

Aislamiento e identificación molecular de cepas bacterianas anaeróbicas aisladas del compartimento 1 de la alpaca (*Vicugna pacos*)

Isolation and molecular identification of anaerobic bacterial strains isolated from compartment 1 of the alpaca (*Vicugna pacos*)

Pedro Coila¹, Yolanda Romero^{2,3}, Diana Sánchez⁴, Oscar Oros¹, Celso Zapata¹, Nils Flores⁴, Richard Estrada^{2,3*}

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo identificar bacterias anaeróbicas aisladas del compartimento 1 del tracto digestivo de las alpacas. Se obtuvieron 4 aislamientos del licor (LC1) y 9 de la pared del compartimento (PC1) de los tractos digestivos. Los aislamientos de LC1 se cultivaron en agar Anaeróbico de Brewer (BA), y los aislamientos de PC1 en BA suplementado con L-cisteína. Los aislamientos anaeróbicos fueron sometidos a identificación mediante observación microscópica y pruebas bioquímicas, seguidas de la extracción de ADN bacteriano total. La amplificación se realizó utilizando cebadores 27F-1492R en el gen 16S ARNr, y se secuenció utilizando el método Sanger con un analizador de ADN ABI PRISM 3730XL. El análisis bioinformático reveló que las cepas correspondientes a la especie de LC1 eran cuatro *Streptococcus equinus* y de PC1 eran nueve

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú

² Instituto de Investigación en Bioinformática y Bioestadística – BIOINFO, La Molina, Perú

³ Dirección de Desarrollo Tecnológico Agrario, Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Lima, Perú

⁴ Escuela Profesional de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Cusco, Perú

* Autor correspondiente: Richard Estrada; richard.estrada.bioinfo@gmail.com

Recibido: 10 de abril de 2024

Aceptado para publicación: 3 de enero de 2025

Publicado: 28 de febrero de 2025

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

Streptococcus vicugnae. En el análisis filogenético, las cepas de *Streptococcus equinus* formaron un clado monofilético con un valor de Bootstrap de 100 y *Streptococcus vicugnae* con 88. Las cepas revelaron una naturaleza estrictamente anaeróbica, destacando la complejidad de la taxonomía del género *Streptococcus* y enfatizando la necesidad de futuras investigaciones para aclarar su clasificación taxonómica.

Palabras clave: bacterias anaeróbicas, alpaca, compartimento 1, 16S rDNA, filogenética, *Streptococcus*

ABSTRACT

The aim of the study was to identify anaerobic bacteria isolated from compartment 1 of the digestive tract of alpacas. Four isolates were obtained from the liquor (LC1) and nine from the compartment wall (PC1) of the digestive tracts. LC1 isolates were cultured on Brewer's Anaerobic Agar (BA), and PC1 isolates on BA supplemented with L-cysteine. Anaerobic isolates were subjected to identification by microscopic observation and biochemical tests, followed by extraction of total bacterial DNA. Amplification was performed using primers 27F-1492R on the 16S rRNA gene and sequenced using the Sanger method with an ABI PRISM 3730XL DNA analyser. Bioinformatic analysis revealed that the strains corresponding to the species of LC1 were four *Streptococcus equinus* and of PC1 were nine *Streptococcus vicugnae*. In phylogenetic analysis, *Streptococcus equinus* strains formed a monophyletic clade with a Bootstrap value of 100 and *Streptococcus vicugnae* with 88. The strains revealed a strictly anaerobic nature, highlighting the complexity of the taxonomy of the *Streptococcus* genus and emphasizing the need for future research to clarify its taxonomic classification.

Keywords: anaerobic bacteria, alpaca, compartment 1, 16S rDNA, phylogenetics, *Streptococcus*

INTRODUCCIÓN

Las tierras altas de Perú, incluyendo áreas como Puno, Cusco y Huancavelica, albergan la mayor concentración de alpacas a nivel mundial (INEI, 2012; Candio *et al.*, 2021; Wurzinger y Gutiérrez, 2022). En este entorno particular, emergen dos importantes razas de alpacas, Huacaya y Suri, constituyendo colectivamente más del 85% de la población de alpacas en Perú (Quispe *et al.*, 2009). La fibra derivada de las alpacas Huacaya recibe notable reconocimiento y experimenta una extensa demanda dentro de la industria textil (Paredes *et al.*, 2013; Machaca *et al.*, 2017; Bustinza *et al.*, 2021).

