

DIVERSIDAD BACTERIANA PRESENTE EN LECHE DE CABRAS CON MASTITIS CLÍNICA EN ECUADOR

Bacterial diversity in goat milk with clinical mastitis in Ecuador

 Cristhian Sagbay Díaz¹,  Oscar Vivanco-Galván²,  Luis Rodrigo Saa^{2*},
 Froilán Garnica Marquina³,  Cristòfol Peris Ribera¹,  Paulo Herrera²

¹Universitat Politècnica de València, Institut de Ciència i Tecnologia Animal, Valencia, España; Camí de Vera s/n, 46022.

E-mail: crisagdi@posgrado.upv.es, cperis@dca.upv.es.

²Universidad Técnica Particular de Loja, Escuela de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Loja, Ecuador; San Cayetano Alto s/n, 1101608. E-mail: oavivanco@utpl.edu.ec, piherrera@utpl.edu.ec

³Universidad Politécnica Salesiana, Globalgen, Cuenca, Ecuador; Calle Vieja 12-30 y Elia Liut, 010105. E-mail: fgarnica@ups.edu.ec

RESUMEN: La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria que afecta significativamente a la producción y calidad de la leche en las cabras, lo que genera pérdidas económicas para los agricultores ecuatorianos. Este estudio tuvo como objetivo explorar la diversidad bacteriana asociada con la mastitis clínica en cabras en Ecuador. Se recolectaron muestras de leche de cabras con evidencia macroscópica de mastitis clínica para posteriormente ser extraído el ADN. Para el análisis metagenómico se amplificó y secuenció el gen 16S rRNA mediante la tecnología Illumina MiSeq. Las secuencias se filtraron por calidad y agrupadas en unidades taxonómicas operacionales de radio cero (zOTUs); luego se agruparon taxonómicamente para clasificar las especies bacterianas presentes en la leche. El análisis reveló una alta riqueza de comunidades bacterianas, con 550 zOTUs pertenecientes a 12 filos. Proteobacteria y Firmicutes fueron los filos predominantes, los cuales incluyen diversas familias, como: Enterobacteriaceae (Proteobacteria) y Staphylococcaceae (Firmicutes). Notablemente, una porción significativa (86,91%) de los zOTUs identificados pertenecían a familias con funcionalidades desconocidas en el contexto de la mastitis. Estos hallazgos ofrecen una visión inicial y valiosa sobre la diversidad bacteriana asociada con la mastitis clínica en cabras, resaltando además la posible presencia de bacterias aún no caracterizadas que podrían ser relevantes en el contexto de esta enfermedad. Es necesario realizar futuros estudios que se enfoquen en la identificación a nivel de especie y la caracterización funcional, para desarrollar estrategias dirigidas a la prevención y control de la mastitis en la producción caprina ecuatoriana.

Palabras clave: Leche de cabra, industria láctea, mastitis, metagenómica, microbiomas.

ABSTRACT: Mastitis is an inflammation of the mammary gland that significantly affects goat milk production and quality, leading to economic losses for Ecuadorian farmers. This study aimed to research the bacterial diversity associated with clinical mastitis in goats from Ecuador. Milk samples were collected from goats showing macroscopic evidence of clinical mastitis for subsequent DNA extraction. The 16S rRNA gene was amplified and sequenced using Illumina MiSeq technology for metagenomic analysis. Sequences were quality filtered and clustered into Zero-radius Operational Taxonomic Units (zOTUs). They were then taxonomically grouped to classify the bacterial species present in the milk. The analysis revealed a high diversity of bacterial communities, with 550 zOTUs belonging to 12 phyla. Proteobacteria and Firmicutes emerged as the predominant phyla, harboring diverse families which include: Enterobacteriaceae (*Proteobacteria*) and Staphylococcaceae (Firmicutes). Notably, a significant portion (86.91%) of the zOTUs identified belonged to families with unknown functionalities related to mastitis. These findings offer an initial and valuable overview of the bacterial diversity associated with clinical mastitis in goats, as well as highlighting the potential presence of uncharacterized mastitis-related bacteria that could be relevant for this disease. Future studies focusing on species level identification and functional characterization are needed to develop strategies for the prevention and control of mastitis in Ecuadorian goat production.

Key words: Goat milk, dairy industry, mastitis, metagenomics, microbiomes.

*Correspondencia a: Luis Rodrigo Saa. E mail: lrsaa@utpl.edu.ec

Recibido: 09/11/2024

Aceptado: 18/12/2024

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Contribución de los autores: Cristhian Sagbay Díaz: **Conceptualización, Metodología, Redacción-revisión y edición, Análisis formal, Supervisión, adquisición de fondos.** Oscar Vivanco-Galván: **Análisis formal, Redacción-revisión y edición.** Luis Rodrigo Saa: **Conceptualización, Redacción-revisión y edición, Supervisión, adquisición de fondos.** Cristòfol Peris Ribera: **Conceptualización, Revisión y edición, Supervisión, Análisis formal.** Patricio Garnica Marquina: **Conceptualización, Metodología, Redacción-revisión y edición.** Paulo Herrera: **Análisis formal, Redacción-revisión y edición.** Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final del manuscrito.



Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0).
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



INTRODUCCIÓN

Las cabras lecheras juegan un papel crucial en la dieta de aproximadamente 6 mil millones de personas en países en desarrollo, mediante el aporte a la mitigación del hambre, sobre todo en infantes que se encuentran en condiciones críticas de desnutrición (1, 2). En las últimas dos décadas, la producción de leche de cabra y sus productos se incrementaron de manera constante, impulsada por una creciente conciencia de sus beneficios nutricionales ayudando a mejorar la salud humana, mediante la prevención de patologías de deficiencia como la anemia, hipoavitaminosis, deficiencia de minerales, con efectos antihipertensivos y ergogénicos y en casos de intolerancia a la lactosa, resulta ser un reemplazo a la leche de vaca (3, 4). La cría de cabras contribuye significativamente a las economías de las comunidades rurales en todo el mundo, especialmente en las naciones en desarrollo, gracias a la resistencia y adaptabilidad de las cabras a los ambientes hostiles (5). Estos animales robustos prosperan en entornos desafiantes, mediante la utilización de recursos naturales de baja calidad que pueden no ser aptos para otras especies de ganado (6, 7).

En Ecuador, la mayor población de cabras (62%) se concentra en la región del bosque seco en la parte sur del país. Sin embargo, la producción y calidad de la leche de cabra son vulnerables a la mastitis, causada principalmente por infecciones intramamarias (IIM) bacterianas (5, 7). Las IIM se destacan como la enfermedad más significativa que afecta a los pequeños rumiantes, con pérdidas económicas sustanciales para la industria lechera mundial (8, 9, 10).

La mastitis es una enfermedad costosa y multifactorial que impacta significativamente en el tejido de la ubre de los animales lecheros, que causa inflamación de la glándula mamaria, la cual resulta en una disminución de la calidad, cantidad y rendimiento de la leche. La mastitis provoca varios cambios en la composición de la leche, incluidas alteraciones físicas, químicas, patológicas y microbiológicas (11, 12, 13). Las células somáticas, particularmente los leucocitos y el tejido epitelial que se desprende en el parénquima, aumentan, lo que lleva a efectos perjudiciales de tal manera que, inclusive los conductos de leche pueden bloquearse temporal o permanentemente. Por otro lado, existe el riesgo de propagar enfermedades zoonóticas relacionadas con la leche (10), debido a la presencia de patógenos, como es el caso de la brucelosis; lo que representa una amenaza para la salud pública (13). Como resultado, la producción total de leche disminuye, lo que impacta negativamente en la economía de los productores (12, 14).

Las infecciones intramamarias (IIM) pueden atribuirse a varios patógenos bacterianos, con *Staphylococcus* spp. como el agente más comúnmente diagnosticado en cabras (15, 16). La principal vía de transmisión de *Staphylococcus aureus* es a través de los procedimientos de ordeño, cuando ocurre el contacto directo entre las manos del ordeñador y las ubres del ganado lechero o cabras (17). Otros microorganismos, como: *Streptococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Mannheimia haemolytica*, *Corynebacterium* spp. y algunos hongos, son capaces de causar IIMs en ovejas y cabras; sin embargo, sus tasas de ocurrencia son relativamente bajas (13, 16, 18). Además, se ha observado una diversidad de géneros, incluidos: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*,

Alkalibacterium, *Bacteroides*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia/Shigella*, *Fusobacterium*, *Klebsiella*, *Massilia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Phyllobacterium*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Shewanella*, *Streptococcus* y *Yersinia* (8, 19, 20).

Desafortunadamente, el conocimiento sobre la microbiota bacteriana asociada con la mastitis clínica en cabras sigue siendo limitado, especialmente en el contexto de infecciones intramamarias (IIMs), lo que impide una comprensión integral de los factores microbianos implicados en la patología en esta región. Hasta donde sabemos, no existen estudios en Ecuador que hayan reportado la diversidad de microorganismos en la leche de cabra con mastitis. Sin embargo, pocos estudios han caracterizado el microbioma en la leche de cabra, que incluye predominantemente a los filos bacterianos: Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes (8, 19, 20). Entender la microbiología de las bacterias que causan mastitis clínica en cabras es fundamental para desarrollar estrategias de control, diagnóstico, tratamiento y prevención más efectivas. Para ello, se recomienda utilizar métodos moleculares como los estudios metagenómicos con un enfoque integral para revelar la composición microbiana completa de la leche de cabra, incluidas las bacterias asociadas con la mastitis y las bacterias que son parte de la flora normal de las ubres de cabra (21, 22, 23).

El objetivo principal del estudio fue explorar la diversidad bacteriana de la leche de cabra mediante el análisis de muestras de cabras diagnosticadas con mastitis clínica. Se empleó la secuenciación del amplicón del ARNr 16S para detectar las poblaciones bacterianas asociadas con la mastitis clínica en las granjas de producción de leche caprina en Ecuador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aprobación ética

En este estudio, se obtuvo el consentimiento informado de los propietarios de las cabras para recolectar muestras de leche tras el examen de las ubres. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonitario (AGROCALIDAD), bajo el permiso AGC/Z7/LOJA-2023-000528-EXT y la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Técnica Particular de Loja. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los individuos.

Recolección de muestras

Este trabajo se realizó con 39 muestras de leche de cabra de animales afectados por mastitis clínica, provenientes de 47 granjas en seis provincias del Ecuador (Imbabura, Carchi, Pichincha, Azuay, Loja y Santa Elena). En cada una de las granjas se realizó la identificación de los animales afectados de mastitis clínica mediante exámenes visuales y táctiles de las ubres (detección de asimetrías, enrojecimiento, cambios en la textura/presencia de nódulos) y, a continuación, por observación visual de los primeros chorros de leche obtenidos por ordeño manual con el objeto de identificar alteraciones en la misma como: presencia de coágulos, cambios en el color y consistencia, como material caseoso

o purulento. En 12, 31, 3, y 1, granjas se identificaron 0, 1, 2 y ≥ 3 cabras con mastitis clínica, respectivamente. En cada explotación se tomaron muestras de leche de un máximo de dos animales, elegidos al azar de entre los afectados (24, 25).

