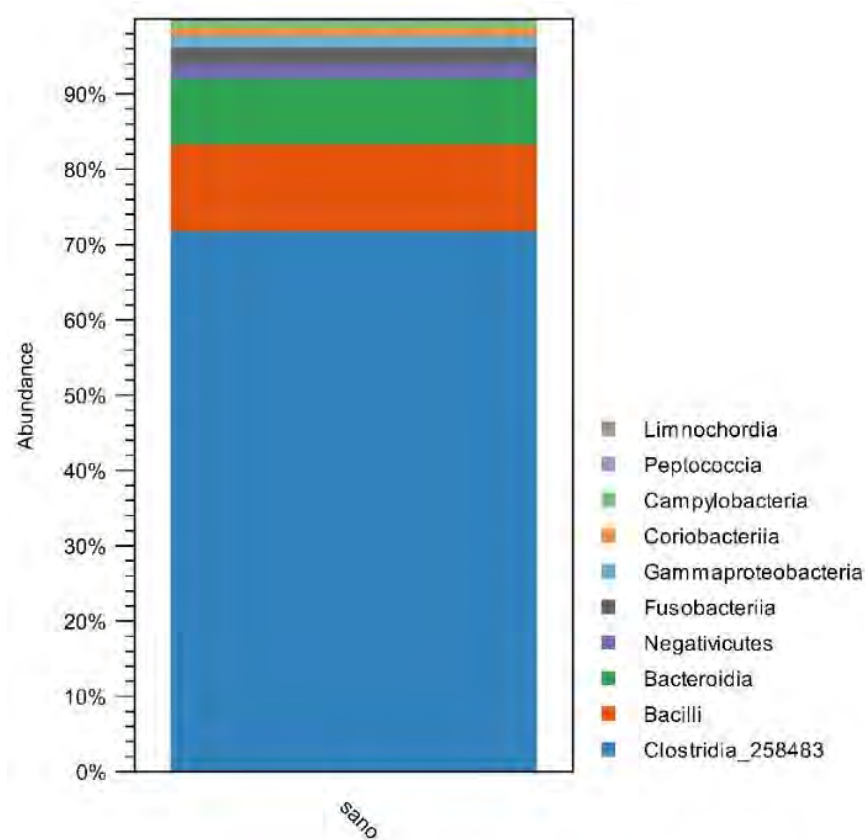
comúnmente en la mucosa de humanos y animales, particularmente en la cavidad oral, donde desempeñan un papel importante en la periodontitis. De igual manera, están presentes en el tracto gastrointestinal de humanos y animales (Nalage et al., 2024).

Por su parte, las Proteobacterias son generalmente anaerobios facultativos, lo que significa que pueden tolerar una amplia gama de entornos de oxígeno. Gracias a esta capacidad, se cree que contribuyen al equilibrio del entorno anaeróbico del tracto intestinal, estabilizando la microbiota estrictamente anaeróbica (Nalage et al., 2024). Adicionalmente, y como consecuencia directa de su metabolismo flexible, estas bacterias se encuentran entre los colonizadores iniciales de los intestinos tanto en animales como en humanos, especialmente en recién nacidos, donde el ambiente es aún rico en oxígeno (Nalage et al., 2024).

6.1.2. Según clase

Resultados con respecto a la categoría clase en la Figura 10, se muestra las 10 clases de bacterias más abundantes encontrados en crías sanas y estas fueron: Clostridia_258483 (72%), Bacilli (12%), Bacteroidia (8.6%), Negativicutes (2.2%), Fusobacteriia (2.1%), Gammaproteobacteria (1.5%), Coriobacteriia (0.99%), Campylobacteriia (0.78%) y otras con menor porcentaje Peptococcia y Limnochordia.

Figura 10. *Abundancia relativa (%) consensuada de las principales clases de bacterias en muestras fecales de cría de llama sana.*



Con respecto a la clase taxonómica (Figura 10), los taxones predominantes en este estudio, fueron Clostridia_258483, Bacilli y Bacteroidia. Este resultado concuerda con el reporte de Zapata et al. (2024) en alpacas neonatos, quienes también reportaron una mayor abundancia de la clase Clostridia en crías de alpacas sanas (grupo control), pero con porcentajes menores a los que se reporta en el presente estudio. A su vez, indican que encontraron abundancia de Bacteroidia, Verrucomicrobiae y Bacillis, clases que también difieren del presente estudio, ya que no se encontró Verrucomicrobiae en crías de llamas sanas. Estas discrepancias podrían deberse a la diferencia de especies, donde la llama podría ser más resistente por no haberse encontrado la clase Verrucomicrobiae, la cual se considera patógena.

La clase taxonómica Clostridia y Bacteroidia también fueron reportadas en la microbiota ruminal en ovinos (Wang et al., 2016; Zhang et al., 2021) y en camellos

dromedarios (*Camelus dromedarius*) (Samsudin et al. 2011). La clase Clostridia son un grupo de bacterias grampositivas del filo Firmicutes que, por ejemplo, en humanos colonizan el intestino durante el primer mes de vida y ocupan un nicho específico en la mucosa intestinal en estrecha proximidad con las células del huésped (Lopetuso et al., 2013). Entre sus múltiples funciones, cumplen un papel crucial en la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como butirato, propionato y acetato, que no solo aportan energía a los enterocitos, sino que también ejercen efectos antiinflamatorios (Lopetuso et al., 2013).

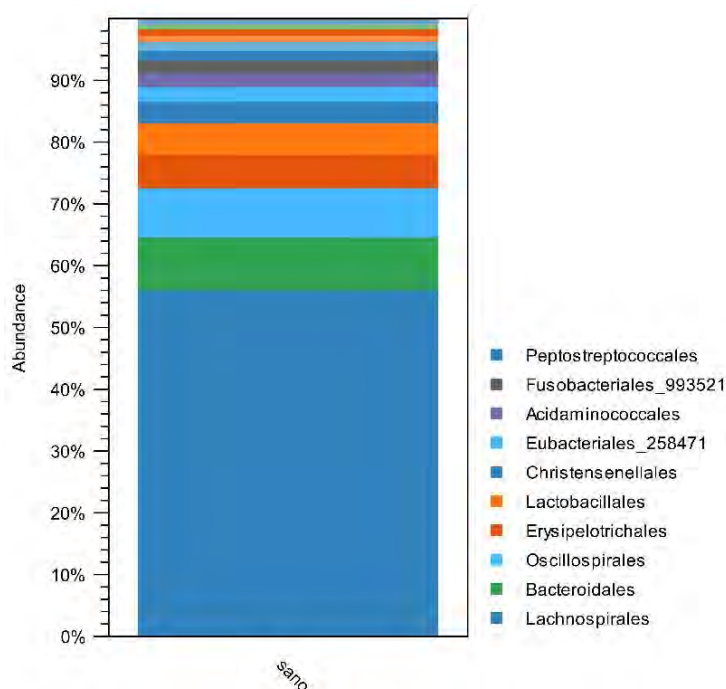
La clase taxonomica Bacilli, también fue reportado en crías de alpacas sanas (grupo control) en menor abundancia (Zapata et al., 2024) y en otras especies, en el estomago del camello dromedario (Samsudin et al., 2011). Esta clase taxonómica constituye varios géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*, que se caracterizan por prevalecer en el tracto digestivo, lo que la consolida como otro grupo diverso de Firmicutes (Nalage, 2024). En conjunto, estos hallazgos subrayan el papel crucial de la clase Bacilli en el mantenimiento de la salud intestinal y la eficiencia energética derivada de la fermentación de dietas fibrosas en diversas especies animales, lo que pone de manifiesto su adaptabilidad e importancia ecológica en distintos nichos gastrointestinales.

Con respecto la clase Negativicutes, reportado en este estudio, podemos mencionar que esta clase de bacteria, junto con *Bacteroidetes*, se erige como uno de los productores dominantes de propionato a partir de la fibra dietética (hexosas) en el colon (Reichardt et al., 2014). Por lo tanto, su presencia y abundancia contribuyen significativamente al pool total de este AGV beneficioso en el intestino.

6.1.3. Según orden

Resultados en la categoría orden en la Figura 11, se tiene las 10 órdenes más abundantes encontradas las cuales fueron: Lachnospirales (56%), Bacteroidales (8.6%), Oscillospirales (7.9%), Erysipelotrichales (5.3%), Lactobacillales (5.2%), Christensenellales (3.6%), Eubacteriales_258471 (2.3%), Acidaminococcales (2.2%), fusobacteriales_993521 (2.1%) y Pectostreptococcales (1.6%). También se identificaron otras en menor abundancia Enterobacteriales _A_737866 (1.5%) y Campylobacteriales (0.78%) en la Tabla 16.

Figura 11. Abundancia relativa (%) consensuada a nivel de orden de las principales bacterias en muestras fecales de cría de llama sana.



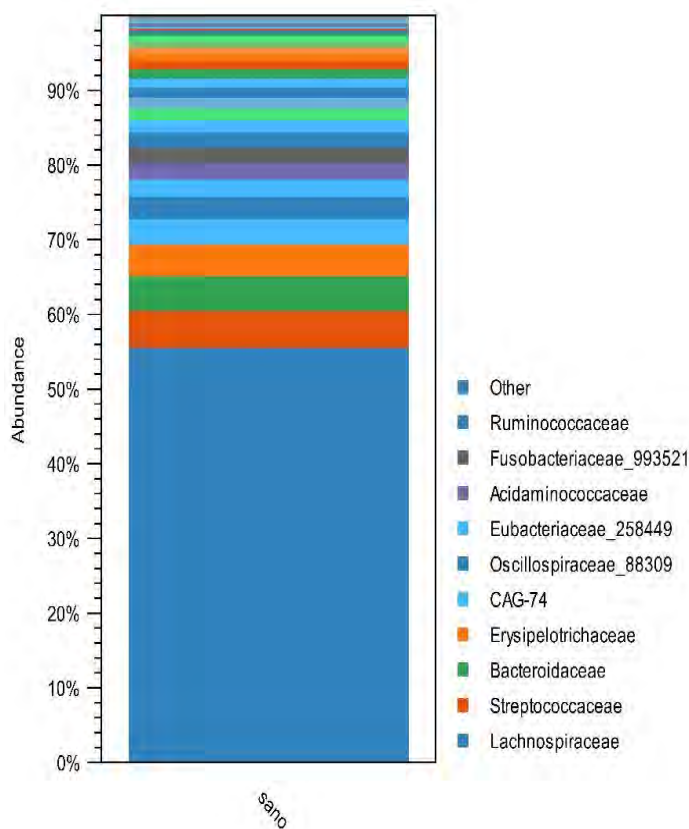
Con respecto al orden taxonomico (Figura 11), se reporta en este estudio a Lachnospirales, Bacteroidales, Oscillospirales, Erysipelotrichales y Lactobacillales como los mas abundantes, reportados en terneros (Klein-Jöbstl et al., 2019), ovejas y ciervos (Kittelman et al., 2013). El orden Oscillospirales (Yang et al., 2021), agrupa géneros bacterianos ampliamente presente en el intestino humano y animal, frecuentemente detectado en estudios de secuenciación genética. Sin embargo, su aislamiento y cultivo

puro siguen sin ser alcanzados, lo que la clasifica como un "microorganismo no cultivado", lo que hasta ahora ha limitado su estudio funcional completo (Yang et al., 2021). pero que ha ganado atención debido a su importante presencia en la microbiota intestinal humana y su asociación con resultados de salud como la delgadez y las condiciones metabólicas (Gophna et al., 2017). La evidencia combinada de datos genómicos y de perfiles metabólicos sugiere firmemente que *Oscillospira* tiene la capacidad potencial de producir ácidos grasos de cadena corta (AGCC), específicamente butirato. Este metabolito es crucial para la salud del colonocito (célula intestinal), tiene efectos antiinflamatorios sistémicos y regula el metabolismo energético, lo que explicaría su asociación con la delgadez (Yang et al., 2021).