El estómago de los camélidos sudamericanos difiere morfológicamente de los rumiantes, pues poseen tres compartimentos en contraste con el estómago de cuatro compartimentos de los rumiantes (Vallenas *et al.*, 1971; Ingrand, 2000; Davies *et al.*, 2007). El primer compartimento (C1), análogo al rumen, es responsable de la mezcla, regurgitación y digestión microbiana de la ingesta. El licor estomacal de este compartimento juega un papel crucial en la fermentación y digestión microbiana, en tanto que la pared del compartimento estomacal absorbe los productos finales de la digestión microbiana. Esta interacción entre el licor y la pared del compartimento estomacal es esencial en el proceso digestivo de estos animales (Hund y Wittek, 2018).

El rumen de los rumiantes alberga una diversidad de microorganismos, incluyendo arqueas, hongos, protozoos, bacteriófagos, virus y bacterias, que desempeñan un papel fundamental en la conversión de componentes vegetales dietéticos en energía (Cholewińska *et al.*, 2021). Sin embargo, hay pocos estudios sobre la caracterización del microbiota de la alpaca a partir de muestras de heces (Carroll *et al.*, 2019; Bedenice *et al.*, 2022), habiendo encontrado solo un informe sobre el análisis del microbiota en el compartimento 1 (García *et al.*, 2021).

El género *Streptococcus*, perteneciente al grupo de bacterias lácticas (LAB), engloba una diversidad de especies. Si bien algunas son patógenas (Herrera *et al.*, 2009), se tienen muchas que no son patógenas (Jans *et al.*, 2015), encontrándose naturalmente en la flora comensal de la piel, cavidad oral, nasofaringe, tracto respiratorio superior, tracto gastrointestinal y tracto urogenital en humanos y animales (Clark, 2020). Aquellas que colonizan el tracto gastrointestinal exhiben un comportamiento anaeróbico facultativo (Whitehead y Cotta, 2000), habiéndose reportado en ovejas, cabras y vacas (Okura *et al.*, 2019; Gottschalk *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2022), alpacas (Volkhov *et al.*, 2021), llamas (Tavella *et al.*, 2018) y camélidos (Stoughton y Gold, 2015).

Las secuencias del gen ARNr 16S conforman una herramienta fundamental para identificar y clasificar microorganismos en diversos ambientes (Schloss y Handelsman, 2004). Con el tiempo, se ha establecido que la amplificación mediante PCR, la clonación y la secuenciación son las principales tecnologías empleadas para la determinación efectiva de secuencias del gen ARNr 16S en diversos contextos (Kim *et al.*, 2011).

La destacada eficiencia digestiva de las alpacas las convierte en un modelo de hospedador atractivo para el estudio de bacterias anaeróbicas. Los objetivos de este estudio fueron aislar e identificar cepas bacterianas anaeróbicas que residen en el compartimento 1 de las alpacas y determinar su filogenia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

La investigación se llevó a cabo en el Centro Experimental 'La Raya' de la Universidad Nacional del Altiplano, ubicado en el distrito de Santa Rosa, Provincia de Melgar, departamento de Puno, Perú. Este centro, situado dentro de la región agroecológica conocida como Puna Húmeda, se encuentra a una altitud de 4200 msnm, con predominio de temperatura entre -10 y 17 °C y precipitación anual de 525 mm.

Se utilizó la técnica de muestreo no probabilístico intencional para seleccionar un grupo compuesto por cuatro alpacas macho de raza Huacaya, con edades entre 3 y 4 años. Estos ejemplares se crían en un sistema de manejo extensivo y su dieta se basa en el pastoreo de los pastizales naturales de la región montañosa. La selección de estos ejemplares se realizó cumpliendo con la Ley Nacional Peruana N.º 30407, relacionada con la 'Protección y Bienestar Animal'.