Para la obtención de las muestras de leche, se limpiaron los pezones con hipoclorito de sodio, para mantener la integridad del ADN proveniente exclusivamente del conducto. Las mismas fueron recolectadas en botellas estériles de 250 mL (BRAND®), se refrigeraron por 4 horas y luego se congelaron a temperatura entre -15°C y -25°C . Posteriormente, las muestras de leche se enviaron al laboratorio BioSequence (Quito, Ecuador), donde se extrajo el ADN para ser amplificado y secuenciado mediante la técnica Illumina.

Análisis molecular

El ADN total se aisló de 250 μL de muestras de leche utilizando el kit ZymoBIOMICS Magbead DNA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se amplificaron las regiones genéticas 16S V3-V4 mediante PCR con los cebadores 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') y 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (26). Las condiciones para la PCR, extracción de ADN y secuenciación fueron determinadas por el laboratorio BioSequence. Los amplicones obtenidos se purificaron con perlas de purificación Illumina® y se secuenciaron como lecturas emparejadas de 300 pb en la plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA). Los archivos de secuencias crudas se depositaron en NCBI bajo el BioProject PRJNA1113707.

Análisis de secuencias y delimitación de zOTU

Se evaluó la calidad de las lecturas de las secuencias crudas de 16S bacterianas utilizando el programa FastQC (versión 0.11.9) (27). Posteriormente, se realizó un recorte de las secuencias en el software Trimmomatic (versión 0.39) (28), seleccionando aquellas con una calidad mínima de Q25 o superior. Los datos de las secuencias recortadas se analizaron con el algoritmo UPARSE implementado en USEARCH Ver. 11.0.667 (29, 30), según las indicaciones recomendadas disponibles en https://drive5.com/usearch/manual/ex_miseq.html. Las lecturas de extremos emparejados de cada muestra se ensamblaron en una sola secuencia y se filtraron para descartar las lecturas cuando los errores esperados fueran mayores de 0,5 (31). Durante el procesamiento de datos se descartaron secuencias únicas, duplicadas y quimeras. Las secuencias con 97% de homología se agruparon en unidades taxonómicas operativas de radio cero (zOTUs) (32), que son equivalentes a variantes de secuencia (33). El algoritmo SINTAX (32) con un corte de 0,9 se utilizó para predecir la taxonomía de las zOTUs observadas, comparado con la base de datos del conjunto de entrenamiento RDP v16. Solo se consideraron para análisis posteriores las zOTUs bacterianas con una precisión promedio de 1,0. Las zOTUs asignadas como origen de arqueas, cloroplastos o mitocondrias fueron eliminadas. Finalmente, las secuencias de zOTU se utilizaron para calcular la distribución de conteo de cada zOTU en cada muestra. Solo se consideraron para análisis estadísticos adicionales las zOTUs presentes en más de dos muestras.

Riqueza y diversidad de zOTUs bacterianas en la leche

Se calculó una curva de acumulación basada en individuos y su asíntota para evaluar la riqueza potencial y la completitud del inventario de zOTUs bacterianas, mediante el programa EstimateS Ver. 9.1.0. La curva y sus intervalos de confianza del 95% se ajustaron a una curva de Clench (34) en el programa Statistica Ver. 7.0.61.0. El esfuerzo de muestreo para registrar el 95% de la proporción estimada de las zOTUs se calculó de acuerdo a Jimenez Valverde (35).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de las 39 muestras analizadas, se obtuvieron un total de 1,255,275 secuencias para la delimitación de zOTUs. Se descartaron 80,120 singletons y 42 quimeras.

Se observaron un total de 550 zOTUs bacterianas en la leche de cabras con mastitis (Fig. 1). La curva de acumulación de zOTUs bacterianas en las muestras de leche fue asíntota e indicó una completitud del inventario del 52.44% (Fig. 1).

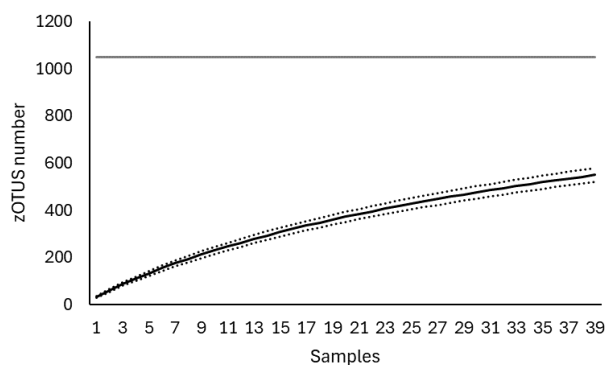


Figura 1. Curva de acumulación de zOTUs bacterianas obtenidas de las muestras de leche de cabra con mastitis, en Ecuador. Las líneas punteadas representan los intervalos de confianza al 95 % de la curva, mientras que la línea gris horizontal indica el valor asíntótico. Es importante destacar que el análisis evalúa la comunidad bacteriana presente en las muestras de leche, no las especies individuales. / *Bacterial zOTU accumulation curve obtained from goat milk samples with mastitis, in Ecuador. Dashed lines represent the 95 % confidence intervals of the curve, while the horizontal gray line indicates the asymptotic value. It is important to emphasize that the analysis evaluates the bacterial community present in the milk samples, not the individual species.*

Los zOTUs observados pertenecieron a 12 filos, pero solo seis filos fueron los más ricos, donde Proteobacteria y Firmicutes presentaron la mayor riqueza con 254 y 103 zOTUs, respectivamente. Los seis filos restantes abarcaron a menos de 60 zOTUs (Fig. 2). Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria fueron los filos más abundantes en la mayoría de las muestras estudiadas (Fig.3).

