ДНК секвениране на мляко — ключът към по-добро здраве на животните

През последните две години кризата с Covid-19 внесе голям тласък в **разработването и усъвършенстването на технологиите за секвениране на ДНК** с почти ежедневни нови разработки. **Секвенирането на ДНК** може да се използва за **широк спектър от приложения и едно потенциално приложение е извличането на богата информация за здравето на животните и статута на стопанството директно от пробите от сурово мляко** (същият вид проби са използвани за определяне на количество мазнини, протеини и качество на млякото).

След като **разберем микробиома на суровото / пастьоризираното мляко**, имаме възможност да предоставим на земеделските стопани малко **допълнителна помощ и подкрепа в стопанството, свързана основно с показателите за здравето на животните**.

Технологиите за секвениране на ДНК позволяват вече секвенирането на млечния микробиом, което означава, че **всички видове микроорганизми, присъстващи в пробата, са „разчетени“**. След това тази информация може да се използва за наблюдение на здравето на стадата и за ранна намеса при наличие на заболяване при животните.

Въпреки че терминът „микробиом„ почти не е чут и споменаван през годините от учените до преди по-малко от десетилетие, напоследък се наблюдава нарастваща публичност относно „човешкия чревен микробиом“ (като източник на информация за здравето и историята на хората). Въпреки че пробите между хората и животните са различни, по отношение на млякото могат да се прилагат принципи, подобни на изследванията на микробиома в човешките черва.

В допълнение към соматичните клетки, **кравето мляко съдържа стотици различни видове бактерии, гъбички, вируси** и др. Някои видове могат да причинят заболяване, докато други вероятно ще бъдат от полза за животните.

LIC е новозеландска кооперация за агротехнологии и подобряване на стадата и има дълга история на **предоставяне на водещи в света иновации за млечната индустрия**. Използват **нови технологии, базирани на генетиката и новите молекулярни технологии**.

С произход от 1909г., този кооператив залага на научноизследователска и развойна дейност (R&D) и разработване на нови продукти, продължаваща и днес със стратегията на *LIC* за осигуряване на растеж, воден от иновации, с постоянен фокус върху основната новозеландска млечна индустрия. *LIC* също има офиси в Обединеното кралство, Ирландия и Австралия. Като кооперация, собственост на земеделски производители, цялата печалба на *LIC* се връща на собствениците/акционерите и на земеделските производители като дивиденти или се реинвестира за нови решения,

изследвания и разработки. *LIC* е един от най-големите частни инвеститори в селскостопанския сектор на Нова Зеландия в научноизследователска и развойна дейност и разработване на нови продукти. Квалифицираните продукти и услуги включват MINDA®, услуги за тестване на стада и изкуствено развъждане.

LIC залага на **ДНК секвениране на сурово мляко, като пробите могат да са от вътрешността на вимето, кожата на вимето, доилните системи и от млякото при самото доене**. **Ранното откриване на патогенни микроорганизми и заболявания е по-добра защита**. Обикновено *LIC* **открива 100 - 400 различни видове микроорганизми във всяка анализирана проба от мляко**. Целта е тази информация да се използва за разработване на „системи за ранно предупреждение“, които ще позволят на земеделските стопани и ветеринарните лекари да управляват и третират по-ефективно събития, свързани със здравето на животните, чрез разбиране: точно кои патогени присъстват в животното и циркулират във фермата; колко вирулентни са те (подобно на секвенирането на SARS-CoV-2, като ни дават информация кой щам на вируса е налице); и дали са резистентни към антибиотици. Това знание трябва да улесни избора на правилното лечение, вероятно преди дори да се наблюдават клинични симптоми.

Като използват този подход, земеделските стопани и ветеринарите могат да не тестват пробите за един патогенен вид бактерии, когато има подозрение за болни животни в стадата. Не е необходимо да се правят предположения за причините и причинителите на заболяването. Например, вместо да изследваме за болестта на Джон (Болест на Джон, наричана още паратуберкулоза е сериозно инфекциозно заболяване, причинено от *Mycobacterium avium paratuberculosis*.), бихме могли вместо това **да наблюдаваме всички видове, за които е известно, че са патогенни за кравите и/или човешкото здраве, както и видовете, които са новопоявили се в конкретен район, държава, стопанство, ферма** (така се получава информация и за нивата на биосигурността във фермите).

Може да се **използват международни публично достъпни бази данни** за последователността, за да се намерят съвпадения с други геномни последователности на патогенни причинители на заболявания при животните. Базата данни, която повечето учени на *LIC* използват (за съхранение на геномни секвенции), се намира в Националния институт по здравеопазване на САЩ, който в момента съдържа повече от 63 400 секвенирани бактериални вида (с разнообразие от изолати, представляващи всеки вид).

Екипи от **учени работят постоянно в намирането и оптимизирането на протоколите за секвениране на млечния микробиом в рамките на *LIC***, за да може секвенирането на генома/микробиома на патогенните организми в млякото да се превърне в реалност, а не да е възможно само в лабораторна среда, но и във фермите.

През последните две години са разработени лабораторни процеси за извличане на ДНК от млечни проби и генериране на надеждни ДНК данни.

Вторият етап на този „проект“ е свързан с анализ на проби от пастьоризирано мляко от широк кръг стопанства в Нова Зеландия. Целта на този етап е да се разбере кои видове бактерии (и какви нива на тези видове) обикновено присъстват в пробите от варено/пастьоризирано мляко в новозеландските млекопроизводителни стопанства и

как тези нива варират в зависимост от местоположението, системите за отглеждане и времето на годината.

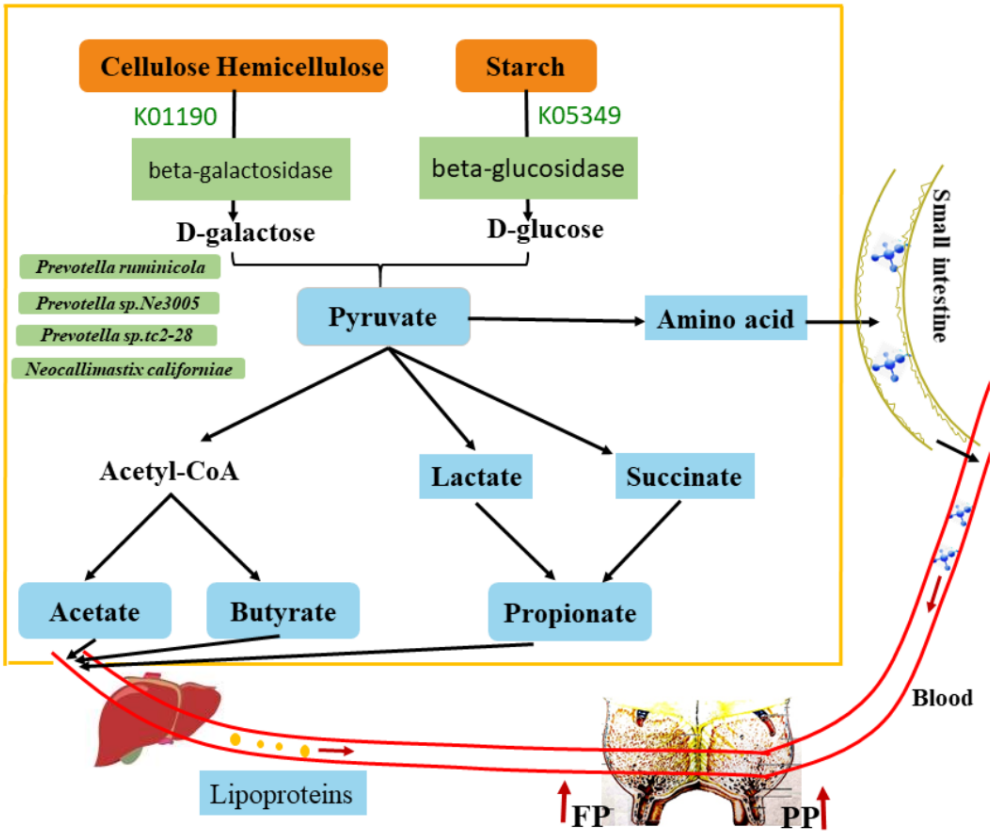
След като бъде разбран микробиома на млякото, има възможност за **своевременни и адекватни мерки при наличие/циркулация на патогенни бактерии**, както и да бъде **предоставена помощ на фермерите и земеделските стопани в стопанството за подобряване на мерките за биосигурност, обезпечаване на здравето и благосъстоянието на животните, и не на последно място осигуряване на здрава и безопасна храна за крайния потребител**. Това следва също така да спомогне за защитата на млекопреработвателната промишленост чрез свеждане до минимум на вредните последици, които възникват, когато нови видове бактерии преминават бариерите за биосигурност. Тази дейност е част от научноизследователската програма за устойчиви млечни продукти, която се ръководи от *LIC* с инвестиции и подкрепа от Министерството на първичните производства (*MPI*) и *DairyNZ.*

В научен труд на тема „*Identification of the Potential Role of the Rumen Microbiome in Milk Protein and Fat Synthesis in Dairy Cows Using Metagenomic Sequencing*“ на авторски колектив *Xin Wu, Shuai Huang, Jinfeng Huang, Peng, Yanan Liu, Bo Han and Dongxiao Sun* ясно се подчертава още веднъж **ролята на метагеномния анализ и целогеномното секвениране за охарактеризиране качеството на млякото и факторите, които влияят върху него**.