Para la obtención de las muestras se extrajo aproximadamente 500 g del contenido del compartimento C1 del tracto digestivo que luego fue sometido a un proceso de tamizado utilizando gasa estéril. Esto permitió obtener un volumen de 20 mL de licor, que fue posteriormente diluido en una proporción de 1:10 utilizando una solución de NaCl al 0.09%. Se obtuvieron 13 muestras.

Aislamiento de Bacterias

El aislamiento inicial de bacterias anaeróbicas del compartimento C1 del tracto digestivo de las alpacas se llevó a cabo utilizando el precipitado bacteriano de cuatro aislamientos LC1 y 9 aislamientos PC1. Se realizó en placas de Petri utilizando Agar Columbia con sangre (OXOID) suplementado con 0.05% de L-cisteína. Se empleó la técnica de doble capa, donde la primera capa implicaba el rayado para el agotamiento utili-

zando un asa de Kolle. Posteriormente, se agregó agar fundido que se había pre-enfriado a 50 °C. Antes de la incubación, las placas se voltearon y se colocaron en pilas dentro de cámaras anaeróbicas. Esta disposición facilitó la correcta colonización del agar por parte de los microorganismos inoculados y también sirvió para prevenir la contaminación y que el agua de condensación afectara al medio de cultivo. La caracterización fenotípica implicó la observación de las características morfológicas de las colonias con la tinción de Gram.

Cultivo de Bacterias Anaeróbicas y Pruebas Bioquímicas

El cultivo anaeróbico se llevó a cabo en cámaras anaeróbicas utilizando sobres BBL Gaspak como indicadores. Tras su activación, los sobres mostraron condiciones anaeróbicas, cambiando de azul a blanco. Esto confirmó que el crecimiento del cultivo ocurrió en un ambiente anaeróbico después de 48 h de incubación a 37 °C. Las colonias de LC1 se cultivaron en Agar Anaeróbico de Brewer (BA), mientras que las de la PC1 se cultivaron en Agar Anaeróbico de Brewer suplementado con L-cisteína (BA-Cys). Se realizaron pruebas de identificación bioquímica, incluyendo evaluaciones de catalasa, actividad oxidasa, producción de indol, azufre, motilidad, utilización de citrato de Simmons y reacciones del Agar de Hierro de Kligler (KIA), en las trece cepas bacterianas aisladas.

Extracción de ADN, PCR y Secuenciación

El ADN bacteriano aislado se extrajo utilizando el kit Extracta Plus DNA - Quantabio, siguiendo el protocolo del kit. La pureza de las plantillas de ADN extraídas se analizó utilizando un nanofotómetro de implante mediante la medición de la absorbancia a 260/280 nm, la cual se visualizó en un gel de agarosa al 1%. La amplificación del gen 16S ARNr se llevó a cabo utilizando los cebadores: 27F hacia adelante (5' AGAGTTTGATCMT-

GGCTCAG 3') y 1492R hacia atrás (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'). La amplificación de PCR se realizó siguiendo el protocolo del kit AccuStart II PCR SuperMix - Quantabio.

El gen 16S rRNA se sometió a secuenciación de ADN utilizando el método de secuenciación de Sanger con un analizador de ADN ABI Prism 3730XL de Applied Biosystems. El proceso de secuenciación involucró un paso de desnaturalización inicial a 96 °C durante 20 s, seguido de 30 ciclos de hibridación a 50 °C durante 20 s y extensión a 60 °C durante 4 min. La purificación de los productos de secuenciación de Sanger se realizó utilizando el kit de purificación BigDye® X Terminator™ de Applied Biosystems. Este proceso de purificación involucró la adición de soluciones SAM y BigDye X Terminator, mezcla y posterior centrifugación. El sobrenadante resultante se transfirió para su análisis en un analizador genético.