En el filo Proteobacteria se encontraron 43 familias de bacterias, pero la familia más abundante fue Enterobacteriaceae con 43 zOTUs, seguida por Moraxellaceae, Hyphomicrobiaceae, Pseudomonadaceae, Sphingomonadaceae y Xanthomonadaceae, que tuvieron entre 12 y 22 zOTUs (Fig. 4). Las otras 37 familias de Proteobacteria presentaron menos de 10 zOTUs (Fig. 4).

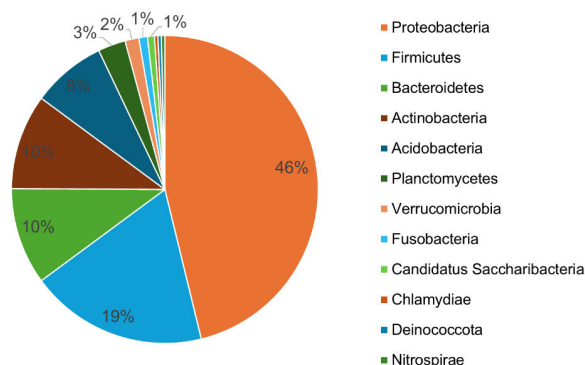


Figura 2. Distribución de los zOTUs bacterianos entre 12 filos detectados en la comunidad bacteriana en muestras de leche de cabra con mastitis, en Ecuador. / *Distribution of bacterial zOTUs among 12 phyla detected in the bacterial community in goat milk samples with mastitis, in Ecuador.*

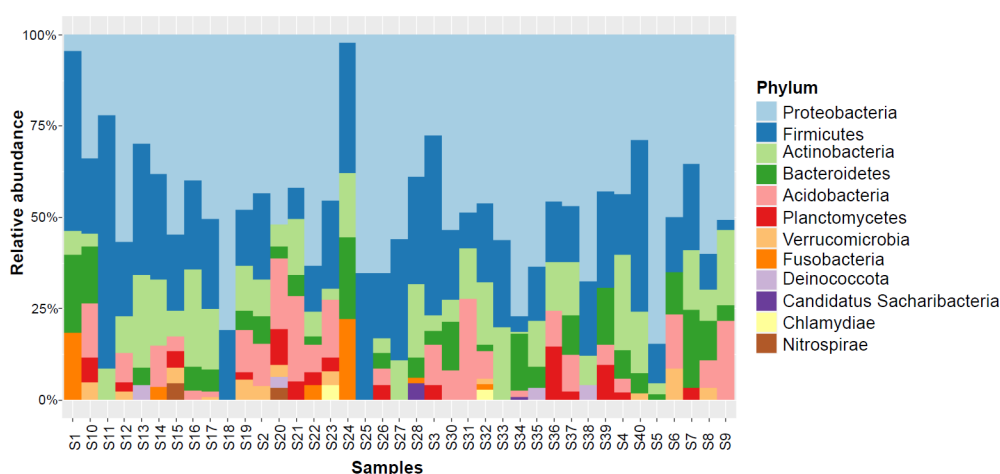


Figura 3. Composición a nivel de filo de la comunidad bacteriana detectada en muestras de leche de cabra con mastitis, en Ecuador. Abundancia relativa de 12 filos bacterianos identificados mediante la secuenciación del gen 16S rDNA. / *Phylum-level composition of the bacterial community detected in goat milk samples with mastitis, in Ecuador. Relative abundance of 12 bacterial phyla identified through the 16S rDNA gene sequencing.*

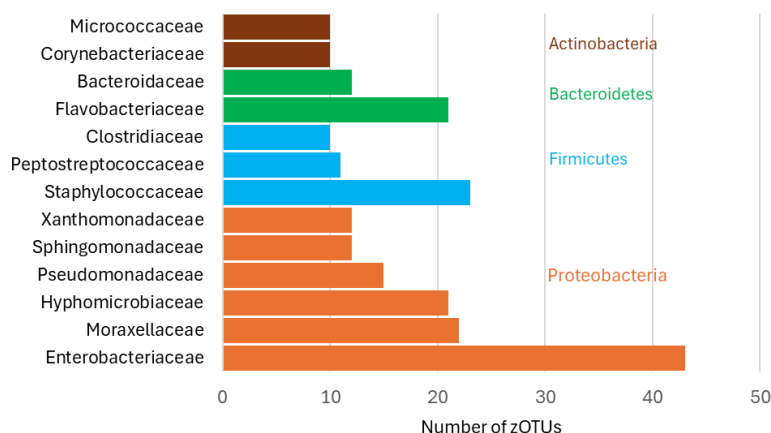


Figura 4. Distribución de frecuencia de las familias bacterianas más representativas de zOTUs detectadas en muestras de leche de cabra con mastitis, en Ecuador. / *Frequency distribution of the most representative bacterial families of zOTUs detected in goat milk samples with mastitis, in Ecuador.*

Dentro de estas familias, encontramos 95 géneros, con *Pseudomona* como el género dominante con 15 zOTUs.