Кравето мляко е пълно с основни енергийни елементи, като аминокиселини и хранителни вещества, осигуряващи подходящ растеж и развитие на човека. С **нарастването на световното население се очаква потреблението на мляко да нараства постоянно през следващите 50 години**. Поради това повишаването на ефективността и качеството на производството на мляко е постоянен приоритет.

Търбуха на млекодайните крави е основният орган, участващ в храносмилането и абсорбцията. Подобно на голям анаеробен ферментор, търбухът съдържа изобилие от микроорганизми, включващи бактерии, протозои и гъбички. Микроорганизмите в търбуха спомагат за храносмилането.

Метагеномният анализ на микробните съобщества е широко използван за изследване на микробното разнообразие и метаболитните възможности на микроорганизмите в различни екологични ниши, ферментирали храни, пречиствателни съоръжения за отпадъчни води и стомашно-чревния тракт при хората и животните. При преживните животни микроорганизмите от търбуха играят жизненоважна роля за разграждането на растителните лигноцелулозни вещества. *Xue et al.* разкриват, че бактериалното богатство на търбуха и относителното изобилие на няколко бактериални таксони се различават значително между млекодайните крави с високи и ниски добиви на мляко, което **доказва значението на микробиома в търбуха за добива на млечни протеини**. Екипът установява, че **някои физиологични параметри, като добив на мляко и млечни мазнини, силно корелират с изобилието на микробиома в търбуха**. Досега повечето проучвания чрез секвениране на 16S rRNA при млекодайни крави са съсредоточени главно върху нивата на микробиома в търбуха и видовете, съставляващи микробиома в търбуха, за да се проучи тяхното въздействие върху производството на мляко, коефициента на преобразуване на фуражите и емисиите на метан.



Фиг. 1: *Метаболитен цикъл на разграждане на целулозата и нишестето до ацетат, бутират и пропионат, основни градивни елементи на мазнини, белтъци в млякото*

В това проучване са разгледани връзката между микробиома в търбуха при млекодайните крави Холщайн с изключително висок и нисък процент млечни протеини (PP) и процент на мазнини (FP), микробната ферментация и параметрите за качество на млякото, които могат да допринесат за производството на висококачествено мляко.

Използвайки **метагеномния анализ е изследван микробиома на кравите Холщайн** в края на лактацията с висок и нисък млеконадой: процент протеини и мазнини и възраст. Установено е, че богатият микробиом, охарактеризиран до ниво тип, род и вид са значително свързани с образуване на млечните протеини и мазнините. Открити са общо **6977 уникални микроорганизми**. Трите най-често срещани бактериални семейства са: ***Bacteroidetes, Firmicutes* и *Proteobacteria***. Въз основа на секвенирането на 16S rRNA, *Huang et al.* предполагат, че актинобактериите са най-преобладаващият тип, освен *Bacteroidetes* и *Firmicutes*, в търбуха на млекодайните крави Холщайн. **Различията в проучванията върху микробиома на млякото** може да са **свързани с различията във фуража, различия в средата за отглеждане на животните и други подобни фактори**. В съответствие с предходното становище на *Xue et al.* учените също така са изолирали ***Prevotella* като основен род ммикроорганизми в търбуха на млечно направление крави**, като е подчертана **взаимовръзката на тези микроорганизми в търбуха на кравите с високото съдържание на млечен протеин в млякото**.

Анализите на *LefSe* и *Metastats* показват, че **наличието на *Prevotella ruminicola*, *Prevotella sp. Ne3005* и *Prevotella sp. tc2-28*** са **силно взаимосвързани с по-високата масленост и протеинно съдържание в млякото** (HPF). Известно е, че родът ***Prevotella* подпомага метаболизма на целулозата и нишестето, а и производството на ацетат, бутират и пропионат**. *Chiquette et al.* съобщават, че *Prevotella bryantii 25A* може да увеличи продуктите от ферментацията и концентрацията на млечни мазнини при кравите. По същия начин, *Osborne et al.* предполагат, че ***Prevotella ruminicola*, заедно с други целулолозни бактерии, може синергично да участва в разграждането на фуража**, за да се усвои напълно целулозата, хемицелулозата и пектина за превръщане в VFA. Като цяло, тези открития предполагат, че видовете ***Prevotella* са от съществено значение за биосинтезата на VFA**.

Освен това, сред 35-те най-разпространени микроорганизми, 14 вида с най-голямо изобилие в HPF групата принадлежат към два рода, а 11 от 14-те вида принадлежат към рода *Prevotella*. Обратно, в групата на LPF кравите, 19 вида микроорганизми с голямо изобилие са разпределени в четири различни рода. В HPF групата, кравите, чието мляко е с високо съдържание на млечни мазнини и протеини показват характеристиките на по-ниско разнообразие и по-високо изобилие на ниво род. По-специално, **микробното разнообразие е важен фактор, влияещ върху метаболизма на кравите**. Установено е и, че по-ниското богатство на генното съдържание на микробиома и таксоните е тясно свързано с ефективността на храненето. Интересно е, че на ниво еукариоти, ***Neocallimastix californiae***, изолиран от HPF групата, е положително свързан с общия VFA и ацетат. Този еукариот **може да улеснява разграждането на целулозата от микробите в търбуха**. **Разнообразието и изобилието от микроорганизми и симбиозата между доминиращите бактерии и анаеробните гъбички** създават отлична микробна среда в търбуха, **позволяваща на HPF групата да произвежда повече VFA** и да усвоява достатъчно суровини за производството на мляко.

Въз основа на базите данни KEGG и eggNOG е открито, че **метаболизмът на галактоза, нишесте и захароза, гликолиза, липиди, енергия, бутаноат и пируват е по-добър в HPF групата**, което показва повишеното производство на хидролитични продукти и пируват поради подобрената способност за разграждане на въглехидратите от микробиома на тази група. В сравнение с групата на LPF, силно разпространените гени, кодиращи CAZ-ензими, участващи в синтеза на въглехидрати (GHs) и по-високите концентрации на основния VFA в HPF групата предполагат, че техните **микробиоми на търбуха са по-ефективни при хидролиза за производство на VFA и от своя страна, при подобряване на лактогенезата**. Като цяло, съдържанието на *Prevotella* и VFA в групата на HPF е значително по-високо от това в групата на LPF. **Различното съдържание на *Prevotella* може да промени въглехидратния, енергийния, липидния и аминокиселинния метаболизъм, водейки до повишаване на ацетат, бутират и пропионат в HPF групата**. Ацетатът и бутиратът са прекурсори на млечната мазнина, докато пропионатът е предшественик на млечния протеин. Микробиомът на HPF групата може ефективно да усвоява хранителните съставки, за да ги разгради до пируват, като накрая генерира повече VFA. Интересно е откритието на тази група учени, че пътищата, свързани с разграждането на валин, левцин и изолевцин и метаболизма на аланин, аспартат и глутамат, са засилени в HPF групата. Трябва да се проведат **бъдещи**

проучвания, за да се идентифицират функциите на различните микробиоми, а еднобактериалните култури трябва да потвърдят функцията на видовете *Prevotella* в регулирането на млечните мазнини и млечния протеин.

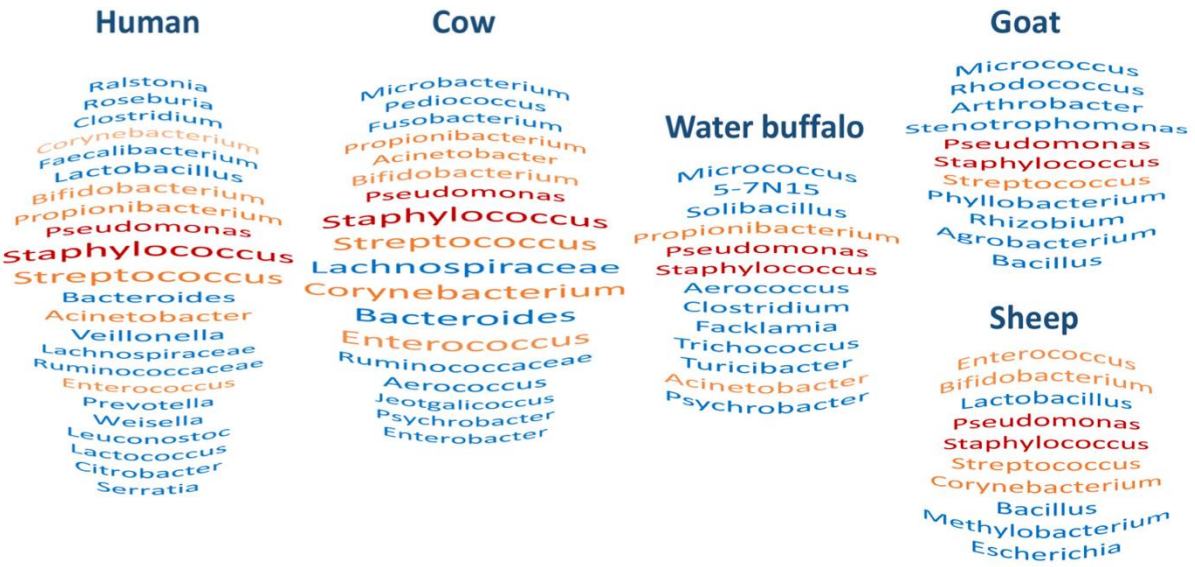
Следва обаче **да се приложат повече метагеномни анализи и секвенирания на микробиома, за да се постигнат по-високо информативни данни за подобряване на откриването**. Освен това потенциалните регулаторни роли на микроорганизмите (главно видове *Prevotella* и *Neocallimastix californiae*) трябва да бъдат допълнително проучени.