Análisis del Árbol Filogenético

Se llevó a cabo un proceso exhaustivo de análisis de secuencias. Inicialmente, se aplicó un control de calidad a las secuencias coincidentes utilizando Chromas v. 2.6.6. Luego, las secuencias de ADN se ensamblaron utilizando el software Geneious Prime 6. Posteriormente, se utilizó la herramienta bioinformática NCBI BLAST para identificar las secuencias. Se construyó un árbol filogenético utilizando un subconjunto de secuencias de GenBank estrechamente relacionadas después de alinear múltiples secuencias con AliView v. 1.26 (Larsson, 2014). Para construir el árbol filogenético, se utilizó el programa Raxml v. 8.2 (Stamatakis, 2016) con 1000 réplicas de Bootstrap. Además, se utilizó Modeltest para determinar el modelo evolutivo de ADN más apropiado. Finalmente, se utilizó el programa iTOL v. 5 (Letunic y Bork, 2021) para observar el mapa filogenético.

Cuadro 1. Resultados de pruebas bioquímicas de bacterias anaeróbicas aisladas del Compartimento 1 del estómago de cuatro alpacas

Origen	ID Bacteria	Caracterización microscópica		Medio de cultivo	Pruebas bioquímicas						
		Tinción de Gram			C	O	KIA	SIM			S.C
		Forma	Color					S	Indol	M	
PC1	UNAP01	Cocos	Gram positiva	BA-Cys	-	-	A/A	-	-	-	-
	UNAP04			BA-Cys	-	-	A/A	-	-	-	-
	UNAP04.2			BA-Cys	-	-	A/A	-	-	-	-
	UNAP03			BA-Cys	-	-	A/A	-	-	-	-
	UNAP05			BA-Cys	-	-	A/A	-	-	-	-
	UNAP06			BA-Cys	-	-	A/A	-	-	-	-
	UNAP07			BA-Cys	-	-	A/A	-	-	-	-
	UNAP08			BA-Cys	-	-	A/A	-	-	-	-
LC1	UNAP02.1	Cocos	Gram positiva	BA-Cys	-	-	A/A	-	-	-	-
	UNAP03.1			BA	-	-	A/A	-	-	-	-
	UNAP01.1			BA	-	-	A/A	-	-	-	-
	UNAP02.1			BA	-	-	A/A	-	-	-	-
	UNAP04.1			BA	-	-	A/A	-	-	-	-

LC1: licor; PC1: pared del compartimento C1

C: prueba de Catalasa, O: prueba de Oxidasa, S: prueba de Azufre, M: Motilidad, S.C: prueba de Citrato de Simmons

BA: Agar Anaeróbico de Brewer; BA-Cys: Ba suplementado con L-cisteína

RESULTADOS

Prueba de microscopía y pruebas bioquímicas

Las trece cepas bacterianas aisladas mostraron un perfil Grampositivo y presentaron morfología de cocos (Cuadro 1). Las cepas bacterianas aisladas en las pruebas bioquímicas mostraron una respuesta negativa, incluyendo la producción de indol, reducción de sulfuro, motilidad, citrato de Simmons, reactividad a la oxidasa y actividad catalasa. Además, al ser sometidas a Agar de Hierro de Kligler (KIA), se observó consistentemente un resultado A/A (Cuadro 1).

Identificación molecular

La identificación taxonómica se realizó utilizando la herramienta BLAST. Las secuencias obtenidas se almacenaron en la base

de datos de GenBank. Los resultados obtenidos de la búsqueda abarcan el reconocimiento de la especie bacteriana correspondiente, el número de acceso vinculado a la especie más cercana, el número de acceso de las secuencias archivadas, junto con los porcentajes de cobertura de consulta, similitudes de identidad, brechas detectadas y valor E, como se describe en el Cuadro 2.

Construcción y análisis de árbol filogenético

La taxonomía de los 13 aislados se determinó construyendo un árbol filogenético utilizando las secuencias del gen 16S ARNr de los aislados y aquellas obtenidas de la base de datos GenBank en NCBI. Los resultados (Figura 1) indicaron que los aislados OQ989631.1, OQ982904.1, OQ989632.1 y OQ982900.1 de LC1 formaron un clado monofilético con NR 181987.1, identificado como *Streptococcus vicugnae* con un valor de Bootstrap de 88. Por otro lado, las cepas

Cuadro 2. Identificación molecular de las especies bacterianas encontradas en el contenido del Compartimento 1 del tracto digestivo de cuatro alpacas