En el filo Firmicutes, se detectaron 19 familias, siendo la familia Staphylococcaceae la más predominante con 23 zOTUs (Fig. 4). La familia de bacterias Flavobacteriaceae fue la más rica en zOTUs (21 zOTUs) entre las 12 familias del filo Bacteroidetes, y las familias Corynebacteriaceae y Micrococcaceae fueron las más ricas

en el filo Actinobacteria con 10 zOTUs cada una (Fig. 4). Actinobacteria contenía 19 familias.

En el estudio se empleó la secuenciación del gen 16S rRNA y la delimitación de zOTUs para caracterizar la diversidad bacteriana asociada con la mastitis clínica en cabras. Hasta donde sabemos, esta investigación representa el primer estudio en Ecuador que explora las comunidades bacterianas presentes en cabras con mastitis clínica.

Estos hallazgos revelaron una alta riqueza de zOTUs bacterianas, que incluyen algunos patógenos conocidos asociados con la mastitis clínica en varias especies de rumiantes, incluidas las cabras. La mastitis clínica en cabras representa una carga económica significativa para los productores en Ecuador, conduciendo a una reducción en la producción de leche, posible mastectomía, sacrificio de animales e incluso la muerte (16, 36, 37).

Se observó una notable diversidad bacteriana en las muestras de leche provenientes de cabras con mastitis clínica, identificándose un total de 550 unidades operacionales taxonómicas (zOTUs). Estas zOTUs correspondieron a 12 filos bacterianos, siendo Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria los filos predominantes en las muestras analizadas. Estas observaciones se alinean con investigaciones previas en otras regiones geográficas, donde se identificaron filos similares en la microbiota central en la leche de cabra, como Proteobacteria y Firmicutes, así como Bacteroidetes y Actinobacteria. Es importante destacar que los filos predominantes se asocian al estadio de la lactación, es así que Proteobacteria se ha encontrado como dominante al inicio de la lactación y Actinobacteria al final de la misma (16, 20, 36). La aplicación de la secuenciación de nueva generación (NGS) demostró ser altamente beneficiosa en este estudio, ya que permite la amplificación y detección de un amplio espectro de secuencias bacterianas por muestra. Esto facilita una caracterización más exhaustiva y robusta de la microbiota de la leche en comparación con los métodos tradicionales basados en cultivos. No obstante, ambos enfoques pueden complementarse entre sí, aprovechando las fortalezas de cada uno (38, 39, 40).

Al examinar los filos dominantes, se identificó una amplia variedad de familias bacterianas, las cuales abarcan: Enterobacteriaceae (Proteobacteria), Staphylococcaceae (Firmicutes), Flavobacteriaceae (Bacteroidetes), Corynebacteriaceae y Micrococcaceae (Actinobacteria). Notablemente, *Pseudomonas* emergió como el género dominante dentro de la comunidad bacteriana. Aunque este estudio se centró en la identificación a nivel de familia, nuestros hallazgos proporcionan una valiosa primera aproximación de los grupos bacterianos más representativos asociados con la mastitis clínica en la leche de cabra ecuatoriana. Estos hallazgos destacan la compleja composición bacteriana asociada con la mastitis clínica en cabras y complementan este conocimiento existente al establecer una comprensión básica de las comunidades bacterianas asociadas con la mastitis clínica en las cabras ecuatorianas.

Numerosos géneros dentro de las familias bacterianas identificadas han sido previamente asociados con la mastitis caprina en diversos estudios. En particular, *Staphylococcus* spp. (familia Staphylococcaceae) y *Streptococcus* spp. (familia Streptococcaceae) son comúnmente reportados como patógenos involucrados en diferentes tipos de mastitis, incluyendo las formas subclínicas, clínica y gangrenosa. (16, 41). De manera similar, *Streptococcus* y *Escherichia coli* (Enterobacteriaceae) se identifican como patógenos comunes responsables de la mastitis en cabras (42). Además, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus agalactiae* se han aislado en casos tanto de mastitis clínica como subclínica y a menudo presentan perfiles de resistencia

a antibióticos bajos, con excepciones para antibióticos específicos como penicilina y tetraciclina (43). La presencia de estos patógenos conocidos de mastitis dentro de las familias identificadas requiere una investigación adicional para determinar su prevalencia e impacto potencial en la severidad de la mastitis en las cabras ecuatorianas.

Curiosamente, nuestros hallazgos sobre la composición bacteriana de la leche de cabras con mastitis clínica concuerdan con análisis metagenómicos previos de leche de cabras sanas. Estos estudios demuestran una microbiota central compartida tanto en el calostro como en la leche madura, con: Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroidetes como los filos predominantes (38). Por lo tanto, dentro de esta alta diversidad de bacterias encontrada en nuestro estudio, ciertamente puede haber muchas bacterias que no son patógenas, o que son parte de la flora de la glándula mamaria de la cabra. Esta observación sugiere que las comunidades microbianas de la leche de cabra son relativamente estables, y que la presencia de mastitis clínica causa cambios en las abundancias relativas de taxones específicos dentro de los filos principales. Además, es esencial reconocer que la secuenciación del gen 16S rRNA captura la taxonomía microbiana y genera perfiles funcionales potenciales, pero no revela directamente las funciones reales de las comunidades microbianas presentes.