6.1.4. Según familia

Resultados en la categoría familias se puede observar que en la Figura 12, se presenta 10 familias más abundantes para crías de llamas sanas, siendo estas: Lachnospiraceae (56%), Streptococcaceae (4.9%), Bacteroidaceae (4.7%), Erysipelotrichaceae (4.2%), CAG:74 (3.4%), Oscillospiraceae_88309 (3.0%), Eubacteriaceae_258449 (2.3%), Acidaminococcaceae (2.2%), Fusobacteriaceae_993521 (2.1%), Ruminococcaceae (1.9%). Otros en menor abundancia Acutalibacteraceae (1.6%), Anaerovoracaceae (1.4%), Barnesiellaceae (1.6%), Tannerellaceae (1.2%), Rikenellaceae (0.75%), Enterobacteriaceae_A (1.5%), Eggerthellaceae (0.84%), Campylobacteraceae (0.78%), Butyricicoccaceae (1.2%) y Coprobacillaceae (1.1%) en la Tabla 15-16.

Figura 12. *Abundancia relativa (%) consensuada de las principales familias de bacterias en muestras fecales de crías de llamas sanas.*



En relación a la familia taxonómica (Figura 12), los taxones mas abundantes a mencionar, Lachnospiraceae, Streptococcaceae, Bacteroidaceae y Erysipelotrichaceae. Lachnospiraceae es reportado en ganado criollo (Wang et al., 2022), en rumen de ovejas y ciervos (Kittelmann et al., 2013), Lachnospiraceae y Bacteroidaceae en terneros (Klein-Jöbstl et al., 2019).

Lachnospiraceae es una familia de clostridios que incluye los principales componentes del microbioma del tracto gastrointestinal en mamíferos, principalmente en rumiantes (Kittelmann et al., 2013) y en caso de humanos se encuentra incluso en el meconio (Sagheddu et al., 2016). En este trabajo de investigación la familia Lachnospiraceae también se encuentra como principal componente en crías de llamas sanas, corroborando los reportes ya mencionados. La alta abundancia la familia Lachnospiraceae (56%) sugiere una microbiota especializada en fermentación de

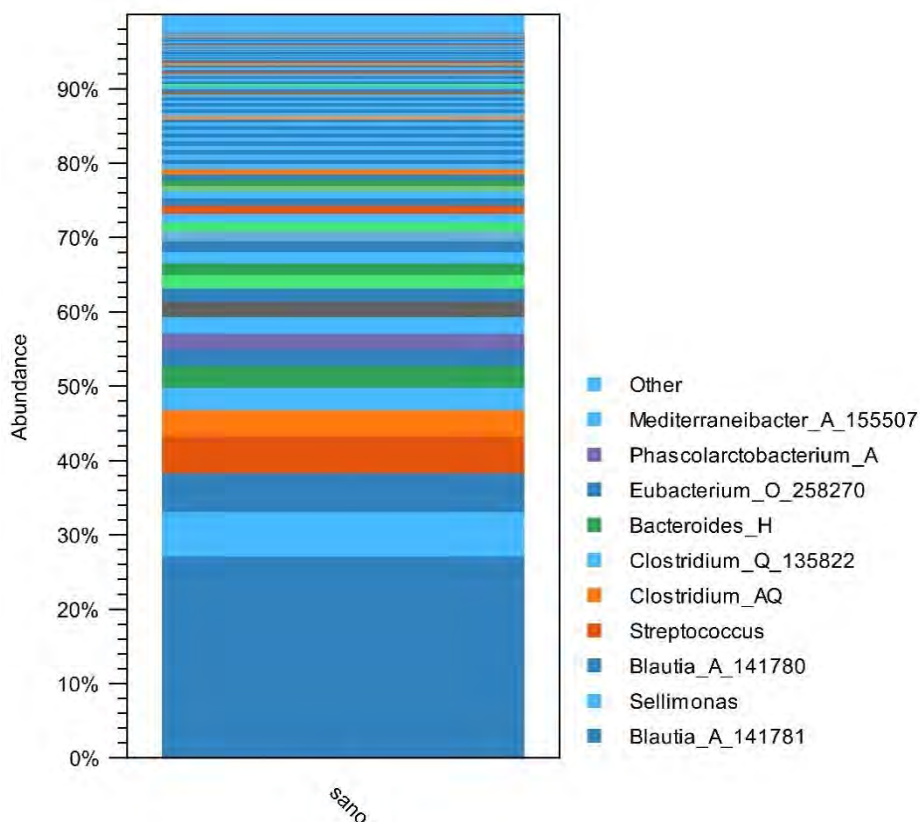
carbohidratos complejos, similar a lo reportado por Wang et al. (2022) en bovinos, donde indica una abundancia considerable de Ruminococcaceae, junto con Lachnospiraceae y Christensenellaceae, en todas las regiones del tracto gastrointestinal. Esto Implica que la alta abundancia de Firmicutes y Lachnospiraceae refleja una microbiota especializada en degradación de fibra, esencial para la eficiencia digestiva en llamas, así como la baja proporción de Proteobacteria (1.5%), lo que sugiere un estado de equilibrio (eubiosis), sin dominancia de patógenos.

La familia Ruminococcaceae, también se ha identificado en rumen varias especies de rumiantes (Kittelman et al., 2013). En particular el género Ruminococcus, desempeña un papel crucial en la microbiota intestinal de rumiantes sanos, como alpacas y llamas, al facilitar la degradación de polisacáridos complejos en nutrientes que el huésped puede utilizar (Reau y Suen, 2018; Reau et al., 2016). Estas bacterias se asocian predominantemente con dietas herbívoras, esenciales para su crecimiento y funcionamiento (Reau et al., 2016). Sin embargo, su abundancia puede ser menor en ciertos rumiantes debido a las variaciones dietéticas y a la competencia con otras bacterias celulolíticas, como *Fibrobacter succinogenes*, que puede predominar en ambientes específicos como el rumen (Yeoman et al., 2021). En las alpacas, los estudios indican que la composición de la microbiota intestinal está influenciada por la dieta y la ubicación del cuerpo, pero la abundancia general de Ruminococcaceae puede ser menos pronunciada en comparación con otros rumiantes, posiblemente debido a sus adaptaciones dietéticas específicas y la dinámica ecológica dentro del microbioma intestinal (Carroll et al., 2019; Carhuapoma-Delacruz et al., 2022).

6.1.5. Según género

Resultados a nivel de género, en la Figura 13, se reporta los 10 géneros más abundantes, siendo estos: *Blautia_A_141781* (27%), *Sellimonas* (5.9%), *Blautia_A_141780* (5.3%), *Streptococcus* (4.9%), *Clostridium_AQ* (3.6%), *Clostridium_Q_135822* (3.0%), *Bacteroides_H* (2.9%), *Eubacterium_O_258270* (2.2%), *Mediterraneibacter_A* (2.2%), *Phascolarctobacterium_A* (2.2%). Otros en menor abundancia *Cetobacterium_A* (2.1%), *Escherichia_710834* (1.3%), *Anaerostipes* (1.5%), *Lawsonibacter* (1.5%), *Butyricicoccus_A_77030* (1%), *CAG:74* (1.8%), *Phocaeicola_A_858004* (1.8%), *Barnesiella* (1.6%), *Parabacteroides_B_862066* (1.2%), *Alistipes_A_871400* (0.74%) y *Campylobacter_A:2583* (0.78%) en la Tabla 14 – 16.

Figura 13. Abundancia relativa (%) consensuada de los principales géneros de bacterias en muestras fecales de cría de llama sana.



Respecto al taxón genero (Figura 13), se ha identificado en mayor abundancia, *Blautia*, *Sellimonas*, *Streptococcus*, *Clostridium* y *Bacteroides*. *Clostridium* fue reportado en la microbiota fecal bovina (Pacheco-Torres et al., 2022). En estudios con alpacas peruanas neonatales, *Blautia* se identificó entre las clases bacterianas predominantes, aunque su abundancia fue notablemente mayor en aquellas con diarrea, lo que sugiere una relación compleja entre este género y la salud intestinal (Zapata et al., 2024). Si bien los porcentajes específicos de abundancia de *Blautia* en rumiantes sanos no se detallan explícitamente en la literatura, forma parte del filo Firmicutes, que en conjunto constituye alrededor del 80% de la microbiota intestinal de estos animales (Zapata et al., 2024). Por tanto, la presencia de *Blautia* es indicativa de una microbiota saludable, aunque su abundancia exacta puede variar según el estado de salud y factores dietéticos.

En relación a la menor abundancia de géneros *Cetobacterium_A* y *Escherichia*. Refleja una microbiota típica de animales sanos, donde bacterias comensales superan a potenciales patógenos (*Escherichia*), formando una comunidad diversa de microorganismos que juega un papel crucial en el mantenimiento del sistema inmunológico (Mejía et al., 2024).

Tabla 14. Composición de la microbiota bacteriana fecal en crías de llamas sanas

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
Firmicutes_A (72%)	Clostridia_258483 (72%)	Lachnospirales (56%)	Lachnospiraceae (56%)	<i>Blautia_A_141781</i> (27%)
				<i>Sellimonas</i> (5.9%)
				<i>Blautia_A_141780</i> (5.3%)
				<i>Clostridium_Q_135822</i> (3%)
				<i>Mediterraneibacter_A_155507</i> (2.2%)
				<i>Anaerostipes</i> (1.5%)
		Eubacteriales (2.3%)	Eubacteriaceae (2.3%)	<i>Eubacterium_O_258270</i> (2.2%)
		Oscillospirales (7.9%)	Ruminococcaceae (1.9%)	-
			Acutalibacteraceae (1.6%)	-
			Oscillospiraceae (3%)	<i>Lawsonibacter</i> (1.5%)
			Butyricicoccaceae (1.2%)	<i>Butyricoccus_A_77030</i> (1%)
		Christensenellales (3.6)	CAG:74 (3.4%)	CAG:74:5992 (1.8%)
		Pectostreptococcales (1.6%)	Anaerovoracaceae (1.4%)	-

Tabla 15. Composición de la microbiota bacteriana fecal en crías de llamas sanas (Continuación)

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
Firmicutes-D (12%)	Bacilli (12%)	Lactobacillales (5.2%)	Streptococcaceae (4.9%)	<i>Streptococcus</i> (4.9)
			Erysipelotrichaceae (4.2%)	<i>Clostridium_AQ</i> (3.6%)
		Erysipelotrichales (5.3%)	Coprobacillaceae (1.1%)	-
			Bacteroidaceae (4.7%)	<i>Bacteroidetes_H</i> (2.9%)
				<i>Phocaeicola_A_858004</i> (1.8%)
Bacteroidota (8.6%)	Bacteroidia (8.6%)	Bacteroidales (8.6%)	Barnesiellaceae (1.6%)	<i>Barnesiella</i> (1.6%)
			Tannerellaceae (1.2%)	<i>Parabacteroides_B_862066</i> (1.2%)
			Rikenellaceae (0.75%)	<i>Alistipes_A_871400</i> (0.74%)

