

## Determinación de bacterias y hongos en semen fresco de alpaca obtenido por tres técnicas de colección

### Determination of bacteria and fungi in fresh alpaca semen obtained by three collection techniques

Joel I. Pacheco Curie<sup>1,3</sup>, José M. Angulo-Tisoc<sup>1</sup>, Juan Siuce<sup>2</sup>,  
Wilber García Vera<sup>1</sup>

#### RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo describir la microbiota presente en semen de alpaca. Se colectaron 15 muestras de semen mediante las técnicas de vagina artificial, electroeyaculación y pos-cópula (cinco por técnica). Además, se hicieron hisopados prepuciales (n=5) y vaginales (n=5). Se hicieron cultivos microbiológicos para determinar los géneros bacterianos y fúngicos y una valoración de la carga bacteriana mediante la determinación de la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC/ml). Se identificaron seis géneros bacterianos en vagina y siete en prepucio, además de una especie de hongo (*Aspergillus fumigatus*). Bacterias de los géneros *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Bacillus* fueron los más abundantes y presentes en semen obtenidos por tres técnicas, coincidiendo con los encontrados en los hisopados prepuciales y vaginales. La cantidad de UFC/ml fue similar para las tres técnicas, mientras que no hubo presencia de hongos en el semen obtenido por electroeyaculación, probablemente por el lavado prepucial previo. La presencia y cantidad de géneros bacterianos y fúngicos fue superior a lo reportado en otras especies animales.

**Palabras clave:** microbiota, semen, contaminación, cópula

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Producción y Sanidad de Ganadería Altoandina, Centro de Investigación Estación IVITA - Estación Marangani, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Cusco, Perú

<sup>2</sup> Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

<sup>3</sup> E-mail: [jpachecoc@unmsm.edu.pe](mailto:jpachecoc@unmsm.edu.pe)

Recibido: 26 de octubre de 2021

Aceptado para publicación: 25 de mayo de 2022

Publicado: 29 de junio de 2022

©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

## ABSTRACT

The study aimed to describe the microbiota present in alpaca semen. Fifteen semen samples were collected using the artificial vagina, electroejaculation and post-copula techniques (five per technique). In addition, preputial (n=5) and vaginal (n=5) swabs were made. Microbiological cultures were made to determine the bacterial and fungal genera and an assessment of the bacterial load by determining the number of colony-forming units (CFU/ml). Six bacterial genera were identified in the vagina and seven in the prepuce, in addition to a fungal species (*Aspergillus fumigatus*). Bacteria of the genera *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Bacillus* were the most abundant and present in semen obtained by the three techniques, coinciding with those found in preputial and vaginal swabs. The amount of CFU/ml was similar for the three techniques, while there was no presence of fungi in the semen obtained by electroejaculation, probably due to the previous preputial washing. The presence and quantity of bacterial and fungal genera was higher than that reported in other animal species.

**Key words:** microbiota, semen, contamination, copula

## INTRODUCCIÓN

El semen de los camélidos sudamericanos presenta características únicas respecto al de otras especies domésticas, tales como extrema viscosidad, bajos parámetros de motilidad, concentración y viabilidad, entre otros, además de considerar el depósito intrauterino durante la cópula, produciendo su mezcla con sangre y fluidos uterinos e inflamatorios (Franco *et al.*, 1981; Bravo, 2002). Se han desarrollado técnicas de obtención de semen a través de la vagina artificial y la electroeyaculación, obteniéndose diferente tipo y calidad de semen, lo cual ha limitado en alguna forma el desarrollo de protocolos de refrigeración y congelamiento de semen (Sumar, 1991; Pacheco, 2008).

Un estudio en el semen humano demostró la presencia de bacterias de diversos géneros sin relación alguna con los parámetros seminales, evidenciando posible intercambio de bacterias presentes en el tracto vaginal (Baud *et al.*, 2018), habiéndose también descrito poblaciones bacterianas habituales en

órganos reproductivos de vacas (Boscan *et al.*, 2010). En el humano se observa una relación en pacientes con cierto grado de infertilidad con bacterias, especialmente con la presencia de *E. coli* (Moretti *et al.*, 2009). En alpacas vacías se ha demostrado la presencia de bacterias de los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Proteus* y levaduras en vagina (Ccama y Soto, 1997). Estos géneros bacterianos coinciden con el trabajo de Tibary y Anohuassi (2001). Asimismo, se ha descrito la presencia de poblaciones bacterianas en útero y vagina (Jiménez, 2016) y en prepucio de llamas (Jarvinen y Kinyon, 2010), dado que los tractos reproductivos presentan pH neutro favorable para el crecimiento bacteriano, tanto en hembras (Pacheco *et al.*, 2011) como en machos (Huamantuco, 2005).