Aunque en este estudio se centró en caracterizar la diversidad bacteriana asociada con la mastitis clínica en cabras ecuatorianas, la influencia de diversos factores en esta composición, aún debe ser dilucidada. Investigaciones previas sugieren que la raza de cabra, las propiedades físicoquímicas de la leche (pH, proteínas, grasas, contenido de aminoácidos), la ubicación geográfica y las prácticas de manejo pueden desempeñar un papel en la conformación de las comunidades bacterianas en la leche de cabra, de tal manera que aquellas granjas que manejan la leche cruda de manera artesanal tienen una microbiota en la leche diferente de aquellas granjas en las que se maneja la leche de manera más técnica (16, 20, 43). Por ejemplo, se han identificado variaciones específicas en la composición de la microbiota de la leche asociadas a la raza de las cabras. Estos estudios han demostrado que ciertas razas presentan una mayor abundancia de taxones bacterianos específicos, lo que sugiere que la raza influye significativamente en la diversidad y en el perfil bacteriano de la microbiota láctea (20). Además, la ubicación geográfica (por ejemplo, zonas áridas) y las prácticas de manejo empleadas en la crianza de cabras probablemente contribuyan a la diversidad de comunidades bacterianas (44, 45, 46). Se justifican futuros estudios en la producción de cabras ecuatorianas para investigar las contribuciones específicas de estos factores a la diversidad bacteriana observada en nuestro estudio. Tales investigaciones proporcionarán valiosos conocimientos sobre la ecología de las bacterias asociadas con la mastitis en cabras ecuatorianas y allanarán el camino para desarrollar estrategias de prevención y control de mastitis más específicas.

Por otro lado, es importante mencionar ciertas limitaciones que requieren una investigación adicional. La curva de acumulación no saturada sugiere que el número total de especies bacterianas en las muestras de leche puede superar los 550 zOTUs identificados en este estudio.

Esto destaca la necesidad de aumentar los esfuerzos de muestreo para capturar una representación más completa de la microbiota de la leche. Además, aunque este estudio se centró en caracterizar familias bacterianas, la investigación futura debería profundizar en la identificación de especies y géneros específicos, particularmente aquellos conocidos por estar asociados con la patogénesis de la mastitis. Esta información es crucial para comprender los mecanismos subyacentes al desarrollo de la mastitis en las cabras.

Aunque los métodos convencionales de cultivo han sido aplicados en estudios anteriores para aislar e identificar bacterias de la leche de cabra, sus limitaciones para identificar la diversidad completa de la microbiota de la leche son ampliamente reconocidas (47, 48, 49). Sin embargo, la disponibilidad de aislados bacterianos puede representar otro paso importante en la búsqueda de nuevos tratamientos específicos contra la mastitis. Enfoques alternativos, como la metagenómica y la metatranscriptómica, ofrecen una mayor sensibilidad y especificidad para caracterizar las comunidades microbianas en la leche de cabra. Continuar con la aplicación de estas técnicas avanzadas en estudios futuros proporcionará una comprensión más completa de los roles funcionales desempeñados por diferentes taxones bacterianos en el contexto de la mastitis.

CONCLUSIONES

En conclusión, este estudio proporciona una valiosa primera aproximación a la diversidad bacteriana asociada con la mastitis clínica en cabras ecuatorianas, con una alta riqueza y diversidad de bacterias. Estos hallazgos contribuyen al creciente cuerpo de conocimiento sobre la microbiota central de la leche de cabra y destacan la presencia de patógenos conocidos de mastitis. Se necesita más investigación para explorar los roles funcionales de los taxones bacterianos específicos y la influencia de diversos factores en la composición de la microbiota de la leche. Al abordar estas limitaciones, podemos obtener valiosos conocimientos que informarán el desarrollo de estrategias más efectivas para la prevención y control de la mastitis en la industria caprina ecuatoriana.

AGRADECIMIENTOS

Los autores extienden su agradecimiento a todos los participantes del estudio, con especial aprecio a los propietarios de fincas en Ecuador por sus valiosas contribuciones y cooperación.