Tabla 16. Composición de la Microbiota bacteriana fecal en crías de llamas sanas (Continuación)

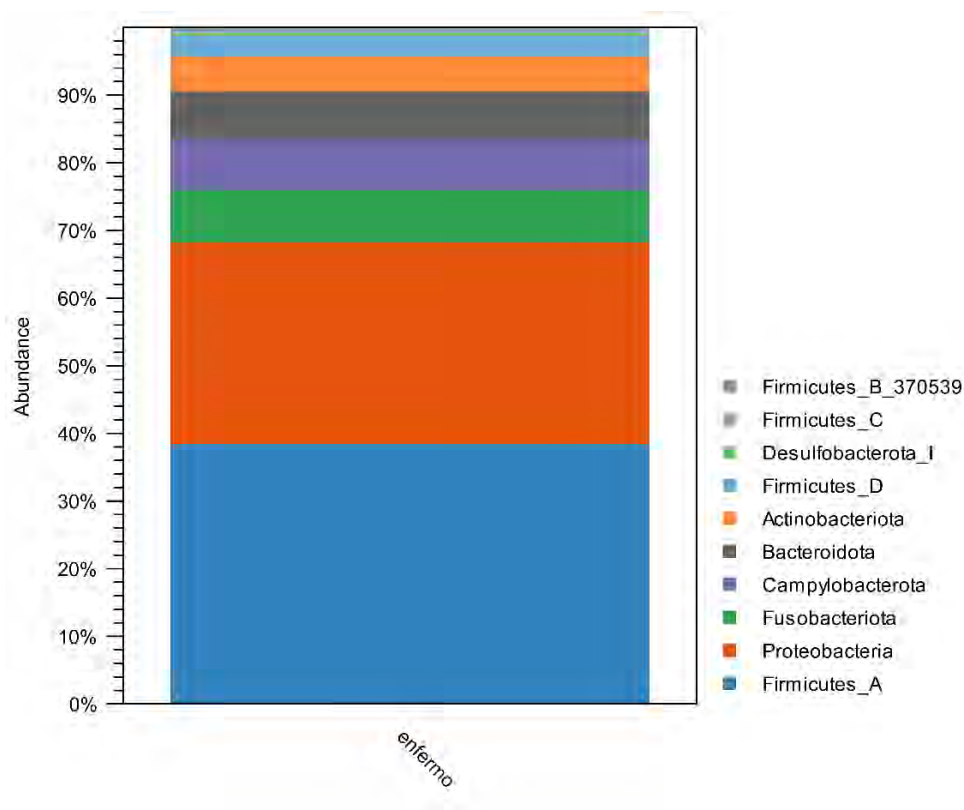
Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
Firmicutes_C (2.2%)	Negativicutes (2.2%)	Acidaminococcales (2.2%)	Acidaminococcaceae (2.2%)	<i>Phascolarctobacterium_A</i> (2.2%)
Fusobacteriota (2.1%)	Fusobacteriia (2.1%)	Fusobacteriales_993521 (2.1%)	Fusobacteriaceae_993521 (2.1%)	<i>Cetobacterium_A</i> (2.1%)
Proteobacteria (1.5%)	Gammaproteobacteria (1.5%)	Enterobacterales_A737866 (1.5%)	Enterobacteriaceae_A (1.5%)	<i>Escherichia_710834</i> (1.3%)
Actinobacteriota (1%)	Coriobacteriia (0.99)	-	Eggerthellaceae (0.84%)	-
Campylobacterota (0.78%)	Campylobacteria (0.78)	Campylobacterales (0.78%)	Campylobacteraceae (0.78%)	<i>Campylobacter_A:2583</i> (0.78%)

6.2. Análisis de resultados de la composición de la microbiota bacteriana fecal en crías de llamas con proceso de diarrea

6.2.1. Según phylum

Resultados de la abundancia de microorganismos a nivel de phylum se muestra en la Figura 14, donde los 10 phylum más abundantes en muestras de crías con diarrea fueron: Firmicutes_A (39%), Proteobacteria (30%), Fusobacteriota (7.7%), Campylobacterota (7.5%). Bacteroidota (7.1%), Actinobacteriota (5.2%), Firmicutes_D (3.0%), Desulfobacterota_I (0.55%) y otras en menor abundancia Firmicutes_C y Firmicutes_B_370539.

Figura 14. Abundancia relativa (%) consensuada de los principales phylum de bacterias en muestras fecales de cría de llama con diarrea.



En relación al phylum taxonomico (Figura 14). Los resultados hallados muestran una reducción drástica de los filos Firmicutes A (39% vs. 72% en sanas) y aumento de

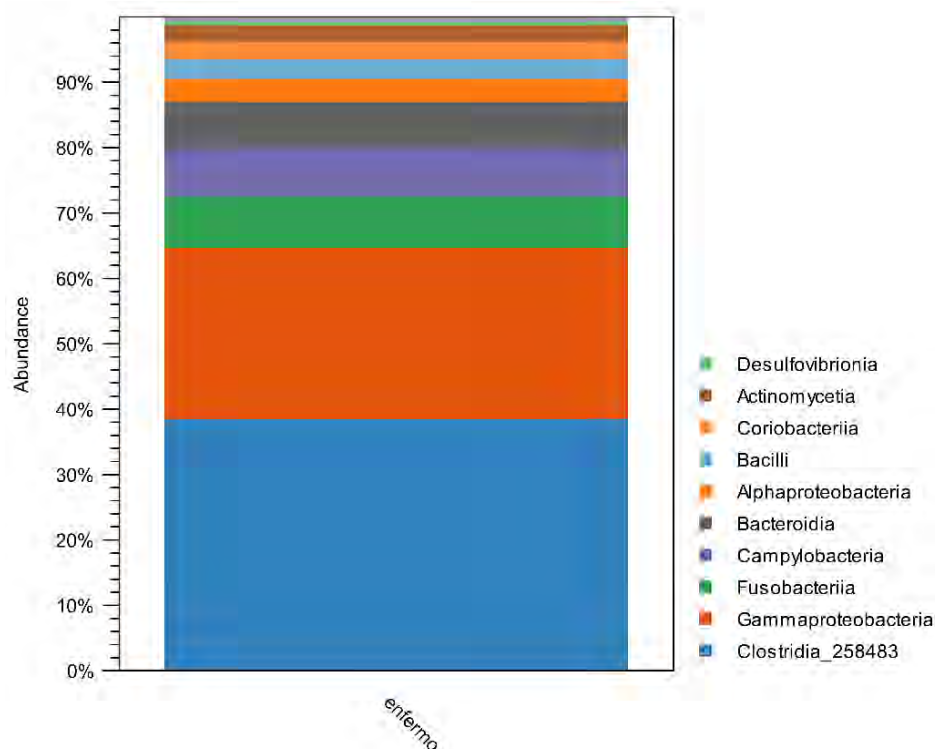
Proteobacteria (30% vs. 1.5%). Este patrón de disbiosis, donde Firmicutes es reemplazado por Proteobacteria, coincide con lo reportado en la bibliografía para cuadros diarreicos en otras especies de rumiantes, como corderos y cabritos (Wang et al., 2023). Además el phylum Proteobacteria juega un papel importante en satisfacer sus elevadas necesidades energéticas y nutricionales debido a su variada gama de funciones metabólicas (Zhang et al., 2020), necesidades que son mayores en crías con procesos de diarrea, por ello es que podría observarse el aumento significativo de este phylum.

La abundancia de Fusobacteriota (7.7%) y Campylobacterota (7.5%) en muestras fecales de crías de llamas con diarrea, son similares a los reportados por Pacheco-Torres (2020) en bovinos, donde también registraron tres géneros (*Clostridium*, *Corynebacterium* y *Fusobacterium*) y una especie (*Campylobacter fetus*) potencialmente patógenas.

6.2.2. Según clase

Resultados con respecto al taxón clase, en la Figura 15, se observa las 10 clases más abundantes, siendo estas: Clostridia_258483 (39%), Gammaproteobacteria (26%), Fusobacteriia (7.7%), Campylobacteriia (7.5%), Bacteroidia (7.1%), Alphaproteobacteria (3.5%), Bacilli (3.0%), Coriobacteriia (2.7%), Actinomycetia (2.5%) y Desulfovibrionia (1%).

Figura 15. Abundancia relativa (%) consensuada de las principales clases de bacterias en muestras fecales de cría de llama con diarrea.



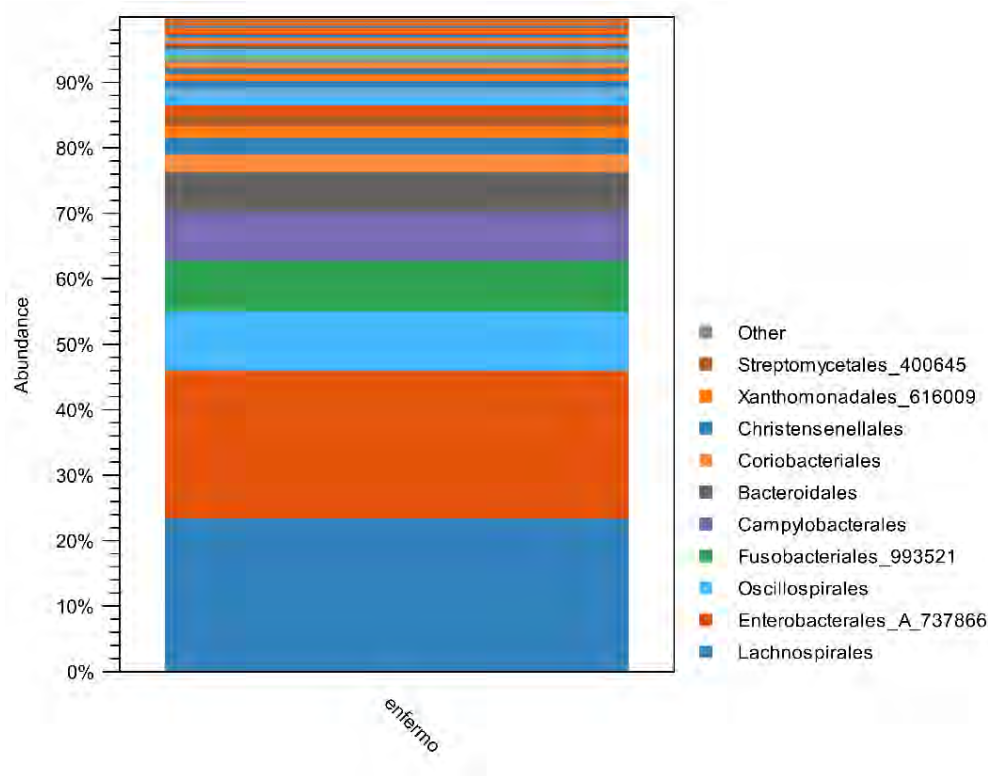
Los resultados obtenidos (Figura 15), muestran una disminución de la clase Clostridia y un aumento de Gammaproteobacteria. Gammaproteobacteria es una clase donde se incluyen las enterobacterias (Williams et al., 2010), este resultado coincide con Zhong et al. (2022), donde se ha informado una mayor abundancia de enterobacterias en corderos con diarrea que en los animales sanos.