В настоящото проучване, **използвайки целогеномното секвениране на генома, са идентифицирани 38 от най-продуктивните бактериални видове от микробиома между млекодайните крави, които участват активно във въглехидратния, аминокиселинния, пируватния, инсулиновия и липидния метаболизъм**. *Prevotella ruminicola, Prevotella* sp. *tc2-28* и *Neocallimastix californiae*, с по-голямо изобилие в групата HPF, са свързани с общото VFA и ацетат, което предполага по-добра способност за храносмилане на фуражите и осигуряване на подходящ субстрат за синтез на мляко в млечните жлези.

В друго обстойно проучване на тема: „*Milk Microbiota: What Are We Exactly Talking About?*“ на авторски колектив *Georgios Oikonomou, Maria Filippa Addis, Christophe Chassard, Maria Elena Fatima Nader-Macias, I. Grant, Celine Delbès, Cristina Inés Bogni, Yves Le Loir and Sergine Even* е направен изключително **интересен паралел между микробиома на кравето мляко и кърмата при човека, отново посредством пълен геномен секвентен анализ и метагеномен анализ**.

Разработването на техники за секвениране с висока производителност (включително секвениране от второ и трето поколение и комбинации от тях) драстично е намалило разходите и е повишило ефективността и точността на секвенирането на ДНК, което даде възможност за възход на метагеномни или метататаксономични изследвания в множество екосистеми. **Тези техники доказват, откриват и охарактеризират микробни общности в неизследвани до момента телесни течности, органи и системи при животните и човека** (*Kizerwetter-Swida and Binek, 2016, Borghiet al., 2018, Zeineldin M. et al., 2017*). Неотдавнашната работа на този екип действително показа, че **човешката кърма, освен осигуряването на подходящи хранителни вещества за новородените, доставя полезен микробиом на стомашно-чревния тракт на новородените** бебета по време на техния ранен и критичен период на развитие (*Jurink et al., 2013; Jost et al., 2015*; *Murphy et al., 2017; Parnanen et al., 2018*). През последното десетилетие има много доклади за жизнеспособни бактерии в кърмата от здрави жени.

Този екип от учени сравнява микробиома, присъстващ в кравето мляко с микробиома на майчината кърма посредством пълно геномно секвениране на микробиома и метагеномен анализ.



Фиг. 2: *Видове бактерии, присъстващи в микробиома на млякото от животни и човек*

В съответствие с определението, предложено от *Marchesi и Ravel (2015),* **млечния микробиом представлява съвкупността от микроорганизми, присъстващи в млякото**.

Повечето проучвания върху млечния микробиом на човека изследват млякото, събрано след лактация, но малко от тях са заложили на изследвания на микробиома в коластрата при хора и говеда (*Aakko et al., 2017; Lima et al., 2017; Toscano et al., 2017; Derakhshani et al., 2018*). Доказано е, че бактериите присъстват в млякото в свободно витално състояние, но могат да бъдат свързани и с имунни клетки.

Изследването на млечния микробиом при човека и животните включва както клетъчно културални методи, така и новите геномни техники и пълното геномно секвениране (*Gill et al., 2006 г.; Verdier-Metz et al., 2012*), а **през последните 10 години – основно метагеномика, базирана на 16S rRNA геномно секвениране**. Различните методи, използвани за изследване на млечния микробиом, вероятно ще доведат до значително отклонение в таксономичния профил на млечната микробна общност. Например, **клетъчно културалните подходи** са насочени **само към култивируеми бактерии**. Напротив, **молекулярните подходи като метагеномиката откриват ДНК от всички бактерии, налични в пробата, жива или не**. Основно ограничение на по-старите геномни изследвания е, че тези подходи позволяваха описание на микробните съобщества главно на равнище род или по-високи таксономични нива, като по този начин се изключва изследването на разнообразието на видовете или дори на нивата на щама. **По-висока таксономична „разделителна способност“** може да бъде постигната чрез **използване на метагеномни подходи**. В момента има малко на брой проучвания върху млечния микробиом с използване на **метагеномни подходи** (*Bhatt et al., 2012 г.; Jimenez et al., 2015; Parnanen et al., 2018; Hoque et al., 2019*). Тези проучвания също така позволяват изследване на археи, гъби и вирусни съобщества в допълнение към бактериалните съобщества. Освен това те дадоха достъп до **функционално профилиране на тези микробни общности, включително данни за микробния метаболизъм, вирулентността или антибиотичната резистентност** (*Hoque et al.,*

2019). Предприети са и междинни подходи между метатаксономични и метагеномни подходи, основани на **геномно секвениране, което позволява по-задълбочено таксономично характеризиране на вида и дори на нивата на щама** (*Avershinaet al., 2018*). Следователно, въпреки че наличието на микроорганизми в млякото се подкрепя от голям набор от изследвания в целия свят в различни гостоприемници, следва да се **имат предвид и начина на вземане на пробите и използваните методи и работните протоколи, които трябва да бъдат хармонизирани, за да бъде постигната съпоставимост на даннните**.

Редица проучвания характеризират млечният микробиом главно при хората и кравите, като се използват предимно клетъчно културални подходи, като всички те описват сложна и разнообразна общност от микроорганизми (*Cabrera-Rubio et al., 2012; Oikonomou et al., 2014; Addis et al., 2016; Murphy et al., 2017; Derakhshani et al., 2018*). Като илюстрация, ***Murphy et al.*** **изследва 10 двойки майки-деца** и **идентифицира над 207 родове в микробиома на човешката кърма**. В това проучване млечния микробиом показва по-голямо разнообразие в сравнение с бебешките изпражнения. Тъкмо обратната хипотеза изказва *Parnanen et al.*, който съобщава за по-малко разнообразие на млякото в сравнение с детските изпражнения, както е определено от метагеномния анализ (*Parnanen et al., 2018*). **Ниското изобилие на микробна ДНК и по-малката дълбочина на четене при секвениране**, което затруднява наблюдението на таксони с ниско изобилие, могат да доведат до **такова несъответствие**. По подобен начин *Hoque et al* съобщава за **сложна микробна общност в кравето мляко**. (2019), с **146 бактериални щама**, идентифицирани в млякото **чрез *shot gun* метагеномно секвениране**.

Прегледът на повечето проучвания на млечния микробиом ясно посочва **общите таксони между човешкото и кравето мляко**: ***Staphylococcus, Streptococcus, Pseudomonas, Bifidobacterium, Propionibacterium, Bacteroides, Corynebacterium и Enterococcus*** са **най-често цитираните доминантни таксони** в проучванията както на микробиома на човешкото, така и на говеждото мляко (*Oikonomou et al., 2014; Jimenez et al., 2015; Addis et al., 2016; Boix-Amoros et al., 2016; Urbaniak et al., 2016; Murphy et al., 2017; Derakhshani et al., 2018*). Няколко проучвания изказват хипотезата за съществуването на основен микробиом в човешката кърма (*Hunter et al., 2011; Murphy et al., 2017*) посредством *shot gun* секвентен анализ (*Jimenez et al., 2015; Parnanen et al., 2018*). **Тези подходи също така позволяват да се опишат наличието на гъбични, протозойни и вирусни ДНК в същите млечни проби**. Разнообразието на микробиома на човешката кърма показва, че отвъд доминиращите родове *Staphylococcus, Streptococcus и Propionibacterium*, се изолират *Bifidobacterium, Rothia, Enterococcus, Lactobacillus*, или дори облигатни анаероби като *Veillonella (Perez et al., 2007; Jost et al., 2013*). Млечният микробиом е изследван и при други животни, включително магарета, кози, овце, елени и воден бивол, въпреки че броят на проучванията е ограничен в сравнение с изследванията на човешкото и кравето мляко, които показват известно припокриване с микробиома на човешкото и кравето мляко (*Castro et al., 2011; McInnis et al., 2015; Catozzi et al., 2017; Li et al., 2017; Soto Del Rio et al., 2017; Esteban-Blanco et al., 2019*).

