



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Το μικροβίωμα του ενδομητρίου»

ΓΡΑΒΑΝΗ ΚΛΕΟΠΑΤΡΑ

ΛΑΡΙΣΑ, 2021



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE**

MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

“The Endometrial Microbiome”

GRAVANI KLEOPATRA
LARISA, 2021

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σωτήρης Ζαρογιάννης
Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας
Επιβλέπων

Αναστάσιος Γερμενής
Καθηγητής Ανοσολογίας

Ματθαίος Σπελέτας
Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κύριο Σωτήρη Ζαρογιάννη ο οποίος ήταν επιβλέπων της διπλωματικής μου εργασίας και τον καθηγητή Ανοσολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κύριο Αναστάσιο Γερμενή, για τη βοήθειά τους καθώς και την εμπιστοσύνη που έδειξαν στο πρόσωπό μου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη διδάκτορα Μαρία Ζαμανάκου για την πολύτιμη καθοδήγηση και υποστήριξή της στη διεκπεραίωση της διπλωματικής μου εργασίας, όπως και τον υποψήφιο διδάκτορα Γεδεών Λουλέ αλλά και τη διδάκτορα Σοφία Βάτσιου για τις συμβουλές και τη βοήθεια που μου παρείχαν. Η διεκπεραίωση των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις της CeMIA SA και παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω το κέντρο υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ΑΚΕΣΩ Έμβρυο a.r.t, τον κλινικό εμβρυολόγο κύριο Μιχάλη Πελεκάνο, την κυρία Δέσποινα Σανούδου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακογονιδιωματικής στην Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και τον κύριο Αριστείδη Ηλιόπουλο, καθηγητή και διευθυντή του εργαστηρίου βιολογίας της ιατρικής σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, που στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «T2EDK-01371 Mi-IVF» μου έδωσαν την ευκαιρία να ασχοληθώ με το μικροβίωμα του ενδομητρίου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, λόγω της μεγάλης διαθεσιμότητας σε τεχνικές αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS), έχει αποκαλυφθεί η παρουσία μικροβιακών κοινοτήτων σχεδόν σε όλο το ανθρώπινο σώμα, συμπεριλαμβανομένης και της αναπαραγωγικής οδού. Το μικροβίωμα θεωρείται πως εμπλέκεται στη διατήρηση μίας υγιούς κατάστασης στον οργανισμό, συνεπώς αλλαγές που οφείλονται σε εσωτερικούς ή εξωτερικούς παράγοντες μπορεί να οδηγήσουν σε μικροβιακή δυσβίωση και στην ανάπτυξη παθολογιών. Έχει προταθεί πως το μικροβίωμα του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος εμπλέκεται στη γυναικεία υπογονιμότητα και πως μπορεί να έχει βασικό ρόλο στην επιτυχία της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Ένα φυσιολογικό δείγμα κολπικού μικροβιώματος χαρακτηρίζεται από την παρουσία βακτηρίων που ανήκουν στο γένος *Lactobacillus* ενώ πρόσφατες μελέτες, αποκάλυψαν την ύπαρξη μικροβιώματος στο ενδομήτριο, το οποίο αποτελούνταν από *Lactobacillus* και άλλα βακτήρια. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε το μικροβίωμα της αναπαραγωγικής οδού γυναικών (20 γυναίκες-ενδομήτριο, κόλπος, τράχηλος) που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση, με τη χρήση αλληλούχησης νέας γενιάς στο γονίδιο 16S rRNA (NGS-16S Metagenomics). Η πλειοψηφία των δειγμάτων κόλπου (9 από τις 13 γυναίκες) εμφάνισαν ως κυρίαρχο μικροβίωμα είδη της οικογένειας *Lactobacillaceae* σε ποσοστό από 91% έως 99,9%, ενώ στα δείγματα ενδομητρίου και τραχήλου δεν υπήρξε κάποιο κυρίαρχο είδος οργανισμού. Υπήρξε μία συστηματική εμφάνιση *Burkholderiaceae* στα δείγματα ενδομητρίου, ενώ κάποιες γυναίκες παρουσίασαν μία μοναδική εικόνα μικροβιώματος. Είναι σημαντική η κατανόηση της σύστασης του μικροβιώματος στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα, καθώς αυτό μπορεί να αλλάξει τη θεραπευτική προσέγγιση που οδηγεί σε μία επιτυχημένη εγκυμοσύνη.

ABSTRACT

Over the last decade, due to the great availability of next generation sequencing techniques (NGS), the presence of microbial communities has been revealed in almost the entire human body, including the reproductive tract. The microbiome is involved in maintaining a healthy state in the body, therefore a change due to internal or external factors can lead to microbial dysbiosis and the development of pathologies. It has been suggested that the microbiome of the female reproductive system is involved in female infertility and that it may play a key role in the success of assisted reproduction. A normal sample of vaginal microbiome is characterized by the presence of bacteria that belong to the genus *Lactobacillus*, while recent studies have revealed the presence of a microbiome in the endometrium, which is consisted of *Lactobacillus* and other bacteria. This study investigated the microbiome of the female reproductive tract (20 women- endometrium, vagina, cervix), who underwent in vitro fertilization, using next generation sequencing in the 16S rRNA gene (NGS-16S Metagenomics). Most of the vaginal specimens (9 out of 13 females) had a predominant microbiome of species of the family Lactobacillaceae from 91% to 99.9%, while in the endometrial and cervical specimens there were no dominant species. There was a systematic appearance of Burkholderiaceae in endometrial specimens, with some women presenting a unique microbiome. Understanding the composition of the microbiome in the female reproductive tract is very important, as it could change the therapeutic approach that could lead to a successful pregnancy.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
A.1 ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ	9
A.1.2 Μικροβίωμα και εμφύτευση βλαστοκύστης – Υπάρχει συσχέτιση;	12
A.1.3 Η ανοσία της μήτρας και το τοπικό μικροβίωμα.....	14
A.1.4 Επιθηλιακά κύτταρα και προσαρμογή ιστού κατά την εμφύτευση	17
A.1.3 Η υπόθεση του «αποικισμού» της μήτρας.....	19
A.1.4 Κολπικό μικροβίωμα.....	21
A.1.5 Πρώιμες αναλύσεις μικροβιώματος.....	25
A.2 16S rRNA	26
A.3 Αλληλούχηση Νέας Γενιάς (NGS) – 16S Metagenomics	29
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	34
B1. ΣΚΟΠΟΣ	35
B.2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	36
B2.1 Ασθενείς και όργανα υλικά της μελέτης.....	36
B.2.2 Κριτήρια ένταξης και κριτήρια αποκλεισμού γυναικών στη μελέτη	36
B.2.3 Συλλογή υλικού από ενδομήτριο και κόλπο.....	37
B.2.4 Απομόνωση DNA.....	38
B.2.5 Ενίσχυση υπερμεταβλητών περιοχών του γονιδίου 16s.....	38
B.2.6 Δημιουργία βιβλιοθήκης	38
B.2.7 Προγραμματισμός του πειράματος στον Torrent Browser	39
B.2.8 Ανάλυση των αποτελεσμάτων στον Ion Reporter	41
B.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45

B.3.1 Εξέταση πρότυπου δείγματος	45
B.3.2 Εξέταση δειγμάτων	46
B.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	56
B.4.1 Επικύρωση της μεθόδου 16S Metagenomics	56
B.4.2 Alpha και Beta diversity	60
B.4.2 Αποτελέσματα σε δείγματα κόλπου	61
B.4.3 Αποτελέσματα σε δείγματα τραχήλου.	65
B.4.4 Αποτελέσματα σε δείγματα ενδομητρίου	66
B.4.5 Σύγκριση δειγμάτων κόλπου-ενδομητρίου	70
B.4.6 Συμπεράσματα.....	71
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	73
Παράρτημα 1.....	73
Παράρτημα 2.....	75
Παράρτημα 3.....	76
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	85

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1 ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Τα βακτήρια αποικίζουν το μεγαλύτερο μέρος του ανθρώπινου σώματος και η γεννητική οδός των γυναικών δεν αποτελεί εξαίρεση. Ενώ η ύπαρξη του μικροβιώματος του κόλπου έχει μελετηθεί εκτενώς, η άνω γεννητική οδός θεωρούνταν στείρα και η ύπαρξη βακτηρίων σε αυτή ως μία ανεπιθύμητη κλινική εκδήλωση. Μέχρι πρόσφατα, η μήτρα θεωρείτο ένα αποστειρωμένο όργανο που προστατεύεται με την τραχηλική βλέννα από τα βακτήρια που υπάρχουν στο κοιλιακό περιβάλλον. Η υπόθεση «στείρα μήτρα» αμφισβητήθηκε από μελέτες που έδειχναν πως τα βακτήρια ήταν σε θέση να ανέλθουν στον τράχηλο μέσω της προστατευτικής βλέννας. Παρατηρήθηκε πως όχι μόνο βακτήρια, αλλά και μικρά σωματίδια μεταφέρονται ενεργά από τον κόλπο, στον τράχηλο και τη μήτρα, έως τις σάλπιγγες και τα ωοθυλάκια^{1,2}.

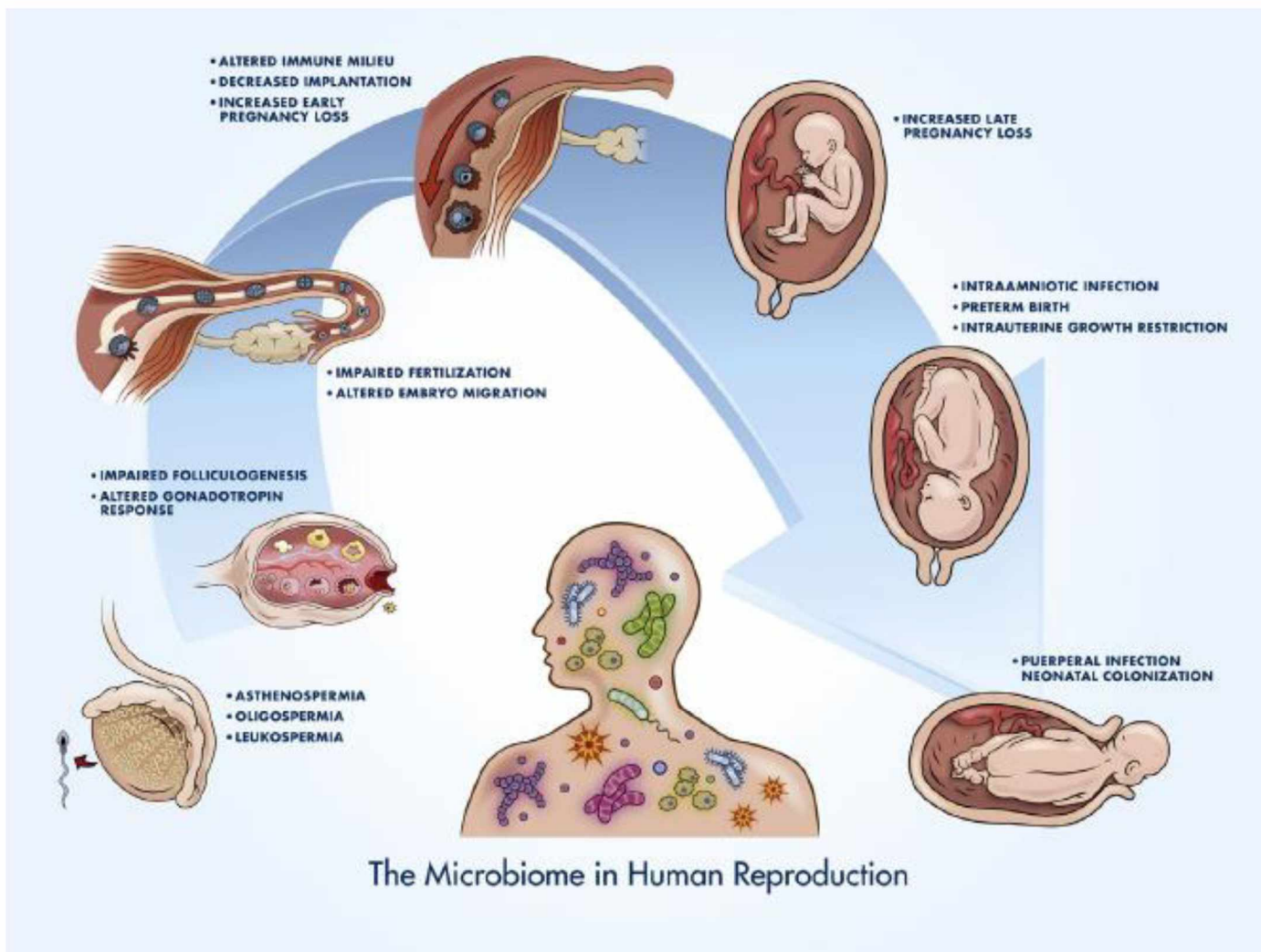
Ένα φυσιολογικό δείγμα κοιλιακού μικροβιώματος χαρακτηρίζεται από την παρουσία βακτηρίων που ανήκουν στο γένος *Lactobacillus*. Πρόσφατες μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε τεχνολογία next generation sequencing στο γονίδιο 16S, αποκάλυψαν την ύπαρξη μικροβιώματος στο ενδομήτριο, το οποίο αποτελούνταν από *Lactobacillus* και άλλα βακτήρια. Γυναίκες στις οποίες η μικροχλωρίδα του ενδομητρίου κυριαρχείται από το γένος *Lactobacillus* σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90%, εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά επιτυχίας εξωσωματικής γονιμοποίησης και φυσιολογικής κύησης. Αντίθετα, μειωμένα ποσοστά επιτυχούς εμφύτευσης και αυξημένος κίνδυνος αποβολής έχουν συσχετισθεί με μικροχλωρίδα που περιέχει <90% *Lactobacillus* και αυξημένα επίπεδα βακτηρίων του γένους *Gardnerella* ή *Streptococcus*. Αυτές οι συσχετίσεις έχουν πρακτικό ενδιαφέρον καθώς ο εμπλουτισμός της μικροχλωρίδας του ενδομητρίου με λακτοβάκιλλο ή η μείωση των επιπέδων *Gardnerella* ή *Streptococcus*, μέσω κατάλληλης διατροφής και χορήγησης προβιοτικών ή αντιβιοτικών θα μπορούσε να αυξήσει τις πιθανότητες επιτυχούς κύησης³.

Σύμφωνα με τα στοιχεία της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Ανθρώπινης Αναπαραγωγής & Εμβρυολογίας (ESHRE), τα ποσοστά επιτυχούς εμφύτευσης γονιμοποιημένου ωαρίου και επίτευξης κλινικής εγκυμοσύνης κυμαίνονται στο 26-30%, αλλά διαφοροποιούνται ανάλογα με την ηλικία. Οι αιτίες της επαναλαμβανόμενης αποτυχίας εμφύτευσης σε υγιείς γυναίκες δεν είναι πλήρως κατανοητές. Ωστόσο, η δεκτικότητα του ενδομητρίου στην υποδοχή του γονιμοποιημένου ωαρίου (εμβρυομεταφορά) αποτελεί σημαντική παράμετρο επιτυχούς εμφύτευσης κατά συνέπεια ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η πρόσφατη ανακάλυψη μικροβιακής κοινότητας στο ενδομήτριο.

Οι επιπτώσεις του ανθρώπινου μικροβιώματος στην αναπαραγωγή μελετώνται έντονα από τον 19ο αιώνα. Οι κλασικές μελέτες του Ignaz Semmelweis⁴, οδήγησαν το 1847 στην πρόταση πως το πλύσιμο των χεριών σε διάλυμα υποχλωριωδίου θα μπορούσε σχεδόν να εξαλείψει τον κίνδυνο του πυρετού λοχειάς, μία διαταραχή που είχε ως αποτέλεσμα ένα ποσοστό θνησιμότητας στις μητέρες από 7% - 15%. Η θεωρία των μικροβίων ως εστία μόλυνσης είχε προταθεί από τον Pasteur⁵, αλλά η έλλειψη επαρκών επιστημονικών εργαλείων για να διευκρινιστεί το πως συμβαίνει η μετάδοση και η πρόκληση του μεταγεννητικού πυρετού, οδήγησαν στην απόρριψη των ευρημάτων του Semmelweis. Ο ίδιος όταν επέμεινε στην παρουσίαση των ευρημάτων του και στην αναγκαιότητα του πλυσίματος των χεριών, χαρακτηρίστηκε ως ψυχικά ασταθής και εισήχθη σε άσυλο, όπου κατά ειρωνικό τρόπο πέθανε εντός λίγων εβδομάδων εξαιτίας μιας λοίμωξης από την οποία προσβλήθηκε στο άσυλο. Από τότε η κατανόηση και ο ρόλος του μικροβιώματος τόσο υπό φυσιολογικές όσο και υπό παθολογικές συνθήκες έχει αυξηθεί δραματικά⁶.

Ο χαρακτηρισμός του «υγιούς» ή του «βασικού» μικροβιώματος της αναπαραγωγικής οδού, ξεκίνησε από τη βιβλιογραφία της γυναικολογίας, η οποία προσδιόριζε το κολπικό μικροβίωμα καθώς αυτό άλλαζε στη διάρκεια του εμμηνορροϊκού κύκλου, στην εμμηνόπαυση αλλά και σε δυσβιωτικές συνθήκες, όπως στις παθολογικές αναταραχές της αναπαραγωγικής οδού. Αυτές οι παρατηρήσεις έθεσαν τις βάσεις για τη θεωρία πως αλλαγές στο μικροβίωμα θα μπορούσαν να έχουν αντίκτυπο στο αναπαραγωγικό δυναμικό ασθενών με υπογονιμότητα, και πως η διόρθωση των ανωμαλιών στο μικροβίωμα του κάθε ασθενούς θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυξημένες πιθανότητες επιτυχημένης εγκυμοσύνης⁷.