6.1.3. Según orden

Resultados respecto al taxón orden en la Figura 16, se tiene las 10 órdenes más abundantes en muestras con diarrea, siendo: Lachnospirales (24%), Enterobacterales_A_737866 (23%), Oscillospirales (9.0%), fusobacteriales_993521 (7.7%), Campylobacteriales (7.5%), Bacteroidales (6.0%), Coriobacteroidales (2.7%), Christensenellales (2.6%), Xanthomonadales_616009 (1.8%), Streptomycetales_400645 (1.6%). Otros en menor abundancia Pectostreptococcales (1.4%), Clostridiales (1.1%),

Lactobacillales (1.3%), Erysipelotrichales (0.91%), Pseudomonadales_650611 (1%), Caulobacterales (1.6%) y Actinomycetales (0.84%) en la Tabla 17 – 19.

Figura 16. *Abundancia relativa (%) consensuada a nivel de orden de las principales bacterias en muestras fecales de cría de llama con diarrea.*



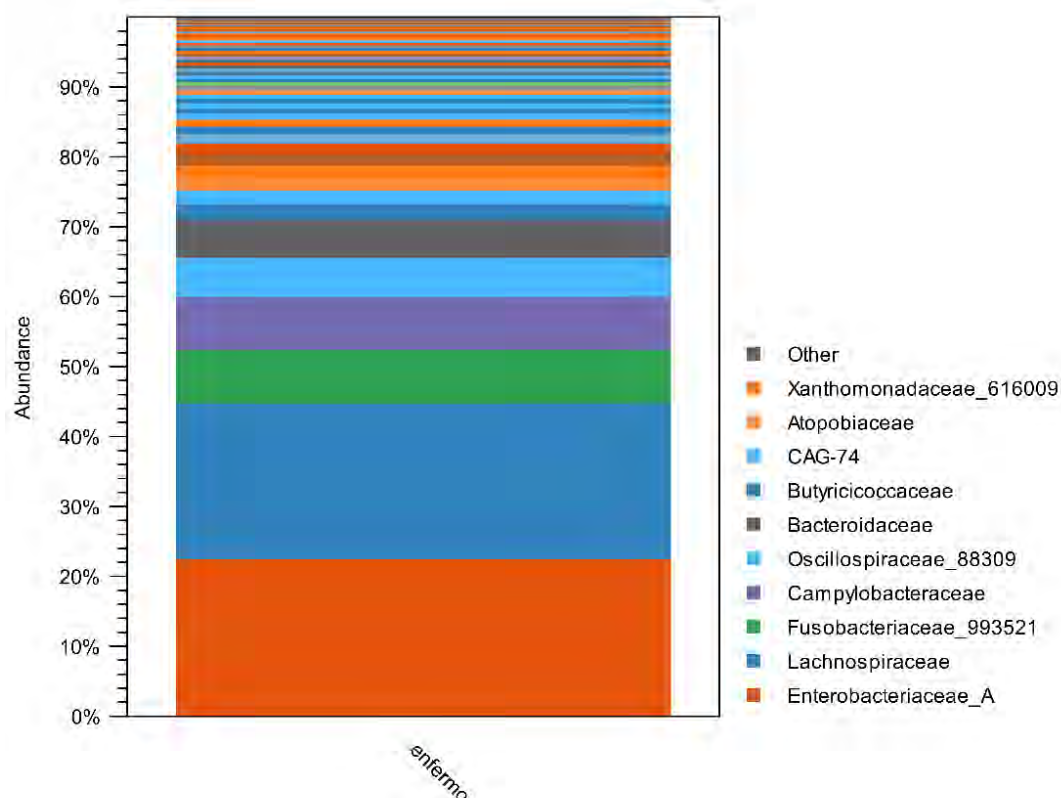
En los resultados (Figura 16), Se corrobora una disminución de Lachnospirales y aumento de enterobacteriales, este resultado coincide con estudios realizados en terneros, que realizaron estudios metataxonomicos de intestinos diarreicos en terneros, donde la abundancia de enterobacteriales coincide con la aparicion de signos diarreicos en terneros y asocia una disbiosis intestinal (Whon et al. (2021).

6.2.3. Según familia

Resultados en lo referente a familias en la Figura 17, se observa las 10 familias más abundantes en crías con diarrea, encontrándose a: Enterobacteriaceae_A (23%), Lachnospiraceae (22%), Fusobacteriaceae_993521 (7.7%), Campylobacteriaceae (7.5%), Oscillospiraceae_88309 (5.6%), Bacteroidaceae (5.5%), Butyricicoccaceae (2.2%), CAG:74

(1.9%), Atopobiaceae (1.8%), Xanthomonadaceae_616009 (1.8%). Otros en menor abundancia Cellulosilyticaceae (0.94%), Ruminococcaceae (0.64%), Pectostreptococcaceae (0.68%), Streptococcaceae (1.3%), Erysipelotrichaceae (0.48%), Coprobacillaceae (0.43%), Pseudomonadaceae (1%) y Caulobacteraceae (1.6%) en la Tabla 17 – 19.

Figura 17. *Abundancia relativa (%) consensuada de las principales familias de bacterias en muestras fecales de cría de llama con diarrea.*



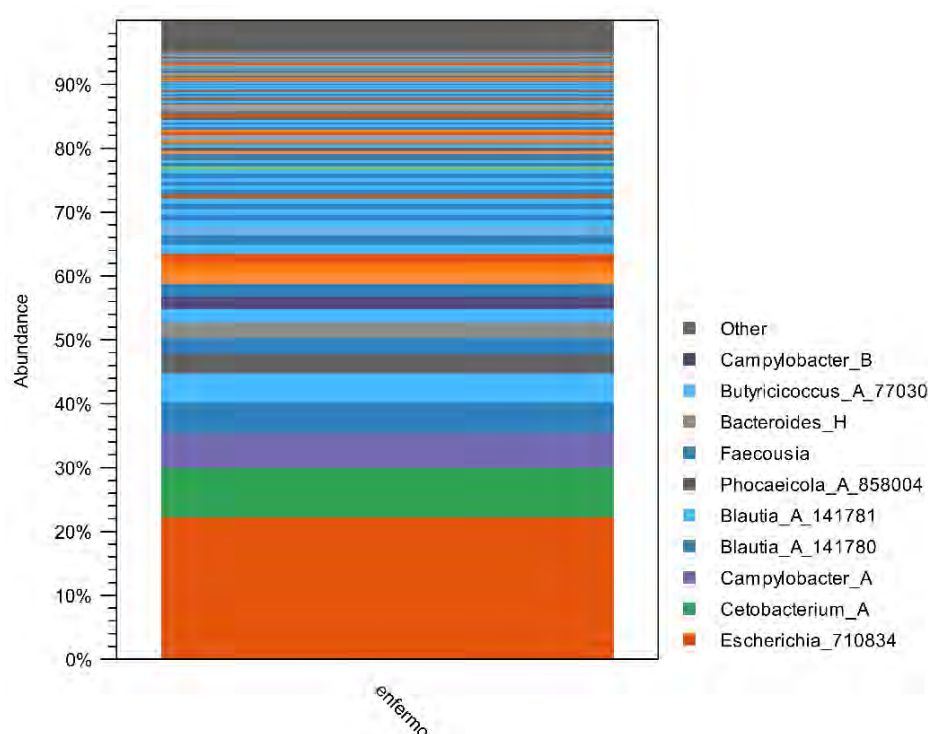
Estos resultados (Figura 17) indican, Enterobacteriaceae, Lachnospiraceae, Fusobacteriaceae y Campylobacteriaceae son los mas abundantes en este estudio. Enterobacteriaceae anteriormente fue reportado en alpacas neonatas con diarrea (Zapata et al., 2024) y en cabritos con diarrea (Zhong et al., 2022).

6.2.4. Según género

Resultados en caso del taxón género en la Figura 18, se tiene los 10 géneros más abundantes, los cuales fueron: *Escherichia_710834* (22%), *cetobacterium_A* (7.7%),

Campylobacter_A (5.5%), *Blautia_A_141780* (4.7%), *Blautia_A_141781* (4.5%), *Phocaeicola_A_858004* (3.1%), *Faecuscia* (2.5%), *Bacteroides_H* (2.4%), *Butyricicoccus_A_77030* (2.0%), *Campylobacter_B* (2.0%). Otros en menor abundancia *Faecalimonas* (2.0%), *Agathobacter_164117* (1.5%), *Ruminococcus_B* (0.84%), *Lawsonibacter* (0.85%), *Clostridium_T* (0.72%), *Streptococcus* (1.3%), *Brevundimonas* (1.6%) y *Streptomyces_G* (1.6%) en la tabla 17 – 19.

Figura 18. Abundancia relativa (%) consensuada de los principales géneros de bacterias en muestras fecales de cría de llama con diarrea.



Con respecto al taxón de género (Figura 18), en este estudio el genero *Escherichia* se encuentra en mayor abundancia en crías de llamas con diarrea, esto coincide con varios reportes previos que lo asocian a cuadros diarreicos en alpacas y llamas (Reyes et al., 2016; Morales et al., 2017; Sicha et al., 2020; Whitehead & Anderson, 2006). Donde se destaca a la especie *Escherichia coli* como parte de la microbiota intestinal de la mayoría de las especies animales y una de las bacterias más versátiles; esto se debe a que, además de las cepas comensales, presenta cepas específicas con potencial para causar numerosas

patologías intestinales y extraintestinales. En este contexto, se mencionan estudios anteriores que han determinado que los animales con enteritis necrótica o hemorrágica frecuentemente presentan co-infecciones con múltiples patógenos que circulan entre las crías de alpaca (Rojas et al., 2016). Además, para profundizar en el perfil patogénico, Sicha et al. (2020) determinaron grupos filogenéticos de *Escherichia coli* obtenidos de alpacas con diarrea. Concretamente, encontraron que el 21% (25/119) de las cepas aisladas pertenecían a los grupos filogenéticos B2 y D, asociados principalmente a cepas patógenas extraintestinales, mientras que el 79% restante (94/119) correspondía a los grupos B1 y A, que son principalmente cepas comensales.

En los resultados también encontramos la presencia del género *Campylobacter*. Este género se ha reportado en casos de diarrea en diversos rumiantes (Pacheco-Torres et al., 2022) como patógenos importantes, aunque los informes específicos en alpacas y llamas son limitados. En un estudio realizado en Puno, Perú, se investigó la presencia de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* en alpacas y llamas, pero no se encontraron casos positivos, lo que sugiere una baja prevalencia en estos camélidos (Pasquel. et al., 2011). Las especies de *Campylobacter* también se asocian con enfermedades reproductivas en rumiantes, como la infertilidad infecciosa enzoótica en el ganado bovino y los abortos en ovejas y cabras, siendo *C. fetus* subsp. *venerealis* y *C. jejuni* contribuyentes notables (Sahin et al., 2017). El papel patogénico de *Campylobacter* en animales es significativo, ya que puede ocasionar pérdidas económicas en el ganado debido a fallos reproductivos y enfermedades gastrointestinales. Si bien *Campylobacter* se considera principalmente un patógeno, su presencia en el tracto gastrointestinal de diversos animales, incluidos los rumiantes, también puede formar parte de la flora normal, lo que complica su papel como comensal o patógeno (Cervantes y Cravioto, 2007; Sahin et al., 2017). En general, la presencia de *Campylobacter* en rumiantes,

incluyendo posibles casos en alpacas y llamas, resalta su importancia en medicina veterinaria y su potencial zoonótico.