ID Bacteria	Número de acceso de secuencias depositadas	Especies bacterianas	Número de acceso de la coincidencia más cercana	Query Cover	Identities	Gaps	E-value
UNAP01	OQ982901	<i>Streptococcus equinus</i>	MN075466.1	100%	100%	0	0
UNAP01.1	OQ982900	<i>Streptococcus vicugnae</i>	NR_181987.1	100%	99.86%	0	0
UNAP02.1	OQ982904	<i>Streptococcus vicugnae</i>	MT537728.1	100%	99.86%	0	0
UNAP03	OQ982903	<i>Streptococcus equinus</i>	MN075469.1	100%	99.93%	0	0
UNAP03.1	OQ989631	<i>Streptococcus vicugnae</i>	NR_181987.1	100%	99.86%	0	0
UNAP04	OQ982905	<i>Streptococcus equinus</i>	MN075471.1	100%	99.93%	0	0
UNAP04.2	OQ989626	<i>Streptococcus equinus</i>	MN075474.1	100%	99.93%	0	0
UNAP04.1	OQ989632	<i>Streptococcus vicugnae</i>	MT537728.1	100%	99.86%	0	0
UNAP05	OQ989627	<i>Streptococcus equinus</i>	MN075449.1	100%	99.93%	0	0
UNAP06	OQ989628	<i>Streptococcus equinus</i>	MN075448.1	100%	99.93%	0	0
UNAP07	OQ989629	<i>Streptococcus equinus</i>	MN075472.1	100%	99.93%	0	0
UNAP08	OQ989630	<i>Streptococcus equinus</i>	MN075452.1	100%	99.93%	0	0
UNAP02	OQ982902	<i>Streptococcus equinus</i>	MN075463.1	100%	99.93%	0	0

aisladas de PC1, identificadas como OQ982901, OQ982903, OQ982905, OQ98-9626, OQ989627, OQ989628, OQ989629, OQ989630 y OQ982902, formaron un clado monofilético con secuencias de la base de datos GenBank identificadas como *Streptococcus equinus*, con un valor de Bootstrap de 100.

DISCUSIÓN

Los resultados revelaron la identificación de dos especies, *Streptococcus vicugnae* y *Streptococcus equinus*, obtenidas de LC1 y PC1 del compartimento 1, res-

pectivamente. Esta información del microbiota de la alpaca es relevante dado el limitado número de estudios relacionados con esta especie. Las cepas bacterianas aisladas fueron cultivadas en un medio específico para bacterias anaeróbicas, siendo las de LC1 cultivadas en BA, mientras que las del compartimento PC1 se cultivaron en BA-Cys. Los resultados de las pruebas de catalasa y oxidasa indicaron que todas las cepas eran estrictamente anaeróbicas (Vолоkhov *et al.*, 2021). Además, las cepas arrojaron resultados negativos en las pruebas de Indol, Movilidad y Citrato de Simmons, características de un perfil propio de bacterias anaeróbicas (Nagy *et al.*, 2018; Volokhov *et al.*, 2021).