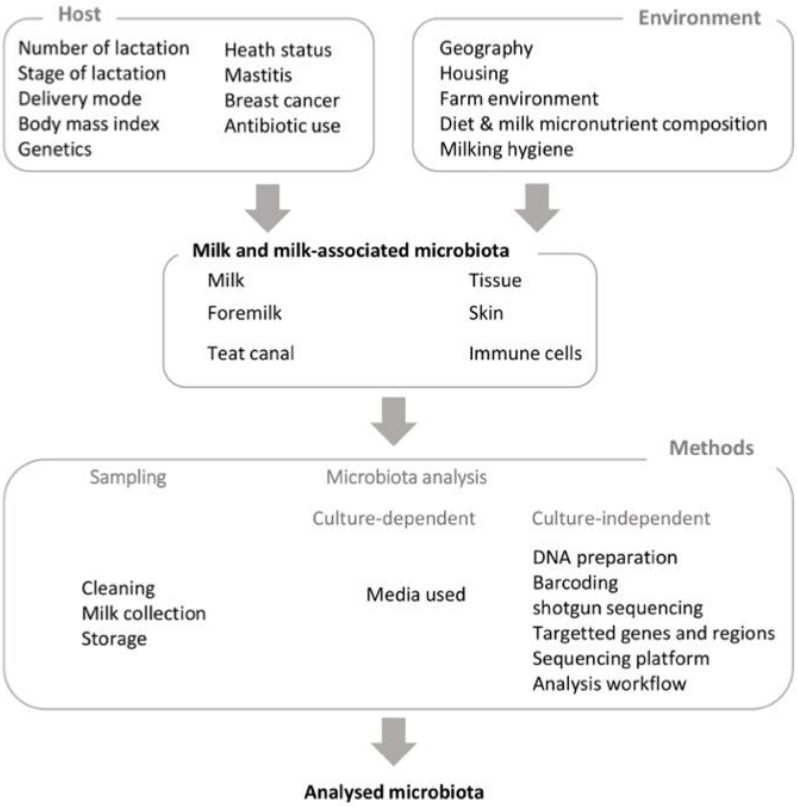
Genus	Reads in dataset 1	Relative abundance, %	Reads in dataset 2	Relative abundance, %
Acinetobacter	0	0	337	0.9
Agrobacterium	487	1.9	270	0.7
Akkermansia	259	1.0	0	0
Alkaliphilus	233	0.9	6	0.02
Bacillus	95	0.4	824	2.2
Bacteroides	1177	4.5	11	0.03
Blautia	2477	9.5	1062	2.8
Calothrix	296	1.1	2	0.005
Chryseobacterium	1	0.004	11 426	30.4
Clostridium	623	2.4	318	0.8
Corynebacterium	37	0.1	4516	12.0
Delftia	0	0	499	1.3
Desulfotomaculum	3	0.01	1405	3.7
Desulfovibrio	541	2.1	5	0.01
Dysgonomonas	364	1.4	171	0.5
Enhydrobacter	0	0	884	2.4
Enterococcus	447	1.7	7176	19.1
Fibrobacter	565	2.2	0	0
Flavobacterium	46	0.2	443	1.2
Lachnospira	289	1.1	104	0.3
Lactobacillus	303	1.2	1	0.002
Legionella	6	0.02	199	0.5
Leptotrichia	0	0	808	2.2
Candidatus *Methylacidiphilum*	1120	4.3	0	0
Methylobacterium	0	0	352	0.9
Microbacterium	0	0	181	0.5
Mycobacterium	0	0	308	0.8
Neisseria	0	0	934	2.5
Oscillospira	719	2.8	0	0
Oxalobacter	1	0.004	262	0.7
Paludibacter	312	1.2	103	0.3
Parabacteroides	0	0	161	0.4
Parapedobacter	249	1.0	0	0
Paraprevotella	671	2.6	2	0.005
Pedobacter	629	2.4	120	0.3
Pelomonas	0	0	156	0.4
Phascolarctobacterium	357	1.4	0	0
Porphyromonas	454	1.7	3	0.008
Prevotella	1081	4.2	146	0.4
Propionicimonas	0	0	387	1.0
Pseudobutyrivibrio	282	1.1	0	0
Pseudomonas	204	0.8	349	0.9
Ralstonia	87	0.3	181	0.5
Ruminococcus	623	2.4	60	0.2
Slackia	312	1.2	1	0.003
Sphingobacterium	2587	10.0	133	0.4
Sphingomonas	245	0.9	142	0.4
Staphylococcus	466	1.8	246	0.7
Streptococcus	247	1.0	3	0.008
Tepidimonas	0	0	373	1.0
Treponema	2760	10.6	0	0
Trichococcus	3	0.01	375	1.0
Total amount of reads in the sample	25,961		37,527	

Таблица 1: *Изолирани микроорганизми при хора и животни от млечния микробиом*

В заключение, този сравнителен анализ на млечния микробиом, свързан с различни гостоприемници, посочва **общи таксони, включително родовете *Staphylococcus* и *Streptococcus***. При систематичен преглед на микробиома на човешкото мляко вече са идентифицирани *Staphylococcus* и *Streptococcus* като всеобщо преобладаващи в кърмата (*Fitzstevens et al., 2016*). Въпреки тези изолати и направените констатации ще бъдат **необходими допълнителни изследвания с по-добра хармонизация на методите**, което може да включва **по-задълбочено характеризиране на таксони на равнище видове и проучване на функционалните профили на тези микробни съобщества.**

Остава **да се определи дали съществуването на междувидов първичен млечен микробиом съществува и каква е специфичната роля на видовете микроорганизми в състава му**.

Фактори, влияещи върху състава на млечния микробиом (Фиг. 3)



Освен факторите, свързани с вземането на проби и методите на изпитване, са докладвани няколко фактора на гостоприемника и на околната среда, които влияят върху състава на млечния микробиом при хората и кравите. Следва да се отбележи, че повечето фактори, изследвани за хората и едрия рогат добитък, не са абсолютно еднакви и, както се очаква, са свързани с практиките за отглеждане на едрия рогат добитък (*Derakhshaniet al., 2018a*). Сред факторите при човека, влияещи върху млечния микробиом, няколко проучвания съобщават за **връзка между млечния микробиом и здравето на майката, като се обръща специално внимание на инфекциите на млечната жлеза**.

Доказано е, че **съставът на човешкото мляко се променя с времето, между коластрата, преходния период и кърмата**, по-специално с увеличаване на видовете микроорганизми (*Cabrera-Rubio et al., 2012; Boix-Amoros et al., 2016; Murphy et al., 2017*). Авторите предполагат, че тази еволюция се дължи по-специално на **индивидуалната взаимовръзка между майката и бебето** (*Moossavi et al., 2019*). Независимо от това е трудно да се открият значителни промени с течение на времето следователно, *Williams et al. (2017)* предполага, че **микробиома на кърмата е относително постоянен във времето**. Връзките между **крави и телета са много ограничени при млекодайните крави поради ранното отбиване на телетата**.

Въпреки това е установено, че **микробиома на кравето мляко също варира с времето**, както в зависимост от етапа, така и по броя на лактациите. Наскоро беше доказано, че коластрата съдържа сложна и разнообразна микробна флора, чието богатство е значително по-високо при първото отелване на кравите в сравнение с многоплодните крави (*Lima et al., 2017*). Таксономичните профили и алфа-разнообразието също са свързани със стадия на кърменето / млеконадоя и варират през първите седмици (*Derakhshani et al., 2018b*). Наблюдават се и разлики в клинично здравите млечни крави Холщайн в микробиома на млякото или коластрата.

Освен това са установени **разлики в микробиома на кърмата при човека по отношение на раждането** (*Cabrera-Rubio et al., 2012; Khodayar-Pardo et al., 2014; Hermansson et al., 2019*). По-голямо бактериално разнообразие е установено в кърмата на естествено раждали жени от при тези, раждали посредством цезарово сечение. Установено е също, че съставът на микробиома на кърмата е свързан с допълнителни фактори като телесно тегло.

При едрия рогат добитък има вероятност няколко свързани с гостоприемника фактори да повлияят на микробиома на млякото и млечните жлези, като физиологични параметри и анатомични характеристики на вимето и генетичните характеристики (*Derakhshani et al., 2018*).