Entre las técnicas de colecta de semen que vienen siendo investigadas, se describe la obtención de semen pos-cópula, electroeyaculación, vagina artificial, aspiración intrauterina del semen pos-cópula y el uso de un vaginoscopio para obtener el reflujó de la

mezcla de semen y fluidos uterinos pos-cópula (Pacheco, 2008), siendo esta última técnica posible de realizar en campo, lográndose obtener gestaciones mediante el uso de muestras frescas y refrigeradas en inseminación artificial (García *et al.*, 2017). No obstante, el avance del uso de la inseminación artificial se ve retrasado por la posibilidad de contaminación intrauterina de las hembras inseminadas, así como posible causa de inflamaciones e infecciones uterinas, por la presencia de carga bacteriana en el fluido colectado pos-cópula (Dellepiane y Morales-Cauti, 2018). Ante estos antecedentes, el objetivo del presente estudio fue determinar la calidad microbiológica y micológica del semen fresco de las alpacas obtenidos mediante las técnicas de electroeyaculación, pos-cópula y vagina artificial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación

Las muestras de semen fueron colectadas de alpacas del rebaño experimental de La Estación IVITA Maranganí, ubicados en el Fundo La Raya, a 4400 msnm, en Cusco, Perú. Las muestras fueron procesadas en el Área de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en Lima.

### Animales y Muestras

Se utilizaron 5 hembras y 15 machos Huacaya, con edad promedio de 6 años, mantenidas en condiciones de crianza extensiva, alimentadas en pasturas naturales y clínicamente sanas. Los animales utilizados para las técnicas de electroeyaculación y pos-cópula fueron utilizados anteriormente en monta natural, en tanto que los machos entrenados y utilizados para la técnica de vagina artificial no tuvieron contacto sexual previo con hembras de la especie.

Las muestras para bacteriología fueron tomadas con un hisopo estéril que fue colocado en un tubo estéril conteniendo agar de transporte (medio Stuart). Los fluidos se colectaron en frascos estériles de 15 ml. Las muestras se almacenaron en cajas de poliestireno expandido (Tecnopor) con hielo en geles de 500 g y trasladadas al laboratorio de bacteriología en un lapso de 24 horas.

Las muestras fueron colectadas según los siguientes procedimientos:

- *Hisopado prepucial*. Se hizo un raspado del prepucio y fórnix prepucial (5 machos) utilizando un hisopo estéril.
- *Hisopado vaginal*. Se hizo un hisopado de la porción media y profunda de la vagina (5 hembras) con la ayuda de un espéculo vaginal.
- *Electroeyaculación (EE)*. Previo a la toma de muestra, se hizo un lavado del prepucio, glándula y fórnix prepucial con suero fisiológico estéril. Se obtuvo el semen por el procedimiento de electroeyaculación descrito por Director *et al.* (2004) en cinco machos y la muestra se obtuvo introduciendo el hisopo estéril dentro del tubo de colecta. Se utilizaron los mismos machos para la técnica pos-cópula.
- *Pos-cópula (PC)*. Se utilizaron 5 machos y 5 hembras. La colección se realizó luego de la cópula. Para ello se utilizó un sigmoidoscopio para alcanzar la *os externa* del cérvix (Tibary y Pearson, 2015). La muestra fue colectada con hisopo estéril del fluido colectado del tracto reproductivo de las hembras.
- *Vagina artificial (VA)*. Se utilizaron cinco machos entrenados para vagina artificial, usando maniquí de hembra, de acuerdo con la técnica descrita por Bravo *et al.* (1997). Las muestras fueron colectadas del tubo de colección mediante un hisopo.