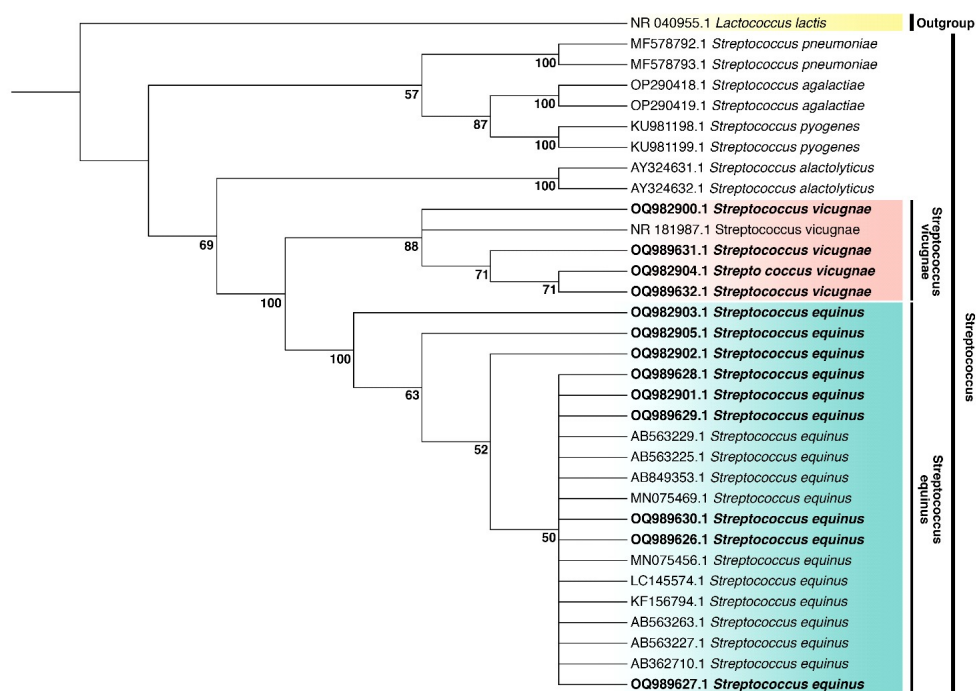


Figura 1. Árbol filogenético de los aislamientos bacterianos basado en las secuencias de ARNr 16S

El análisis filogenético desempeñó un papel crucial en la identificación de las relaciones taxonómicas de las cepas bacterianas bajo investigación. Al construir un árbol filogenético basado en las secuencias de ARNr 16S de las cepas aisladas, junto con secuencias obtenidas de las bases de datos GenBank y NCBI, se sugiere una conexión potencial entre las cepas aisladas y las especies *Streptococcus equinus* y *Streptococcus vicugnae*, lo que enfatiza la necesidad de una investigación más exhaustiva.

Streptococcus equinus, una especie Grampositiva que reside en el tracto gastrointestinal de animales y humanos (Bolej y Tjalsma, 2013) es uno de los componentes aerotolerantes del microbiota en la superficie epitelial del rumen (Jans y Boleij, 2018). Asimismo, se reportó en la flora conjuntival de la alpaca Huapaya (Storms *et al.*, 2016). Es importante destacar que *Streptococcus*

equinus se encuentra categorizado dentro del complejo SBSEC, el cual ha demostrado una estrecha relación filogenética con otras especies de *Streptococcus* como *S. gallolyticus*, *S. infantarius*, *S. macedonicus*, *S. waius*, *S. lutetiensis* y *S. pasteurianus*, distinguiéndolo de otras especies de *Streptococcus* que no pertenecen a este complejo (Jans *et al.*, 2015; Jans y Boleij, 2018).

El descubrimiento de *Streptococcus vicugnae*, una especie recién identificada en 2021 (Volokhov *et al.*, 2021) es de considerable importancia dentro del contexto de este estudio. Los resultados filogenéticos sugieren la posibilidad de que las cepas bajo investigación representen variantes o subtipos dentro de esta especie recién descubierta. Del mismo modo, es la primera vez que se ha reportado *Streptococcus vicugnae* en alpacas nativas del Perú. Esta observación subraya la complejidad de la taxonomía dentro del

género *Streptococcus* y resalta la necesidad urgente de más investigación para elucidar con precisión la naturaleza de la relación taxonómica.

CONCLUSIÓN

Las cepas bacterianas aisladas, caracterizadas como estrictos anaerobios, mostraron relaciones filogenéticas con *Streptococcus equinus* de PC1 y *Streptococcus vicugnae* de LC1, aisladas del compartimento 1. Este es el primer estudio que reporta bacterias anaeróbicas en los tractos digestivos de las alpacas peruanas. Por último, esto resalta la complejidad de la taxonomía del género *Streptococcus* y subraya la importancia de futuras investigaciones para comprender la clasificación taxonómica de estas cepas.