Доказано е, че **географията играе роля в моделите на микробиома** (Kumar et al., 2016). Тези географски различия обаче могат да се дължат на няколко фактора, като околна среда, диета или дори генетика. При едрия рогат добитък, въпреки че влиянието на „географията“ само по себе си не е проучено, бе установено, че **млечния микробиом е свързан със спецификите на отглеждането на животните в селскостопанска среда и добрите практики и биосигурността във фермите** (*Doyle et al., 2017; Derakhshani et al., 2018; Fretin et al., 2018; Metzger et al., 2018*). *Metzger et al. (2018a)* докладва **взаимовръзка между материала за постелята и профилите на микробиома** на кравето мляко. По същия начин се съобщава, че практиките на доене, включително доилните апарати оказват влияние върху млечния микробиом (*Doyle et al., 2017*).

Съобщава се също, че **диетата, хранителните навици и вида храна/фураж засягат млечния микробиом както при хората, така и при животните**. Доказано е, че бактериалните съобщества в кърмата и кравето мляко е свързана със специфични нива на мастни киселини, въглехидрати и протеини и относителното изобилие на няколко таксони в млякото (*Zhang et al. (2015*).

Сред **факторите, за които е доказано, че оказват влияние** върху микробиома като цяло и са вредни за разнообразието на микроорганизмите, са **антибиотиците**. Влиянието на антибиотиците е често документирано в кравето мляко. Сред **обичайните селскостопански практики** е **прилагането на антибиотици в сухостойния период поради повишения риск от инфекции** (*Bradley and Green, 2004*). *Bonsaglia et al. (2017)* оценяват този проблем, като определят ефекта на приложението на антибиотици (цефтиофур хидрохлорид) върху немаститити крави. Те установяват, че **прилагането на антибиотици няма пряк ефект върху млечния микробиом в сухостойния период и, че бактериалните съобщества са динамични и антимикробното индуцирано нарушение на млечния микробиом се възобновява към момента, в който кравите започнат нова лактация**. Тези констатации са валидни и при комбинирана терапия с

пеницилин G и новобиоцин, което предполага **висока устойчивост на млечния микробиом след експозиция на антимикробни средства** по време на сухостойния период (*Derakhshani et al., 2018c*).

Съставът на млечния микробиом при хората е свързан с още един **основен фактор като здравето на майката, особено здравето на млечните жлези**. Например **бактериалната дисбиоза** е описана при кърмещи майки, страдащи от мастит (*Maldonado-Lobon et al., 2015; Mediano et al., 2017*). В случаите на **мастит, млечният микробиом отразява загуба на бактериално разнообразие** и голямо увеличение на изобилието на последователностите, свързани с предполагаемите етиологични агенти като *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* съответно при остър и субакутен мастит (*Jimenez et al., 2015; Patel et al., 2017*). По същия начин при говедата както клиничните, така и субклиничните вътрематочни инфекции са свързани с промени в млечния микробиом (*Oikonomou et al., 2012, 2014; Kuehn et al., 2013; Falentin et al., 2016; Lima et al., 2017*). Повечето проучвания са проведени, за да се разбере по-добре бактериалната екология по време на инфекцията. Това е от особен интерес, тъй като патогенът(ите), отговорен(и) за мастит, не е(са) идентифициран(и) чрез клетъчно-културални методи, при 10 - 40 % от случаите на клиничен мастит.

В едно обстойно проучване ***Ganda et al. (2017)* описва микробиома на кравето мляко преди, по време и след експериментално индуциран мастит с *Escherichia coli*.** Интересното е, че **млечния микробиом е временно повлиян от инфекцията с *E. coli***, но се възвръща към първоначалния си състав преди инфекцията с *E. coli*, и в двете групи, лекувани с цефтиофур, цефалоспорин трето поколение и нелекуваните групи, което предполага **устойчивост на млечния микробиом към инфекция**.

Също така се съобщава за **взаимовръзки между млечния микробиом и здравето на майката при хора със заболявания**. Микробиома е повлиян при жени, страдащи от цьолиакия (*Olivares et al., 2014*) и млякото съдържа по-малко бифидобактерии, въпреки че това може да е свързано със самото заболяване или с модифицираната диета. Също така са документирани **промени в състава на микробиома при човека, свързани с вирусни инфекции или с медицински лечения**. И накрая, млечния микробиом може да бъде повлиян от здравето на майката по отношение на предаването на патогени. Вертикални трансфери на вируси (напр. Денга) или бактериални патогени (*Salmonella* и *Streptococci B*) чрез мляко се съобщават в проучвания на медицински случаи (*Qutaishat et al., 2003; Wang et al., 2007; Cooke et al., 2009; Barthel et al., 2013; Vilca et al., 2015*), което показва, че здравословното състояние на майката може пряко да повлияе на безопасността на кърмачетата при кърмене. Повечето от тези проучвания не изследват млечния микробиом, за да потвърдят или опровергаят бактериалната дисбиоза. Ако са възможни директни трансфери от майката на бебето независимо върху млечния микробиом, са необходими допълнителни изследвания, за да се оцени ролята на млечния микробиом и дисбиозата за трансфера на патогени в зависимост от здравния статус на майката.

Поради **прекалено многото неизвестни, прекалено многото фактори, влияещи върху качеството на млякото и разнообразието на млечния микробиом, е необходим мултидисциплинарен подход при изследването и охарактеризирането на видовете микроорганизми, съставляващи млечния микробиом**, обхващащ не

само пълно геномно секвениране и биоинформатични анализи, налага се **да бъдат включени математическо моделиране, статистика, медицински данни, както и данни от мониторинговите програми, данни за секвенирани вече бактериални изолати, резистентни към повечето антимикробни средства и други свързани науки**.

Има **много въпроси, на които все още трябва да се отговори, преди да могат учените да предприемат действия за оказване на влияние върху млечния микробиом**.

Един от основните аргументи срещу възможното наличие на сложен здравословен млечен микробиом е, че повечето проучвания на млечния микробиом разчитат на метататаксономика и метагеномика, докато само няколко проучвания се основават на клетъчно-културални подходи (*Jost et al., 2013*). Техниките за амплификация на ДНК могат да уловят и намножат нежизнеспособни ДНК фрагменти и части от микроорганизми, включително такива, които биха могли да присъстват във фагоцитите (*Rainard, 2017*). Сравнението между общата бактериална популация, определена чрез клетъчно-културални методи и молекулярните методи, показват значителни несъответствия. Това предполага, че **част от млечния микробиом, определен чрез молекулярни подходи, може да съответства на нежизнеспособни (или не култивируеми) бактерии или че до момента само част от тази бактериална общност е била изолирана** (*Jost et al., 2013*). *Jost et al.* съобщава, че 90 % от изолираните щамове съответстват на *Staphylococcus, Streptococcus* и *Propionibacterium*, докато относителното им изобилие при използване на секвениране е 23,7%. Независимо от това, облигатните анаероби, включително *Bifidobacterium* и *Veillonella*, също са изолирани, което предполага, че **живата част на млечния микробиом може да не е била напълно или правилно проучена досега**. **Биологичното разнообразие на млечния микробиом** (*Kuehn et al., 2013*), както и неговата устойчивост след заразяване или антибиотично лечение (*Gandaet al., 2016; Bonsaglia et al., 2017; Derakhshani et al., 2018*) предполага, че млечния микробиом **не се ограничава до нежизнеспособни бактерии, които са свързани или не с имунни клетки, и е необходимо допълнително преразглеждане на този въпрос**, като **се използват методи, базирани на високопроизводителното секвениране**.

Освен **въпросите, свързани с оценката на жизнеспособността на млечните бактерии**, могат да бъдат повдигнати **относно потенциалната роля на нежизнеспособните бактерии както за здравето на кърмачетата, така и за здравето на майката / животните, особено по отношение на имунната система** на поколението (*Popovicet al., 2019*). Независимо дали бактериите са живи или не, има някои бактериални антигени, които могат да взаимодействат с имунната система на гостоприемника, както и инактивираните ваксини (*Vinodet al., 2015*).

Малкия брой бактерии в млякото може да оправдае поставянето под въпрос на тяхното биологично значение. Въпреки това, въпреки че общият им брой в млякото е малък, **бифидобактериите играят решаваща роля за оформянето на детския стомашно-чревен микробиом**.

Друг довод срещу наличието на постоянен млечен микробиом е, че техниките за намножаване на ДНК могат да „намножат“ дори най-малкото „замърсяване“. Всъщност

е **необходимо ДНК да се подложи на няколко кръга на амплификация, преди да може да се опише бактериалното разнообразие в кърмата или кравето мляко**. Освен това вземането на проби от мляко, е напълно подходящо за микробна култура, но може да не е достатъчно „добро“ за метататаксономичните и метагеномните подходи.