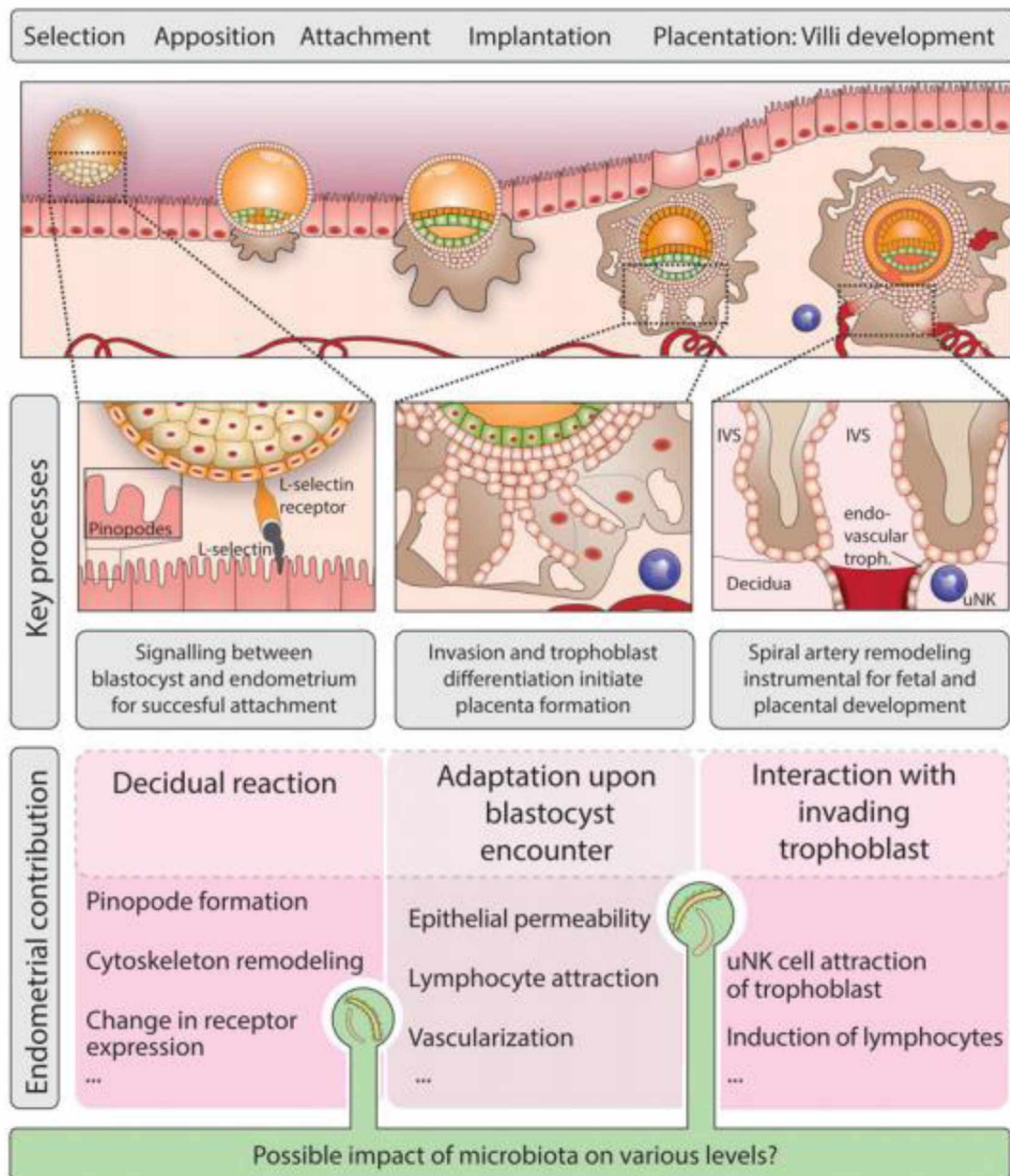
Η δυσβιωτική συνθήκη στη μαιευτική έχει συνδεθεί με φλεγμονώδεις καταστάσεις που μπορούν να οδηγήσουν σε αυθόρμητο πρόωρο τοκετό, μεταξύ άλλων ανεπιθύμητων μαιευτικών αποτελεσμάτων. Το πεδίο της μεταγονιδιοματικής αποκάλυψε πως ο πλακούντας διαθέτει πλούσιο και ποικίλο μικροβίωμα ακόμη και σε υγιείς εγκυμοσύνες. Εδώ έγκειται ένα σημείο ενδιαφέροντος, καθώς όπως στη διαδικασία της εμφύτευσης, όπου υπάρχει μία εισβολή βλαστοκύστης στο σύστημα, το ανοσοποιητικό σύστημα πρέπει να επιτύχει την ισορροπία μεταξύ της απόρριψης του ιστού του πλακούντα και του εμβρύου, ενώ παράλληλα παρέχει στη μητέρα άμυνα κατά της μόλυνσης. Τα δεδομένα που εξάγονται από τη μελέτη αυτής της ισορροπίας, μπορούν να οδηγήσουν σε ευρήματα όπως είναι οι πολυμορφισμοί TNF-alpha-308, οι οποίοι μπορούν να αναγνωριστούν ως δείκτες σε γυναίκες υποψήφιες για ανεπιθύμητα μαιευτικά αποτελέσματα, ή ακόμη και σαν δείκτες υπογονιμότητας⁶.



Εικόνα 1: Το ανθρώπινο μικροβίωμα επηρεάζει όλες τις πτυχές της αναπαραγωγής, από τη γαμετογένεση, τη γονιμοποίηση και τη μετανάστευση των εμβρύων, έως την εμφύτευση, με αντίκτυπο σε πρώιμη αποτυχία της εγκυμοσύνης και ακόμη και σε μία ενδομήτρια λοίμωξη που θα μπορούσε να οδηγήσει σε πρόωρο τοκετό. (Frasasiak. Microbiome in reproduction. Fertil Steril 2015)

A.1.2 Μικροβίωμα και εμφύτευση βλαστοκύστης – Υπάρχει συσχέτιση;

Για να υπάρξει κατανόηση της μικροβιακής δράσης στην αλληλεπίδραση των κυττάρων της μήτρας που εμπλέκονται στην εμφύτευση του εμβρύου, πρέπει πρώτα να υπάρξει κατανόηση της σημαντικότητας του ενδομητρίου στην επιτυχία της εμφύτευσης και στη δημιουργία του πλακούντα. Παρά το αυξανόμενο ενδιαφέρον από τους επιστήμονες στη διαδικασία της εμφύτευσης, οι μηχανισμοί στους οποίους βασίζεται η ανθρώπινη εμφύτευση παραμένουν ελάχιστα κατανοητοί. Κάθε μήνα, πριν την παρουσία ενός αναπτυσσόμενου εμβρύου, δημιουργούνται οι κατάλληλες συνθήκες για το σχηματισμό του πλακούντα. Κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης συμβαίνει αυθόρμητος μετασχηματισμός του ενδομητρίου προς μία δεκτική κατάσταση, ανεξάρτητη από την παρουσία ή την απουσία της σύλληψης. Στη συνέχεια, 6-10 ημέρες μετά την ωορρηξία (κατά τις ημέρες 19-24 του εμμηνορροϊκού κύκλου) διαμορφώνεται η δεκτική κατάσταση του ενδομητρίου. Αυτό αναφέρεται ως «το παράθυρο της εμφύτευσης» (WOI) που διαρκεί 2-4 ημέρες. Οι φυσιολογικές προσαρμογές που απαιτούνται για τις σωστές κυκλικές αλλαγές του ενδομητρίου ρυθμίζονται από διακυμάνσεις στα επίπεδα προγεστερόνης και οιστρογόνων καθώς και από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και τα προϊόντα τους. Οι ενδομητριακοί ινοβλάστες διαφοροποιούνται για να γίνουν μεγαλύτεροι και πιο στρογγυλοί, σαν ινοβλάστες στρωματικών κυττάρων. Για να επιτευχθεί αυτό, ο κυτταροσκελετός και η πλασματική μεμβράνη υφίστανται τροποποιήσεις. Η κοίλη επιφάνεια του ενδομητρίου(luminal), πρέπει να μπορεί να αλληλοεπιδρά με τη βλαστοκύστη. Οι αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν επίσης μόρια πρόσφυσης όπως είναι οι ιντεγκρίνες, συνδέτες L-σελεκτίνης και ολιγοσακχαρίτες. Το ενδομήτριο, κατά συνέπεια είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη ενός υγιούς πλακούντα, και ως εκ τούτου μιας υγιούς εγκυμοσύνης. Εάν οι μικροβιακές ενώσεις συνιστούν έναν ακόμα φυσιολογικό παράγοντα στο πολύπλοκο περιβάλλον της μήτρας, τότε θα συμβάλουν επίσης στην εμφύτευση και τη σύσταση του πλακούντα ⁸(Εικ.2).



Εικόνα 2: Απεικόνιση των βασικών στοιχείων της αλληλεπίδρασης βλαστοκύστης – ενδομητρίου, που απαιτείται για ένα δεκτικό ενδομήτριο. Λόγω των σημαντικών συνεισφορών του στη δημιουργία του πρώιμου πλακούντα, το ενδομήτριο είναι το κλειδί για μία υγιή εγκυμοσύνη. Η σωστή αλληλεπίδραση μεταξύ τροφοβλάστης και τοπικής ανοσίας είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί η σωστή ανάπτυξη λαχνών και υγιούς πλακούντα. Όλες αυτές οι ιδιαίτερα ρυθμιζόμενες ιδιότητες του ενδομητρίου που απαιτούνται στην αρχική φάση της εγκυμοσύνης επηρεάζονται πιθανώς από το μικροβίωμα της μήτρας. (Benner M. et all. Hum Reprod Update. 2018)

A.1.3 Η ανοσία της μήτρας και το τοπικό μικροβίωμα

Τα τοπικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ανήκουν στους παράγοντες που είναι γνωστό πως επηρεάζουν τη μετανάστευση των τροφοβλαστών, συνεπώς είναι καθοριστικής σημασίας για την αναδιαμόρφωση της μητρικής σπειροειδούς αρτηρίας. Το ανοσοποιητικό σύστημα συμμετέχει στενά σε όλες τις πτυχές της αναπαραγωγικής διαδικασίας, ιδιαίτερα τη στιγμή της σύλληψης και την περίοδο της εμφύτευσης. Διαφορετικά στάδια κατά την έναρξη της εγκυμοσύνης εμπεριέχουν διάφορες ανοσολογικές προκλήσεις: για μία υγιή εγκυμοσύνη, το μητρικό ανοσοποιητικό σύστημα πρέπει να υποστηρίξει την εισαγωγή του σπέρματος και να επιτρέψει τη γονιμοποίηση, την αρχική επαφή της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο και το σωστό σχηματισμό του πλακούντα. Τα NK κύτταρα, τα κύτταρα T και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) είναι ένα κοινός στόχος κατά τη διερεύνηση της ανοσολογίας της εγκυμοσύνης. Είναι πολύ μεγάλη η σημασία ενός αυστηρά ρυθμισμένου ανοσοποιητικού περιβάλλοντος της μήτρας, που θα μπορούσε ενδεχομένως να επηρεαστεί από μικροβιοεπαγωγικούς παράγοντες⁹.

Για την ανίχνευση παθογόνων ιικής, βακτηριακής και μυκητιακής προέλευσης, το ανοσοποιητικό σύστημα ανιχνεύει μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με τα παθογόνα (PAMP), μέσω υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (PRR), όπως είναι οι υποδοχείς TLR, υποδοχείς τύπου RIG-I, υποδοχείς τύπου NOD (NLRs) και υποδοχείς λεκτίνης τύπου C, όπως είναι οι κολεκτίνες (collectins), οι σελεκτίνες (selectins), οι ενδοκυτταρικοί υποδοχείς και οι πρωτεογλυκάνες. Οι PRRs αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας κατά των σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων, ή άλλων παθογόνων που μπορούν να εισέλθουν στη γυναικεία αναπαραγωγική οδό μέσω του κόλπου. Η έκφραση του mRNA και των πρωτεϊνών των TLR υποδοχέων αλλάζει κατά τη διάρκεια του εμμηνορροϊκού κύκλου, ενώ η έκφραση του υποδοχέα στα κύτταρα του ενδομητρίου βρέθηκε να είναι χαμηλή στην πολλαπλασιαστική φάση και αυξημένη στην εκκριτική φάση. Μαζί με τους ενδοκυτταρικούς υποδοχείς, υπάρχει μία υψηλή έκφραση αισθητήρων παθογένειας που καλύπτουν τη γυναικεία αναπαραγωγική οδό. Όλοι αυτοί οι υποδοχείς μπορούν να αντιληφθούν συγκεκριμένα PAMPs και να αντιδράσουν προκαλώντας καταρράκτες σηματοδότησης¹⁰.

Η διατήρηση των αποικιών των βακτηρίων του μικροβιώματος προσδίδει προστασία στον ξενιστή ενάντια σε διάφορα παθογόνα. Τα συγκεκριμένα βακτήρια ανταγωνίζονται επιτυχώς τα παθογόνα που εισβάλλουν περιστασιακά στον ξενιστή στις θέσεις που αποικίζουν, επιδίδοντας καλύτερη προσαρμοστικότητα, κάτι το οποίο ονομάζεται «αντίσταση αποικισμού». Τα βακτήρια του μικροβιώματος (commensal microbiota) εξειδικεύονται στη χρήση των θρεπτικών συστατικών του περιβάλλοντός τους, εξαντλώντας το έτος από θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για την ανάπτυξη

των παθογόνων ειδών. Η κατανάλωση ενός περιορισμένου πόρου μπορεί να «πεινάσει» τον παθογόνο εισβολέα. Το E.coli, για παράδειγμα, ανταγωνίζεται στην κατανάλωση σακχάρων, αμινοξέων και άλλων θρεπτικών συστατικών με την παθογόνο εντεροαιμορραγική E.coli (EHEC). Τα συμβιωτικά βακτήρια επίσης υπερασπίζονται τη θέση που αποικίζουν. Ένα παράδειγμα είναι αυτό του συμβιωτικού *Clostridium scindens*, το οποίο προστατεύει το κόλον από μόλυνση με *Clostridioides difficile*, μέσω της παραγωγής δευτερογενών οξέων χολής (bile acids), τα οποία αναστέλλουν την ανάπτυξη του *C.difficile*. Μία ακόμη συμβολή των συμβιωτικών βακτηρίων, είναι η συνεχής διέγερση των υποδοχέων, που οδηγούν σε ρύθμιση του TLR, που απαιτείται για την αντίληψη δυνητικά παθογόνων βακτηρίων. Ποντίκια και άνθρωποι που έλαβαν αντιβιοτικά, μειώνοντας έτσι το μικροβίωμα του εντέρου, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε στελέχη ανθεκτικά στα αντιβιοτικά, λόγω της μειωμένης έκφρασης των αντιμικροβιακών αμυντικών μηχανισμών. Στη γυναικεία αναπαραγωγική οδό, παρατηρείται αναστολή του *Neisseria gonorrhoeae* στην παρουσία γαλακτοβάκιλλων, σε μοντέλο ενδομητριάκων επιθηλιακών κυττάρων. Σε μοντέλα ενδοτραχηλιακών επιθηλιακών κυττάρων, αγωνιστές TLR, που χρησιμοποιήθηκαν ως υποκατάστατα για μικροβιακά προϊόντα, αποδείχθηκε πως διεγείρουν αντιμικροβιακά προϊόντα και βλεννίνες. Συνεπώς, η διατήρηση ενός συμβιωτικού μικροβιώματος εντός του ενδομητρίου μπορεί να αποδειχθεί πως είναι ένα αποτελεσματικό μέσο προστασίας της μήτρας από λοιμώξεις¹¹ (Εικ. 3).

Pattern recognition receptor	Expressed on	EEC	ESC	Cyclical changes	Pathogen-associated molecular pattern	Pathogen	Reference
Toll-like receptor							
TLR1	Plasma membrane	x	(x)	–	Lipid-containing PAMPs, e.g. LTA (together with TLR2/6)	Gram pos. bacteria, fungi	Aflatoonian et al. (2007); Young et al. (2004)
TLR2	Plasma membrane	x	x	x	Lipid-containing PAMPs, e.g. LTA (together with TLR2/6), zymosan	Gram pos. bacteria, fungi	Aflatoonian et al. (2007); Hirata et al. (2007); Young et al. (2004)
TLR6	Plasma membrane	x	(x)	x	See TLR1/2		Aflatoonian et al. (2007)
TLR4	Plasma membrane	x	x	x	LPS, LipidA	Gram neg. bacteria	Aflatoonian et al. (2007); Hirata et al. (2007); Young et al. (2004)
TLR5	Plasma membrane	x	(x)	x	Flagellin	Flagellated bacteria	Aflatoonian et al. (2007); Young et al. (2004)
TLR3	Endosome	x	x	x	dsRNA	Virus	Aflatoonian et al. (2007); Hirata et al. (2007); Jorgenson et al. (2005); Schaefer et al. (2005); Young et al. (2004)
TLR7	Endosome	x	x	–	ssRNA	Virus, bacteria	Aflatoonian et al. (2007)
TLR8	Endosome	x	x	–	ssRNA	Virus, bacteria	Aflatoonian et al. (2007)
TLR9	Endosome	x	x	x	CpG-rich unmethylated ssDNA	Virus, bacteria	Aflatoonian et al. (2007); Hirata et al. (2007); Young et al. (2004)
TLR10	Endosome	x	x	x	Unknown		Aflatoonian et al. (2007)
Nod-like receptor							
Nod1	Cytoplasm	x	Low	–	Peptidoglycan (gram pos. bacteria cell wall component)	Gram pos./neg. Bacteria	Ghosh et al. (2013); King et al. (2009)
Nod2	Cytoplasm	x	x	x	Muramyl dipeptide	Gram pos./neg. Bacteria	Ghosh et al. (2013); King et al. (2009)
Inflammasome	Cytoplasm	x	Low	nd	Muramyl dipeptide	Gram pos./neg. Bacteria	D'Ipollito et al. (2016)
RIG-I-like receptor							
RIG-I	Cytoplasm	x	Low	nd	Short/5'triphosphate dsRNA	Virus	Ghosh et al. (2013)
MDA-5	Cytoplasm	x	Low	nd	dsRNA, preference for long segments	Virus	Ghosh et al. (2013)
C-type lectin							
E.g. Dectins, mannose-binding lectin	Plasma membrane/ endosome/ secreted	(x)	(x)	nd	β -Glucan, zymosan (yeast cell wall), carbohydrates	Virus, fungi	Oger et al. (2009)

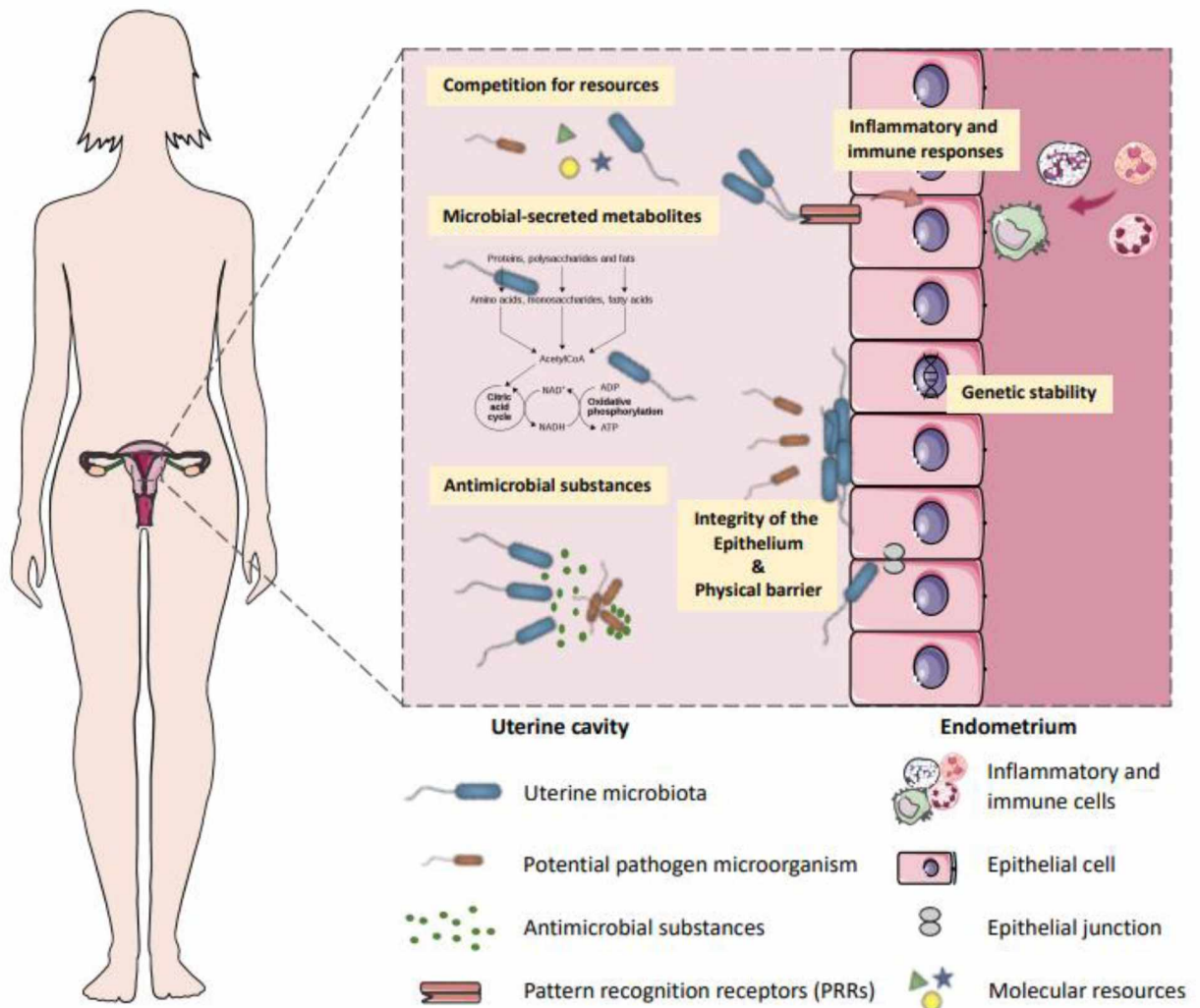
Εικόνα 3: Έκφραση PRRs σε κύτταρα ενδομητρίου. (Benner M. et al. Hum Reprod Update. 2018)