LITERATURA CITADA

1. **Bedenice D, Resnick-Sousa J, Bookbinder L, Trautwein V, Creasey HN, Widmer G. 2022.** The association between fecal microbiota, age and endoparasitism in adult alpacas. *Plos One* 17: e0272556. doi: 10.1371/journal.pone.0272556
2. **Boleij A, Tjalsma H. 2013.** The itinerary of *Streptococcus gallolyticus* infection in patients with colonic malignant disease. *Lancet Infect Dis* 13: 719-724. doi: 10.1016/S1473-3099(13)-70107-5
3. **Bustinza AV, Machaca V, Cano V, Coaquira J. 2021.** Evolución y desarrollo de las razas de alpaca: Suri y Huacaya. *Rev Inv Vet Perú* 32: e19876. doi: 10.15381/rivep.v32i5.19876
4. **Candio Lopez JR, Gutiérrez Reynoso GA, Candio Lopez JR, Gutiérrez Reynoso GA. 2021.** Objetivos de selección para la crianza de alpacas Huacaya bajo dos escenarios económicos en la sierra central del Perú. *Ecol Apl* 20: 113-125. doi: 10.21704/rea.v20i2.1802
5. **Carroll C, Olsen KD, Ricks NJ, Dill-McFarland KA, Suen G, Robinson TF, Chaston JM. 2019.** Bacterial communities in the alpaca gastrointestinal tract vary with diet and body site. *Front Microbiol* 9 :3334. doi: 10.3389/fmicb.2018.-03334
6. **Cholewińska P, Górniak W, Wojnarowski K. 2021.** Impact of selected environmental factors on microbiome of the digestive tract of ruminants. *BMC Vet Res* 17: 25. doi: 10.1186/s12917-021-02742-y
7. **Clark SE. 2020.** Commensal bacteria in the upper respiratory tract regulate susceptibility to infection. *Curr Opin Immunol* 66: 42-49. doi: 10.1016/j.coi.2020.03.010
8. **Davies HL, Robinson TF, Roeder BL, Sharp ME, Johnston NP, Christensen AC, Schaalje GB. 2007.** Digestibility, nitrogen balance, and blood metabolites in llama (*Lama glama*) and alpaca (*Lama pacos*) fed barley or barley alfalfa diets. *Small Ruminant Res* 73: 1-7. doi: 10.1016/j.smallrumres.2006.10.006
9. **García M, Chipayo Y, Olazabal J, Camargo R, San Martín F. 2021.** Densidad poblacional de protozoarios en el compartimiento 1 de alpacas durante la época seca. *Rev Investig Agropecu Sci Biotechnol* 1: 35-37. doi:10.25127/riagrop.-20211.662
10. **Gottschalk M, Lacouture S, Fecteau G, Desrochers A, Boa A, Saab ME, Okura M. 2020.** Canada: Isolation of *Streptococcus ruminantium* (*Streptococcus suis*-like) from diseased ruminants in Canada. *Can Vet J* 61: 473-475.
11. **Herrera P, Kwon YM, Ricke SC. 2009.** Ecology and pathogenicity of gastrointestinal *Streptococcus bovis*. *Anaerobe* 15: 44-54. doi: 10.1016/j.anaerobe.2008.11.003
12. **Hund A, Wittek T. 2018.** Abomasal and third compartment ulcers in ruminants and South American camelids. *Vet Clin N Am-Food A* 34: 35-54. doi: 10.1016/j.cvfa.2017.10.003