Микробиомът може да включва бактерии, вируси, гъбички и други микроорганизми. Досега изследванията са съсредоточени главно върху бактериалния компонент на млечния микробиом. Възможно е обаче множество гъбични и вирусни представители да присъстват със съответните физиологични и патологични последици за техния гостоприемник. **Метагеномното *shot gun* секвениране може да даде информация за секвенирането на небактериалните общности, както и за функционалното профилиране на млечния микробиом** (*Jimenez et al., 2015; Parnanen et al., 2018; Hoque et al., 2019*). В много случаи експресираните протеини и свързаните с тях биологични функции могат да се променят, въпреки че таксономичните профили претърпяват относително незначителни изменения (*Huttenhower et al., 2012*). **Задачата за изследване на протеиновата експресия и микробните функции на млечния микробиом чрез протеомика е възпрепятствана от много голямото изобилие на протеини на гостоприемника в млякото в сравнение с микробния еквивалент**. Освен това няма налична информация за последователността за по-голямата част от млечния микробиом, което създава допълнителни трудности по отношение на анотацията на базата данни и идентификацията на протеините (*Heyer et al., 2017*). **Разглеждането на млечен метаболом може също да предостави полезна информация за микробните функции**. Тези подходи обаче все още са предизвикателство дори в добре характеризираните микробиоми, като например в човешката кърма (*Smirnov et al., 2016*).

Както стана ясно по-горе в изложението, **няколко допълнителни фактора, свързани с околната среда, оказват влияние върху млечния микробиом при животните**, като **анатомичните характеристики на вимето, селскостопанската среда и практиките за отглеждане и практиките за доене**. Малко на брой проучвания са насочени и към въздействието на генетиката на гостоприемника върху микробиома на кравето мляко. *Curone et al. (2018)* сравнява няколко характеристики на млякото от две породи, високопродуктивния Холщайн и автохтонната *Rendena*. Предимството на проучването е, че се изследват две различни породи, отглеждани в едно и също стопанство и при едни и същи условия на околната среда и хранителни режими. В резултат на това при кравите *Rendena* се наблюдава по-ниско биологично разнообразие в млечния микробиом в сравнение с *Holstein* и по-голямо разпространение на ***Streptococcus thermophilus* с важна роля във ферментацията на млечните продукти** (*Quigley etal., 2013*) и с **потенциална роля за защитата срещу патогени на млечната жлеза** (*Nader- Macias et al., 2008; Espeche et al., 2012; Rigobelo et al., 2015*). По-нататъшното характеризиране на състава на микробиома на 117 млечни проби от двете породи показва значително по-ниско бактериално биологично разнообразие и по-стабилен микробиом в млякото на *Rendena*, докато млякото от Холщайн показва по-значителни промени в млечния си бактериален състав (*Cremonesi et al., 2018*). Бяха открити и интересни разлики в прогнозираните функционални профили. Констатациите на автора предполагат, че **породата и следователно генетиката на гостоприемника**

могат да окажат влияние върху състава на млечния микробиом, което има последици за характеристиките на млечния продукт, но също така и за податливостта към болести и резистентността към бактериална инфекция.

В проучване на *Huson et al. (2018)* екипът от учени успяха да идентифицират **региони в генома на кравите Холщайн, които потенциално са свързани с микробните профили на млякото**. В по-целенасочен подход, *Derakhshani et al. (2018)* докладва връзка между генния полиморфизъм на комплекса за хистосъвместимост и микробния състав на коластрата. Ясно е, че **много повече изследвания ще бъдат необходими за разбиране на тази корелация**, също и когато се разглежда различната физиология и анатомични особености.

Рутинното отглеждане на едър рогат добитък включва прилагането на интрамамарни антибиотици на кравите в началото на сухостойния период, с цел предотвратяване на инфекция при следващата лактация. Употребата на антибиотици е стандартна практика в тези периоди, но са изразени опасения относно възможното въздействие на този подход върху селективния натиск (*Oliver and Murinda, 2012*). Освен това **интрамамарните антибиотици**, прилагани в здрави стада, **могат да повлияят на микробиома** и **да увеличат групата от гени, кодиращи антимикробна резистентност**. Наличието на разработени **метагеномни методи, които са насочени към генетичен материал, изолиран и намножен директно от млечни проби, ще бъде от помощ за разбиране на ролята на некултивируемите бактерии и за характеризиране на резистома** (*Perry et al., 2014*). Функционалното профилиране на микробиома на кравето мляко показа по-специално няколко метаболитни пътя, свързани с резистентността към антибиотици и тежките метали, които вероятно са резултат от широкото използване на тези съединения (*Hoque et al., 2019*). Започнати са изследвания и на човешкият млечен резистом също, което предполага ролята му в оформянето на стомашно-чревния резистом на бебето (*Parnanen et al., 2018*). **Допълнителни функционални черти** като способността на бактериите да се образуват биофилми **за които е доказано, че допринасят за резистентност към антибиотици, също трябва да бъдат изследвани**, когато се разглежда резистомът (*Hall and Mah, 2017*).

Правени са проучвания при жени, на които се прилагат пробиотични добавки, с цел **модулиране на млечния микробиом** и повлияване на стомашно-чревния микробиом на бебето, както и здравето на млечните жлези. Това е изследвано при микробиома на кърмата при човека при антибиотично лечение, за което е доказано, че влияе върху съдържанието на бифидобактерии и лактобацили (*Soto et al., 2014*). Установено е също, че **микробиома на кърмата е свързан с приема на хранителни вещества, включително прием на мастни киселини, въглехидрати или протеини** (*Williams et al., 2017*). Проучванията при жени подкрепят **защитната роля на микробиома на млечната жлеза срещу инфекции**. *Arroyo et al. (2010)* показва, че **пероралното приложение на лактобацили, изолирани от кърмата на здрави жени, е по-ефективно от антибиотичната терапия при лечение на мастит**. **От друга страна**, в едно съвсем скорошно проучване на жените, *Simpson et al. (2018)* изследва ефекта на добавени към кърмата *Lactobacillus rhamnosus GG, Lactobacillus acidophilus La- 5, и Bifidobacterium animalis ssp. lactis Bb -12* върху млечния микробиом и детския стомашно-чревен микробиом. В резултат на това те заключават, че **кърменето е малко**

вероятно да бъде значителен източник на тези пробиотици за кърмачетата. В допълнение, **пероралното приложение при майките не повлиява значително цялостния състав на млечния микробиом**.

При говеда се предлага **интрамамарната инфузия с лактококи да бъде също толкова ефективна за елиминиране на хроничните субклинични инфекции, колкото и антибиотичното лечение** (*Klostermann et al., 2008*). Въпреки това, вместо да се възстанови равновесието на микробиома, някои автори твърдят, че това може да се дължи на имунна стимулация, позволяваща отговор на млечната жлеза и клирънс на субклинични интрамамарни инфекциозни агенти (*Crispieet al., 2008; Mignacca et al., 2017*). В съответствие с тази концепция, *Pellegrino et al. (2017)* описва, че **инокулацията на млечнокисели бактерии при кравите по време на сухостойния период увеличава количеството изотипове на IgG в кръвта и млякото и установява, че тези антитела могат да разпознаят епитопите на *S. aureus***. Пролиферацията на лимфоцитите е значително по- висока в инокулираната група по всяко време. Резултатите показват, че **пробиотиците могат да бъдат естествена и ефективна алтернатива за предотвратяване на мастит по говедата в сухостойния период и да действат като имуномодулатор, стимулиращ локалните и системните защитни линии** (*Pellegrino et al., 2017*). Ясно е, че са **необходими повече изследвания, за да се разбере въздействието на приложението на пробиотици върху микробиома** на кравето мляко, както и върху стомашно-чревния микробиом на потомството и върху съответния им здравен статус.

В изключително полезно ветеринарно проучване на тема: „*Bovine milk microbiome: a more complex issue than expected*“ на авторски колектив *Suvi Taponen, David McGuinness, Heidi Hiitiö, Heli Simojoki, Ruth Zadoks and Satu Pyörälä*, целта е била **да се анализира съставът на бактериалните съобщества в проби от маститно мляко от говеда, като се използва секвениране от следващо поколение на ампликони от гена 16S rRNA** и да се сравнят микробиомите с конвенционална култура и резултатите от PCR анализ от същите проби. Включени са и проби от мляко от здрави крави без инфекция. Пробите са обработени отделно в два набора от данни и резултатите са сравнени.

Възпалението на млечната жлеза, **мастит, най-често се причинява от интрамамарна инфекция (IMI), предизвикана от бактерии**. Приблизително **140 бактериални вида са изолирани чрез конвенционални методи** като клетъчно-културално култивиране в проби от мляко, взети от инфектирани животни и директно от мляко. **Най-често срещаните патогенни родове**, изолирани в проби от контаминирано мляко, са **стафилококи, ентеробактерии и стрептококи**, които причиняват по-голямата част от инфекциите. През последното десетилетие конвенционалните методи за изпитване постепенно бяха заменени от иновативни молекулярни ДНК методи за диагностика на мастит.