A.1.4 Επιθηλιακά κύτταρα και προσαρμογή ιστού κατά την εμφύτευση

Εκτός από τα λεμφοκύτταρα, τα επιθηλιακά κύτταρα διαδραματίζουν έναν καθοριστικό ρόλο στο συμβιωτικό αποικισμό των ιστών. Τα επιθηλιακά κύτταρα μαζί με τα συμβιωτικά βακτήρια αποτελούν ένα φυσικό φραγμό έναντι των παθογόνων. Αυξανόμενα στοιχεία αναδεικνύουν τη σημασία των μικροβίων στην ανάπτυξη του εντέρου και τη μορφογένεσή του. Γνωστές προσαρμογές που οφείλονται στο μικροβίωμα του εντέρου, είναι η εντερική επιθηλιακή κυτταρική διαφοροποίηση, η αναγέννηση των επιθηλιακών κυττάρων, η διαμόρφωση της διαπερατότητας των επιθηλιακών κυττάρων και η αγγείωση (vascularization) του εντέρου. Στη μήτρα, τα συμβιωτικά βακτήρια μπορεί να συμβάλλουν στην αναδιαμόρφωση που απαιτείται για μία δεκτική κατάσταση στο ενδομήτριο. Το γένος *Bacteroides*, που αποτελεί το 30% της κοινότητας των βακτηρίων στο ενδομήτριο στο 90% των γυναικών, είναι γνωστό πως συμμετέχει στενά στην ανάπτυξη του εντερικού ιστού επηρεάζοντας την ωρίμανση και τη συντήρηση των επιθηλιακών κυττάρων. Οι Hooper et al., απέδειξαν πως το *B.thetaiotaomicron* προκαλεί γονιδιακή έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην απορρόφηση θρεπτικών συστατικών, στην αγγειογένεση, στην εντερική ωρίμανση και στην ενίσχυση του φραγμού του βλεννογόνου. Τα *Bacteroides*, αποδείχθηκε πως είναι απαραίτητα για την εντερική αγγείωση μέσω σηματοδότησης που μεσολαβείται από τα κύτταρα Paneth, τον κύριο τύπο επιθηλιακών κυττάρων στο έντερο, εκκρίνοντας αντιμικροβιακές ενώσεις. Περαιτέρω μελέτες οι οποίες έκαναν χρήση ενδομητρικών επιθηλιακών κυττάρων, αποδίδουν παρόμοιες φυσιολογικές λειτουργίες στο μικροβίωμα της μήτρας κατά τη διάρκεια της αναδιαμόρφωσης του ενδομητρίου. Οι συνεχείς επανορθωτικές διαδικασίες που ακολουθούν την εκκριτική φάση, μπορεί να ωφεληθούν από μηχανισμούς υποστήριξης του μικροβιώματος. Η δυσβίωση σε αυτή την κρίσιμη περίοδο προετοιμασίας της βλαστοκύστης για εμφύτευση, μπορεί να είναι μία από τις αιτίες που οδηγούν σε μία αποτυχημένη εμφύτευση.

Μία ακόμα ενδιαφέρουσα προσαρμογή ιστού που εμπλέκεται στην περίοδο της εμφύτευσης, είναι η αλλαγή στη λειτουργία του φραγμού στο επιθήλιο του ενδομητρίου. Κάποια χαρακτηριστικά των στενοσυνδέσμων αλλάζουν στις ημέρες 13 έως 22 του εμμηνορροϊκού κύκλου, και θα μπορούσαν να έχουν έναν ευεργετικό ρόλο στην εμφύτευση. Η αναδιανομή των συνδέσμων προσκόλλησης (adherens junctions) και των δεσμοσωμάτων κατά τη διάρκεια των γόνιμων ημερών, μπορεί επίσης να προετοιμάζουν τον ιστό για την εισβολή της τροφοβλάστης. Η λειτουργία των στενοσυνδέσμων ρυθμίζεται από θρεπτικά συστατικά και κυτοκίνες. Ως μία παρενέργεια της αυξημένης διαπερατότητας του ιστού, αυξάνεται και η διαπερατότητα σε βακτήρια της γεννητικής οδού. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ένα περιβάλλον που διεγείρει τα βλεννογόνα ανοσοποιητικά κύτταρα έτσι

ώστε να εκκρίνουν κυτοκίνες, που είναι ευεργετικές κατά την περίοδο την εμφύτευσης της βλαστοκύστης¹².



Εικόνα 4: Το μικροβίωμα του ενδομητρίου μπορεί να συμβάλει στην υγιή φυσιολογία του ενδομητρίου. Κατά την αναγνώριση μορίων από τους PRRs, τα επιθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν διαλυτούς παράγοντες όπως κυτοκίνες, που επηρεάζουν τους τοπικούς πληθυσμούς λεμφοκυττάρων. Τα μικρόβια της μήτρας θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη γονιδιωματική σταθερότητα των επιθηλίων της μήτρας, μέσω της ρύθμισης των μεταγραφικών παραγόντων και άλλων γενομικών και επιγενετικών αλλαγών. Εάν τα βακτήρια υπάρχουν φυσικά στη μήτρα, μπορεί να υπάρξει, παρόμοια αλληλεπίδραση με τα κύτταρα του ξενιστή, όπως και στην περίπτωση του βλεννογόνου του εντέρου. (Molina NM et al. Biomolecules. 2020)

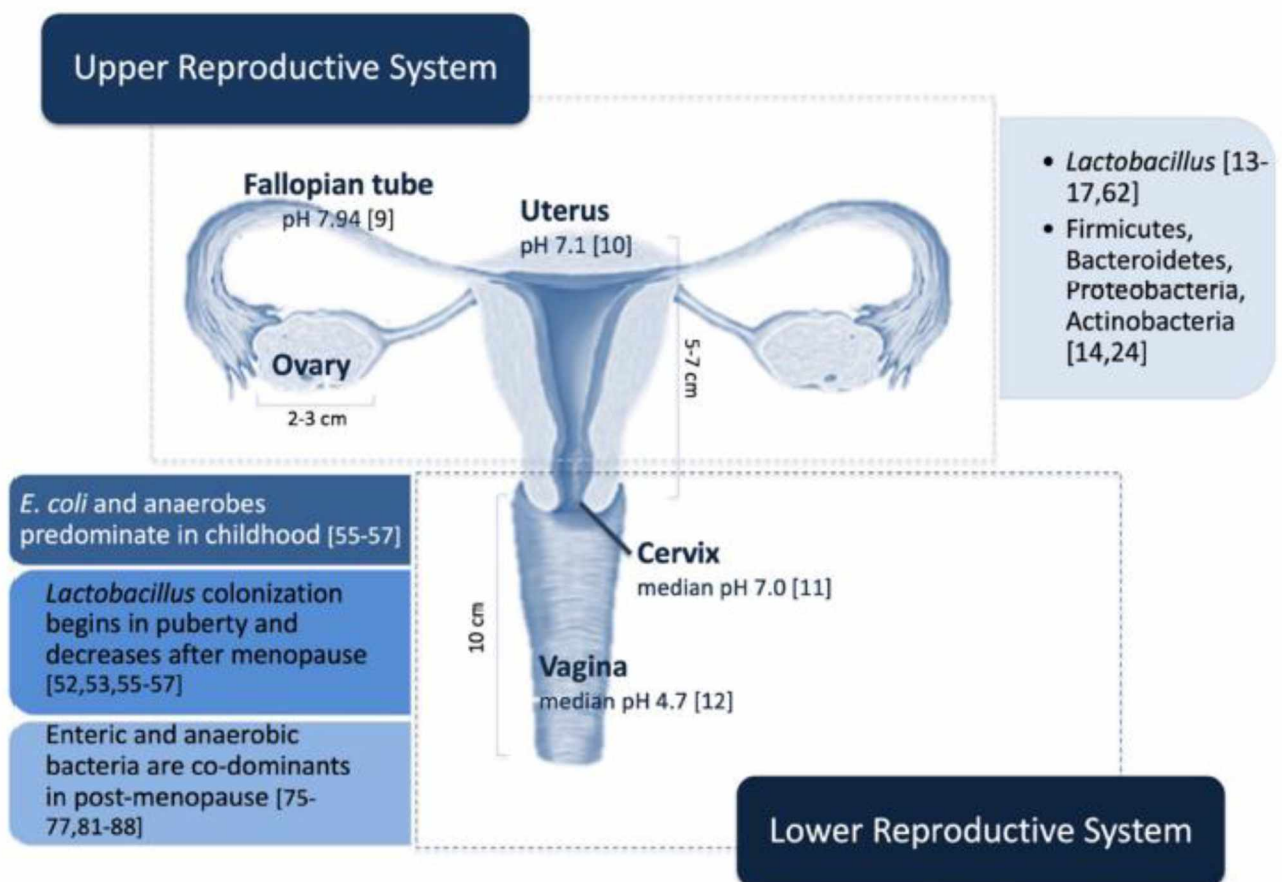
A.1.3 Η υπόθεση του «αποικισμού» της μήτρας

Τα τελευταία χρόνια αυξανόμενα στοιχεία έχουν δείξει την παρουσία μικροοργανισμών, όχι μόνο στον κόλπο αλλά και στο ανώτερο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα (συμπεριλαμβανομένων των ωοθηκών, των σαλπίνγων και τη μήτρα), που για μεγάλο χρονικό διάστημα θεωρείτο ως στείρο.

Μόλις πρόσφατα, μεταγονιδιωματικές μελέτες έδειξαν πως το ανώτερο αναπαραγωγικό σύστημα, το οποίο περιλαμβάνει τις ωοθήκες, τις σάλπιγγες και τη μήτρα, δεν είναι στείρο, αλλά φιλοξενεί ένα συγκεκριμένο μικροβιακό προφίλ (Εικ. 2). Πριν από περίπου 30 χρόνια, καλλιιεργήθηκαν για πρώτη φορά βακτήρια σε δείγματα ενδομητρίου¹³. Αργότερα οι Mitchell et al. απέδειξαν την παρουσία συγκεκριμένων βακτηρίων στη μήτρα, διαφορετικών από αυτά που υπάρχουν στον κόλπο, ακόμη και αν ο πλούτος των ειδών ήταν χαμηλότερος στη μήτρα¹⁴. Σύμφωνα με τα τελευταία ευρήματα, οι Chen et al., χρησιμοποιώντας τόσο ποσοτική PCR όσο και αλληλούχηση επόμενης γενιάς (NGS), ανακάλυψαν πως το ανώτερο αναπαραγωγικό σύστημα φιλοξενεί περίπου 10.000 λιγότερα βακτήρια από τον κόλπο¹⁵. Αυτό το χαμηλότερο βακτηριακό φορτίο μπορεί να οφείλεται στο φραγμό που υπάρχει ανάμεσα σε κόλπο και μήτρα, και εμποδίζει την άνοδο μικροβίων από τον κόλπο σε αυτή, σε κάποιες ανοσολογικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο περιβάλλον της μήτρας, αλλά και σε συγκεκριμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επιτρέπουν την ανάπτυξη ορισμένων μόνο taxa βακτηρίων. Παρόλη τη χαμηλή βιομάζα, το μικροβίωμα της μήτρας εμφανίζεται ενεργό, ενώ τα πιο άφθονα φύλλα βακτηρίων σε αυτή φαίνεται πως είναι τα Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria και Actinobacteria. Τέλος, οι Lactobacillus φαίνεται πως είναι το πιο εκπροσωπούμενο γένος στο ενδομήτριο¹⁶.

Το μικροβίωμα του ενδομητρίου έχει προταθεί πως μπορεί να τροποποιήσει τις λειτουργίες των ενδομητρικών κυττάρων και του τοπικού ανοσοποιητικού συστήματος, όπως και να βοηθήσει στην πρόληψη λοιμώξεων της μήτρας, ανταγωνιζόμενο παθογόνους μικροοργανισμούς και παράγοντας προστατευτικά μόρια. Ωστόσο, λόγω των δυσκολιών στη λήψη δειγμάτων του ανώτερου αναπαραγωγικού συστήματος από υγιείς γυναίκες, λίγα στοιχεία είναι διαθέσιμα μέχρι σήμερα. Οι Moreno et al., συγκρίνοντας το μικροβίωμα από ενδομήτριο και κόλπο γόνιμων και υγιών γυναικών, επιβεβαίωσαν τον επιπολασμό των ειδών Lactobacillus σε αυτά, ενώ παρόμοιο μικροβιακό προφίλ βρέθηκε μεταξύ κόλπου και ενδομητρίου στο 80% των περιπτώσεων¹⁷. Παρόμοια αποτελέσματα επιτεύχθηκαν και από τους Kyono et al., έστω και σε ένα μικρότερο πληθυσμό δειγμάτων¹⁸. Συνολικά αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν την υπόθεση μιας συνέχειας μικροβίων κατά μήκος του αναπαραγωγικού συστήματος, με την άνοδο των μικροβίων σε αυτό από τον κόλπο.

Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί, πως υπάρχει ακόμη συζήτηση για τον εάν όντως η ανώτερη γεννητική οδός φιλοξενεί βακτήρια. Αρκετές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει NGS για την εκτίμηση της παρουσίας βακτηρίων στον πλακούντα και για τη συσχέτισή τους σε διαφορετικές συνθήκες υγείας. Από την άλλη, πολλές μελέτες έχοντας υπόψιν το bias που μπορεί να προκληθεί λόγω επιμόλυνσης σε δείγματα με τόσο χαμηλή βιομάζα, δεν ανίχνευσαν βακτήρια στον πλακούντα¹⁹. Η «υπόθεση του αποικισμού της μήτρας» εξακολουθεί να είναι αδύναμη, καθώς οι χρησιμοποιούμενες μοριακές προσεγγίσεις έχουν ένα όριο ανίχνευσης, το οποίο ίσως δεν είναι ικανό να αναλύσει μικροβιακούς πληθυσμούς χαμηλής βιομάζας. Για τον καθορισμό της ποικιλότητας τέτοιων δειγμάτων είναι αναγκαίες οι καλά σχεδιασμένες μελέτες ελέγχου μεγάλων αριθμών δειγμάτων, οι οποίες θα λαμβάνουν υπόψιν εργαστηριακές πηγές μόλυνσης αλλά και τα τεχνικά όρια της κάθε μεθόδου, έτσι ώστε να αντιμετωπίζεται το πρόβλημα εμφάνισης bias στα αποτελέσματα. Αυτό θα επιτρέψει να καθοριστούν οι λειτουργίες του μικροβιώματος του άνω αναπαραγωγικού συστήματος και να οριστεί ο ρόλος του σε αυτό.



Εικόνα 5: Το μικροβίωμα του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν είναι στείρο, αλλά φιλοξενεί μία συγκεκριμένη σύνθεση μικροβιώματος. (Tomaiuolo R. et al. Microbiota and Human Reproduction: The Case of Female Infertility, 2020 May).

A.1.4 Κολπικό μικροβίωμα

Το ανθρώπινο κολπικό μικροβίωμα περιλαμβάνει μία ποικιλία ωφέλιμων μικροβίων αλλά και παθογόνων, τα οποία κατοικούν στο κολπικό περιβάλλον. Τα αυτόχθονα μικροβιώτα στο κολπικό περιβάλλον φαίνεται πως είναι σε συμβιωτική σχέση με τον ξενιστή. Μύκητες και συγκεκριμένα είδη *Candida*, είναι πιθανό να υπάρχουν στον βλεννογόνο του κόλπου και να αποτελούν μέρος του πολύπλοκου κολπικού οικοσυστήματος μαζί με άλλα βακτήρια. Η διακύμανση στη σύσταση μικροβίων και μυκήτων σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας εξαρτάται από ορμονικές αλλαγές, την ηλικία, τις σεξουαλικές πρακτικές και τη χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων. Η μικροβιακή δυσβίωση στον κόλπο οδηγεί σε υπερανάπτυξη διάφορων παθογόνων και τελικά συμβάλει σε εμφάνιση νόσου.

Η κολπική δυσβίωση αναφέρεται στη διαταραχή της μικροβιακής κοινότητας στον κόλπο και συχνά σχετίζεται με αρκετές γυναικολογικές παθήσεις. Πολλαπλές μελέτες έχουν αποδείξει τη σχέση μεταξύ της κολπικής δυσβίωσης και αυξημένων κολπικών λοιμώξεων, όπως της βακτηριακής κολπίτιδας, της αιδιοκολπικής καντιντίασης και των σεξουαλικά μεταδιδόμενων λοιμώξεων (HPV, χλαμύδια, CT)²⁰. Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά της δυσβίωσης είναι οι αλλαγές στο pH του κόλπου. Σε πρόσφατη μελέτη, σημαντικά υψηλότερο κολπικό pH, που προκαλείται από μειωμένη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος παρατηρήθηκε σε γυναίκες με βακτηριακή κολπίτιδα, CT και αιδιοκολπική καντιντίαση σε σχέση με υγιείς γυναίκες²¹. Αλλαγές στο μικροβίωμα του κόλπου μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε σοβαρά γυναικολογικά προβλήματα, όπως είναι η απώλεια εγκυμοσύνης, ο πρόωρος τοκετός και η μειωμένη ικανότητα σύλληψης.