13. **Ingrand S. 2000.** La digestion chez les camélidés; comparaison avec les ruminants. INRAE Prod Anim 13: 165-176.
14. **[INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2012.** IV Censo Nacional Agropecuario. [Internet]. Disponible en: <https://sinia.minam.gob.pe/documentos/resultados-definitivos-iv-censo-nacional-agropecuario-2012-0>
15. **Jans C, Boleij A. 2018.** The road to infection: host-microbe interactions defining the pathogenicity of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* Complex Members. Front Microbiol 9: 603. doi: 10.3389/fmicb.2018.00603
16. **Jans C, Meile L, Lacroix C, Stevens MJA. 2015.** Genomics, evolution, and molecular epidemiology of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (SBSEC). Infect Genet Evol 33: 419-436. doi: 10.1016/j.meegid.2014.09.017
17. **Kim M, Morrison M, Yu Z. 2011.** Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. J Microbiol Meth 84:8 1-87. doi: 10.1016/j.mimet.2010.10.020
18. **Larsson A. 2014.** AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. Bioinformatics 30: 3276-3278. doi: 10.1093/bioinformatics/btu531
19. **Letunic I, Bork P. 2021.** Interactive tree of life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. Nucleic Acids Res 49: W293-W296. doi: 10.1093/nar/gkab301
20. **Machaca V, Bustinza AV, Corredor FA, Paucara V, Quispe EE, Machaca R. 2017.** Características de la fibra de alpaca Huacaya de Cotaruse, Apurímac, Perú. Rev Inv Vet Perú 28: 843-851. doi: 10.15381/rivep.v28i4.13889
21. **Nagy E, Boyanova L, Justesen US. 2018.** How to isolate, identify and determine antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in routine laboratories. Clin Microbiol Infect 24: 1139-1148. doi: 10.1016/j.cmi.2018.02.008
22. **Okura M, Maruyama F, Ota A, Tanaka T, Matoba Y, Osawa A, Sadaat SM, et al. 2019.** Genotypic diversity of *Streptococcus suis* and the *S. suis*-like bacterium *Streptococcus ruminantium* in ruminants. Vet Res 50: 94. doi: 10.1186/s13567-019-0708-1
23. **Paredes MM, Membrillo A, Azor PJ, Machaca JE, Torres D, Serrano AM. 2013.** Genetic and phenotypic variation in five populations of Huacaya Alpacas (*Vicugna pacos*) from Peru. Small Ruminant Res 111: 31-40. doi: 10.1016/j.smallrumres.2012.09.017
24. **Park SY, Muhammad N, Kim SG, Kwon H, Seo S, Kim JH. 2022.** *Streptococcus ruminicola* sp. nov., new species of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (SBSEC) isolated from the rumen of Korean domestic ruminants. Arch Microbiol 204: 636. doi:10.1007/s00203-022-03255-4
25. **Quispe EC, Rodríguez TC, Iñiguez LR, Mueller JP. 2009.** Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamérica. Anim Genet Resour Inf 45: 1-14.
26. **Schloss PD, Handelsman J. 2004.** Status of the microbial census. Microbiol Mol Biol R 68: 696-691. doi: 10.1128/MMBR.68.4.686-691.2004
27. **Stamatakis A. 2016.** The RAxML v8. 2. X Manual. Heidleberg Inst Theor Stud.
28. **Storms G, Meersschaert C, Farnir F, Grauwels M. 2016.** Normal bacterial conjunctival flora in the Huacaya alpaca (*Vicugna pacos*). Vet Ophthalmol 19: 22-28. doi: 10.1111/vop.12248
29. **Stoughton WB, Gold J. 2015.** *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus* pleuropneumonia and peritonitis in a dromedary camel (*Camelus dromedarius*) calf in North America. J Am Vet Med Assoc 247: 300-303. doi: 10.2460/javma.247.3.300
30. **Tavella A, Bettini A, Cocchi M, Idrizi I, Colorio S, Viel L, Zanardello C, et al. 2018.** Isolation of *Streptococcus agalactiae* in a female llama (*Lama glama*) in South Tyrol (Italy). BMC Vet Res 14: 343. doi: 10.1186/s12917-018-1676-9

31. **Vallenas A, Cummings JF, Munnell JF. 1971.** A gross study of the compartmentalized stomach of two new-world camelids, the llama and guanaco. *J Morphol* 34: 399-423. doi: 10.1002/jmor.1051340403
32. **Volokhov DV, Zagorodnyaya TA, Shen Z, Blom J, Furtak VA, Eisenberg T, Fan P, et al. 2021.** *Streptococcus vicugnae* sp. nov., isolated from faeces of alpacas (*Vicugna pacos*) and cattle (*Bos taurus*), *Streptococcus zalophi* sp. nov., and *Streptococcus pacificus* sp. nov., isolated from respiratory tract of California sea lions (*Zalophus californianus*). *Int J Syst Evol Microbiol* 71: 004826. doi: 10.1099/ijsem.0.004826
33. **Whitehead TR, Cotta MA. 2000.** Development of molecular methods for identification of *Streptococcus bovis* from human and ruminal origins. *FEMS Microbiol Lett* 182: 237-240. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb08901.x
34. **Wurzinger M, Gutiérrez G. 2022.** Alpaca breeding in Peru: From individual initiatives towards a national breeding programme? *Small Ruminant Res* 217: 106844. doi: 10.1016/j.smallrumres.-2022.106844