Появата на **високопроизводителни платформи за секвениране доведе до проучвания, изследващи микробните връзки в широк спектър от различни биологични екосистеми, включително в кравето мляко**. Най-често използваният

подход за изследване на млечния микробиом и неговата динамика е **секвенирането на гена 16S rRNA**, който е приложен **в проучвания за мастит по говедата**. Наред с новите данни от микроорганизмите, като предразполагащ фактор за мастита и метрита е въведена нова хипотеза за възможна „дисбиоза“ на млечните жлези. В млякото от групи крави с мастит е установено наличието на микробиом, състоящ се от богат набор от родове и микробни видове. Маститните крави имат по-голямо бактериално натоварване, отколкото здравите индивиди. Повечето микроорганизми, за които се съобщава, са напълно нови патогенни причинители. Някои **често срещани патогени по вимето на кравите** като ***Escherichia coli, Klebsiella* spp. и *Streptococcus u*beris** са били **най-разпространените микроорганизми в микробиома**. В млечните проби от крави с мастит, дължащ се на *Trueperella pyogenes, Streptococcus dysgalactiae* и *Staphylococcus aureus*, последователностите на едни и същи патогени са сред най-често срещаните и в млечния микробиом. Прилагано е **метагеномно секвениране, за да се изследват възможните въздействия на антимикробното третиране върху млечния микробиом**.

Общо са открити **16S rRNA генни последователности от 751 бактериални родове с поне един прочит в една проба в единия или и в двата набора от данни, 700 в набор от данни 1 и 660 в набор от данни 2**. Анализът на алфа-разнообразието, като се използват филогенетичните дървета, разкри **различни отклонения в богатството на видовете между двата набора от данни**, като наборът от данни 1 показва много по-голямо богатство на видовете от набора от данни 2, дори при много ниски нива на подизвадки.

В набор от данни 1, откритите родове с най-високи средни четения на проба са *Staphylococcus* (30,9% от всички четения), *Streptococcus* (10,6% от всички четения), *Corynebacterium* (9,4% от всички четения) и *Lactococcus* (4,5% от всички четения). В набор от данни 2 съответните родове са *Methylobacterium* (50,2% от всички четения), *Staphylococcus* (13,9% от всички четения), *Corynebacterium* (12,2% от всички четения) и *Calothrix* (8,2% от всички четения). При разглеждане на медианите на проба най-често срещаните родове в набора от данни 1 са *Blautia obeum, Sphingobacterium, Treponema* и *Clostridium* и в набор от данни 2 *Methylobacterium, Corynebacterium, Blautia obeum* и *Staphylococcus*.

Настоящото проучване има още един принос към сложния въпрос, свързан с микробиома на кравето мляко, с някои критични забележки. В **необработените данни общият брой на откритите родове в пробите от мляко е бил над 700, ако всички четения на секвенциите се вземат предвид**. Констатациите с много ниски стойности обаче са ненадеждни и **следва да се използват някои гранични стойности за минималните стойности**. По принцип **секвенциите с малък брой четения следва да се изключат, за да се гарантира, че резултатите не са спорадични**. Публикуваните до момента **проучвания на млечните микроорганизми не дават праг за четене на секвенциите, което затруднява сравненията**. Важна констатация тук е, че резултатите от двата набора от данни, произхождащи от едно и също пробовземане, извършено в рамките на 1 ден от едно стадо, се различават, тъй като някои родове присъстват във всички проби в единия набор от данни, но не са открити в другия. Родовете, открити

само в един набор от данни, е много вероятно да са резултат от контаминация при вземането, обработката и анализа на пробите.

Най-често срещаните родове, открити в пробите от мастититно мляко в настоящото проучване, *Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroides*, и *Proteobacteria*, са същите като тези, докладвани в предишни проучвания. Резултатите от предишни проучвания са противоречиви. В първото публикувано проучване на маститния млечен микробиом, голям брой последователности от анаеробни бактериални родове *Fusobacterium* и *Porphyromonas*, и последователности, принадлежащи към *Fusobacterium necrophorum*, са силно разпространени във всички проби от животни с мастит. *Kuehn et al.* открива в своите проучвания значително повече *Brevundimonas, Burkholderia, Sphingomonas, и Stenotrophomonas* в проби от маститни крави. В друго проучване родът *Sphingobacterium* е значително по-богато представен, както и *Streptococcus*.

Предполага се, че **някои родове ще се изключат от „естествения“ микробиом на кравето мляко**. Логично тези родове трябва да присъстват в млякото от здрави стада. В действителност е докладвано, че профилите на микробиома от здрави животни могат да бъдат ясно дискриминирани от пробите от маститни крави.

В проучването на *Oikonomou et al.* във всички проби от здрави стада са присъствали четири бактериални рода: *Faecalibacterium* spp., некласифицирани *Lachnospiraceae, Propionibacterium* spp. и *Aeribacillus* spp.; също така *Nocardiodes* и *Paenibacillus*. В същото проучване ***Strep. uberis* е открит във всички групи тествани животни и се предлага хипотезата този вид бактерия евентуално да принадлежи към естествения микробиом на млякото**.

В едно проучване, в което е изследван микробиома на кравите в сухостойния период, най-разпространените родове са *Corynebacterium, Acinetobacterium, Arthrobacter, Staphylococcus* и *Psychrobacter*, т.е. различни родове от съобщените в другите цитирани проучвания. Изследвана е и терапията на кравите с антимикробни средства в сухостойния период, но няма ефект върху млечния микробиом.

Lima et al. изследва микробиомите в проби от коластра от млечно направление крави, откривайки *Staphylococcus, Prevotella, Ruminococcaceae, Bacteroidales, Clostridiales* и *Pseudomonas* като доминиращи родове.

Както се вижда по-горе, **публикуваните досега проучвания върху млечните микроби имат променливи и често-противоречиви резултати**.

Микробиома, присъстващ в млечните проби, взети от маститните или здрави животни, трябва да се има предвид, че не представляват целия микробиом на млечната жлеза. В проучванията, изследващи въздействието на експерименталния мастит, лекуван с антимикробни средства върху млечния микробиом, авторите заключават, че **млечната жлеза има устойчив микробиом, който е установен след експозицията на антимикробни средства**.

Трудно е да се намери подкрепа за хипотезата за някакъв метагенен профил, който да отразява „нормалния“ микробиом на млякото. По време на вземането на проби от млякото на много етапи от процедурата може да се получи контаминация на пробата. Асептичната техника е предпоставка за вземане на качествени проби от мляко. *Metzger et al.* констатира, че съставът на бактериалния микробиом в пробите от мляко се

различава при кравите, отглеждани на различни места. Това показва, че **околната среда засяга млечните микробиоми, дори ако млякото се събира при еднакви условия и с еднаква техника**. **Сред идентифицираните в млечните проби родове**, **голяма част** е известно, че **принадлежат към основния микробиом на търбуха на едрия рогат добитък**, като ***Prevotella, Butyrivibrio, Ruminococcus, Lachnospira и Clostridium***. Присъствието им в млечните проби не е изненадващо, тъй като бактериите от търбуха също се озовават в изпражненията и на външните части на тялото и околната среда в животновъдния обект. **Много родове, докладвани в млякото като *Arthrobacter, Acinetobacter* и *Psychrobacter*, са бактерии от околната среда**, които могат да бъдат открити във водата, почвата и други разнообразни местообитания. Въпреки високите хигиенни условия и мерките за биосигурност тези бактерии лесно могат да замърсят пробата. Географските условия и местата за вземане на проби със сигурност оказват въздействие върху микробиома, открит в пробите от мляко, и вероятно поне отчасти обясняват твърде различните микробиоми, докладвани в различни изследвания.

Заключението е, че е **необходима критична оценка на резултатите от анализите на млечните микробиоми в различните проучвания. Какви са ролите на многобройните различни родове и видове, открити в млякото, дали те са ендогенни или придобити, патогени, коменсали или замърсители? За истинско разбиране на ролята и значението на микробиома в млечната екосистема са необходими повече изследвания за тяхното наличие и динамика, изследвания на здравния статус и циркулиращите заболявания, както и циркулацията/наличието на тези микроорганизми в различни среди и животновъдни обекти за млекодайно направление говеда. Освен това вземането на проби и анализирането следва да се извършват в съответствие с най-добрите практики и новите молекулярни изследвания.** Необходими са допълнителни проучвания върху потенциалната роля на млечния микробиом и сложността на цялата микробна мрежа и техните взаимодействия помежду. Трябва да се идентифицират и охарактеризират отделните микроорганизми в състава на микробиома, за **да се изясни и защитния им потенциал срещу различни патогенни агенти**. Ако се потвърдят ползите от прилагането на тази методика, трябва да може да се разгадае и механизма на действие и **потенциалната бъдеща употреба при животни и хора**.