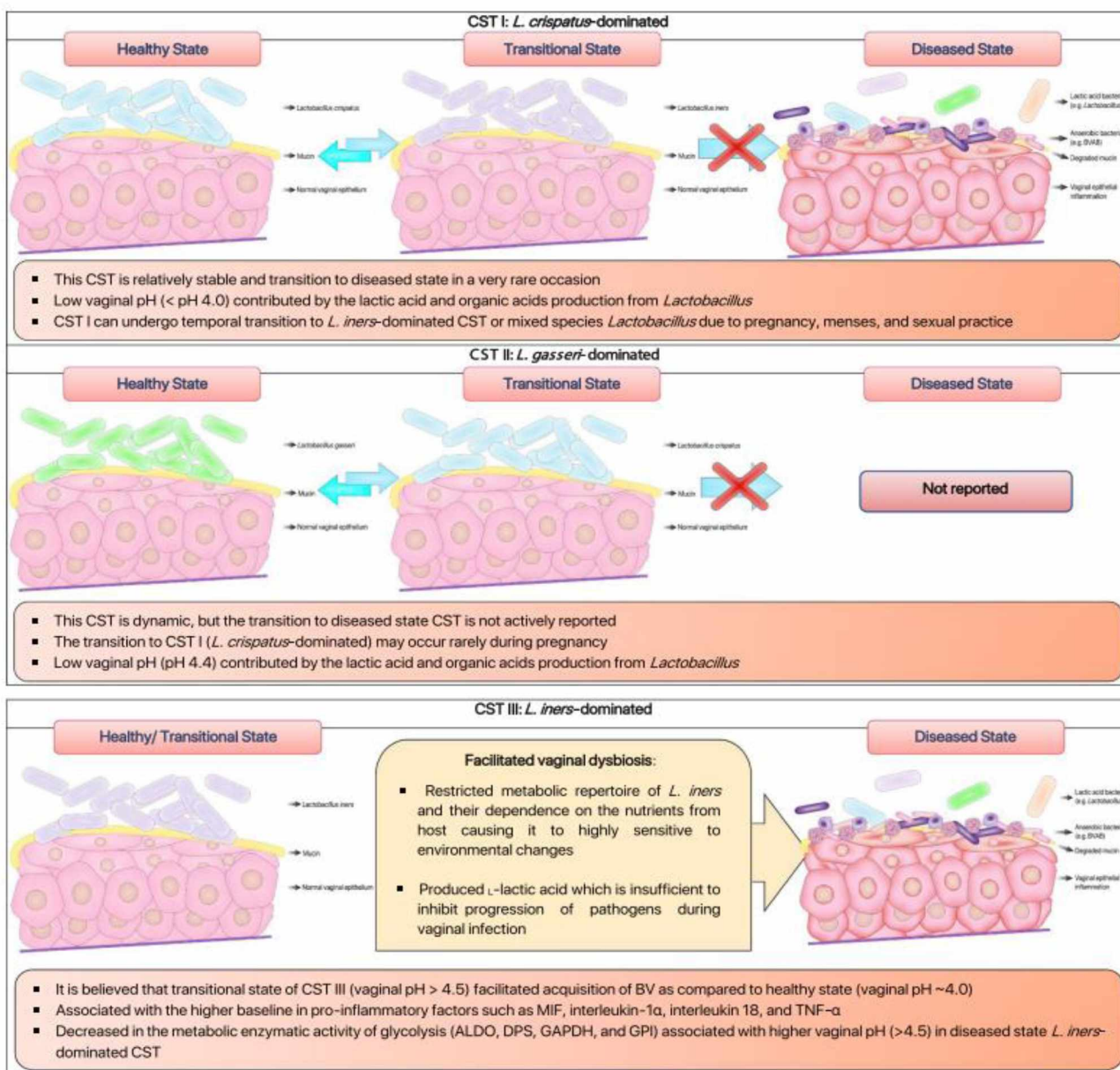
Κατά την τελευταία δεκαετία, οι έρευνες που αφορούν το κολπικό μικροβίωμα έχουν αυξηθεί εκθετικά. Οι συγκεκριμένες μελέτες αποκάλυψαν την ποικιλία των μικροβιακών κοινοτήτων που διαμορφώνουν μία ξεχωριστή σύνθεση μικροβιώματος στο γυναικείο κόλπο. Το σύνολο των ευρημάτων των μελετών πρότειναν πως υπάρχει κυριαρχία της κοινότητας λακτοβάκιλλων στο υγιές κολπικό περιβάλλον, ενώ ένα υψηλό κολπικό pH (λιγότερο όξινο) είναι πιθανό να παρατηρηθεί σε νοσηρές κολπικές συνθήκες. Τα πιο κοινά είδη λακτοβάκιλλων που παρατηρούνται στο κολπικό περιβάλλον είναι τα *Lactobasillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* και *Lactobacillus jensenii*²². Οι αλλαγές στη σύνθεση των μικροβίων του ανθρώπινου κόλπου μπορούν να συμβούν σε διαφορετικά στάδια της ζωής, όπως είναι η βρεφική ηλικία, η εφηβεία, η εγκυμοσύνη και η εμμηνόπαυση. Επιπλέον, οι ορμονικές αλλαγές, η ανεξέλεγκτη χρήση αντιβιοτικών, η έμμηνος ρύση και οι κολπικές πλύσεις είναι κοινοί παράγοντες που οδηγούν σε χρόνιες αλλαγές στο ανθρώπινο κολπικό μικροβίωμα²³.

Οι σχετικές αφθονίες των κυρίαρχων βακτηρίων γαλακτικού οξέος (LAB) στον υγιή κόλπο, καθορίζουν τους τύπους της κοινότητας βακτηρίων του κόλπου, γνωστούς και ως CSTs. Τα CSTs ομαδοποιούνται ως CST I, II, III, IV, και V με καθένα από τα CST να κυριαρχείται από *L.crisparatus*, *L.gasseri*, *L.iners*, πολυμικροβιακά προφίλ που συμπεριλαμβάνουν βακτήρια του γένους *Lactobasillus* και βακτήρια που σχετίζονται με τη βακτηριακή κολπίτιδα (BVAB), και τέλος *L.jensenii* αντίστοιχα. Ενώ οι καταστάσεις CST I, III, και IV έχουν μελετηθεί εκτενώς και εμφανίζονται συνήθως στις γυναίκες, οι καταστάσεις CST II και V σπάνια εντοπίζονται σε γυναίκες²⁴.

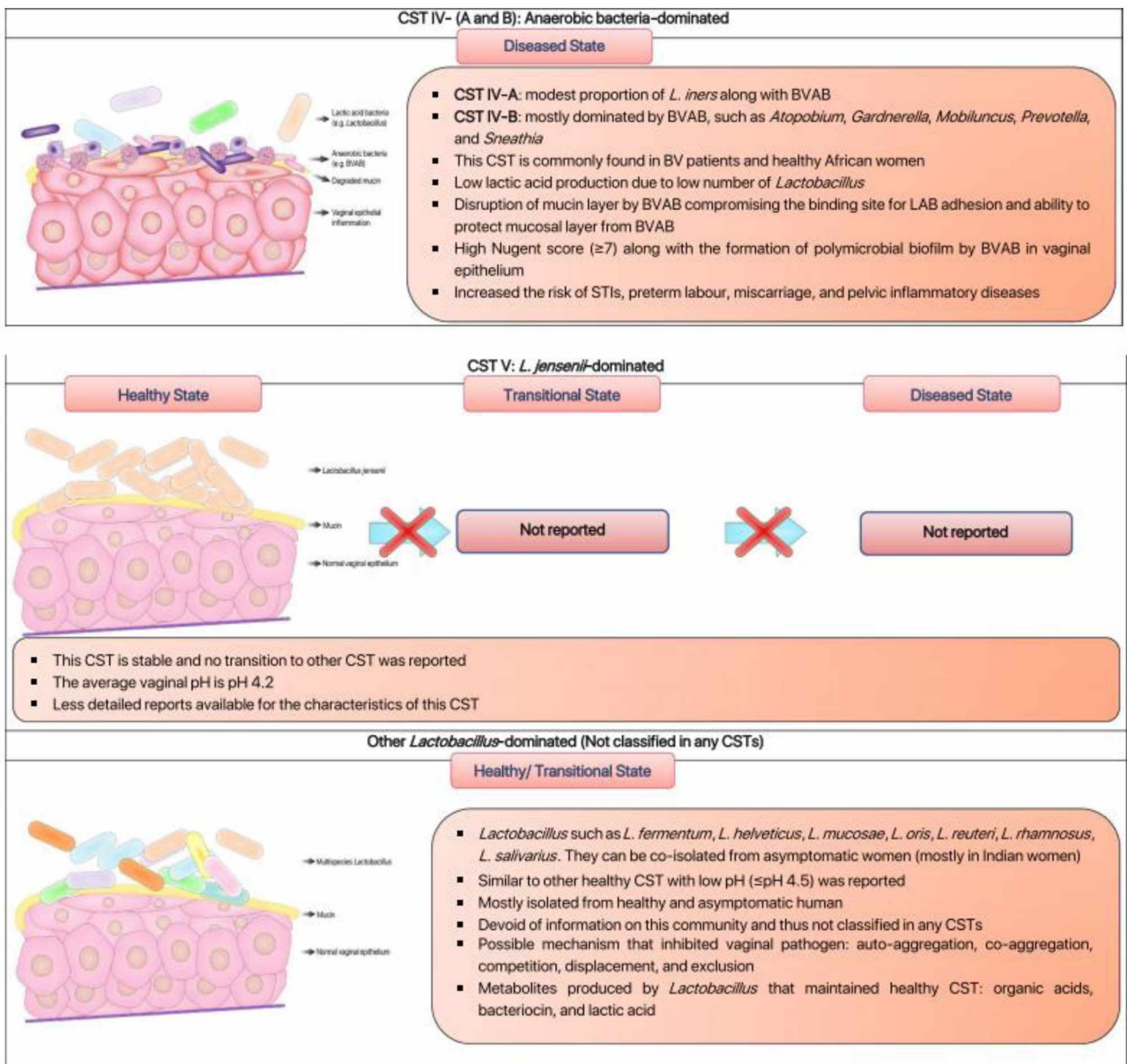
Η παρουσία *L.iners* στο CTS III και CTS IV συσχετίστηκαν με υψηλότερη αντίσταση (baseline) σε προμολυσματικούς παράγοντες όπως είναι ο ανασταλτικός παράγοντας μετανάστευσης μακροφάγων (MIF), η ιντερλευκίνη-1 α , η ιντερλευκίνη 18 και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (TNF- α), που είναι υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση φλεγμονώδων απαντήσεων στον κόλπο. Το κολπικό μικροβίωμα που κυριαρχείται από *L.crisparatus* (CST I), σχετίζεται πάντα με το προφίλ ενός υγιούς κόλπου, ενώ το κολπικό περιβάλλον που κυριαρχείται από *L.iners* (CST III) είναι πιο επιρρεπές στην κολπική δυσβίωση. Πολλαπλές μελέτες έχουν δείξει πως το προστατευτικό αποτέλεσμα του *L.crisparatus* έναντι των σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων και της βακτηριακής κολπίτιδας, συνδέεται με την ικανότητά του για παραγωγή γαλακτικού οξέος και βακτηριοκίνης, που διατηρούν την υγιή κατάσταση του κόλπου. Ταυτόχρονα, η έλλειψη βασικής σύνθεσης αμινοξέων από το *L.iners*, το αναγκάζουν να βασίζεται σε μεγάλο βαθμό σε εξωγενή αμινοξέα, τα οποία προέρχονται από τον ξενιστή. Το περιορισμένο μεταβολικό του ρεπερτόριο και η εξάρτησή του από τα θρεπτικά συστατικά του ξενιστή, το καθιστούν ευαίσθητο στις περιβαλλοντικές αλλαγές. Επιπλέον, παράγει μία ξεχωριστή ισομερή μορφή γαλακτικού οξέος (L-γαλακτικό οξύ)²⁵, η οποία είναι ανεπαρκής στην καταστολή παθογόνων κατά τη διάρκεια κολπικής λοίμωξης.

Όπως αναφέρθηκε, μία πληθώρα ερευνών έδειξε πως η ανθρώπινη κολπική σύνθεση διαφοροποιείται σημαντικά μεταξύ ατόμων και επηρεάζεται αρκετά από ορμόνες (εγκυμοσύνη και έμμηνος ρύση), όπως και από την εθνότητα των ατόμων. Οι επίδραση των ορμονών, και ιδιαίτερα της οιστραδιόλης μπορεί να διεγείρει τη μετάβαση του CST I (*L.crisparatus*) σε CST III (*L.iners*) ή σε μία μικτή κοινότητα λακτοβάκιλλων, αλλά σπάνια σε μία παθολογική κοινότητα μικροβίων. Οι καταστάσεις CST IV και CST III εντοπίστηκαν κυρίως σε άτομα Αφρικανικής ιθαγένειας. Είναι πιθανό πως γενετικοί παράγοντες σε αυτές τις ομάδες μπορεί να μεταβάλουν τις ανοσολογικές αντιδράσεις οι οποίες ευνοούν των αποικισμό των *L.iners* και άλλων παθογόνων που προκαλούν κολπική δυσβίωση²⁶. Σε γυναίκες της Ασίας και λευκές γυναίκες, το κύριο κολπικό μικροβίωμα αποτελείται από είδη λακτοβάκιλων σε ποσοστό 80,2% και 89,7% αντίστοιχα. Αντίθετα, οι

λακτοβάκιλοι δεν είναι το μοναδικό γένος μικροοργανισμών που εμφανίζονται σε μαύρες και ισπανόφωνες γυναίκες (μόνο 59,6% και 61,9% αντίστοιχα). Μία μελέτη σε 151 γυναίκες (65 HPV θετικές, 86 HPV αρνητικές), αποκάλυψε πως ο HPV σχετίζεται σημαντικά με την υψηλή παρουσία αναερόβιων μικροοργανισμών όπως τα *Bacteroides plebeius*, *Acinetobacter Iwofi* και *Prevotella buccae*. Αυτά τα ευρήματα υπονοούσαν πως υψηλή ποικιλομορφία κολπικής μικροβίωσης αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο απόκτησης HPV. Μία διατάραξη στο μικροβίωμα του κόλπου, μπορεί να επηρεάσει την έμφυτη ανοσία του ξενιστή έναντι της λοίμωξης από HPV, που μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας²⁷.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των ανθρώπινων κολπικών βακτηριακών κοινοτήτων (CSTs) με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία. (Chee, Chew, & Than. Vaginal microbiota and the potential of Lactobacillus derivatives in maintaining vaginal health, 2020).



Εικόνα 6 συνέχεια

A.1.5 Πρώιμες αναλύσεις μικροβιώματος

Ο αριθμός των μικροοργανισμών που συνυπάρχουν μέσα και επάνω στο ανθρώπινο σώμα εκτιμάται πως είναι ανάλογος με το συνολικό αριθμό κυττάρων που αποτελούν το σώμα. Οι μικροοργανισμοί που αποικούν το ανθρώπινο σώμα αναφέρονται ως μικροβιώτα. Τα μικροβιώτα συνιστούν τη δεξαμενή των μικροβίων που φιλοξενούνται στο ανθρώπινο σώμα και εκτός από βακτήρια περιλαμβάνουν ιούς, μύκητες, ζύμες, αρχαία και πρωτόζωα. Το συλλογικό γενετικό περιεχόμενο αυτών των μικροοργανισμών και οι περιβάλλοντες συνθήκες είναι γνωστές ως μικροβίωμα. Ο συνδυασμός του συνόλου των μικροβιακών και ανθρώπινων κυττάρων θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μία οικολογική και βιολογική μονάδα, το λεγόμενο ανθρώπινο ολοβίωμα (holobiont). Η σχέση μεταξύ ξενιστή και μικροβιώματος μπορεί να χαρακτηριστεί ως κοινοπραξία (το ένα είδος ωφελείται, ενώ το άλλο παραμένει ανεπηρέαστο), αμοιβαία (ευεργετική και για τα δύο είδη), ή παρασιτική (το ένα είδος να ωφελείται εις βάρος του άλλου)²⁸.

Η χρήση μικροσκοπίου υπήρξε εδώ και δεκαετίες ο ακρογωνιαίος λίθος ταυτοποίησης των μικροβίων. Τα βακτήρια μπορούν να αναγνωριστούν και να ταξινομηθούν με βάση τα χαρακτηριστικά τους, όπως είναι η χρώση Gram και η μορφολογία των κυττάρων (σχήμα, διάταξη, μορφή και μέγεθος). Η μικροσκοπία χρησιμοποιείται ακόμη σαν τεχνική σε κλινικά δείγματα για τη διάγνωση ορισμένων μολυσματικών ασθενειών. Στον τομέα της ανθρώπινης αναπαραγωγής, η μικροσκοπία εξακολουθεί να έχει ένα σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση κυτταρικών ενδείξεων ή στον προσδιορισμό του Nugent Score στην περίπτωση της βακτηριακής κολπίτιδας. Παρόλα αυτά μία πρόσφατη μελέτη έδειξε πως η ευαισθησία της διάγνωσης του ιατρού στη βακτηριακή κολπίτιδα είναι σημαντικά χαμηλότερη από τη διερεύνηση του περιστατικού με χρήση PCR τεχνικών²⁹.

Οι μέθοδοι που εξαρτώνται από την καλλιέργεια των μικροοργανισμών ήταν οι πρώτες τεχνικές, μετά τη μικροσκοπία, που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των μικροοργανισμών και τον καθορισμό των κατάλληλων μέσων ανάπτυξής τους. Ύστερα από ένα συγκεκριμένο χρονικό περιθώριο καλλιέργειας, τα διαφορετικά γένη μπορούν να καθοριστούν με την αξιολόγηση της χρώσης των κυττάρων, τη μορφολογία τους και την ικανότητά τους για διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις. Παρόλο που αυτές οι μέθοδοι δεν κοστίζουν, είναι αρκετά χρονοβόρες και περίπλοκες και μόνο τα μικρόβια των οποίων οι μεταβολικές και φυσιολογικές ανάγκες παρέχονται από το συγκεκριμένο μέσο ανάπτυξης θα πολλαπλασιαστούν ενώ θα καταστείλουν τα υπόλοιπα είδη που μπορεί να υπάρχουν στο δείγμα. Επομένως, ο μεγαλύτερος περιορισμός αυτής της τεχνικής είναι πως η προκύπτουσα μικροβιακή σύνθεση είναι ατελής και μη αντιπροσωπευτική³⁰.

A.2 16S rRNA

Όταν υπάρχει υποψία μόλυνσης, η έγκαιρη και ακριβής αναγνώριση των παθογόνων μπορεί να βελτιώσει τα αποτελέσματα των ασθενών και να μειώσει την υπερβολική χρήση αντιβιοτικών ευρέος φάσματος. Το ισχύον πρότυπο για τη διάγνωση λοιμώξεων είναι με βάση την καλλιέργεια ενός δείγματος και ακολουθείται από μορφολογικές και βιοχημικές μεθόδους για τον εντοπισμό των παθογόνων. Παρά τη διαδεδομένη χρήση και χρησιμότητά της, η διάγνωση μέσω της καλλιέργειας μικροοργανισμών, βασίζεται στην ανάπτυξη ενός ή μερικών κυρίαρχων μικροοργανισμών, έναντι των πολλών δυνητικά κλινικά σημαντικών οργανισμών που μπορεί να υπάρχουν στο δείγμα³¹.

Η ταυτοποίηση των βακτηρίων με βάση τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους δεν είναι τόσο ακριβής όσο η ταυτοποίησή τους με βάση γονοτυπικές μεθόδους. Η σύγκριση της βακτηριακής αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου έχει προκύψει ως η προτιμώμενη γενετική τεχνική. Η ανάλυση αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου μπορεί να αναγνωρίσει καλύτερα τα κακώς περιγραφόμενα, σπάνια απομονωμένα ή φαινοτυπικά παρεκκλίνοντα στελέχη, και μπορεί να οδηγήσει στην αναγνώριση νέων παθογόνων και μη καλλιεργημένων βακτηρίων.

Στη δεκαετία του 1980, άρχισε να αναπτύσσεται ένα νέο πρότυπο για τον εντοπισμό βακτηρίων. Αποδείχθηκε πως οι φυλογενετικές σχέσεις των βακτηρίων θα μπορούσαν να προσδιοριστούν συγκρίνοντας ένα σταθερό μέρος του γενετικού τους κώδικα. Το μέρος του DNA που χρησιμοποιείται πιο συχνά για ταξινομικούς σκοπούς στα βακτήρια είναι το γονίδιο 16S rRNA. Το συγκεκριμένο γονίδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για σύγκριση όχι μόνο μεταξύ των βακτηρίων, αλλά και με το γονίδιο 16S rRNA των αρχαιοβακτηρίων και το 18S rRNA γονίδιο των ευκαρυωτών.