Para las muestras de hisopado prepucial se utilizaron machos diferentes a los usados en las técnicas de colección de semen. Las muestras fueron obtenidas por separado para

cada método de colección, con intervalos de una semana entre colectas.

### Análisis Bacteriológico

El aislamiento microbiológico se realizó en agar Sangre y agar MacConkey, con el uso de generadores de anaerobiosis en Anaerocult®, cultivándose entre 24 a 72 h a 37 °C. Se realizaron coloraciones Gram a las colonias obtenidas y se realizaron pruebas bioquímicas primarias como Oxidasa y Catalasa. Posterior a ello, según el Manual Bergey para la identificación del género y especie bacteriana, se utilizaron las pruebas bioquímicas: fermentación de carbohidratos (lactosa, glucosa y sacarosa), prueba de citrato, movilidad, indol, urea, coagulasa, hidrólisis de la esculina, reducción de nitratos, producción de sulfuro de hidrógeno y producción de gas (Brenner *et al.*, 2005).

En el recuento bacteriano se emplearon diluciones de la muestra utilizando agua peptonada tamponada para la dilución. Se emplearon nueve volúmenes del dilutor con un volumen de la muestra, obteniéndose diluciones de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$ . Se transfirió 1 ml y se agregó 20 ml de los medios PCA (*Plate count agar*) para el recuento de mesófilos y agar BRV (Violeta cristal-rojo neutro-bilis-lactosa) para la cuantificación de coliformes. La incubación se realizó a 37 °C durante 24-48 h. El conteo de colonias se realizó mediante un estereoscopio, de manera de expresar el promedio de (UFC/ml). Los datos fueron analizados mediante estadística descriptiva.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los géneros de bacterias u hongos identificados en hisopados de órganos reproductivos de machos y hembras se describen en el Cuadro 1. Las bacterias identificadas en muestras de semen obtenidos por EE, PC y VA se presentan en el Cuadro 2 y la evaluación cuantitativa de la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) en el Cuadro 3:

Cuadro 1. Bacterias y hongos aislados de prepucio y vagina de alpacas aparentemente sanas (Cusco, Perú)

	Prepucio	Vagina
<i>Escherichia coli</i>	+++	++++
<i>Enterobacter</i> sp.	+++	++
<i>Corynebacterium</i> sp.	++	+
<i>Staphylococcus</i> sp.	+++	++
<i>Klebsiella oxitoca</i>	+	-
<i>Citrobacter</i> sp.	+	-
<i>Streptococcus</i> sp.	+	-
<i>Bacillus</i> sp.	-	+
<i>Providencia</i> sp.	-	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	-

En prepucio se identificaron siete géneros bacterianos y un género fúngico, mientras que en muestras vaginales fueron seis géneros bacterianos, compartiendo especies de los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Corynebacterium* y *Staphylococcus*, por lo que podrían considerarse como géneros saprofitos o residentes comunes de estos órganos, tal como sucede en vacas (Boscan *et al.*, 2010) y ovejas (Swartz *et al.*, 2014). Por otro lado, una evaluación más exhaustiva mediante secuenciamiento genético en semen de cerdos identificó 291 géneros bacterianos (Zhang *et al.*, 2020), lo que refleja la gran diversidad microbiana relacionada a los órganos genitales de los animales.

Todos los géneros bacterianos encontrados en muestras de prepucio de alpaca coinciden con los géneros descritos anteriormente en pene y prepucio de alpacas y llamas (Jarvinen y Kinyon, 2010; Jiménez, 2016) y dromedarios (Ghoneim *et al.*, 2014), con excepción del género *Citrobacter* que no ha sido descrito en estudios previos. Por otro lado, el hongo *Aspergillus fumigatus* fue descrito

Cuadro 2. Bacterias identificadas en muestras de semen de alpaca obtenidas por electroeyaculación (EE), pos-cópula (PC) y vagina artificial (VA)

Género	EE	PC	VA
<i>Streptococcus</i> sp	+	++	++++
<i>Staphylococcus</i> sp	++	+	+
<i>Escherichia coli</i>	++	++	-
<i>Nocardia</i> sp	+	-	-
<i>Bacillus</i> sp	+	+	++
<i>Micrococcus</i> sp	-	-	+

en muestras de semen de alpacas colectado pos-cópula (Dellepiane y Morales-Cauti, 2018), hongo que se encuentra en el medioambiente, de modo que podría fácilmente contaminar el prepucio, especialmente durante la cópula que se realiza con la hembra en recumbencia esternal (Bravo, 2014).