REFERENCIAS

1. FAO. (2020) *Dairy Market Review - Overview of Global Dairy Market Developments in 2019*.
2. Prosser CG. Navigating Food Analysis: Practical Tips and Tricks from Sample Prep to LC. *J. Food Sci.* 2021; 86: 257-265. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15574>.
3. ALKaisy QH, Al-Saadi J, Al-Rikabi AK, Altemimi AB, Hesarinejad A, Abeledmaksoud TG. Exploring the health benefits and functional properties of goat milk proteins. *Food Sci Nutr.* 2023; 11(10): 5641-5656. doi: [10.1002/fsn3.3531](https://doi.org/10.1002/fsn3.3531).
4. Mirzaei H, Chaleshtori RS. Role of fermented goat milk as a nutritional product to improve anemia, *J Food Biochem.* 2021; 46, e13969. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13969>
5. Ajmone-Marsan P, Colli L, Han JL, Achilli A, Lancioni H, Joost S, Crepaldi P, Pilla F, Stella A, Taberlet P, Boettcher P, Negrini R, Lenstra JA. The characterization of goat genetic diversity: Towards a genomic approach. *Small Rumin Res.* 2014; 121(1):58-72. doi:[10.1016/j.smallrumres.2014.06.010](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.06.010).
6. Ginja C, Cortés O, Gama LT, Delgado JV, Amills M, De Sousa C, et al. (2018) Conservation of Goat Populations from Southwestern Europe Based on Molecular Diversity Criteria. In: Simões J, Gutiérrez C, eds. *Sustainable Goat Production in Adverse Environments: Volume I*. Springer, Cham pp 509-5335. doi:[10.1038/ismej.2011.41](https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41).
7. Nguyen VD, Nguyen CO, Chau TML, Nguyen DQD, Han AT, Le TTH. Goat Production, Supply Chains, Challenges, and Opportunities for Development in Vietnam: A Review. *Animals.* 2023;13(15):2546. doi: [10.3390/ani13152546](https://doi.org/10.3390/ani13152546)
8. Polveiro RC, Vidigal PM, Mendes TA, Yamatogi RS, Lima MC, Moreira MA. Effects of enrofloxacin treatment on the bacterial microbiota of milk from goats with persistent mastitis. *Sci Rep.* 2020; 10(1):4421. doi:[10.1038/s41598-020-61407-2](https://doi.org/10.1038/s41598-020-61407-2).
9. Oikonomou G, Bicalho ML, Meira E, Rossi RE, Foditch C, Machado VS, Teixeira AG, Santisteban C, Schukken YH, Bicalho RC. Microbiota of Cow's Milk; Distinguishing Healthy, Sub-Clinically and Clinically Diseased Quarters. Guan LL, ed. *PLoS ONE.* 2014; 9(1): e85904. doi:[10.1371/journal.pone.0085904](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085904).
10. Azooz MF, El-Wakeel SA, Yousef HM. Financial and economic analyses of the impact of cattle mastitis on the profitability of Egyptian dairy farms. *Vet World.* 2020; 13(9):1750-1759. doi: [10.14202/vetworld.2020.1750-1759](https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1750-1759).
11. Podhorecká K, Borková M, Šulc M, Šulc M, Seydlová R, Hedvika Dragounová, H, Švejcarová M, Peroutková J, Elich O. Somatic Cell Count in Goat Milk: An Indirect Quality Indicator. *Foods.* 2021; 10(5), 1046; <https://doi.org/10.3390/foods10051046>.
12. Menzies P. Udder Health for Dairy Goats. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice.* 2021; 37:1, 149 - 174
13. Novac CS, Andrei S. The Impact of Mastitis on the Biochemical Parameters, Oxidative and Nitrosative Stress Markers in Goat's Milk: A Review. *Pathogens.* 2020; 9(11):882. doi:[10.3390/pathogens9110882](https://doi.org/10.3390/pathogens9110882).
14. Rahimi H, Tukmechi A, Rashidian E. Genetic diversity of *Brucella melitensis* isolates from sheep and goat milk in Iran. *Veterinary Research Forum.* 2023; 14 (12): 649-657 doi: [10.30466/vrf.2023.1988859.3768](https://doi.org/10.30466/vrf.2023.1988859.3768)
15. Contreras A, Sierra D, Sánchez A, Corrales JC, Marco JC, Paape MJ, Gonzalo C. Mastitis in small ruminants. *Small Rumin Res.* 2007; 68(1-2):145-153. doi:[10.1016/j.smallrumres.2006.09.011](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.011).
16. Polveiro RC, Vidigal PMP, De Oliveira Mendes TA, Yamatogi RS, Da Silva LS, Fujikura JM, et al. Distinguishing the milk microbiota of healthy goats and goats diagnosed with subclinical mastitis, clinical