Το 16S rRNA γονίδιο συμπεριφέρεται ως ένα μοριακό χρονόμετρο, ενώ ο βαθμός διατήρησής του θεωρείται πως προκύπτει από τη σημασία του 16S rRNA στην κυτταρική λειτουργία. Παρόλα αυτά ο ρυθμός μεταβλητότητας του γονιδίου μπορεί να μην είναι πανομοιότυπος για όλους τους οργανισμούς, ενώ διαφορετικές ταξινομικές ομάδες θα μπορούσαν να έχουν διαφορετικούς ρυθμούς μεταβολής του γονιδίου. Τα ποσοστά μεταλλαξιγένεσης θα μπορούσαν να ποικίλουν κατά καιρούς κατά τη διάρκεια της εξέλιξης και τα ποσοστά των μεταλλάξεων θα μπορούσαν να είναι διαφορετικά σε διαφορετικές θέσεις του γονιδίου. Υπάρχουν τα λεγόμενα «hot spots» που παρουσιάζουν μεγάλα ποσοστά μεταλλάξεων, χωρίς να είναι τα ίδια για όλα τα είδη. Επιπλέον το 16S rRNA εξυπηρετεί ως στόχος για αρκετούς αντιμικροβιακούς φορείς. Συνεπώς μεταλλάξεις στο γονίδιο μπορούν να επηρεάσουν την ευαισθησία του οργανισμού σε τέτοιους παράγοντες και να αποτελέσουν εργαλείο διάκρισης των μικροοργανισμών σε αντιμικροβιακούς φορείς³².

Η αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου έχει μήκος περίπου 1.550 bp και αποτελείται από μεταβλητές και διατηρημένες περιοχές. Το γονίδιο είναι αρκετά μεγάλο, με επαρκείς ενδοειδικούς πολυμορφισμούς, έτσι ώστε να παρέχει διακριτικές και στατιστικά έγκυρες μετρήσεις³³. Παράλληλα, το 16S rRNA γονίδιο είναι καθολικό στα βακτήρια, συνεπώς οι σχέσεις μπορούν να μετρηθούν μεταξύ όλων των βακτηρίων. Γενικά η σύγκριση του 16S rRNA γονιδίου επιτρέπει τη διάκριση σε επίπεδο γένους σε όλα τα κύρια φύλλα των βακτηρίων, αλλά και σε επίπεδο είδους και υποείδους σε αρκετά. Οι περιστασιακές εξαιρέσεις στη χρησιμότητα της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA σχετίζονται συνήθως με περισσότερα από ένα γνωστά είδη που εμφανίζουν τις ίδιες ή πολύ παρόμοιες αλληλουχίες.

Η ποικιλία των μικροοργανισμών σε μια δεδομένη τοποθεσία του σώματος ορίζεται ως ο αριθμός των διαφορετικών οργανισμών στη συγκεκριμένη τοποθεσία. Ο πιο άφθονος μικροοργανισμός ονομάζεται κυρίαρχος και κάθε περιοχή εντός του ανθρώπινου σώματος έχει τη δική του χαρακτηριστική σύνθεση. Διάκριση στην ποικιλομορφία των μικροοργανισμών πραγματοποιείται εντός (alpha diversity) και μεταξύ των δειγμάτων (beta diversity). Το alpha diversity αναφέρεται στη μέση ποικιλότητα των ειδών στην περιοχή ενδιαφέροντος, ενώ το beta diversity αντικατοπτρίζει τη διαφορετικότητα μεταξύ των διαφορετικών περιοχών ενδιαφέροντος, αν και όλα τα μικρόβια επηρεάζονται και αλληλοεπιδρούν ενεργά μεταξύ τους³³.

A.3 Αλληλούχηση Νέας Γενιάς (NGS) – 16S Metagenomics

Οι αναλύσεις των αλληλουχιών DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να απαντήσουν σε διάφορα διαγνωστικά ερωτήματα, όπως είναι η γενετική σχέση μεταξύ βακτηρίων ή ιών, η ανίχνευση μεταλλάξεων σε γονιδιώματα ιών ή βακτηρίων που οδηγούν σε αντίσταση κατά των ιών ή των αντιβιοτικών, η αναγνώριση μυκήτων μέσω αναλύσεων της αλληλουχίας του 18S rDNA, της περιοχής ITS, και η ταυτοποίηση βακτηρίων μέσω των αναλύσεων της αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου. Γενικά γι' αυτές τις διεργασίες χρησιμοποιείται η αλληλούχηση κατά Sanger, της οποίας προηγείται η ενίσχυση κάθε γονιδίου ή γενωμικής περιοχής χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους εκκινητές. Η ίδια μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί για τον εντοπισμό παθογόνων παραγόντων στο κλινικό υλικό. Ωστόσο, αυτή η προσέγγιση καθίσταται προβληματική όταν το κλινικό υλικό είναι πιο περίπλοκο και περιέχει πολλαπλά είδη, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση των κοπράνων. Σε τέτοιες περιπτώσεις τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με τη μέθοδο Sanger δεν είναι αξιόπιστα και καθιστούν δύσκολο τον εντοπισμό συγκεκριμένων παθογόνων παραγόντων. Επιπλέον, το κόστος χρήσης της αλληλούχησης κατά Sanger για αυτές τις περιπτώσεις είναι υψηλό και ο χρόνος ολοκλήρωσης των αποτελεσμάτων μεγάλος.

Η Αλληλούχηση Νέας Γενιάς (NGS) επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της αλληλουχίας πολυάριθμων παθογόνων, είτε από απομονωμένα βακτήρια ασθενών, είτε από πολλά είδη που μπορεί να υπάρχουν στο υλικό ενός ατόμου. Το κόστος της συγκεκριμένης τεχνικής έχει μειωθεί δραματικά κατά την τελευταία δεκαετία. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα του NGS, σε σχέση με τη Sanger, είναι πως ένα μόνο πρωτόκολλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για όλα τα παθογόνα έτσι ώστε να γίνει εφικτή η ταυτοποίησή τους. Στο NGS, δεν υπάρχει ανάγκη για εκκινητές ειδικά σχεδιασμένους για τον εκάστοτε στόχο, όπως στην περίπτωση της Sanger. Σε ένα μόνο πείραμα, ολόκληρο το γονιδίωμα ενός οργανισμού αναλύεται τυχαία. Πριν από τον προσδιορισμό της αλληλουχίας, πραγματοποιείται κατακερματισμός του γονιδιώματος, αφού το μέγιστο μέγεθος που μπορεί να αλληλουχηθεί τη φορά κυμαίνεται μεταξύ 100 και 1000 βάσεων και συνεπώς το γονιδίωμα δεν μπορεί να προσδιοριστεί σε ένα μέρος. Άρα, το NGS απαιτεί την προετοιμασία βιβλιοθηκών, στις οποίες θραύσματα DNA συγχωνεύονται σε προσαρμογείς(adaptors) και κωδικούς ιχνηλασιμότητας(barcodes), το οποίο ακολουθείται από ενίσχυση των κλώνων που δημιουργήθηκαν και τέλος αλληλούχηση των εν λόγω κλώνων. Γι' αυτό και απαιτείται μια προετοιμασία των βιβλιοθηκών, οι οποίες θα περιέχουν μια αντιπροσωπευτική πηγή του DNA του γονιδιώματος που βρίσκεται υπό έρευνα.

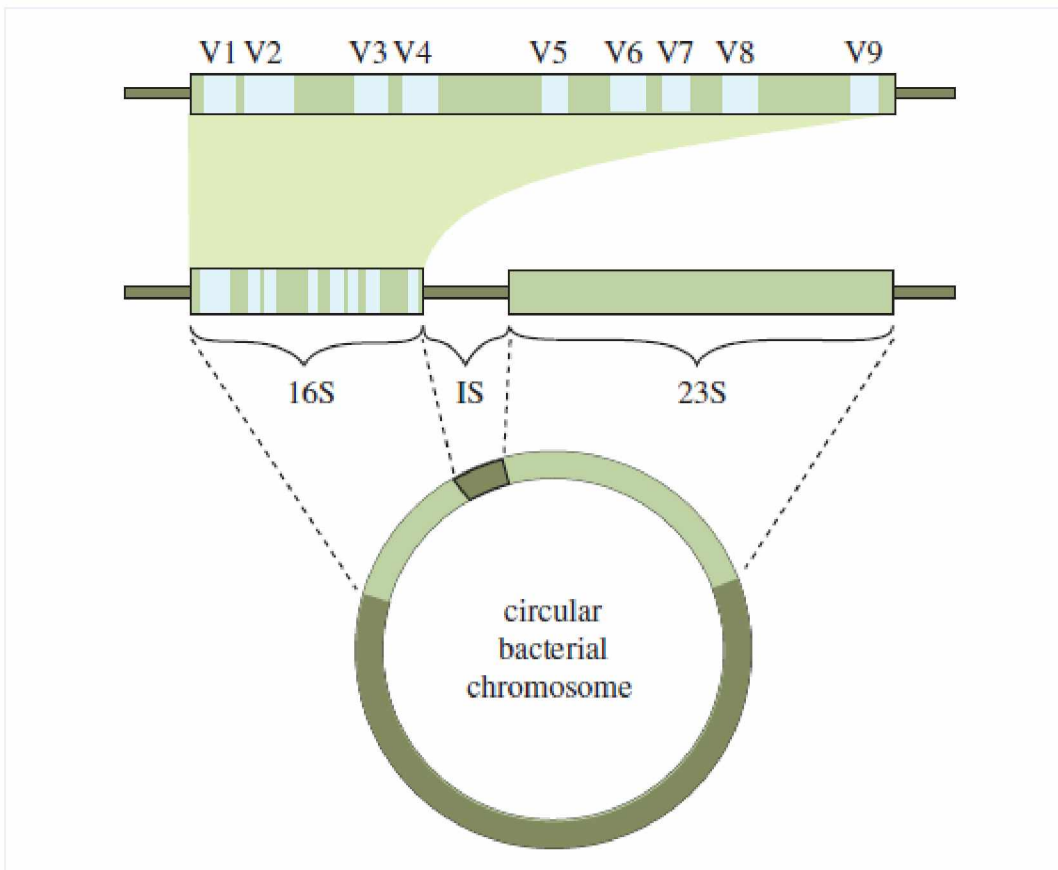
Οι βιβλιοθήκες NGS ενδέχεται να περιέχουν σφάλματα που μειώνουν την ποιότητα των δεδομένων, διαταράσσοντας έτσι την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η λεπτομερής γνώση του είδους

των σφαλμάτων είναι σημαντική έτσι ώστε να βρεθούν τρόποι αποφυγής εισαγωγής τέτοιων σφαλμάτων στο πείραμα, αλλά και για τη σωστή ερμηνεία των δεδομένων που εξάγονται. Σχεδόν σε όλα τα ξεχωριστά βήματα στη διαδικασία της αλληλούχησης μπορούν να εισαχθούν σφάλματα.

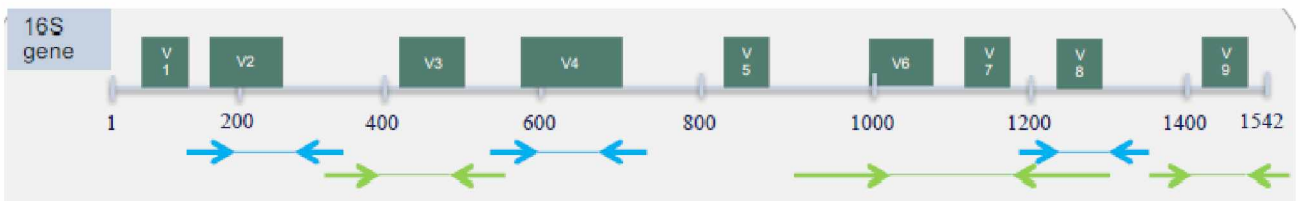
Προς το παρόν είναι διαθέσιμες αρκετές πλατφόρμες NGS. Οι διαφορετικές πλατφόρμες NGS χρησιμοποιούν και διαφορετικές τεχνολογίες αλληλούχησης. Οι γενετικοί αναλυτές της Illumina χρησιμοποιούν τεχνολογία αλληλούχησης με σύνθεση φθορίζοντων τερματιστών αλληλουχίας, ενώ οι γενετικοί αναλυτές της Thermo Fisher χρησιμοποιούν τεχνολογία αλληλούχησης με ημιαγωγούς, που μετρούν αλλαγές στο pH κατά την ενσωμάτωση των νουκλεοτιδίων. Μετά την αλληλούχηση, τα διαδοχικά θραύσματα που έχουν δημιουργηθεί μπορούν να συναρμολογηθούν de novo. Με αυτό τον τρόπο οι αλληλουχίες ευθυγραμμίζονται μεταξύ τους χωρίς τη χρήση ενός οργανισμού αναφοράς. Γενικά όσο μεγαλύτερα είναι τα θραύσματα, τόσο πιο εύκολη και ακριβής θα είναι η συγκρότηση του γονιδιώματος. Διάφορα πακέτα λογισμικού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη συναρμολόγηση των γονιδιωμάτων³⁴.

Η αξιολόγηση της μικροβιακής ποικιλομορφίας, ο εντοπισμός βακτηριακών ειδών και η ταξινομική διάκριση αυτών, είναι πιθανή πλέον λόγω της υψηλής διατήρησης του γονιδίου 16S rRNA στα βακτήρια και τα αρχαία. Η ταξινομική διάκριση είναι δυνατή με τη χρήση των 9 υπερμεταβλητών περιοχών του γονιδίου (V1-V9), που περιέχουν επαρκή ακολουθία και ποικιλομορφία για την ταξινόμηση των μικροβίων. Τις υπερμεταβλητές περιοχές (V1-V9), πλαισιώνουν συντηρημένες περιοχές, συνεπώς είναι δυνατή η χρήση κοινών(universal) εκκινητών για την ενίσχυση των συγκεκριμένων περιοχών με PCR (Εικ. 8,9).

Ωστόσο, δεν υπάρχει καμία υπερμεταβλητή περιοχή που να είναι αρκετά διαφορετική έτσι ώστε να αρκεί για τη διάκριση σε όλα τα βακτηριακά είδη. Για να αντιμετωπιστεί αυτό χρησιμοποιούνται συνδυασμοί υπερμεταβλητών περιοχών και στην περίπτωση της Ion Torrent (Thermo Fisher) ερευνώνται ταυτόχρονα 7 από τις 9 υπερμεταβλητές περιοχές του γονιδίου³⁵.



Εικόνα 8: Αναπαράσταση του κυκλικού χρωμοσώματος των βακτηρίων. Τα γονίδια 16S και 23S rRNA επισημαίνονται μαζί με την περιοχή του διαγονιδιακού χώρου (IS). Οι V1-V9 περιοχές σηματοδοτούν τις μεταβλητές περιοχές, με τις διατηρημένες περιοχές μεταξύ τους. (Koedooder R. et all, Identification and evaluation of the microbiome in the female and male reproductive tracts.)



Εικόνα 9: Υπερμεταβλητές περιοχές 16S rRNA γονιδίου. (Ion 16S metagenomics kit software application note)

Στις μελέτες με θέμα τα 16S Metagenomics και πιο συγκεκριμένα το μικροβίωμα του ενδομητρίου και τη συσχέτισή του με την αναπαραγωγική δυναμική των γυναικών παρατηρείται μία πολύ μεγάλη ανομοιογένεια. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές πλατφόρμες αλληλούχησης που χρησιμοποιούνται, στους διαφορετικούς εκκινήτες που χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση των υπερμεταβλητών περιοχών, στους συνδυασμούς των υπερμεταβλητών περιοχών έτσι ώστε να επιτευχθεί η διάκριση των βακτηριακών ειδών, στις βάσεις δεδομένων αναφοράς των μικροοργανισμών αλλά και στην εθνικότητα των γυναικών, την ηλικία τους, τη διατροφή τους ακόμη και από τον αριθμό των αποτυχημένων κυήσεων (Πίνακας 1). Στην παρούσα μελέτη, έγινε μία διερεύνηση του μικροβιώματος του ενδομητρίου, του κόλπου και του τραχήλου, σε γυναίκες του ελληνικού πληθυσμού, με τη χρήση της πλατφόρμας αλληλούχησης του Ion Torrent.

Δημοσίευση	Μέθοδος αλληλούχησης	No κύκλων PCR	Ποσότητα DNA για PCR
Moreno I et al., 2016	16SrRNA gene V3-V5 region pyrosequencing	30	5μl
Kitaya K. et al., 2019	16SrRNA gene V4 region pyrosequencing, Illumina MiSeq	30	25ng
Kyono K. et al., 2019	16SrRNA gene V4 region sequencing (microbiome analysis performed by 3 rd party)	Not mentioned (microbiome analysis performed by 3 rd party)	(microbiome analysis performed by 3 rd party)
Kyono K. et al., 2018	16SrRNA gene V4 region sequencing, Illumina MiSeq	30	25ng/μl
Franasiak J. M. et al., 2015	16SrRNA gene V2-4-8 and V3-6, 7-9 regions next-generation sequencing Ion 16S Metagenomics Kit	Not mentioned	Not mentioned
Tomoko Hashimoto& KoichiKyono., 2019	16SrRNA gene V4 region sequencing Illumina MiSeq	30	25ng/μl
Wee B. A. et al., 2017	16SrRNA gene V1-V3 region sequencing Illumina MiSeq	29	2μl
Winters D. A. et al., 2019	16SrRNA gene V4 region sequencing Illumina MiSeq	30	5μl
Pelzer E. S. et al., 2018	16SrRNA gene V5 and V8 regions sequencing 454 GS-FLX Titanium platform	30	5μl
Verstraelen H. et al., 2016	16SrRNA gene V1-V2 region sequencing Illumina MiSeq	1 st 20 cycle PCR 2 nd 15 cycle PCR 3 rd 10 cycle PCR	Not mentioned
Yingyu Liu et al., 2018	16SrRNA gene V4 region sequencing Illumina MiSeq	Not mentioned	Not mentioned

Chen C. et al., 2017	16SrRNA gene V4-V5 region sequencing PGM Ion Torrent	25	Not specified
Tao X. et al., 2017	16SrRNA gene V4 region sequencing Illumina MiSeq	1 st PCR 20 cycles 2 nd PCR 8 cycles	1 st PCR 7.5μl (pre-amplified DNA) 2 nd PCR 5μl (purified DNA)
Fang R.-L. et al., 2016	16SrRNA gene V4 region sequencing Illumina Miseq250	Not mentioned	Not mentioned
Leoni C. et al., 2019	16SrRNA gene V5-V6 region Illumina MiSeq	10 and 15 (two-step amplification reaction)	100ng
Yingyu Liu et al., 2019	16SrRNA gene V4 region sequencing Illumina Miseq	Not mentioned	Not mentioned
Carosso A. et al., 2020	16SrRNA gene V3-V4-V6 region sequencing microbiota solution B kit	Not specified	Not specified
Moreno I et al., 2020	16SrRNA gene V2-4-8 and V3-6, 7-9 regions sequencing Ion 16S Metagenomics Kit	Not specified	Not specified
Walther - Antonio et al., 2016	16SrRNA gene V3-V5 region sequencing Illumina MiSeq	34	50ng

Πίνακας 1: Διαφορετικές μελέτες με θέμα τη διερεύνηση του μικροβιώματος του ενδομητρίου μέσω του γονιδίου 16S.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση του μικροβιώματος με τη μέθοδο αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS-16S Metagenomics), σε δείγματα από ενδομήτριο και κόλπο γυναικών που βρίσκονται σε διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης.