Tabla 17. *Composición de la microbiota bacteriana fecal en crías de llamas con diarrea.*

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
Firmicutes_A (39%)	Clostridia_258483 (39%)	Lachnospirales (24%)	Lachnospiraceae (22%)	<i>Blautia_A_141780</i> (4.7%)
				<i>Blautia_A_141781</i> (4.5%)
				<i>Faecalimonas</i> (2%)
				<i>Agathobacter_164117</i> (1.5%)
				<i>Ruminococcus_B</i> (0.84%)
		Oscillospirales (9.0%)	Cellulosilyticaceae (0.94%)	-
			Oscillospiraceae_88309 (5.6%)	<i>Faecousia</i> (2.5%)
				<i>Lawsonibacter</i> (0.85%)
			Butyricicoccaceae (2.2%)	<i>Butyricicoccus_A_77030</i> (2%)
		Christensenellales (2.6%)	Ruminococcaceae (0.64%)	-
			CAG-74 (1.9%)	-
			Pectostreptococcales (1.4%)	Pectostreptococcaceae (0.68%)
		Clostridiales (1.1%)	-	<i>Clostridium_T</i> (0.72%)

Tabla 18. Composición de la microbiota bacteriana fecal en crías de llamas con diarrea (continuación)

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
Firmicutes_D (3.0%)	Bacilli (3.0%)	Lactobacillales (1.3%)	Streptococcaceae (1.3%)	<i>Streptococcus</i> (1.3%)
		Erysipelotrichales (0.91%)	Erysipelotrichaceae (0.48%)	-
			Coprobacillaceae (0.43%)	-
		Enterobacterales_A_737866 (23%)	Enterobacteriaceae_A (23%)	<i>Escherichia_710834</i> (22%)
Proteobacteria (30%)	Gammaproteobacteria (26%)	Pseudomonadales_650611 (1%)	Pseudomonadaceae (1%)	-
		Xanthomonadales_616009 (1.8%)	Xanthomonadaceae_616009 (1.8%)	-
	Alphaproteobacteria (3.5%)	Caulobacterales (1.6%)	Caulobacteraceae (1.6%)	<i>Brevundimonas</i> (1.6%)
Fusobacteriota (7.7%)	Fusobacteriia (7.7%)	Fusobacteriales_993521 (7.7%)	Fusobacteriaceae_993521(7.7%)	<i>Cetobacterium_A</i> (7.7%)

Tabla 19. *Composición de la microbiota bacteriana fecal en crías de llamas con diarrea (continuación).*

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
Campylobacterota (7.5%)	Campylobacteria (7.5%)	Campylobacteriales (7.5%)	Campylobacteriaceae (7.5%)	<i>Campylobacter_A</i> (5.5%)
				<i>Campylobacter_B</i> (2%)
Bacteroidota (7.1%)	Bacteroidia (7.1%)	Bacteroidales (6.0%)	Bacteroidaceae (5.5%)	<i>Bacteroides_H</i> (2.4%)
			-	<i>Phocaeicola_A_858004</i> (3.1%)
			Atopobiaceae (1.8%)	-
Actinobacteriota (5.2%)	Actinomycetia (2.5%)	Streptomycetales_400645 (1.6%)	-	<i>Streptomyces_G_399870</i> (1.6%)
		Actinomycetales (0.84%)	-	-
Desulfobacterota_I (0.55%)	Desulfovibrionia (1%)	-	-	-

CAPITULO VII

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. Conclusiones

En este estudio se logró identificar y cuantificar los principales grupos taxonómicos bacterianos agrupados en OTUS presentes en “muestras fecales en crías de llamas sanas y crías de llamas con proceso de diarrea”. Los resultados revelaron la presencia de 10 phylum, 10 clases, 12 órdenes, 20 familias y 21 géneros bacterianos en muestras fecales de crías de llamas sanas y también 10 phylum, 10 clases, 17 órdenes, 18 familias y 18 géneros bacterianos en muestras fecales de crías de llamas con diarrea, con una marcada dominancia en ciertos grupos taxonómicos.

La microbiota bacteriana fecal en crías de llamas sanas se caracteriza por una mayor abundancia del phylum Firmicutes (86.2% en total) y Bacteroidota (8.6%), con una alta abundancia de las clases Clostridia_258483 (72%) y Bacilli (12%), así como del orden Lachnospirales (56%) y la familia Lachnospiraceae (56%). Este perfil refleja una microbiota típica de herbívoros, adaptada para la degradación eficiente de material vegetal y la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC). La baja abundancia de phyla potencialmente patógenos como Proteobacteria (1.5%) y Campylobacterota (0.78%), junto con la presencia minoritaria de géneros como *Escherichia* (1.3%) y *Campylobacter_A* (0.78%), confirma un estado de homeostasis intestinal óptimo y un control efectivo de patógenos. El género *Blautia* (32% en total) destaca como el más abundante, asociado a beneficios inmunomoduladores y metabólicos.

La microbiota bacteriana fecal en crías de llamas con diarrea se caracteriza por una importante disbiosis intestinal, caracterizada por una reducción drástica del phylum Firmicutes (42% en total) y una pérdida significativa de taxones beneficiosos como Lachnospirales (24%) y Lachnospiraceae (22%). Paralelamente, se observa una mayor abundancia de bacterias proinflamatorias y potencialmente patógenas, como Proteobacteria (30%), impulsada por el orden Enterobacterales (23%) y el género *Escherichia* (22%). El phylum Campylobacterota incrementa notablemente (7.5%), con predominio del género *Campylobacter* (~7.5%). Estos cambios reflejan un desequilibrio cualitativo y cuantitativo en la microbiota bacteriana, con pérdida de función fermentadora y sobrecrecimiento de patógenos asociados a daño intestinal y diarrea.

7.2. Recomendaciones

Para comprender mejor la microbiota intestinal en llamas requiere que futuras investigaciones identifiquen las causas subyacentes de la disbiosis, como la dieta, el estrés (crías de llamas en destete) o infecciones subyacentes, para desarrollar estrategias preventivas y terapéuticas más efectivas.

Así mismo complementar este estudio con estudios en meta-proteómica que puede ofrecer información sobre la expresión proteica y las vías metabólicas, lo que mejoraría la comprensión de la funcionalidad microbiana. También la metabolómica permitiría el análisis de subproductos metabólicos, revelando las poblaciones microbianas activas y sus interacciones con el hospedador. La integración de estos enfoques puede abordar las complejidades del microbioma, ya que métodos individuales pueden pasar por alto interacciones biológicas críticas. Esta estrategia multiómica es esencial para una comprensión integral del papel de la microbiota intestinal en la salud y la enfermedad durante las primeras etapas de la vida.

CAPÍTULO VIII

BIBLIOGRAFÍA

- Abellan-Schneyder, I., Matchado, M. S., Reitmeier, S., Sommer, A., Sewald, Z., Baumbach, J., List, M., & Neuhaus, K. (2021). Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing. *mSphere*, 6(1), e01202-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.01202-20>
- Alzola, R. H., Ghezzi, M. D., Gimeno, E. J., Lupidio, M., Castro, A., & Rodríguez, J. A. (2004). Topography and morphology of the llama (*Lama glama*) stomach. *International Journal of Morphology*, 22(2), 155–164. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022004000200010>
- Ameghino, E., & DeMartini, J. C. (1991). Mortality in South American camelids attributed to bacterial infections. *Small Ruminant Research*, 5(1-2), 75-85.
- Anwar, H., Iftikhar, A., Muzaffar, H., Almatroudi, A., Allemailem, K. S., Navaid, S., Saleem, S., & Khurshid, M. (2021). Biodiversity of Gut Microbiota: Impact of Various Host and Environmental Factors. *BioMed research international*, 2021, 5575245. <https://doi.org/10.1155/2021/5575245>
- Avilés, D. F., Montero, M., & Barros-Rodríguez, M. (2018). Los camélidos sudamericanos: productos y subproductos usados en la región andina. *Actas Iberoamericanas en Conservación Animal AICA*, 11, 30-38. https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_de_camelidos/camelidos_general/35-AICA2017_Trabajo004.pdf

- Barko, P. C., McMichael, M., Swanson, K. S., & Williams, D. A. (2018). The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. doi: 10.1111/JVIM.14875
- Bedenice, D., Resnick-Sousa, J., Bookbinder, L., Trautwein, V., Creasey, H., & Widmer, G. (2022). The association between fecal microbiota, age and endoparasitism in adult alpacas. *PLOS ONE*, 17(8), e0272556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272556>
- Buddington, R. K., & Sangild, P. T. (2011). Companion animals symposium: development of the mammalian gastrointestinal tract, the resident microbiota, and the role of diet in early life. *Journal of Animal Science*, 89(5), 1506–1519. <https://doi.org/10.2527/JAS.2010-3705>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl 1(Suppl 1), 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Carhuapoma-Delacruz, V., Auqui-Acharte, G. S., Valencia-Mamani, N., Gonzales-Huamán, T. J., Guillen-Domínguez, H. M., & Esparza, M. (2022). Bacterias fibrolíticas aisladas de rumen de alpaca, ovino y vacuno con capacidad biodegradadora de celulosa. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias*, XXXII, 1–7. <https://doi.org/10.52973/rcfcv-e32094>
- Carroll, C., Olsen, K. D., Ricks, N. J., Dill-McFarland, K. A., Suen, G., Robinson, T. F., & Chaston, J. M. (2019). Bacterial Communities in the Alpaca Gastrointestinal Tract Vary With Diet and Body Site. *Frontiers in microbiology*, 9, 3334. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03334>

- Castellaro G., Giorgio, Ullrich R., Tamara, Wackwitz, Birgit, & Raggi S., Alberto. (2004). Botanical composition of alpaca (*Lama pacos* L.) and llama (*Lama glama* L.) diets in two seasons of the year on highland ranges of Parinacota province, Chile.. *Agricultura Técnica*, 64(4), 353-363. <https://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072004000400004>
- Ccanccapa-Yucra, K., Cruz-Gladys, E., & Benito-López, D. (2024). Líquido proveniente del estómago anterior de alpacas Suri (*Vicugna pacos*) y su efecto en el desarrollo y la supervivencia de las crías. *MQRInvestigar*, 8(4), 1352–1372. <https://doi.org/10.56048/MQR20225.8.4.2024.1352-1372>
- Cebra C. (2014). Disorders of the Digestive System. *Llama and Alpaca Care*, 477–536. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2352-6.00040-7>
- Cebra, C. K., Cebra, M. L., Garry, F. B., & Belknap, E. B. (1996). Forestomach acidosis in six New World camelids. *Javma-Journal of The American Veterinary Medical Association*, 208(6), 901–904. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8617651/>
- Cebra, C. K., Mattson, D. E., Baker, R. J., Sonn, R. J., & Dearing, P. L. (2003). Potential pathogens in feces from unweaned llamas and alpacas with diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223(12), 1806-1808. Retrieved Sep 7, 2025, from <https://doi.org/10.2460/javma.2003.223.1806>
- Ceron Cucchi, M. E. (2014). Estudio de la diversidad microbiana del compartimiento C1 del sistema digestivo de llama (*Lama glama*) Tesis de disertación doctoral. [Universidad de Buenos aires. Facultad de farmacia y bioquímica]. <https://core.ac.uk/reader/299812760>
- Cerón Cucchi, M. E., Marcoppido, G., Trangoni, M. D., & Cravero, S. L. P. (2013). Detection of fiber-digesting bacteria in the forestomach contents of llamas (*Lama glama*) by PCR.