- mastitis, and gangrenous mastitis. *Front Microbiol.* 2022; 13:918706. doi:10.3389/fmicb.2022.918706.
17. Deddefo A, Mamo G, Leta S, Amenu K. Prevalence and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* in raw milk and milk products in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Food Contam.* 2022; 9:8 <https://doi.org/10.1186/s40550-022-00094-5>
 18. Nagao PE, Burkovski A, Mattos-Guaraldi AL. Editorial: *Streptococcus* spp. and *Corynebacterium* spp.: Clinical and Zoonotic Epidemiology, Virulence Potential, Antimicrobial Resistance, and Genomic Trends and Approaches. *Front Microbiol.* 2022; 28 (13):867210. doi: 10.3389/fmicb.2022.867210
 19. McInnis EA, Kalanetra KM, Mills DA, Maga EA. Analysis of raw goat milk microbiota: Impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity. *Food Microbiol.* 2015; 46:121-131. doi:10.1016/j.fm.2014.07.021.
 20. Zhang F, Wang Z, Lei F, Wang Z, Jiang S, Peng Q, Zhang J, Shao Y. Bacterial diversity in goat milk from the Guanzhong area of China. *J Dairy Sci.* 2017; 100 (10):7812-7824. doi:10.3168/jds.2017-13244.
 21. Ngara TR, Zhang H. Recent Advances in Function-Based Metagenomic Screening. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2018; 16 (6):405-415. doi:10.1016/j.gpb.2018.01.002.
 22. Ahmad T, Singh RS, Gupta G, Sharma A, Kaur B. Metagenomics in the Search for Industrial Enzymes. In: *Advances in Enzyme Technology.* Elsevier. 2019; 419-451.
 23. Wright RJ, Gibson MI, Christie-Oleza JA. Understanding microbial community dynamics to improve optimal microbiome selection. *Microbiome.* 2019; 7(1):85. doi:10.1186/s40168-019-0702-x.
 24. Win Epi (Working in epidemiology) 2024. [Citado Sept 29]. Disponible en: <http://www.winepi.net/sp/index.htm>
 25. ESPAC (Instituto Ecuatoriano de Estadísticas y Censos) 2023 [Citado Sept 29]. Disponible en: <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>
 26. Herlemann, DP, Labrenz M, Jürgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* 2011; 5(10):1571-1579. doi:10.1038/ismej.2011.41.
 27. Andrés S. FastQC: A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. 2012. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
 28. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014; 30 (15):2114-2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
 29. Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods.* 2013; 10(10):996-998.
 30. Edgar RC. Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. Valencia A, ed. *Bioinformatics.* 2018; 34(14):2371-2375. doi:10.1038/nmeth.2604.
 31. Herrera P, Suárez JP, Sánchez-Rodríguez, A, Molina MC, Prieto M, Méndez M. Many broadly-shared mycobionts characterize mycorrhizal interactions of two coexisting epiphytic orchids in a high elevation tropical forest. *Fungal Ecol.* 2019; 39:26-36. doi:10.1016/j.funeco.2018.11.003.
 32. Edgar RC. UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *BioRxiv.* 2016. doi:10.1093/bioinformatics/bty113.
 33. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 2016; 13(7):581-583. doi:10.1038/nmeth.3869.
 34. Soberón M J, Llorente BJ. The Use of Species Accumulation Functions for the Prediction of Species Richness. *Conserv Biol.* 1993; 7(3):480-488. doi:10.1046/j.1523-1739.1993.07030480.x.
 35. Jiménez-Valverde A, Horta J. Las curvas de acumulación de especies y la necesidad de evaluar la calidad de los inventarios biológicos. *Rev Ibérica Aracnol* 2003; 8:151-161.
 36. Anil, N.S., Janus A., Deepa, P.M. Shyma V.H., Rajasekhar R., Habeeb B.B. Anand L.F. Clinicopathological findings and etiological characterization in caprine gangrenous mastitis. *Small Rumin Res.* 2024 241: 107389 <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2024.107389>
 37. Ribeiro MG, Lira GHB, Bicudo SD, Souza AVG, Salerno T, Siqueira AK, Geraldo JS. An unusual gangrenous goat mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli* co-infection. *Arq Bras Med Veterinária E Zootec.* 2007; 59(3):810-812. doi:10.1590/S0102-09352007000300037.
 38. Niyazbekova Z, Yao XT, Liu MJ, Bold N, Tong JZ, Chang Jj, Wen Y, Li L, Wang Y, Chen DK, Ma WT. Compositional and functional comparison of the microbiota in the colostrum and mature Milk of dairy goats. *Animals.* 2020; 10(11): 1955 <https://doi.org/10.3390/ani10111955>
 39. Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, Cotter PD. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev.* 2013; 37(5):664-698. doi:10.1111/1574-6976.12030.
 40. Breitenwieser F, Doll EV, Clavel T, Scherer S, Wenning M. Complementary Use of Cultivation and High-Throughput Amplicon Sequencing Reveals High Biodiversity Within Raw Milk Microbiota. *Front Microbiol.* 2020; 11:1557. doi:10.3389/fmicb.2020.01557.
 41. Nelli A, Voidarou C, Venardou B, Fotou K, Tsinas A, Bonos E, Fthenakis GC, Skoufos I, Tzora A. Antimicrobial and Methicillin Resistance Pattern of Potential Mastitis-Inducing *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative *Staphylococci* Isolates from the Mammary Secretion of Dairy Goats. *Biology.* 2022; 11(11):1591. doi:10.3390/biology11111591.
 42. Jabbar A, Saleem MH, Iqbal MZ, Qasim M, Ashraf M, Tolba MM, et al. Epidemiology and antibiogram of common mastitis-causing bacteria in Beetal goats. *Vet World.* 2020; 13(12):2596-2607. doi:10.14202/vetworld.2020.2596-2607.
 43. Pereira CS, Santos LM, Machado LS, Melo DA, Coelho S, Pereira V, Souza M, Nascimento E. Proteomics characterization of *Staphylococcus* spp.

- from goat mastitis and phenogeno-typical assessment of resistance to beta-lactamics. *Pesqui Veterinária Bras.* 2021; 41:e06129. doi:[10.1590/1678-5150-pvb-6129](https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-6129).
44. Hoving-Bolink RA, Antonis AF, te Pas MFW, Schokker D. An observational study of the presence and variability of the microbiota composition of goat herd milk related to mainstream and artisanal farm management. *PLOS ONE.* 2023; 18(10): e0292650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292650>.
 45. Tormo H, Delacroix-A, Lopez C, Lekhal DA, Roques C. Farm Management Practices and Diversity of the Dominant Bacterial Species in Raw Goat's Milk. *Int J Dairy Sci.* 2010; 6(1):29-43. doi:[10.3923/ijds.2011.29.43](https://doi.org/10.3923/ijds.2011.29.43).
 46. Barraza A, Montes-Sánchez JJ, Caamal-Chan MG, Loera-Muro A. Characterization of microbial communities from rumen and large intestine of lactating creole goats grazing in arid plant communities. *Microbiology.* 2021;167(10). doi:[10.1099/mic.0.001092](https://doi.org/10.1099/mic.0.001092).
 47. Neviani E, Bottari B, Lazzi C, Gatti M. New developments in the study of the microbiota of raw-milk, long-ripened cheeses by molecular methods: the case of Grana Padano and Parmigiano Reggiano. *Front Microbiol.* 2013; 4 (36): 1-14. doi:[10.3389/fmicb.2013.00036](https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00036).
 48. Yang Z, Ni L, Tian W, Chi H. Screening and Identification of Goat-Milk-Derived Lactic Acid Bacteria with Bacteriocin-like Activity and Probiotic Potentials. *Microorganisms.* 2023-, 11(4):849. doi:[10.3390/microorganisms11040849](https://doi.org/10.3390/microorganisms11040849).
 49. Toquet M, Gómez-Martín betaller E. Review of the bacterial composition of healthy milk, mastitis milk and colostrum in small ruminants. *Research in Veterinary Science.* 2021; 140 1-5 <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.07.022>.