B.2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

B2.1 Ασθενείς και όργανα υλικά της μελέτης

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 20 υπογόνιμες γυναίκες που υπόκεινται σε IVF στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «T2EDK-01371 Mi-IVF», σε συνεργασία με το κέντρο υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ΑΚΕΣΩ Έμβρυο a.r.t. Από τις 20 γυναίκες το υλικό στο οποίο έγινε επεξεργασία ήταν υγρό από ενδομήτριο, κολπικό και τραχηλικό επίχρισμα (συνολικά 33 δείγματα κόλλου, τραχήλου και ενδομητρίου). Η ροή εργασιών που ακολουθήθηκε ξεκίνησε από την απομόνωση μικροβιακού DNA από τα εν λόγω υλικά. Στη συνέχεια έλαβε χώρα η ενίσχυση των υπερμεταβλητών περιοχών V1-V9, η δημιουργία των βιβλιοθηκών και η αλληλούχηση με τη χρήση του Ion Torrent (Thermo Fisher). Τέλος, η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε στην πλατφόρμα Ion Reporter.

Τα αντιδραστήρια, τα αναλώσιμα και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη παρουσιάζονται στο παράρτημα 1 (Πίνακες 4, 5, 6,).

B.2.2 Κριτήρια ένταξης και κριτήρια αποκλεισμού γυναικών στη μελέτη

Τα κριτήρια σύμφωνα με τα οποία έγινε η επιλογή των γυναικών που συμπεριλαμβάνονται στη μελέτη είναι τα εξής:

- Γυναίκες <35 ετών με τουλάχιστον ένα έμβρυο καλής ποιότητας στην εμβρυομεταφορά.
- Γυναίκες <40 ετών με τουλάχιστον δύο έμβρυα καλής ποιότητας στην εμβρυομεταφορά.
- Σπέρμα συζύγου/συντρόφου από εκσπερμάτιση και όχι βιοψία όρχεος.

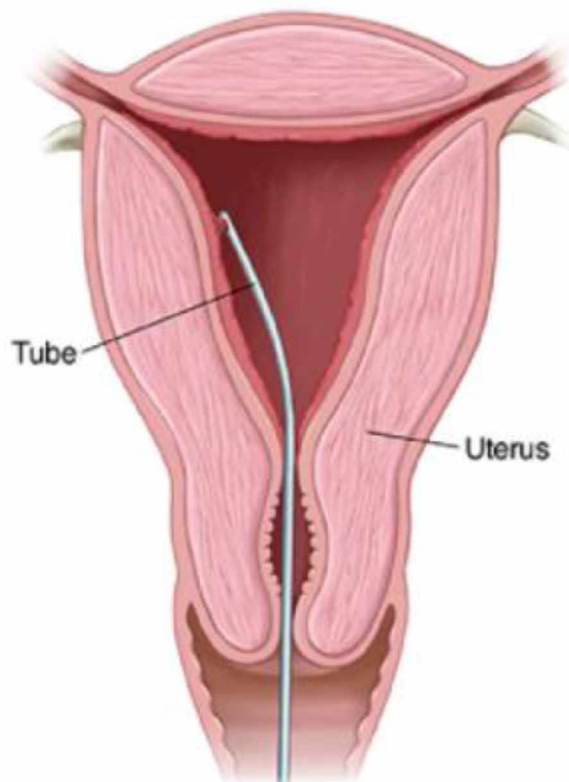
Ενώ τα κριτήρια αποκλεισμού περιλαμβάνουν τα εξής:

- Γυναίκες με ανατομικά προβλήματα μήτρας.
- Γυναίκες με διαγνωσμένη ενδομητρίωση, η οποία δεν έχει χειρουργηθεί.
- Γυναίκες με υδροσάλπιγγες οι οποίες δεν έχουν αφαιρεθεί.

Για την κάθε γυναίκα που έχει συμπεριληφθεί στη μελέτη, ο γυναικολόγος έχει συμπληρώσει πλήρες ιατρικό ιστορικό, ενώ οι γυναίκες που έχουν συμπεριληφθεί έχουν υπογράψει έντυπο συγκατάθεσης (Πρότυπο Έντυπο Ενημερωμένης Συγκατάθεσης). Τέλος κάθε γυναίκα συμπληρώνει ερωτηματολόγιο διατροφικών συνηθειών και φυσικής δραστηριότητας.

B.2.3 Συλλογή υλικού από ενδομήτριο και κόλπο

Η συλλογή υλικού από ενδομήτριο και κόλπο πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του ΑΚΕΣΩ από εξειδικευμένο προσωπικό. Στην περίπτωση του υγρού από ενδομήτριο, το δείγμα λαμβάνεται είτε κατά τη διάρκεια της ωοληψίας είτε κατά τη διάρκεια της εμβρυομεταφοράς σε ένα κύκλο εξωσωματικής γονιμοποίησης. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε με τον καθετήρα εμβρυομεταφοράς Cook Medical®, Australia, σύμφωνα με το πρωτόκολλο συλλογής υγρού ενδομητρίου του ΑΚΕΣΩ. Στην περίπτωση του κολπικού επιχρίσματος, το δείγμα λήφθηκε στον ίδιο κύκλο εξωσωματικής γονιμοποίησης που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία ενδομητριακού υγρού. Ο γυναικολόγος τοποθέτησε αποστειρωμένο κολποδιαστολέα στον κόλπο της γυναίκας, και με αποστειρωμένο βουρτσάκι έλαβε δείγμα ιστού από τα τοιχώματα του κόλπου, σύμφωνα με το πρωτόκολλο συλλογής δείγματος κολπικού επιχρίσματος του ΑΚΕΣΩ.



Εικόνα 10: Συλλογή υλικού από ενδομήτριο. (Ακεσώ Έμβρυο a.r.t.)

B.2.4 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA από υγρό ενδομητρίου και κολπικό επίχρισμα, πραγματοποιήθηκε στο ΑΚΕΣΩ Έμβρυο a.r.t., με τη χρήση δύο εμπορικών Kit για απομόνωση βακτηριακού μικροβιώματος (DNA) από μικτούς πληθυσμούς, τα QIAamp DNA Microbiome Kit και PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit.

B.2.5 Ενίσχυση υπερμεταβλητών περιοχών του γονιδίου 16s

Για την ενίσχυση των υπερμεταβλητών περιοχών χρησιμοποιήθηκε το Ion 16S Metagenomics Kit και η διαδικασία εκτελέστηκε στο μηχάνημα Veriti Thermal Cycler σύμφωνα με το πρωτόκολλο 16S Metagenomics NGS.

Συνοπτικά, ξεκινώντας μετρήθηκε η συγκέντρωση των δειγμάτων με τη μέθοδο Qubit® dsDNA HS Assay Kits στο μηχάνημα Fluorometer Qubit® 4.0 (σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή- [User Guide: Qubit dsDNA HS Assay Kits](#)), για να προσδιοριστεί εάν τα δείγματα είχαν συγκέντρωση μεγαλύτερη από μηδενική. Εφόσον αυτό ίσχυε, για την ενίσχυση των υπερμεταβλητών περιοχών χρησιμοποιήθηκε η μέγιστη ποσότητα αρχικού DNA (9-12 µl) ανά αντίδραση. Για κάθε δείγμα έγινε προετοιμασία δύο αντιδράσεων (μία για το κάθε σετ εκκινητών). Το ένα σετ εκκινητών περιλαμβάνει εκκινητές για τις περιοχές V2-4-8 ενώ το άλλο για τις V3-6, 7-9 αντίστοιχα. Μετά την ενίσχυση των υπερμεταβλητών περιοχών με PCR, ακολούθησε οπτικοποίηση των προϊόντων σε gel αγαρόζης έτσι ώστε να διαπιστωθεί η ορθή ενίσχυση των υπερμεταβλητών περιοχών και η ύπαρξη του προϊόντος ενίσχυσης. Στη συνέχεια ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων με Agentcourt AMPure XP Reagent σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (MAN0010799) και ανάμιξη των δύο σετ εκκινητών για κάθε δείγμα σε ίσους όγκους.

B.2.6 Δημιουργία βιβλιοθήκης

Για τη δημιουργία βιβλιοθήκης χρησιμοποιήθηκε το Ion Plus Fragment Library Kit και η διαδικασία εκτελέστηκε σε συσκευή Veriti Thermal Cycler σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (MAN0010799). Πριν τη δημιουργία βιβλιοθήκης έγινε ποσοτικοποίηση των δειγμάτων με Qubit® dsDNA HS Assay Kits στο μηχάνημα Fluorometer Qubit® 4.0 για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης DNA που θα χρησιμοποιηθεί στη δημιουργία της βιβλιοθήκης. Τα προϊόντα προσαρμόζονται έτσι ώστε η συγκέντρωση που θα χρησιμοποιηθεί να είναι 100ng/µl. Στη συνέχεια έγινε προετοιμασία προϊόντων της PCR ενίσχυσης υπερμεταβλητών περιοχών έτσι ώστε να δημιουργηθούν οι βιβλιοθήκες. Η προετοιμασία περιλαμβάνει δημιουργία κατάλληλων άκρων στα προϊόντα PCR και καθαρισμό έτσι ώστε να υπάρξει σωστή τοποθέτηση σε αυτά των προσαρμογέων

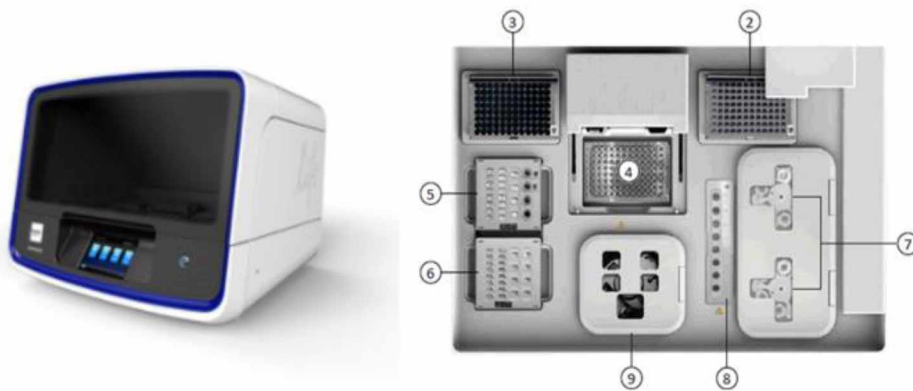
(Ion P1 Adapters) και των κωδικών ιχνηλασιμότητας (Barcodes) με τη χρήση του ενζύμου DNA λιγάση. Οι κωδικοί ιχνηλασιμότητας είναι γνωστές αλληλουχίες, διαφορετικές για κάθε δείγμα οι οποίες σκοπό έχουν να διαχωρίζουν τα δείγματα μεταξύ τους. Τελευταίο βήμα αυτής της διαδικασίας αποτέλεσε η ποσοτικοποίηση της βιβλιοθήκης ώστε να γίνει γνωστή η συγκέντρωση της και να υπολογιστεί ο παράγοντας αραιώσης.

Η ποσοτικοποίηση της βιβλιοθήκης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Ion Universal Library Quantitation Kit με το Real Time PCR system (ViiA7) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (MAN0010799). Η διαδικασία περιλαμβάνει τη δημιουργία διαδοχικών αραιώσεων ενός πρότυπου δείγματος γνωστής συγκέντρωσης E.coli που περιλαμβάνεται στο kit, αλλά και τις διαδοχικές αραιώσεις των βιβλιοθηκών που έχουν δημιουργηθεί. Τέλος υπολογίζεται η συγκέντρωση των βιβλιοθηκών και κατά συνέπεια ο παράγοντας αραιώσης έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση των βιβλιοθηκών να είναι 100pM. Ακολούθησε ισοποσοτική ανάμιξη των βιβλιοθηκών σε ένα συγκεντρωτικό μείγμα βιβλιοθηκών.

B.2.7 Προγραμματισμός του πειράματος στον Torrent Browser

Αρχικά πραγματοποιήθηκε σύνδεση στον Torrent Server μέσω του Torrent Browser. Επιλέχθηκαν οι καρτέλες Plan → Template → 16S Target Sequencing → Ion 16S Metagenomics Template. Στη συνέχεια καθορίστηκαν οι παράμετροι του πειράματος. Στην καρτέλα Kits Tab επιλέχθηκαν τα Ion S5™ System, το κατάλληλο chip για το εκάστοτε πείραμα (510, 520 ή 530) και το Ion Chef for Template Kit με το αντίστοιχο 510, 520, ή 530 kit (η επιλογή γίνεται αναλογικά με τον αριθμό δειγμάτων που θα υπάρξουν σε κάθε πείραμα). Επιπλέον, στην ίδια καρτέλα επιλέχθηκε το είδος των barcodes που χρησιμοποιήθηκαν στη δημιουργία των βιβλιοθηκών (Ion Xpress), και ακολούθησε η επιλογή 400bp (μέγιστο μέγεθος παραγόμενων αλληλουχιών) στις προχωρημένες επιλογές. Μετά επιλέχθηκε το Ion S5 Sequencing Kit από τη λίστα Sequencing Kit και τα 850 flows για τις αλληλουχίες μεγέθους 400bp. Τέλος, δόθηκε όνομα στο προγραμματισμένο πείραμα, εισήχθησαν όλα τα barcodes που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα όπως και τα ονόματα των δειγμάτων που αντιστοιχούν σε κάθε barcode και τα ονόματα των Ion Chef™ Library Sample Tubes. Εφόσον ολοκληρώθηκαν όλες οι παραπάνω επιλογές, το πείραμα αποθηκεύτηκε, και χρησιμοποιήθηκε από το Ion Chef™ System μετά την εισαγωγή των δειγμάτων σε αυτό.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία του Ion Chef™ System, στο οποίο διεκπεραιώθηκε η φόρτωση των δειγμάτων στο chip (510, 520, 530) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (MAN0016855).



Εικόνα 11: Το Ion Chef™ System, παρέχει αυτοματοποιημένη προετοιμασία βιβλιοθήκης, προετοιμασία δείγματος και φόρτωση του chip, έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί από το σύστημα Ion GeneStudio S5.

Το chip κατόπιν τοποθετήθηκε στο Ion GeneStudio S5, όπου και πραγματοποιήθηκε η αλληλούχιση των δειγμάτων. Η προετοιμασία του Ion GeneStudio S5 έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (MAN0017529, MAN0016855).

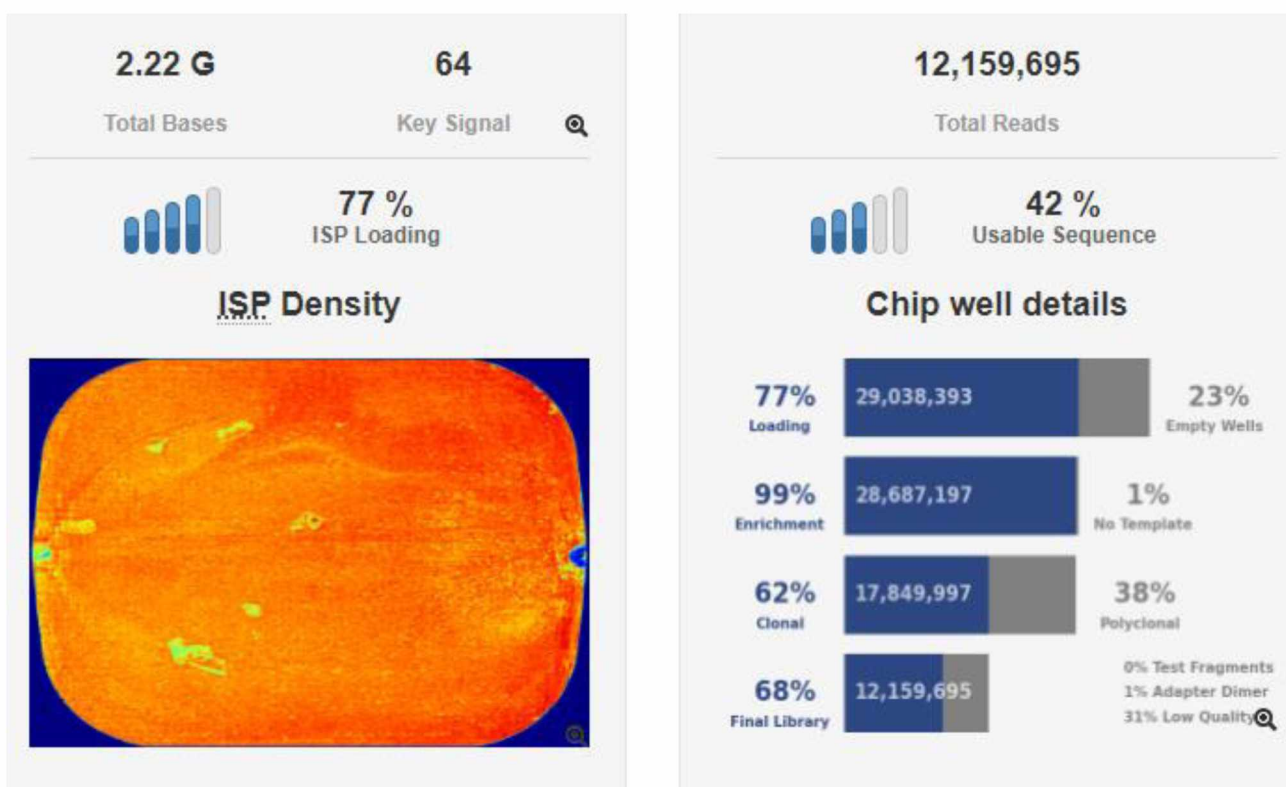


Εικόνα 12: Το Ion GeneStudio S5 και το Ion Chef™ System, στα οποία πραγματοποιείται η αλληλούχιση των βιβλιοθηκών.

B.2.8 Ανάλυση των αποτελεσμάτων στον Ion Reporter

Η αρχική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε στον Ion Torrent Server. Σημαντικές πληροφορίες για την αξιολόγηση των πειραμάτων αποτελούν: η ενότητα «ISP Density», στην οποία φαίνεται ο τρόπος με τον οποίο έχουν φορτωθεί τα ISPs στο chip και η ενότητα «ISP summary», στην οποία παρέχονται πληροφορίες για το ποσοστό του chip που έχει καλυφθεί με ISPs, το ποσοστό από τα άδεια φρεάτια του chip, το ποσοστό εμπλουτισμού των σφαιριδίων, το ποσοστό των μονοκλωνικών και πολυκλωνικών σφαιριδίων που παράχθηκαν καθώς και το ποσοστό της τελικής βιβλιοθήκης (Εικ. 13). Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό φόρτωσης τόσο μεγαλύτερο μέρος του chip έχει καλυφθεί με ISPs. Το ποσοστό εμπλουτισμού των ISPs πρέπει να είναι περίπου 100%, ενώ το ποσοστό των πολυκλωνικών σφαιριδίων πρέπει να κυμαίνεται από 25-40% ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητικός αριθμός ποιοτικών αλληλουχιών.