Макар да има нужда от много още изпитвания и проучвания върху човешкия и животинския млечен микробиом, всички изброени проучвания свидетелстват за това, че **целогеномното секвениране и метагеномният анализ са бързи, надеждни, точни и в реално време биха могли да осигурят изключително информативен и богат набор от данни за микробиома на млякото, особено при съмнение за заболяване или инфекция както при хора така и при животни** (*Ganda et al., 2016*). Освен това, **характеризирането на млечния микробиом до ниво на вида е от значение за идентифициране на възможни промени и дисбиоза**, които не са непременно открити чрез клетъчно-културални методи и секвениране с кратки прочити. Би било полезно да се работи с голям набор от бази данни или дори **да се изгради специфична база данни за млечния микробиом**. **Идентифицирането на потенциални патогени и гени за резистентност в млякото чрез метагеномиката представлява едно от бъдещите**

приложения на тези технологии. **Необходимо е да се хармонизират подходите от пробовземането до биоинформатичния анализ на резултатите**, както **и самите протоколи за диагностика и методите на секвениране**, за **да има съпоставимост на данните**. Необходима е **постоянна обмяна на опит и данни от пълните геномни секвентни анализи**. Важно е така да бъдат оптимизирани протоколите за секвентните и метагеномните анализи, че те да се случват не за денонощия, а за 4-5 часа, както е публикувано в съвсем ново проучване от 2022г. на изследователски екип от учени от Станфорд, които поставиха първия Световен рекорд на Гинес за най-бърза техника за секвениране на ДНК, която беше използвана за секвениране на човешки геном само за 5 часа и 2 минути.

WGS може значително да подобри наблюдението и на AMP на местно, регионално и световно равнище. Очаква се разходите за WGS и новите геномни техники да спаднат също още повече, тъй като те стават все широко използвани не само за секвениране на патогени, но и за секвениране на човешки геноми за медицински цели.

Новият ултра-бърз подход за секвениране на генома, разработен от учените от Станфордския медицнски университет беше използван за диагностициране на редки генетични заболявания средно за осем часа - подвиг, който е почти нечуван в стандартните клинични грижи.

„Няколко седмици е това, което повечето клиницисти наричат „бързи методи“, когато става въпрос за секвениране на генома на пациента и връщане на резултати“, каза Юан Ашли, професор по медицина, генетика и наука за биомедицински данни в Станфорд.

Геномното секвениране позволява на учените да видят пълния ДНК състав на пациента. **Последователността на генома е жизненоважна за диагностицирането на заболявания, инфекции и причинители**. Сега подходът за мега-последователност, разработен от Ашли и неговите колеги, предефинира „бързата генетична диагностика“: най-бързата им диагноза е направена за малко повече от седем часа. **Бързите диагнози означават, че спрямо хората / животните могат да бъдат предприети адекватни, навременни и точни схеми за терапия и лечение, да се предотвратят хоспитализации и смърт, както и икономически щети**. Трябва да се отбележи, че **по-бързото секвениране не жертва точността**.

За период от по-малко от шест месеца екипът записа и секвенира геномите на 12 пациенти, пет от които са получили генетична диагноза от информацията за последователността, за времето, необходимо за ден работа в офиса.

За да постигнат супер бързи скорости на секвениране, **изследователите се нуждаят от нов хардуер, като в случая са използвали Oxford Nanopore Technologies, съставена от 48 секвениращи единици, известни като поточни клетки. Данните, които са получени се прехвърлят директно към облачна система за съхранение, където изчислителната мощност може да бъде усилена достатъчно, за да отсее данните в реално време**. След това алгоритмите независимо сканират входящия генетичен код за грешки, и в последната стъпка **учените правят сравнение на генните варианти на пациента с публично документирани варианти, за които е известно, че причиняват заболяване**.

От началото до края екипът се стреми да ускори всеки аспект на секвенирането на генома на пациента.

Може би **най-важната характеристика** на способността на диагностичния подход да забелязва бързо подозрителни фрагменти от ДНК е **използването на нещо, наречено последователност за дълго четене**. Традиционните техники за секвениране на генома нарязват генома на малки парченца, изписват точния ред на ДНК-основните двойки във всяка част, след което събират цялото нещо обратно заедно, използвайки стандартен разчетен геном като референция. Но този подход не винаги обхваща целия геном и информацията, която предоставя, понякога може да пропусне вариации в гените, които сочат към диагноза. **Продължителното четене на последователности запазва дълги участъци от ДНК, съставени от десетки хиляди базови двойки, осигурявайки подобна точност и повече подробности за учените, които претърсват последователността за грешки**.

„**Мутациите, които възникват върху голяма част от генома, са по-лесни за откриване с помощта на секвениране с дълго четене. Има варианти, които би било почти невъзможно да се открият без някакъв подход за дълго четене**“.

Едва наскоро компании и изследователи усъвършенстваха точността на дългопрочитния подход достатъчно, за да разчитат на него за диагностика.

От екипа е предложено техниката за ускорено секвениране на генома да бъде приложена на недиагностицирани пациенти в отделенията за интензивно лечение на болниците в Станфорд.

Стандартните тестове проверяват пробата за маркери, свързани с болестта, но те сканират само за „шепа“ добре документирани гени. **Търговските лаборатории, които често провеждат тези тестове, бавно актуализират молекулярните тестове и най-вече китовете и праймерите, които използват, и генните локуси, за които проверяват, което означава, че може да отнеме много време, преди новооткритите болестотворни мутации да бъдат интегрирани в теста**. И това може да доведе **до пропуснати или ненавременни диагнози**. Ето защо **бързото секвениране на генома може да бъде такава промяна в диагностиката. Учените могат да сканират целия геном на животни, хора и микроорганизми за всички генни варианти, предложени от научната литература, дори и ако този вариант е бил открит само предния ден**.

Този изключителен напредък в новите геномни техники в диагностиката би дал навременни, точни, бързи, прецизни и информативни данни и то за часове, което би помогнало за своевременното оценяване на риска и вземането на най-правилните мерки и решения за справяне с конкретни заболявания или конкретни патогени.

Изготвил:
Красимира Захариева,
Главен експерт в дирекция „ОРХВ“

Използвана литература:

- *Identification of the Potential Role of the Rumen Microbiome in Milk Protein and Fat Synthesis in Dairy Cows Using Metagenomic Sequencing - Xin Wu, Shuai Huang, Jinfeng Huang, Peng Peng, Yanan Liu, Bo Han and Dongxiao Sun*
- *DNA sequencing milk - the key to better cow health? - https://www.lic.co.nz/news/dna-sequencing-milk-key-better-cow-health/*
- *Milk Microbiota: What Are We Exactly Talking About? - Georgios Oikonomou, Maria Filippa Addis, Christophe Chassard, Maria Elena Fatima Nader-Macias, I. Grant, Celine Delbès, Cristina Inés Bogni, Yves Le Loir and Sergine Even*
- *Bovine milk microbiome: a more complex issue than expected - Suvi Taponen , David McGuinness , Heidi Hiitiö , Heli Simojoki , Ruth Zadoks and Satu Pyörälä*
- *Microbiome-based environmental monitoring of a dairy processing facility highlights the challenges associated with low microbial-load samples - Aoife J. McHugh, Min Yap, Fiona Crispie, Conor Feehily, Colin Hill and Paul D. Cotter*
- *Metagenomic features of traditional fermented milk products Lijun You, Chengcong Yang, Hao Jin, Lai-Yu Kwok, Zhihong Sun, Heping Zhang*
- *Short communication: Milk microbiota profiling on water buffalo with full-length 16S rRNA using nanopore sequencing - Carlotta Catozzi, Fabrizio Ceciliani, Cristina Lecchi, Andrea Talenti, Domenico Vecchio, Esterina De Carlo, Carlo Grassi, Armand Sánchez, Olga Francino, and Anna Cuscó*
- *Evaluation of Human Milk Microbiota by 16S rRNA Gene Next-Generation Sequencing (NGS) and Cultivation/MALDI-TOF Mass Spectrometry Identification - Primož Treven , Aleksander Mahnic, Maja Rupnik , Majda Golob[4] , Tina Pirš , Bojana Bogovic Matijašic and Petra Mohar Lorbeg*
- *Tracking the Dairy Microbiota from Farm Bulk Tank to Skimmed Milk Powder - Aoife J. McHugh, Conor Feehily, Mark A. Fenelon, David Gleeson, Colin Hill, Paul D. Cotter*
- *Gleeson, D., O'Connell, A. & Jordan, K. Review of potential sources and control of thermoduric bacteria in bulk-tank milk. Ir. J. Agric.*
- *Doyle, C. J., Gleeson, D., O'Toole, P. W. & Cotter, P. D. High-throughput sequencing highlights the significant influence of seasonal housing and teat preparation on the raw milk microbiota. Appl. Environ. Microbiol.*
- *Faille, C. et al. Sporulation of Bacillus spp. within biofilms: a potential source of contamination in food processing environments. Food Microbiol. (2014).*
- *Wang, B. et al. Bacterial composition of biofilms formed on dairy-processing equipment. Prep. Biochem. Biotechnol.*
- *Li, N. et al. Variation in raw milk microbiota throughout 12 months and the impact of weather conditions.*
- *Watson, M. & Warr, A. Errors in long-read assemblies can critically affect protein prediction. Nat. Biotechnol.*
- *Bertrand, D. et al. Hybrid metagenomic assembly enables high-resolution analysis of resistance determinants and mobile elements in human microbiomes. Nat. Biotechnol.*