- Revista Argentina de Microbiología, 45(4), 249-252. [https://doi.org/10.1016/s0325-7541\(13\)70015-4](https://doi.org/10.1016/s0325-7541(13)70015-4)
- Cervantes García, E., & Cravioto Q, A. (2007). Campylobacter y enfermedades asociadas. 50(1), 31–35. <https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2007/un071j.pdf>
- Chen, H., Liu, Y., Huang, K. et al. Fecal microbiota dynamics and its relationship to diarrhea and health in dairy calves. J Animal Sci Biotechnol 13, 132 (2022). <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00758-4>
- Chivers, D. J. (1989). Adaptations of digestive systems in non-ruminant herbivores. 48(1), 59–67. <https://doi.org/10.1079/PNS19890010>
- Cid, D., Martín-Espada, C., Maturrano, L., García, A., Luna, L. y Rosadio, R. (2011). "Cepas diarreogénicas de Escherichia coli aisladas de alpacas peruanas neonatales (Vicugna pacos) con diarrea". En Producción de fibra en camélidos sudamericanos y otros animales fibrosos. Leiden, Países Bajos: Wageningen Academic. https://doi.org/10.3920/9789086867271_030
- Cirilo, C. E., Manchego, S. A., Rivera, H., & Rosadio, A. R. (2012). Coexistencia de virus y bacterias en neumonías agudas en alpacas neonatas viral and bacterial coexistence in a cute pneumonia in neonatal a lpacas.
- Clarridge J. E., 3rd (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clinical microbiology reviews, 17(4), 840–862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- Coila Añasco, P. U., Aparicio Armas, R. L., Oros Butrón, O. D., Sánchez Herencia, D., & Zapata Coacalla, C. (2023). Aislamiento y caracterización convencional de bacterias anaerobias del compartimento 1 de la alpaca (Vicugna pacos). Ciencia Latina Revista

Científica Multidisciplinar, 7(2), 2131-2140.

https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i2.5479

Curry, K. D., Wang, Q., Nute, M. G., Tyshaieva, A., Reeves, E., Soriano, S., Wu, Q., Graeber, E., Finzer, P., Mendling, W., Savidge, T., Villapol, S., Dilthey, A., & Treangen, T. J. (2022). Emu: species-level microbial community profiling of full-length 16S rRNA Oxford Nanopore sequencing data. *Nature methods*, 19(7), 845–853.

<https://doi.org/10.1038/s41592-022-01520-4>

De La Torre, U., Henderson, J. D., Furtado, K. L., Pedroja, M., O'Malley, E., Mora, A., Pechanec, M. Y., Maga, E. A., & Mienaltowski, M. J. (2019). Utilizing the fecal microbiota to understand foal gut transitions from birth to weaning. *PLOS ONE*, 14(4).

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0216211>

De, R., Kanungo, S., Mukhopadhyay, A. K., & Dutta, S. (2023). Comparative metagenomic analysis of diarrheal and non-diarrheal gut microbiome delineating the prospective development of prognostic markers and probiotics to protect from diarrhea. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.07.17.549426>

Dehority, B. A. (2002). Gastrointestinal Tracts of Herbivores, Particularly the Ruminant: Anatomy, Physiology and Microbial Digestion of Plants. *Journal of Applied Animal Research*, 21(2), 145–160. <https://doi.org/10.1080/09712119.2002.9706367>

Delzenne, N. M., Knudsen, C., Beaumont, M., Rodriguez, J., Neyrinck, A. M., Bindels, L. B. (2019). Contribution of the gut microbiota to the regulation of host metabolism and energy balance: a focus on the gut–liver axis. *Proceedings of the Nutrition Society*, 78(3):319-328. <https://doi:10.1017/S0029665118002756>

- Dubreuil, J. D., Isaacson, R. E., & Schifferli, D. M. (2016). Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, 7(1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016>
- Dulphy, J. P., Dardillat, C., Jailler, M., & Ballet, J. M. (1997). Comparative study of forestomach digestion in llamas and sheep. *Reproduction, nutrition, development*, 37(6), 709–725. <https://doi.org/10.1051/rnd:19970608>
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* (New York, N.Y.), 308(5728), 1635–1638. <https://doi.org/10.1126/science.1110591>
- Espada, M., Jiménez, P., Evelyn, C., Vázquez, C., Dolores, M., & Cid, D. (2010). Camélidos sudamericanos: estado sanitario de sus crías south american camelids: health status of their cria.
- FAO. (2005). Situación actual de los camélidos sudamericanos en el Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la Región Andina.
- Frias, T. H. (2023). Caracterización del microbioma del ciego en cuyes (*Cavia porcellus*) de las razas Inti, Perú y Andina, Chachapoyas-2021. <https://repositorio.untrm.edu.pe/handle/20.500.14077/3070>
- Fuks, G., Elgart, M., Amir, A., Zeisel, A., Turnbaugh, P. J., Soen, Y., & Shental, N. (2018). Combining 16S rRNA gene variable regions enables high-resolution microbial community profiling. *Microbiome*, 6(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0396-x>

Ganguly, Shreyashi; Chandrasekhara, P . La microbiota intestinal en la salud y la enfermedad.

APIK Journal of Internal Medicine 7(1): p 19-30, enero-marzo de 2019. | DOI:
10.4103/2666-1802.260257

García V., W., San Martín H., F., Novoa M., C., & Franco LL., E. (2002). ENGORDE DE LLAMAS BAJO DIFERENTES REGÍMENES ALIMENTICIOS. Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú, 13(2), 1-9. <https://doi.org/10.15381/rivep.v13i2.7246>

Ghezzi, M. D., Alzola, R. H., Lupidio, M., Massone, A., Castro, A., & Rodríguez, J. A. (2000). CONDUCTO HEPATOPANCREÁTICO DE LA LLAMA (*Lama glama*). 18(1), 27–34. <https://doi.org/10.4067/S0716-98682000000100004>

Gophna, U., Konikoff, T. and Nielsen, H.B. (2017), Oscillospira and related bacteria – From metagenomic species to metabolic features. Environ Microbiol, 19: 835-841. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13658>

Harper, C. M. G., Feng, Y., Xu, S., Taylor, N. S., Kinsel, M. J., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Greenwell, M., Levine, G., Rogers, A. B., & Fox, J. G. (2002). *Helicobacter cetorum* sp. nov., a Urease-Positive *Helicobacter* Species Isolated from Dolphins and Whales. Journal of Clinical Microbiology, 40(12), 4536–4543. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4536-4543.2002>

Hassler, H. B., Probert, B., Moore, C., Lawson, E., Jackson, R. W., Russell, B. T., & Richards, V. P. (2022). Phylogenies of the 16S rRNA gene and its hypervariable regions lack concordance with core genome phylogenies. Microbiome, 10(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01295-y>

Heller, R., Gregory, P. C., & Engelhardt, W. v. (1984). Pattern of motility and flow of digesta in the forestomach of the Llama (*Lama guanacoe* f. *glama*). Journal of Comparative

- Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology, 154(5), 529–533.
<https://doi.org/10.1007/BF02515158>
- Hierro, E., Martín-Espada, C., Maturrano, L. H., García, A., Luna, L., & Rosadio, R. (2011). Diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from neonatal Peruvian alpacas (*Vicugna pacos*) with diarrhea (pp. 223–228).
https://doi.org/10.3920/9789086867271_030
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human immunology*, 82(11), 801–811.
<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- Idalan, N., Martín, L. F., & Clauss, M. (2019). Physical characteristics of gastrointestinal content of llama (*Lama glama*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(4), 1015–1022. <https://doi.org/10.1111/JPN.13116>
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Nageshwar Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology*, 21(29), 8787–8803. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
- Jauk, F. (2019). Secuenciación masiva paralela (NGS): conceptos básicos y aplicaciones. *Hematología*, 23, 21–23.
<https://revistahematologia.com.ar/index.php/Revista/issue/view/21/11>
- Jiménez, C. E. P., Espada, C. M., & Vázquez, M. D. C. (2010). Camélidos Sudamericanos: estado sanitario de sus crías.
<http://www.ucm.es/BUCM/revistasBUC/portal/modulos.php?name=Revistas2&id=RCCV&col=1>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., &

- Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature communications*, 10(1), 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Keane, C., et al. (2022). Epidemiological Investigation of Meningeal Worm-Induced Mortalities in Small Ruminants and Camelids Over a 19 Year Period. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 859028.
- Kishore, A., Pal, B., & Sarkar, P. (2024). Camelids for Sustainability: A Socio-Economic Perspective. *Asian Journal of Environment & Ecology*, 23(1), 53–72. <https://doi.org/10.9734/ajee/2024/v23i1521>
- Kittelman, S., Seedorf, H., Walters, W. A., Clemente, J. C., Knight, R., Gordon, J. I., & Janssen, P. H. (2013). Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. *PloS one*, 8(2), e47879. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047879>
- Klein-Jöbstl, D., Quijada, N. M., Dzieciol, M., Feldbacher, B., Wagner, M., Drillich, M., Schmitz-Esser, S., & Mann, E. (2019). Microbiota of newborn calves and their mothers reveals possible transfer routes for newborn calves' gastrointestinal microbiota. *PloS one*, 14(8), e0220554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220554>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1), e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Krishnan, K., Chen, T., & Paster, B. J. (2017). A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral diseases*, 23(3), 276–286. <https://doi.org/10.1111/odi.12509>

- La Reau, A. J., Meier-Kolthoff, J. P., & Suen, G. (2016). Sequence-based analysis of the genus *Ruminococcus* resolves its phylogeny and reveals strong host association. 2(12). <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000099>
- La Reau, A.J., Suen, G. (2018). The Ruminococci: key symbionts of the gut ecosystem. J Microbiol. 56, 199–208. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-8024-4>
- Lebuhn, M., Hanreich, A., Klocke, M., Schlüter, A., Bauer, C., & Pérez, C. M. (2014). Towards molecular biomarkers for biogas production from lignocellulose-rich substrates. Anaerobe, 29, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.04.006>
- Li, W., Yi, X., Wu, B., Li, X., Ye, B., Deng, Z., A, R., Hu, S., Li, D., Wu, H., & Zhou, Z. (2023). Neonatal Calf Diarrhea Is Associated with Decreased Bacterial Diversity and Altered Gut Microbiome Profiles. Fermentation, 9(9), 827. <https://doi.org/10.3390/fermentation9090827>
- Liu, X., Mao, B., Gu, J., Wu, J., Cui, S., Wang, G., ... Chen, W. (2021). *Blautia*—a new functional genus with potential probiotic properties? Gut Microbes, 13(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1875796>
- Logroño, I. E. N., Coronel, A. A. N., Vera, A. D. B., & Santillán, R. S. D. (2021). Dysbiosis and intestinal permeability: Causes and effects of altering normal intestinal flora. ESPOCH Congresses: The Ecuadorian Journal of STEAM, 1524-1537. <https://doi.org/10.18502/espoch.v1i6.9640>
- Lopetuso, LR, Scaldaferri, F., Petito, V. et al. Clostridios comensales: actores clave en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Gut Pathog 5 , 23 (2013). <https://doi.org/10.1186/1757-4749-5-23>
- Lucas, R. L. J., Morales, C. S., Barrios, A. M., Rodríguez, G. J., Vásquez, C. M., Lira, M. B., Torres, L. B., Casas, A. E., & Espinoza, B. J. (2016). Patógenos Involucrados en Casos

Fatales de Diarrea en Crías de Alpaca de la Sierra Central del Perú.