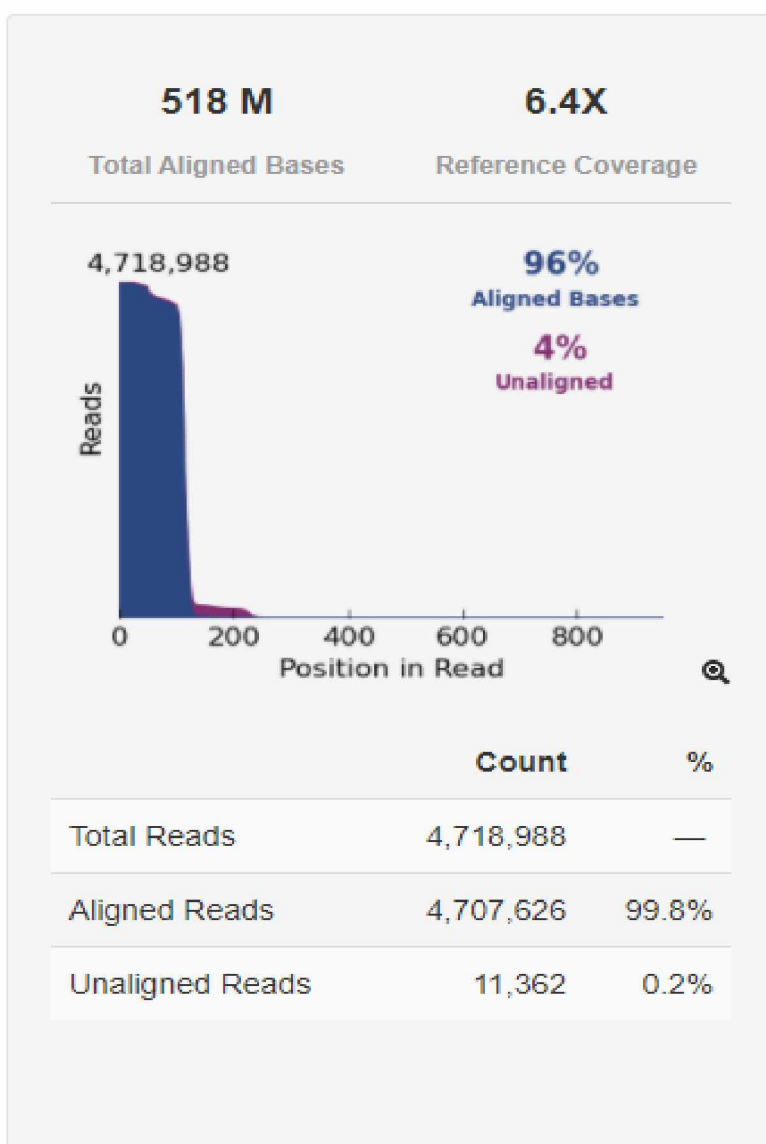
Στη συνέχεια, στον πίνακα «Aligned Reads» παρέχονται πληροφορίες για το σύνολο των αντιστοιχισμένων αλληλουχιών (Reads) που έλαβε το chip (Εικ 15). Υπάρχει η δυνατότητα εύρεσης πληροφοριών για τη διεξαγωγή του πειράματος σε κάθε δείγμα ξεχωριστά (Εικ. 14).



Εικόνα 13: Αντιπροσωπευτική απεικόνιση των χαρακτηριστικών της αλληλούχησης με πυκνότητα σφαιριδίων 77%, αναλογία μονοκλωνικών/πολυκλωνικά σφαιρίδια 62/38% και usable reads 42%.

Barcode Name	Sample	Bases	>=Q20 Bases	Reads	Mean Read Length	Read Length Histogram	Files
IonXpress_081	16S038S11	49,529,864	43,763,921	218,389	226 bp		UBAM BAM BAI
IonXpress_082	16S038S12	114,075,522	101,554,227	533,802	213 bp		UBAM BAM BAI
IonXpress_083	16S039S01	259,476,010	230,543,365	1,135,898	228 bp		UBAM BAM BAI
IonXpress_084	16S039S02	14,006,398	12,305,163	68,891	203 bp		UBAM BAM BAI
IonXpress_085	16S039S03	70,796,928	62,703,850	300,797	235 bp		UBAM BAM BAI

Εικόνα 14: Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα διεξαγωγής του πειράματος. Διακρίνονται οι κωδικοί ιχνηλασιμότητας που αποδίδονται στο κάθε δείγμα (barcode name), το όνομα του δείγματος (sample name), οι αλληλουχίες που έλαβε το κάθε δείγμα κατά τη διεξαγωγή του πειράματος (Reads) και η κατανομή του μεγέθους των τμημάτων που αλληλογήθησαν στο κάθε δείγμα (Read Length Histogram).



Εικόνα 15: Μέσος όρος μεγεθών των Reads που έλαβαν οι βιβλιοθήκες κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, σύνολο αντιστοιχισμένων και μη αντιστοιχισμένων Reads.

Το Ion 16S Metagenomics Kit προσφέρει απεικόνιση μεικτών μικροβιακών πληθυσμών σε συνδυασμό με ολοκληρωμένη βιοπληροφορική ανάλυση με τη χρήση του 16S Metagenomics workflow στο λογισμικό Ion Reporter software. Η διαδικασία έχει ως ακολούθως:

Πραγματοποιείται σύνδεση στον Ion Torrent Server όπου εμφανίζονται όλα τα ολοκληρωμένα πειράματα. Ανοίγεται το επιθυμητό πείραμα και επιλέγονται τα εξής: Plugins to run → Ion Reporter Uploader → cloud και επιλέγεται το .bam only → Launch IRU. Κατόπιν, πραγματοποιείται σύνδεση στο λογισμικό Ion Reporter (<https://ionreporter.thermofisher.com>), και επιλέγονται τα Analysis → Launch → Metagenomics 16S → Launch Analysis. Σαν βάσεις δεδομένων αναφοράς των μικροοργανισμών επιλέγονται οι Greengenes και MicroSEQ® 16S Reference Library της Thermo Fisher. Όταν η ανάλυση ολοκληρωθεί τα αποτελέσματα είναι διαθέσιμα για λήψη και περαιτέρω διερεύνηση. Τα αποτελέσματα μπορούν εύκολα να απεικονιστούν με τα διαγράμματα κτρονα τα οποία παρέχονται από τον Ion Reporter.

The screenshot displays the 'Workflows' section of the Ion Reporter interface. At the top, there are navigation tabs: Home, Samples, Analyses, Workflows (selected), and Admin. Below the tabs, there are sub-tabs: Overview, Create, and Presets. The main heading is 'Workflows' with a search bar containing '16S' and a 'Go' button. Below the search bar are several filter dropdowns: Research Category, Research Application, Workflow, Target, Group, Version, and Reference. A table lists the workflows, with the 'Metagenomics 16S w1.1' workflow selected. The table has columns for checkboxes, Ion icon, Research Category, Research Application, Workflow Name, Version, Reference, Sample Group, and Modified On. The details panel for the selected workflow shows the following information:

Research Category	Research Application	Workflow Name	Version	Reference	Sample Group	Modified On
16S rRNA Profiling	Metagenomics	Metagenomics 16S w1.1	5.16	Curated MicroSEQ(R) 16S Reference Library v2013.1...(2)	Multi	Oct 30 2020 06:47 AM

Details (Metagenomics 16S w1.1):

- ion torrent Metagenomics
- Metagenomics 16S w1.1
- Detects population diversity from a metagenomics sample from Ion semiconductor reads from the Ion 16S Metagenomics Kit. Released with: Ion Reporter Software 5.2. Workflow Version: 1.1.
- Version: 5.16
- Revision: 0
- Sample Group: Multi
- Research Category: 16S rRNA Profiling
- Reference: Curated MicroSEQ(R) 16S Reference Library v2013.1 (2)
- Primers: Default
- Modified By: Admin, IR
- Modified On: Oct 30 2020 06:47 AM
- Created By: Admin, IR
- Created On: Oct 30 2020 06:47 AM
- Parameters: [View](#)
- Tag for IRU: No

Εικόνα 16: Παράδειγμα σχεδιασμού ανάλυσης πειράματος 16S Metagenomics μέσω της πλατφόρμας του Ion Reporter.

Parameter	Value
File	IonXpress_091_rawlib_basecaller.bam
Database	Curated MicroSEQ(R) 16S Reference Library v2013.1, Curated Greengenes v13.5
Number of copies needed	10
Primers detected	Both ends
BP cutoff	150 - NOT in effect when using full coverage
Total number of reads	564610
Number of valid reads	413964
Number of reads ignored	117018 (due to low number of copies <10)
Mapped reads in sample	284067
Un-Mapped reads in sample	12879
Analysis date	8/26/21, 4:55 AM

Primer name	# of mapped reads	# of valid reads	# of low copy number reads	# of un-mapped reads	# of forward found	# of forward full coverage	# of forward short	# of forward valid reads	# of reversed found	# of reversed full coverage	# of reversed short	# of reversed valid reads
V2	27852	44272	16420	0	24414	20673	0	20673	36147	23599	0	23599
V3	170805	230227	50014	9408	171308	136844	0	136844	109046	93383	0	93383
V4	34718	53766	19048	0	33361	29069	0	29069	31300	24697	0	24697
V67	37599	61628	20558	3471	34146	28700	0	28700	39617	32928	0	32928
V8	12668	23453	10785	0	15856	11683	0	11683	15535	11790	0	11790
V9	425	618	193	0	498	350	0	350	438	268	0	268

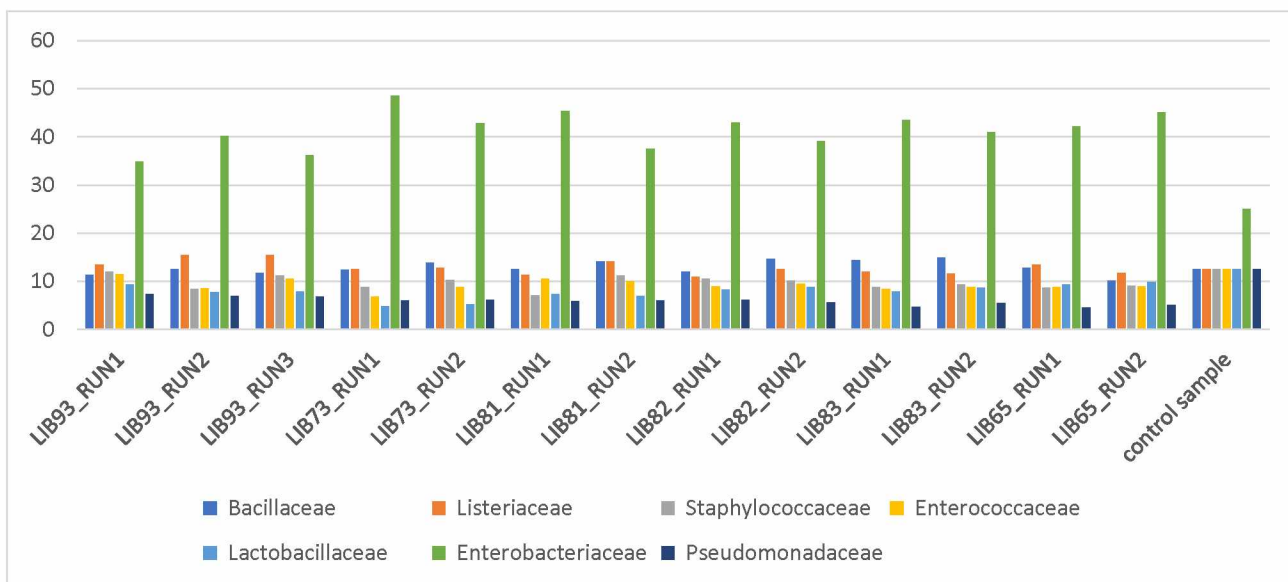
Εικόνα 17: Αντιπροσωπευτική απεικόνιση των γενικών χαρακτηριστικών της ανάλυσης με το 16S Metagenomics workflow στον Ion Reporter. Στις πληροφορίες επισημαίνονται το όνομα του αρχείου, οι βάσεις δεδομένων αναφοράς, ο ελάχιστος αριθμός αντιγράφων (copies) που απαιτούνται για ένα έγκυρο αποτέλεσμα και ο αριθμός των αλληλουχιών (συνολικών, έγκυρων και σε αντιστοιχία με βάσεις δεδομένων) που έλαβε ο κάθε εκκινητής.

B.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

B.3.1 Εξέταση πρότυπου δείγματος

Στην παρούσα εργασία, αρχικά εξετάστηκε το πρότυπο δείγμα ZymoBIOMICS Microbial Community Standard (Zymo Research, D6300). Το ZymoBIOMICS Microbial Community Standard μιμείται μια μικτή μικροβιακή καλλιέργεια, η οποία περιέχει τρία βακτήρια Gram-αρνητικά, πέντε βακτήρια Gram-θετικά και δύο ζύμες. Η θεωρητική σύνθεση του είναι: *Listeria monocytogenes* - 12%, *Pseudomonas aeruginosa* - 12%, *Bacillus subtilis* - 12%, *Escherichia coli* - 12%, *Salmonella enterica* - 12%, *Lactobacillus fermentum* - 12%, *Enterococcus faecalis* - 12%, *Staphylococcus aureus* - 12%, *Saccharomyces cerevisiae* - 2% και *Cryptococcus neoformans* - 2%. Το δείγμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για να πραγματοποιηθεί η επικύρωση της μεθόδου 16S Metagenomics, ως προς τον ποιοτικό και τον ημιποσοτικό χαρακτήρα της.

Κατασκευάστηκαν 6 διαφορετικές βιβλιοθήκες του δείγματος ZymoBIOMICS Microbial Community Standard (TEST16S01), και αυτές οι βιβλιοθήκες αναλύθηκαν σε διαφορετικά πειράματα έτσι ώστε να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου 16S Metagenomics. Τα ποσοστά των μικροοργανισμών που εντοπίστηκαν στο δείγμα παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα. Αναλυτικά τα ποσοστά των μικροοργανισμών παρουσιάζονται στο παράρτημα 2.



Εικόνα 18: Απεικόνιση των ποσοστών των βακτηρίων που εντοπίστηκαν στις διαφορετικές βιβλιοθήκες του πρότυπου δείγματος TEST16S01.

B.3.2 Εξέταση δειγμάτων

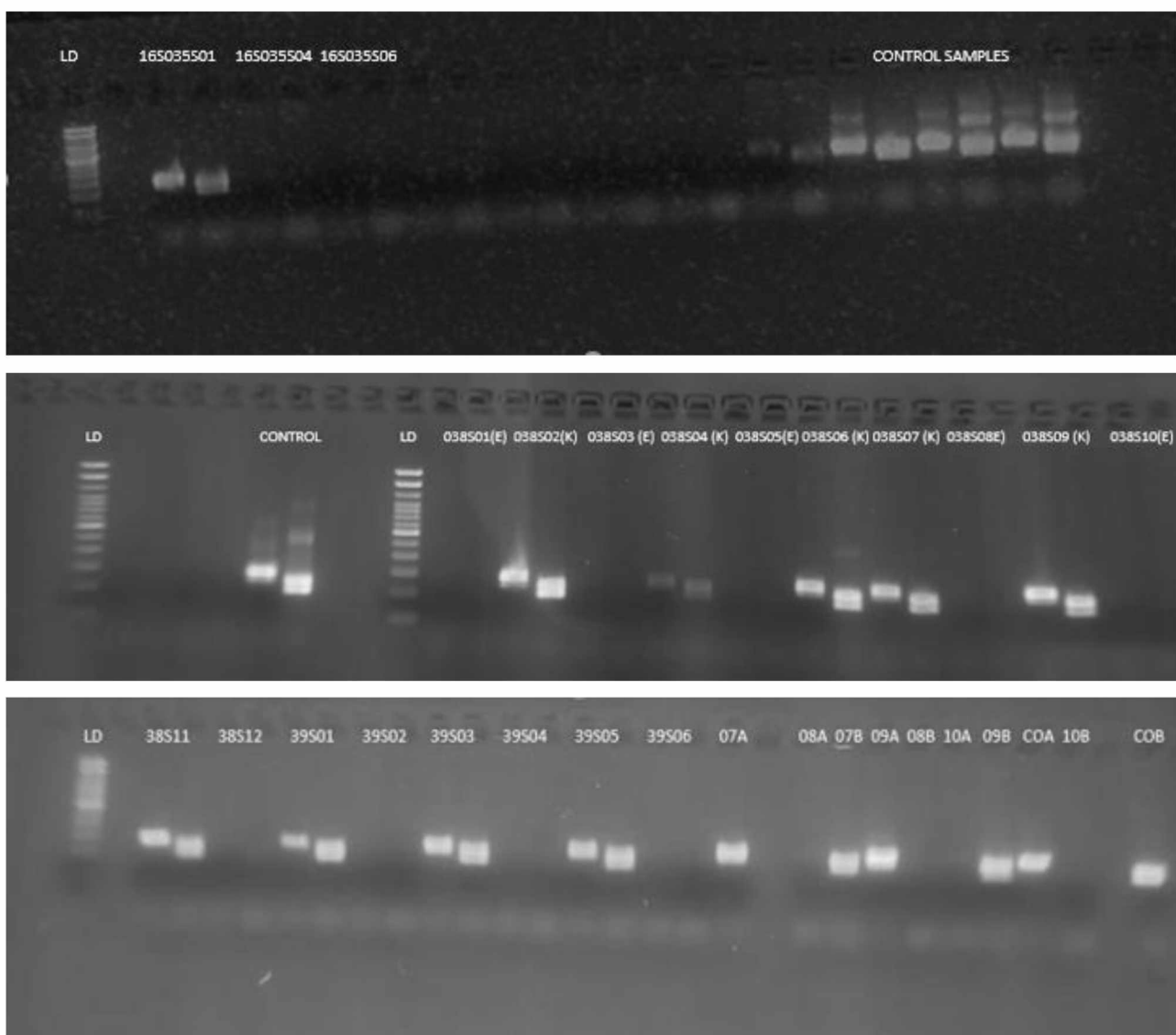
Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν συνολικά 33 δείγματα κόλπου, τραχήλου και ενδομητρίου, από 20 γυναίκες σε διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης. Οι αρχικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων μετά την απομόνωση DNA από υγρό ενδομητρίου, κολπικό επίχρισμα αλλά και βουρτσάκι και επίχρισμα τραχήλου, που πραγματοποιήθηκε στο ΑΚΕΣΩ, παρουσιάζονται στον πίνακα 5.

ΟΝΟΜΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΤΥΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (ng/μL)
16S032S01	Τυφλό	N/A
16S032S02	Τράχηλος (ιστός)	N/A
16S032S03	Τράχηλος (υπερκείμενο ιστού)	N/A
16S032S04	Τράχηλος (ιστός)	N/A
16S035S01	Τράχηλος (βουρτσάκι)	0,456
16S035S04	Τράχηλος (επίχρισμα)	0,452
16S035S06	Ενδομήτριο (ιστός)	1,29
16S038S01	Ενδομήτριο (επίχρισμα)	8,4
16S038S02	Κόλπος	22,2
16S038S03	Ενδομήτριο (επίχρισμα)	9,3
16S038S04	Κόλπος	23
16S038S05	Ενδομήτριο (επίχρισμα)	7,3
16S038S06	Κόλπος	7,7
16S038S07	Κόλπος	6,7
16S038S08	Ενδομήτριο (επίχρισμα)	5,8
16S038S09	Κόλπος	13,8
16S038S10	Ενδομήτριο (επίχρισμα)	10
16S038S11	Κόλπος	37,2
16S038S12	Ενδομήτριο (επίχρισμα)	7
16S039S01	Κόλπος	17,6
16S039S02	Ενδομήτριο (επίχρισμα)	71
16S039S03	Κόλπος	10,4
16S039S04	Ενδομήτριο (επίχρισμα)	146,2
16S039S05	Κόλπος	9,6
16S039S06	Ενδομήτριο (επίχρισμα)	6,8
16S039S07	Κόλπος	32,3
16S039S08	Ενδομήτριο (επίχρισμα)	10,3
16S039S09	Κόλπος	14,3
16S039S10	Ενδομήτριο (επίχρισμα)	5
16S040S01	Κόλπος	1,39
16S040S02	Ενδομήτριο (επίχρισμα)	0,02
16S040S09	Κόλπος	2,4
16S040S10	Ενδομήτριο (επίχρισμα)	0,06

Πίνακας 2: Ονοματολογία, τύπος (τράχηλος, κόλπος, ενδομήτριο) και αρχική συγκέντρωση των δειγμάτων που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

*Να σημειωθεί πως ανά ζεύγη τα δείγματα ανήκουν στην ίδια γυναίκα, με εξαίρεση τα επτά πρώτα (16S032S01, 16S032S02, 16S032S03, 16S032S04, 16S035S01, 16S035S04, 16S035S06). Για παράδειγμα 16S038S01-16S038S02, 16S038S03-16S038S04 κτλ.