Los géneros bacterianos aislados con mayor frecuencia en muestras vaginales fueron *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Bacillus*, lo cual coincide con descripciones anteriores en alpacas (Ccama y Soto, 1997) y llamas (Jiménez, 2016), mientras que Dellepiane y Morales-Cauti (2018) reportaron la presencia de *Escherichia* y *Providencia* en útero de alpaca. *E. coli* fue una de las bacterias predominantes y en mayor cantidad (Cuadro 1), pudiendo influir negativamente en los parámetros reproductivos (Alfaro-Escalona *et al.*, 2019). Sin embargo, *E. coli* suele ser el principal contaminante de los genitales, lo que requiere mayor análisis, pues muchas de ellas son comensales, mientras que algunas pueden ser muy específicas, como las *E. coli* uropatogénicas (Kaper *et al.*, 2004), de las que no se dispone de reportes en alpacas.

Las muestras seminales obtenidas mediante electroeyaculación, a pesar de ser una técnica que permite lavar el prepucio antes de la colección, mantuvo una carga bacteriana similar a las otras dos técnicas utilizadas. Estas poblaciones bacterianas pueden ubicarse en zonas de difícil acceso para ser higienizadas, así como en otras especies como en las criptas del glande en equinos (Clement *et al.*, 1995), el glande, surco coronal y uretra distal en humanos (Lin *et al.*, 2012; Nelson *et al.*, 2012).

Las especies bacterianas presentes en el prepucio de los camélidos tienen mucha probabilidad de contaminar las muestras seminales, a pesar de que en la técnica de electroeyaculación se realiza un lavado del prepucio (Director *et al.*, 2007). En el presente trabajo se encontraron 3 de los 4 géneros descritos por Jiménez (2016) y 3 de los 10 géneros descritos por Jarvinen y Kinyon (2010) en prepucios de llama y alpaca, respectivamente. El lavado prepucial disminuye la carga bacteriana cuando se realiza con soluciones de antibiótico (Bhakat y Raina, 2001); sin embargo, en el presente estudio el lavado se hizo con suero fisiológico estéril, procedimiento que pudo controlar la carga fúngica presente (Rota *et al.*, 2011), pero no la bacteriana (Clement *et al.*, 1995).

Para el caso de las muestras seminales obtenidas pos-cópula, considerando el tipo de cópula, las bacterias presentes deben provenir tanto del macho como de la hembra. Se identificaron cargas bacterianas de *Streptococcus* sp, *Staphylococcus* sp, *E. coli* y *Bacillus* sp, siendo también estas bacterias comunes en tractos reproductivos del humano (Nelson *et al.*, 2012), ovino (Swartz *et al.*, 2014), vacuno (Peña *et al.*, 2011; Swartz *et al.*, 2014), equino (Clement *et al.*, 1995) y camélidos (Ccama y Soto, 1997; Mshelia *et al.*, 2014; Jiménez, 2016; Dellepiane y Morales-Cauti, 2018).

La introducción intracornual del pene en los camélidos sudamericanos (Bravo, 2014) durante la cópula provoca erosión y sangra-

Cuadro 3. Determinación cuantitativa de la presencia de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) en muestras de semen de alpaca colectadas mediante las técnicas de electroeyaculación, pos-cópula y vagina artificial

Técnica de colección	Bacterias mesófilas (UFC/ml)		Coliformes (UFC/ml)		Hongos (UFC/ml)	
	Promedio	Rango	Promedio	Rango	Promedio	Rango
Electroeyaculación	2.93x10 <sup>7</sup>	6x10 <sup>6</sup> -5x10 <sup>7</sup>	2.83x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>6</sup> -5x10 <sup>6</sup>	0	0
Pos-cópula	14.03x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>3</sup> -3x10 <sup>8</sup>	23x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>5</sup> -8x10 <sup>7</sup>	0.6x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>4</sup> -2x10 <sup>5</sup>
Vagina artificial	2.41x10 <sup>7</sup>	7x10 <sup>5</sup> -6x10 <sup>7</sup>	5.18x10 <sup>6</sup>	2x10 <sup>6</sup> -2x10 <sup>7</sup>	0.4x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>4</sup> -1x10 <sup>5</sup>