<https://doi.org/10.15381/RIVEP.V27I1.11465>

Martín Espada, C., Pinto Jiménez, C. E., & Cid Vázquez, M. D. (2010). Camélidos sudamericanos: estado sanitario de sus crías south american camelids: health status of their cria. *Rev Complut Ciencias Vet*, 4(1), 37-50.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4331838>

Mejía, M. A. P., Oliveira, G. O. B. D., Neves, N. C. D. R., Costa, J. G. G., Cirilo, A. M. F., Carmo, R. F. D., ... & Almeida, A. G. D. (2024). Relação entre a microbiota intestinal e a imunidade-redução de complicações em pacientes gravemente enfermos. in *estudos multidisciplinares em microbiologia: teoria e prática* (Vol. 1, pp. 91-109). Editora Científica Digital. <https://doi.org/10.37885/241017830>

Merino Rivera, J. A., Taracena Pacheco, S., Díaz Greene, E. J., & Rodríguez Weber, F. L. (2021). Microbiota intestinal: el órgano olvidado. *Acta Médica Grupo Ángeles*, 19(1), 92–100. <https://doi.org/10.35366/98577>

Minaya Flórez, G. A. (2023). Reducción de la población de llamas (lama glama) en los Andes: modernización de la infraestructura vial y cambios en su manejo en el Cusco. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Católica del Perú. <http://hdl.handle.net/20.500.12404/25439>

Nafea, A. M., Wang, Y., Wang, D., Salama, A. M., Aziz, M. A., Xu, S., & Tong, Y. (2024). Application of next-generation sequencing to identify different pathogens. *Frontiers in microbiology*, 14, 1329330. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1329330>

Nalage, D., Kale, R., Sontakke, T., Pradhan, V., Biradar, A., Senevirathna, JDM,... Kudnar, PS (2024). Filos bacterianos: microbiota del reino animalia. *Biología académica*, 2. <https://doi.org/https://doi.org/10.20935/AcadBiol7423>

- Nicole Reichardt, Sylvia H Duncan, Pauline Young, Alvaro Belenguer, Carol McWilliam Leitch, Karen P Scott, Harry J Flint, Petra Louis, Distribución filogenética de tres vías de producción de propionato en la microbiota intestinal humana, *The ISME Journal* , Volumen 8, Número 6, junio de 2014, páginas 1323–1335, <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.14>
- Niehaus, A. J., & Mora, D. P. (2022). Digestive system and abdomen. *Medicine and surgery of camelids*, 336-390. <https://doi.org/10.1002/9781119583295.ch12>
- Pacheco Torres, I. (2020). Microbiota bacteriana fecal de especies de vertebrados en la reserva de la biosfera Mapimí. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Chapingo. <http://repositorio.chapingo.edu.mx:8080/handle/20.500.12098/788>
- Pacheco-Torres, I., García-De la Peña, C., Meza-Herrera, C. A., Vaca-Paniagua, F., Díaz-Velásquez, C. E., Méndez-Catalá, C. F., Tarángo-Arámbula, L. A., Valenzuela-Núñez, L. M., & Vásquez-Arroyo, J. (2022). Explorando la microbiota bacteriana fecal bovina en la Reserva de la Biosfera de Mapimí, norte de México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 13(4), 910–927. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v13i4.6138>
- Paliy, O., Kenche, H., Abernathy, F., Michail, S., & Michail, S. (2009). High-throughput quantitative analysis of the human intestinal microbiota with a phylogenetic microarray. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(11), 3572–3579. <https://doi.org/10.1128/AEM.02764-08>
- Pasquel H., S., Casas A., E., Huanca L., W., Lopera B., L., & Huanca M., T. (2011). DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* EN ALPACAS Y LLAMAS EN LA ZONA DE PUNO. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 22(3), 278-282. <https://doi.org/10.15381/rivep.v22i3.272>

- Perkel, J. (2011). Making Contact with Sequencing's Fourth Generation. *BioTechniques*, 50(2), 93–95. <https://doi.org/10.2144/000113608>
- Petersen, C., & Round, J. L. (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular Microbiology*, 16(7), 1024–1033. <https://doi.org/10.1111/cmi.12308>
- Pryce, J. E., Coffey, M. P., & Simm, G. (2001). The relationship between body condition score and reproductive performance. *Journal of dairy science*, 84(6), 1508–1515. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70184-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70184-1)
- Rodicio, M. del R., & Mendoza, M. del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238–245. <https://doi.org/10.1157/13059055>
- Rodríguez, C. J., Vásquez, C. M., Lima, M. B., Lucas, L. J., Barrios-Arpi, M., Morales, C. S., & Lopez-Torres, B. (2015). Cambios en los parámetros fisiológicos por diarrea neonatal en crías de alpaca. 9(1), 1–9. https://doi.org/10.5209/REV_RCCV.2015.V9.N1.47689
- 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. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 10(03), 269–274. <https://doi.org/10.3855/jidc.7398>
- Rosadio, R., et al. (2012). Principales enfermedades infecciosas de los camélidos sudamericanos y su impacto en la mortalidad neonatal. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*.

- Sagheddu, V., Patrone, V., Miragoli, F., Puglisi, E., & Morelli, L. (2016). Infant Early Gut Colonization by Lachnospiraceae: High Frequency of *Ruminococcus gnavus*. *Frontiers in pediatrics*, 4, 57. <https://doi.org/10.3389/fped.2016.00057>
- Sahin, O., Yaeger, M. J., Wu, Z., & Zhang, Q. (2017). *Campylobacter*-Associated Diseases in Animals. *Annual Review of Animal Biosciences*, 5(1), 21–42. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ANIMAL-022516-022826>
- Salter, S. J., Cox, M. J., Turek, E. M., Calus, S. T., Cookson, W. O., Moffatt, M. F., Turner, P., Parkhill, J., Loman, N. J., & Walker, A. W. (2014). Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biology*, 12(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0087-z>
- Samsudin, A. A., Evans, P. N., Wright, A. G., & Al Jassim, R. (2011). Molecular diversity of the foregut bacteria community in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Environmental Microbiology*, 13(11), 3024–3035. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02579.x>
- San Martin, F., & Bryant, F. C. (1989). Nutrition of domesticated South American llamas and alpacas. *Small Ruminant Research*, 2(3), 191–216. [https://doi.org/10.1016/0921-4488\(89\)90001-1](https://doi.org/10.1016/0921-4488(89)90001-1)
- Shabat, S. K. Ben, Sasson, G., Doron-Faigenboim, A., Durman, T., Yaacoby, S., Berg Miller, M. E., White, B. A., Shterzer, N., & Mizrahi, I. (2016). Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. *The ISME Journal*, 10(12), 2958–2972. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.62>
- Sicha R., F., Morales-Cauti, S., Lucas L., J., Eslava C., C., Vásquez C., M., Barrios A., M., Rodríguez G., J., & Lira M., B. (2020). Análisis filogenético de cepas de *Escherichia coli* aisladas de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) con diarrea en la sierra central del

- Perú. Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú, 31(2), e17826.
<https://doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17826>
- Siever Morales, C., Eileen Siu, C., Pablo Ramírez, R., & Armando Navarro, O. (2017).
 Determinación de Serotipos de Escherichia coli aisladas de crías de alpacas (Vicugna
 pacos) con y sin diarrea en Huancavelica. Revista Electronica de Veterinaria.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63653009034>
- Siuce, J., Maturrano, L., Wheeler, J.C. et al. Diarrheagenic Escherichia coli isolates from
 neonatal alpacas mainly display F17 fimbriae adhesion gene. Trop Anim Health Prod
 52, 3917–3921 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02415-2>
- Siuce, J., Maturrano, L., Wheeler, J.C. et al. Diarrheagenic Escherichia coli isolates from
 neonatal alpacas mainly display F17 fimbriae adhesion gene. Trop Anim Health
 Prod 52, 3917–3921 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02415-2>
- Spence, C., Wells, W. G., & Smith, C. J. (2006). Characterization of the primary starch
 utilization operon in the obligate anaerobe Bacteroides fragilis: Regulation by carbon
 source and oxygen. Journal of bacteriology, 188(13), 4663–4672.
<https://doi.org/10.1128/JB.00125-06>
- Stanchi, N. O., Martino, P. E., Leotta, G. A., Vigo, G. B., Pantozzi, F. L., Arauz, M. S., &
 Gatti, E. M. (2008). Bacteriología práctica para el médico veterinario.
<http://hdl.handle.net/11336/151280>
- St-Pierre, B., & Wright, A. D. G. (2012). Molecular analysis of methanogenic archaea in the
 forestomach of the alpaca (Vicugna pacos). BMC Microbiology, 12(1), 1.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-1>

- Thomson, A. B. R., & Keelan, M. (1986). The development of the small intestine. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 64(1), 13–29. <https://doi.org/10.1139/Y86-003>
- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11), 1823–1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
- Timm, K. I., Bj, W., & Smith, B. B. (1999). Radiographic contrast gastrointestinal study of the neonatal llama. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 40(6), 596–604. <https://doi.org/10.1111/J.1740-8261.1999.TB00885.X>
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P., & Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 46(4), 327–338. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>
- Vallenas, A., Cummings, J. F., & Munnell, J. F. (1971). A gross study of the compartmentalized stomach of two new-world camelids, the llama and guanaco. *Journal of Morphology*, 134(4), 399–423. <https://doi.org/10.1002/JMOR.1051340403>
- Vásquez C., M., Rodríguez G., J., Lira M., B., Cueva M., S., Ayón S., M., & Mallma D., Y. (2012). pH de la superficie luminal de la mucosa gastrointestinal de crías de alpacas durante las primeras semanas de edad. *Revista UNMSM - Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*. https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/1609-9117_773edf4a83109b336bcfd497fdb26f92
- Vater, A. L., Zandt, E., & Maierl, J. (2021). The topographic and systematic anatomy of the alpaca stomach. *The Anatomical Record*, 304(9), 1999–2013. <https://doi.org/10.1002/ar.24588>