do de la mucosa uterina (Vélez, 1997), lo cual conlleva a formar un fluido en fondo vaginal que es una mezcla de semen, sangre y fluidos uterinos de coloración rojiza, baja viscosidad y presencia de contaminantes (Alarcón *et al.*, 2012). Además, el pH cercano al neutro en el tracto reproductivo del macho permite el crecimiento bacteriano (Huamantuco, 2005), mientras que por el tipo de cópula y eyaculación intracornual, la vagina no se comporta como barrera antibacteriana y no se acidifica, presentando un pH de 6.8 en vaginas de hembras vacías, favoreciendo el crecimiento bacteriano (Pacheco *et al.*, 2011).

En semen obtenido por vagina artificial se aislaron bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Micrococcus*, siendo los dos primeros aislados en muestras prepuciales en el presente trabajo. Cabe indicar que los machos sometidos a la técnica de colección por vagina artificial no han tenido contacto sexual previo con hembras.

El conteo de las Unidades Formadoras de Colonias por unidad de volumen (UFC/ml) permitió determinar la cantidad de UFC/ml para bacterias mesófilas, coliformes y hongos

en los tres tipos de colecta de semen de alpaca (Tórtora *et al.*, 2007). En el presente estudio, si bien no se evaluaron las características espermáticas, tales como motilidad, viabilidad e integridad de membrana, las cantidades de UFC/ml de bacterias mesófilas y coliformes son mayores a lo reportado en otras especies como el ovino, donde se permite el uso y refrigeración de muestras que tengan menos de 100 UFC/ml, sin efecto detrimental sobre la motilidad y velocidad progresiva (Yániz *et al.*, 2010). Benneman *et al.* (2018) reportaron en semen de porcinos cantidades inferiores (1x10<sup>2</sup>-3x10<sup>6</sup> UFC/ml), mientras que Golberg *et al.* (2013) indican que la máxima cantidad para permitir el procesamiento de semen es de 2.2x10<sup>2</sup> UFC/ml para bacterias mesófilas y de 3.5x10<sup>4</sup> UFC/ml para *E. coli*, siendo las cantidades más elevadas para bacterias mesófilas y coliformes, las muestras obtenidas por la técnica post cópula.

Si bien, en alpacas no existe un estándar de las cantidades máximas de UFC/ml, las cargas bacterianas y fúngicas reportadas en el presente estudio mediante los tres métodos empleados para la obtención de semen son comparables al permitido en porcinos

(Golberg *et al.*, 2013). Sin embargo, los métodos de colección de semen tienen un riesgo de contaminación muy alto (Althouse *et al.*, 2000), lo que podría explicar las cargas bacterianas similares en los tres métodos empleados (Cuadro 3).

## CONCLUSIONES

- La presencia de bacterias en el semen de alpaca fue similar entre los diferentes métodos de colección (vagina artificial, electroeyaculación y pos-cópula).
- Los géneros de las bacterias que predominaron fueron *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Bacillus*.
- El lavado prepucial permitió eliminar la presencia de hongos en muestras colectadas por electroeyaculación.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero del Proyecto Concytec – Banco Mundial «Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica» 8682-PE, a través de su unidad ejecutora ProCiencia. Contrato N° 053-FONDECYT/BM.

## LITERATURA CITADA

1. **Alarcón V, García W, Bravo PW. 2012.** Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. *Rev Inv Vet Per* 23: 58-64.
2. **Alfaro-Escalona M, Rivas-Nichorzon M, Silva-Acuña R, Gómez-Piñeres E. 2019.** Presencia de *Escherichia coli* en el contenido prepucial de verracos en una unidad de producción y su influencia a problemas de fertilidad y prolificidad. *Ciencia UNEMI* 12: 95-101. doi: 10.29076/issn.2528-7737vol12iss31.-2019pp95-101p
3. **Althouse GC, Kuster CE, Clark SG, Weisiger RM. 2000.** Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology* 53: 1167-1176. doi: 10.1016/s0093-691x(00)00261-2
4. **Baud D, Pattaroni C, Vulliemod N, Castella V, Marsland B, Stojanov M. 2018.** Sperm microbiota and its impact on semen parameters. *Front Microbiol* 10: 234. doi: 10.3389/fmicb.2019.00234
5. **Benneman PE, Machado SA, Girardini LK, Sonalio K, Tonin AA. 2018.** Bacterial contaminants and antimicrobial susceptibility profile of boar semen in southern Brazil studs. *Rev MVZ Cordova* 23: 6637-6648. doi: 10.21897/rmvz.1338
6. **Bhakat C, Raina VS. 2001.** Effect of preputial washing and antibiotic treatment on bacterial load and preservability of frozen bovine semen. *Indian J Anim Sci* 71: 1127-1130. doi: 10.14202/vetworld.2015.798-803
7. **Boscan J, Zambrano S, Nava J, Portillo G. 2012.** Perfil de la flora bacteriana vaginal: un riesgo potencial para la reproducción de vacas criollo limonero. *Rev Cient-Fac Cien V* 20: 227-234.
8. **Bravo WP. 2014.** Reproductive anatomy and physiology in the male. In: *Llama and alpaca care, medicine, surgery, reproduction, nutrition, and herd health*. Elsevier. p xxx-xxx.
9. **Bravo PW. 2002.** The reproductive process of South American camelids. Salt Lake City, USA: Seagull Printing. 220 p.
10. **Bravo W, Flores U, Garnica J, Ordoñez C. 1997.** Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology* 47: 619-626. doi: 10.1016/S0093-691X(97)00020-4
11. **Brenner DJ, Noel RK, James TS, George MG, and David HB. 2005.** *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Springer. 722 p.

12. **Ccama A, Soto A. 1997.** Determinación bacteriológica del tracto genital de llamas hembras aparentemente normales y doble vacías. *Allpaka* 6: 71-76.
13. **Clement F, Vidament M, Guerin B. 1995.** Microbial contamination of stallion semen. *Biol Reprod* 52: 779-786. doi: 10.1093/biolreprod/52.monograph\_series1.779
14. **Dellepiane H, Morales-Cauti S. 2018.** Identificación de bacterias patógenas oportunistas en útero de alpacas pre y post cópula. *Rev Inv Vet Perú* 29: 602-610. doi: 10.15381/rivep.v29i2.14478
15. **Director A, Giuliano S, Trasorras V, Carretero I, Pinto M, Miragaya M. 2007.** Electroejaculation in llama (*Lama glama*). *J Camel Pract Res* 4: 203-206.
16. **Franco E, Sumar J, Varela M. 1981.** Eyacuación en la alpaca (*Lama pacos*). En: IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Chile, Punta Arenas.
17. **García W, Alarcón V, Bravo W. 2017.** Inseminación artificial de alpacas con semen refrigerado y con inclusión de dos tipos de yema de huevo. *Rev Inv Vet Perú* 28: 337-344. doi: 10.15381/rivep.v28i2.13080.
18. **Ghoneim IM, Waheed MM, Al-Hofofi AN, Fayez MM, Al-Eknaah MM, Al-Busadah KA, Al-Humam NA. 2014.** Evaluation of the microbial quality of fresh ejaculates of camel (*Camelus dromedarius*) semen. *Anim Reprod Sci* 149: 218-223. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.07.021
19. **Golberg AM, Argenti LE, Faccin JE, Linck L, Santi M, Bernardi ML, Cardoso MRI, et al. 2013.** Risk factors for bacterial contamination during boar semen collection. *Res Vet Sci* 95: 362-367. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.06.022
20. **Huamantuco DM. 2005.** pH de los órganos y glándulas anexas del aparato reproductor de alpacas macho. Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. Puno, Perú: Univ. Nacional del Altiplano. 60 p.
21. **Jarvinen JA, Kinyon JM. 2010.** Preputial microflora of llamas (*Lama glama*) and alpacas (*Vicugna pacos*). *Small Ruminant Res* 90: 156-160. doi: 10.1016/j.smallrumres.2010.01.007
22. **Jiménez JS. 2016.** Determinación de la flora bacteriana de la vagina y útero, y la relación con la fertilidad en camélidos sudamericanos domésticos (*Lama glama*) del Centro experimental agropecuario Condoriri. Tesis de Maestría. La Paz-Bolivia: Univ. Mayor de San Andrés. 63 p.
23. **Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. 2004.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Rev Microbiol* 2: 123-140. doi: 10.1038/nrmicro818
24. **Lin PH, Wang TM, Chiang YJ, Huang CT, Chen HW, Chu SH, Liu KL, Lin KJ. 2012.** Differences in preputial colonizing bacteria between balanopostitis and physiological phimosis. *Urological Sci* 23: 114-117. doi: 10.1016/j.urols.2012.10.007
25. **Moretti E, Capitani S, Figura N, Pammolli A, Federico MG, Giannerini V, Collodel G. 2009.** The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *J Assist Reprod Gen* 26: 47-56. doi: 10.1007/s10815-008-9283-5
26. **Mshelia GD, Okpaje G, Voltaire YA, Egwu GO. 2014.** Comparative studies on genital infections and antimicrobial succibility patterns of isolates from camels (*Camelus dromedarius*) and cows (*Bos indicus*) in Maiduguri, Northeastern Nigeria. *Springerplus* 3: 91. doi:10.1186/2193-1801-3-91
27. **Nelson DE, Dong Q, Van Der Pol B, Toh E, Katz BP, Mi D, Rong WGM, Fonterberry D. 2012.** Bacterial communities of the coronal sulcus and distal urethra of adolescent's males. *Plos One* 7: e36298. doi: 10.1371/journal.pone.0036298
28. **Pacheco JI. 2008.** Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos. *REDVET* 9(5). [INTERNET]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63611397005.pdf>