- Vater, A., & Maierl, J. (2018). Adaptive Anatomical Specialization of the Intestines of Alpacas Taking into Account their Original Habitat and Feeding Behaviour. *Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 301(11), 1840–1851. <https://doi.org/10.1002/AR.23863>
- Velasco-Galilea, M., Piles, M., Viñas, M., Rafel, O., González-Rodríguez, O., Guivernau, M., & Sánchez, J. P. (2018). Determinismo genético de la microbiota intestinal del conejo. XIX Reunión Nacional de Mejora Genética Animal. https://acteon.webs.upv.es/CONGRESOS/Z-XIX_Reunion_MG_LEON_2018/043_VelascoGalilea.pdf
- Vilá, B. (2012). *Camélidos sudamericanos*. Eudeba.
- Vilá, B. (2015). Los camélidos como parte del patrimonio biocultural de los Andes. *Revista Rúbricas*. <http://hdl.handle.net/20.500.11777/3748>
- Walker, A. W., Martin, J. C., Scott, P., Parkhill, J., Flint, H. J., & Scott, K. P. (2015). 16S rRNA gene-based profiling of the human infant gut microbiota is strongly influenced by sample processing and PCR primer choice. *Microbiome*, 3(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0087-4>
- Wang, J., Fan, H., Han, Y., Zhao, J., & Zhou, Z. (2017). Characterization of the microbial communities along the gastrointestinal tract of sheep by 454 pyrosequencing analysis. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 30(1), 100–110. <https://doi.org/10.5713/ajas.16.0166>
- Wang, K., Zhang, H., Hu, L., Zhang, G., Lu, H., Luo, H., Zhao, S., Zhu, H., & Wang, Y. (2022). Characterization of the Microbial Communities along the Gastrointestinal Tract in Crossbred Cattle. *Animals*, 12(7), 825. <https://doi.org/10.3390/ani12070825>

- Wang, X., Niu, L., Wang, Y., Zhan, S., Wang, L., Dai, D., Cao, J., Guo, J., Li, L., Zhang, H., & Zhong, T. (2023). Combining 16S rRNA Sequencing and Metabolomics Data to Decipher the Interactions between Gut Microbiota, Host Immunity, and Metabolites in Diarrheic Young Small Ruminants. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11423. <https://doi.org/10.3390/ijms241411423>
- Weinroth, M. D., Belk, A. D., Dean, C., Noyes, N., Dittoe, D. K., Rothrock, M. J., Ricke, S. C., Myer, P. R., Henniger, M. T., Ramírez, G. A., Oakley, B. B., Summers, K. L., Miles, A. M., Ault-Seay, T. B., Yu, Z., Metcalf, J. L., & Wells, J. E. (2022). Considerations and best practices in animal science 16S ribosomal RNA gene sequencing microbiome studies. *Journal of Animal Science*, 100(2). <https://doi.org/10.1093/jas/skab346>
- Whitehead, C. E., & Anderson, D. E. (2006). Neonatal diarrhea in llamas and alpacas. *Small Ruminant Research*, 61(2–3), 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.012>
- Whon TW, Kim HS, Shin N, Sung H, Kim M, Kim JY, Kang W, Kim PS, Hyun D, Seong HJ, Sul WJ, Roh SW, Bae J. 2021. Calf Diarrhea Caused by Prolonged Expansion of Autochthonous Gut Enterobacteriaceae and Their Lytic Bacteriophages. *mSystems* 6:10.1128/msystems.00816-20. <https://doi.org/10.1128/msystems.00816-20>
- Williams, K. P., Gillespie, J. J., Sobral, B. W., Nordberg, E. K., Snyder, E. E., Shallom, J. M., & Dickerman, A. W. (2010). Phylogeny of gammaproteobacteria. *Journal of bacteriology*, 192(9), 2305–2314. <https://doi.org/10.1128/JB.01480-09>
- Xi L, Song Y, Qin X, Han J and Chang Y-F (2021) Microbiome Analysis Reveals the Dynamic Alternations in Gut Microbiota of Diarrheal Giraffa camelopardalis. *Front. Vet. Sci.* 8:649372. doi: 10.3389/fvets.2021.649372

- Yang J, Li Y, Wen Z, Liu W, Meng L, Huang H. Oscillospira - a candidate for the next-generation probiotics. *Gut Microbes*. 2021 Jan-Dec;13(1):1987783. doi: 10.1080/19490976.2021.1987783. PMID: 34693878; PMCID: PMC8547878.
- Yeoman CJ, Fields CJ, Lepercq P, Ruiz P, Forano E, White BA, Mosoni P. 2021. In Vivo Competitions between *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, and *Ruminococcus albus* in a Gnotobiotic Sheep Model Revealed by Multi-Omic Analyses. *mBio* 12:10.1128/mbio.03533-20. <https://doi.org/10.1128/mbio.03533-20>
- Yucra Cano, L. Eleana. (2017). Sistema de comercialización y situación sociocultural, económica y ambiental de la cadena de producción de la fibra de alpaca en el distrito de Macusani, provincia de Carabaya, Puno. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Católica del Perú. <http://hdl.handle.net/20.500.12404/10033>
- Zapata, C., Estrada, R., Oros, O., Sánchez, D., Maicelo, J. L., Arbizu, C. I., & Coila, P. (2024). Alterations in the gut microbial composition and diversity associated with diarrhea in neonatal Peruvian alpacas. *Small Ruminant Research*, 235, 107273. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2024.107273>
- Zhang, Y. K., Zhang, X. X., Li, F. D., Li, C., Li, G. Z., Zhang, D. Y., ... & Wang, W. M. (2021). Characterization of the rumen microbiota and its relationship with residual feed intake in sheep. *Animal*, 15(3), 100161. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100161>
- Zhong, T., Wang, Y., Wang, X., Freitas-de-Melo, A., Li, H., Zhan, S., Wang, L., Cao, J., Dai, D., Guo, J., Li, L., Zhang, H., Liu, J., & Niu, L. (2022). Diarrhea in suckling lambs is associated with changes in gut microbiota, serum immunological and biochemical parameters in an intensive production system. *Frontiers in microbiology*, 13, 1020657. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1020657>

Zoetendal, E. G., Collier, C. T., Koike, S., Mackie, R. I., & Gaskins, H. R. (2004). Molecular Ecological Analysis of the Gastrointestinal Microbiota: A Review. *The Journal of Nutrition*, 134(2), 465–472. <https://doi.org/10.1093/jn/134.2.465>

ANEXOS

Anexo 1. *Tabla de datos de animales muestreados (muestras fecales de crías de llamas de 1 a 3 meses de edad).*

Numero de crías	Numero de muestra	Arete	Parámetros	Lugar de muestreo
1	28	22LL063	sin diarrea	La raya puno
2	30	22LL037	sin diarrea	La raya puno
3	31	22LL033	sin diarrea	La raya puno
4	32	22LL058	sin diarrea	La raya puno
5	33	22LL050	sin diarrea	La raya puno
6	34	22LL052	sin diarrea	La raya puno
7	69	k0024	con diarrea	la raya UNSAAC
8	72	CH0027	con diarrea	la raya UNSAAC
9	73	22LL053	con diarrea	la raya puno
10	74	22LL046	con diarrea	la raya puno
11	75	22LL044	con diarrea	la raya puno

Anexo 2. Foto de trabajo en campo, majada de llamas sector de "Machuhuasi" en el centro experimental la Raya Puno. Para recojo de muestras.



Anexo 3. Foto de trabajo en campo, majada de llamas sector de "tambo" del centro experimental la Raya UNSAAC. Para recojo de muestras.



Anexo 4. Foto. método de extracción de muestras fecales diarreicas en crías de llamas.



Anexo 5. Foto de identificación y almacenamiento de las muestras a -20C.



Anexo 6. Foto esterilización de los materiales para la extracción de ADN genómico, en la campana extractora.



Anexo 7. Foto del Kit de extracción de ADN genómico pure link™.



ANEXO 8. Bead Tubes for PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit



Anexo 9. Foto de equipo heat o baño seco a 65°C.



Anexo 10. Foto de equipo qubit® 2.0 fluorometer (fluorómetro).



Anexo 11. Foto de laboratorio. Extracción de ADN genómico de las muestras de heces, en el laboratorio de genética molecular de medicina veterinaria UNSAAC.



Anexo 12. Foto corrida del termociclador para las librerías.



Anexo 13. Foto qpcr en el equipo quant studio para Cuantificación de librerías.



Anexo 14. Foto encendido del equipo ion one touch 2 para Enriquecimiento de las librerías:



Anexo 15. Foto de trabajo de laboratorio, preparación de librerías genómicas.



Anexo 16. Foto de recuperación de las librerías en el equipo de Ion ONE TOUCH ES.



Anexo 17. Foto de Chip 520 usado retirado del secuenciador para cambiar el nuevo.



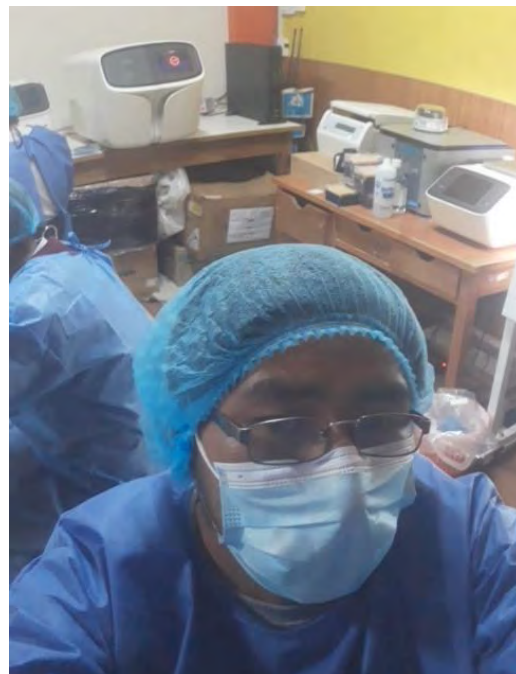
Anexo 18. Foto del equipo centrifuga con el que se centrifugó el chip con el adaptador de chips ion minifuge.



Anexo 19. Foto de preparación del secuenciador ion S5.

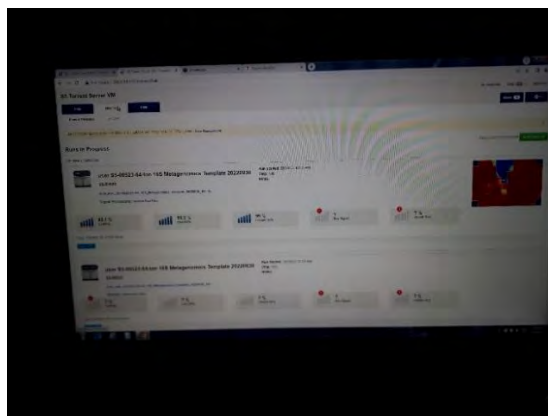


Anexo 21. Foto trabajo de laboratorio. secuenciación de librerías en curso en el S5.



Anexo 22. Foto. Cargado de archivos en el servidor de ion reporter con el secuenciador encendido.

Anexo 20. Foto del secuenciador S5 encendido.



Anexo 23 *Tabla de abundancias OTU de muestras de crías de llamas con diarrea*

Muestra	Total, de lecturas	Lecturas filtradas o quiméricas	Lecturas en OTUs
69 diarrea cría llama.bam			
[Muestra 9] (single, recortada)	94.996	25.260	69.736
cobertura OK			
72 diarrea cría llama.bam			
[Muestra 12] (single, recortada)	75.319	30.074	45.245
cobertura OK			
73 diarrea cría llama.bam			
[Muestra 13] (single, recortada)	532.253	259.587	272.666
cobertura OK			
74 diarrea cría llama.bam			
[Muestra 14] (single, recortada)	395.281	118.963	276.318
cobertura OK			
75 diarrea cría llama.bam			
[Muestra 15] (single, recortada)	85.132	35.110	50.022
cobertura OK			

Nota. OTU = Unidad Taxonómica Operativa (Operational Taxonomic Unit). Las muestras corresponden a crías de llama con diarrea.