29. **Pacheco JI, Coila PU, y Mamani RH. 2011.** pH de los órganos y fluidos reproductivos en alpacas huacayas hembras. En: XXXIV Reunión Científica de la Asociación Peruana de Producción Animal (APPA). Trujillo, Perú.
30. **Peña MA, Góngora A, Jiménez C. 2011.** Infectious agents affecting fertility of bulls, and transmission risk through semen. Retrospective analysis of their sanitary status in Colombia. *Rev Colomb Cienc Pec* 24: 634-646.
31. **Rota A, Calicchio E, Nardoni S, Fratini F, Ebani VV, Sgorbini M, Panzani D, et al. 2011.** Presence and distribution of fungi and bacteria in the reproductive tract of healthy stallions. *Theriogenology* 76: 464-470. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.02.023
32. **Sumar J. 1991.** Fisiología de la reproducción del macho y manejo reproductivo. En: Fernández-Baca S. (ed). *Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos*. Santiago, Chile: FAO. p 111-147.
33. **Swartz JD, Lachman M, Westveer K, O'Neill T, Geary T, Kott R, Berardinelli JG et al. 2014.** Characterization of the vaginal microbiota of ewes and cows reveals a unique microbiota with low levels of *Lactobacilli* and near-neutral pH. *Front Vet Sci* 1: 19. doi: 10.3389/fvet.2014.00019
34. **Tibary A, Anouassi A. 2001.** Uterine infections in *camelidae*. *Vet Sci* 3: 1-12.
35. **Tibary A, Pearson L. 2015.** Pregnancy and pregnancy loss in camelids. in: Proc First Latin American Society for Animal Reproduction Congress. Buenos Aires, Argentina.
36. **Tórtora GJ, Funke BR, Case CL. 2007.** Crecimiento microbiano. En: *Introducción a la microbiología*. 9° ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. p 159-186.
37. **Vélez VM. 1997.** El efecto de la cópula del macho en el endometrio uterino de la hembra, Aspectos histológicos y ecográficos. Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. Arequipa, Perú: Univ. Católica de Santa María. 68 p.
38. **Yániz JL, Marco-Aguado MA, Mateos JA, Santolaria P. 2012.** Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. *Anim Reprod Sci* 122: 142-149. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.08.006
39. **Zhang J, Liu H, Yang Q, Li P, Wen Y, Han X, Li B, Jiang H, Li X. 2020.** Genomic sequencing reveals the diversity of seminal bacteria and relationships to reproductive potential in boar sperm. *Front Microbiol* 11: 1873. doi: 10.3389/fmicb.2020.01873