Τα αποτελέσματα της ενίσχυσης των υπερμεταβλητών περιοχών του 16S rRNA γονιδίου των δειγμάτων παραθέτονται στις παρακάτω φωτογραφίες από γέλη αγαρόζης. Διακρίνονται δύο ζώνες ενίσχυσης για κάθε δείγμα, μία που αντιστοιχεί στο σετ εκκινήτων V2-4-8 και μία για το σετ V3-6, 7-9. Δεν παρατηρήθηκε ορατή με το μάτι ενίσχυση στη γέλη αγαρόζης για τα δείγματα ενδομητρίου. Επίσης δεν παρατηρήθηκαν ζώνες στη γέλη αγαρόζης και μετά την ενίσχυση των υπερμεταβλητών περιοχών στα δείγματα κόλπου και ενδομητρίου 16S040S01-16S040S02 και 16S040S09-16S040S10.



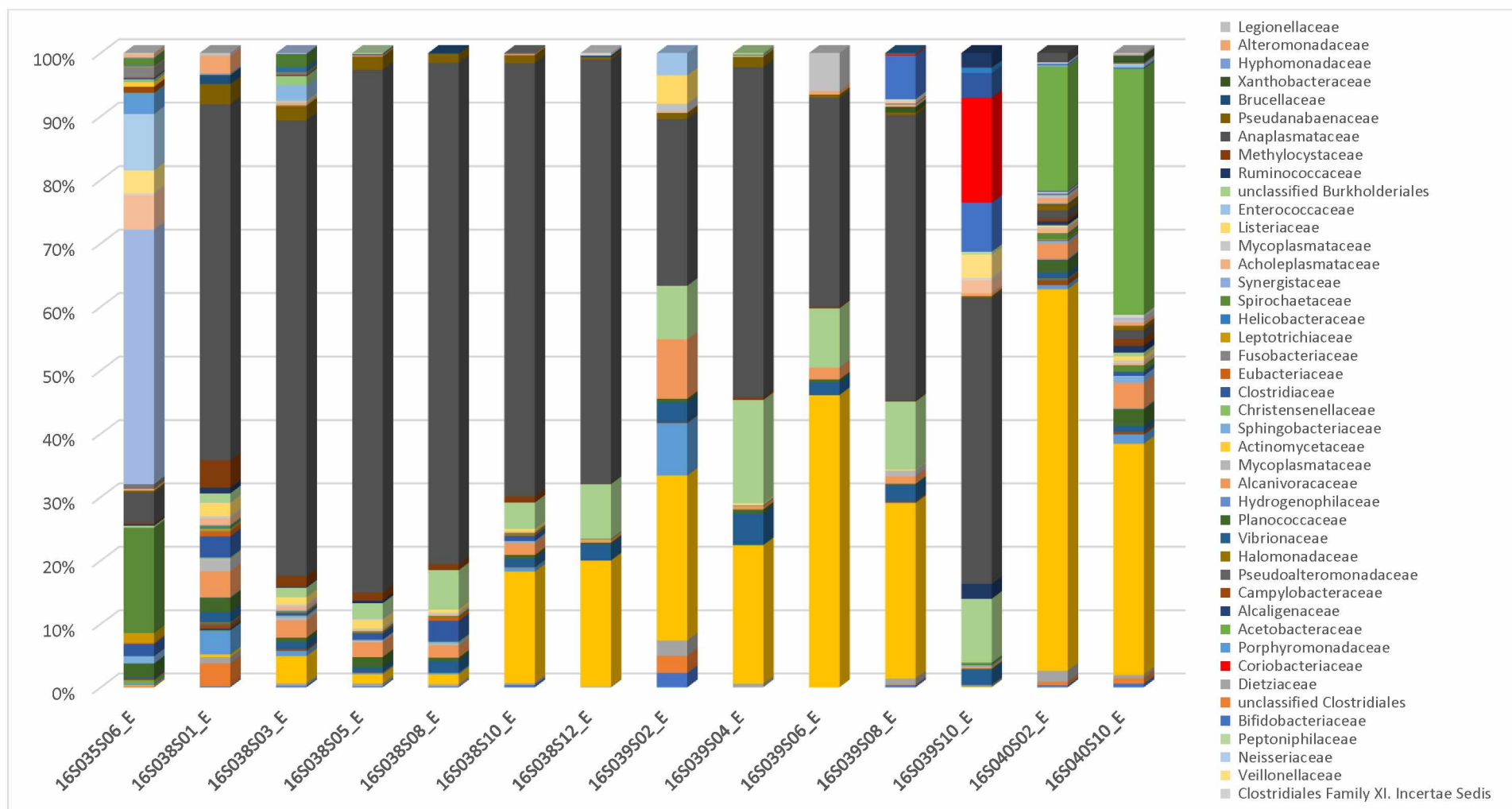
Εικόνα 19 : Φωτογραφίες από γέλη αγαρόζης μετά την ενίσχυση των υπερμεταβλητών περιοχών.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων μετά την αρχική PCR ενίσχυσης (με τη μέθοδο Qubit) και μετά τη μέτρηση της συγκέντρωσης των βιβλιοθηκών με τη μέθοδο της Real Time PCR.

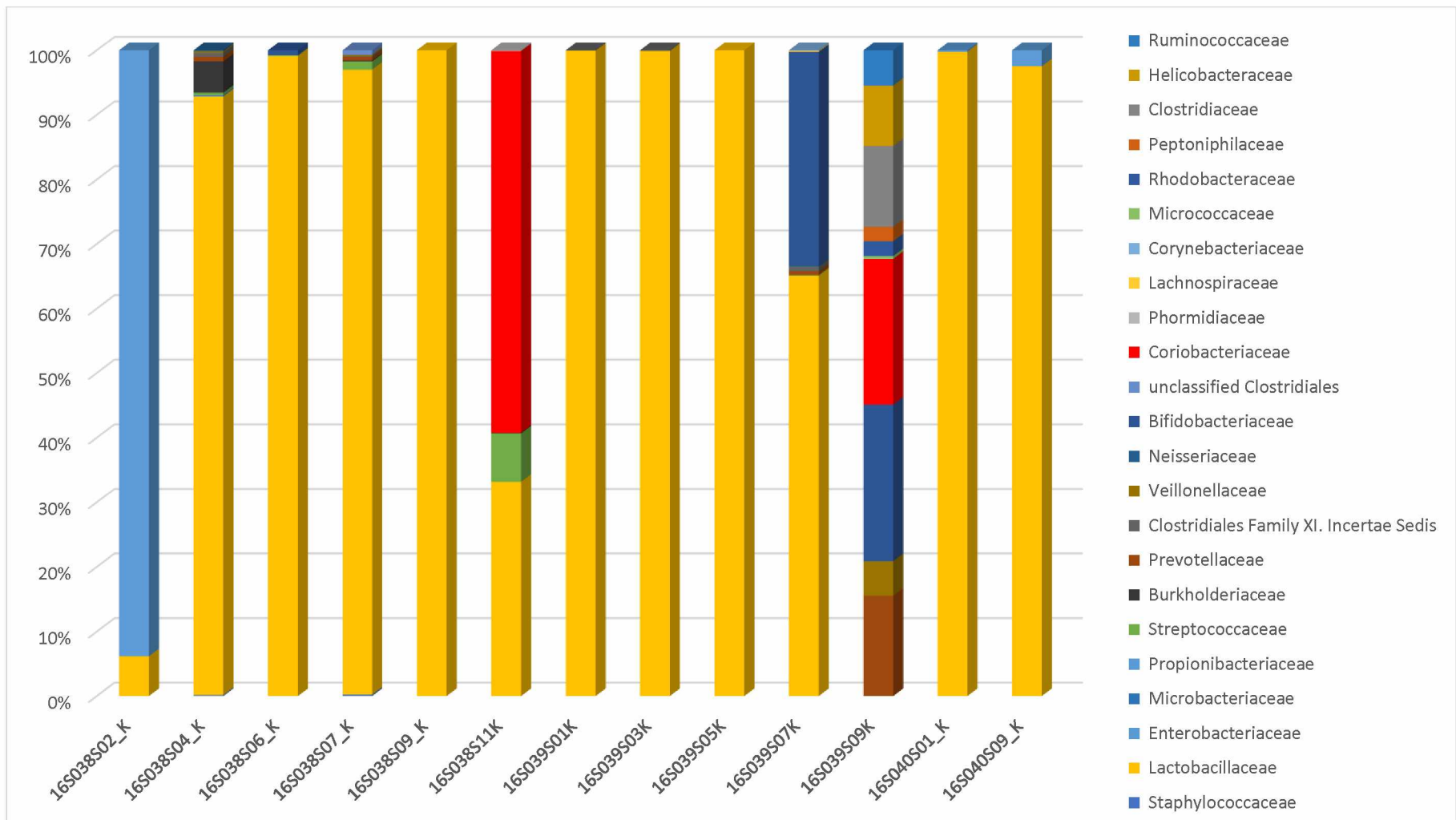
ΟΝΟΜΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΤΥΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ PCR (ng/μL)	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ (pM)
16S032S01	Τυφλό	1,5	9328
16S032S02	Τράχηλος	0,588	1937
16S032S03	Τράχηλος	1,54	1855
16S032S04	Τράχηλος	0,749	3100
16S035S01	Τράχηλος	14,2	1352
16S035S04	Τράχηλος	0,726	246
16S035S06	Ενδομήτριο	0,618	114
16S038S01	Ενδομήτριο	0,266	75
16S038S02	Κόλπος	51	1573
16S038S03	Ενδομήτριο	0,377	86
16S038S04	Κόλπος	2,88	1071
16S038S05	Ενδομήτριο	0,337	71
16S038S06	Κόλπος	31,2	1717
16S038S07	Κόλπος	21,2	855
16S038S08	Ενδομήτριο	0,425	84
16S038S09	Κόλπος	46,7	817
16S038S10	Ενδομήτριο	0,414	99
16S038S11	Κόλπος	38,8	1479
16S038S12	Ενδομήτριο	0,617	178
16S039S01	Κόλπος	25,2	409
16S039S02	Ενδομήτριο	0,229	46
16S039S03	Κόλπος	37,8	947
16S039S04	Ενδομήτριο	0,352	56
16S039S05	Κόλπος	30	1199
16S039S06	Ενδομήτριο	0,356	42
16S039S07	Κόλπος	41,1	2655
16S039S08	Ενδομήτριο	0,691	176
16S039S09	Κόλπος	40,7	2609
16S039S10	Ενδομήτριο	0,811	229
16S040S01	Κόλπος	46,8	2195
16S040S02	Ενδομήτριο	0,846	96
16S040S09	Κόλπος	50	3105
16S040S10	Ενδομήτριο	0,748	105

Πίνακας 3: Συγκεντρώσεις των δειγμάτων μετά την αρχική PCR ενίσχυσης (με τη μέθοδο Qubit) και μετά τη μέτρηση της συγκέντρωσης των βιβλιοθηκών με τη μέθοδο της Real Time PCR

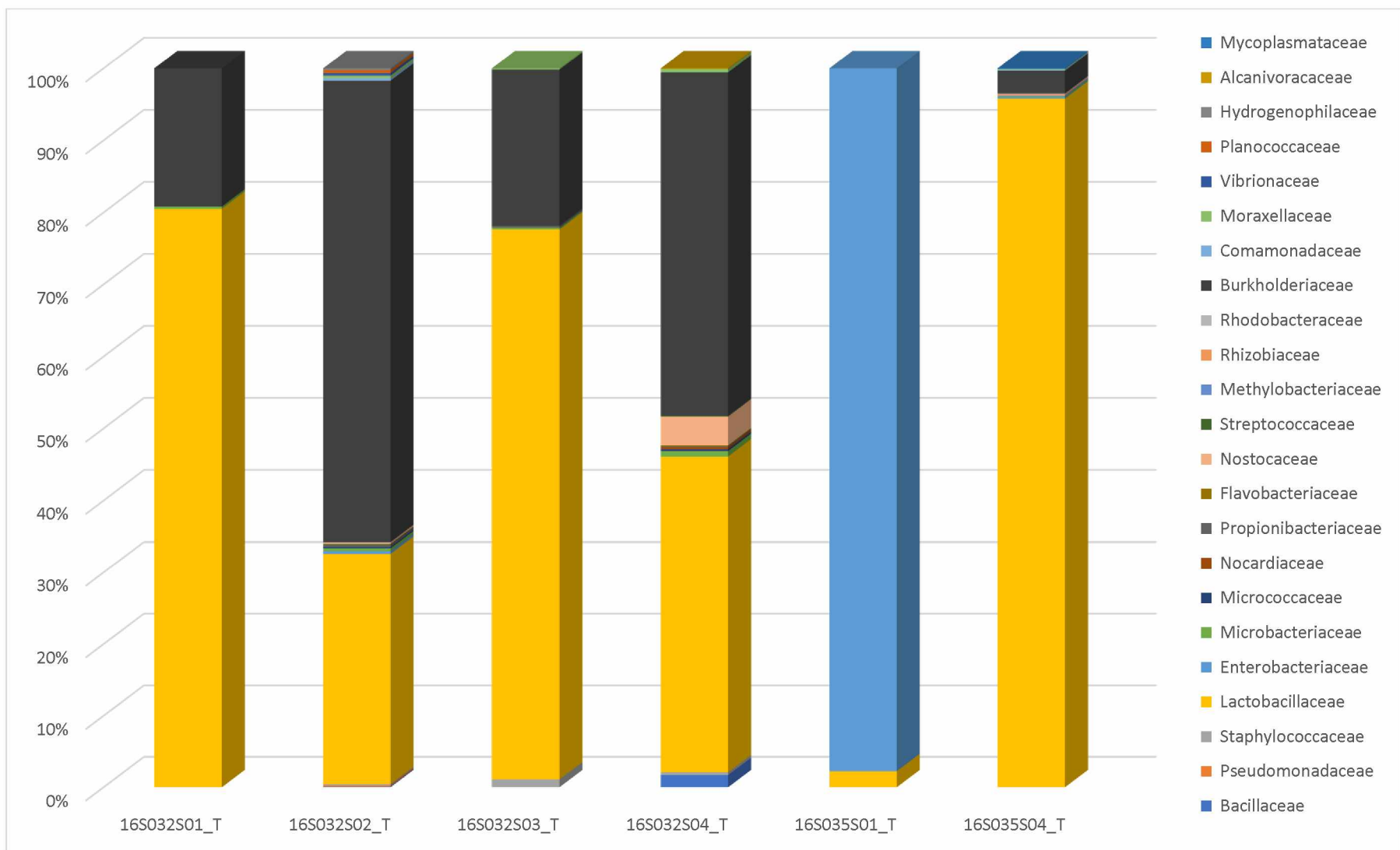
Τα αποτελέσματα ανάλυσης των βιβλιοθηκών στον Ion Reporter, δηλαδή τα ποσοστά των μικροοργανισμών που εντοπίζονται σε κάθε δείγμα παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες (20, 21, 22).



Εικόνα 20: Ποσοστά μικροοργανισμών σε δείγματα ενδομητρίου.

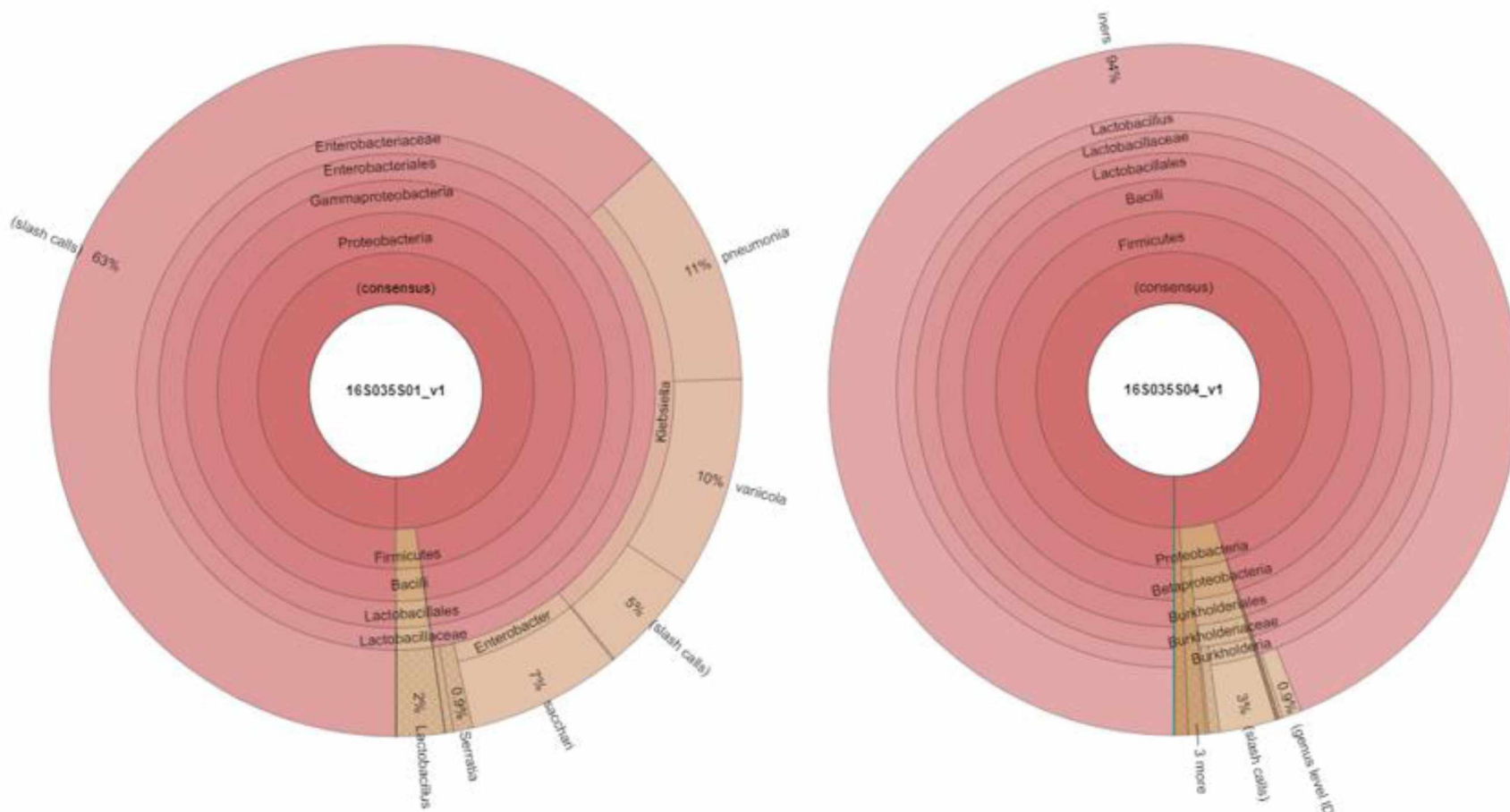


Εικόνα 21: Ποσοστά μικροοργανισμών σε δείγματα κόλπου.

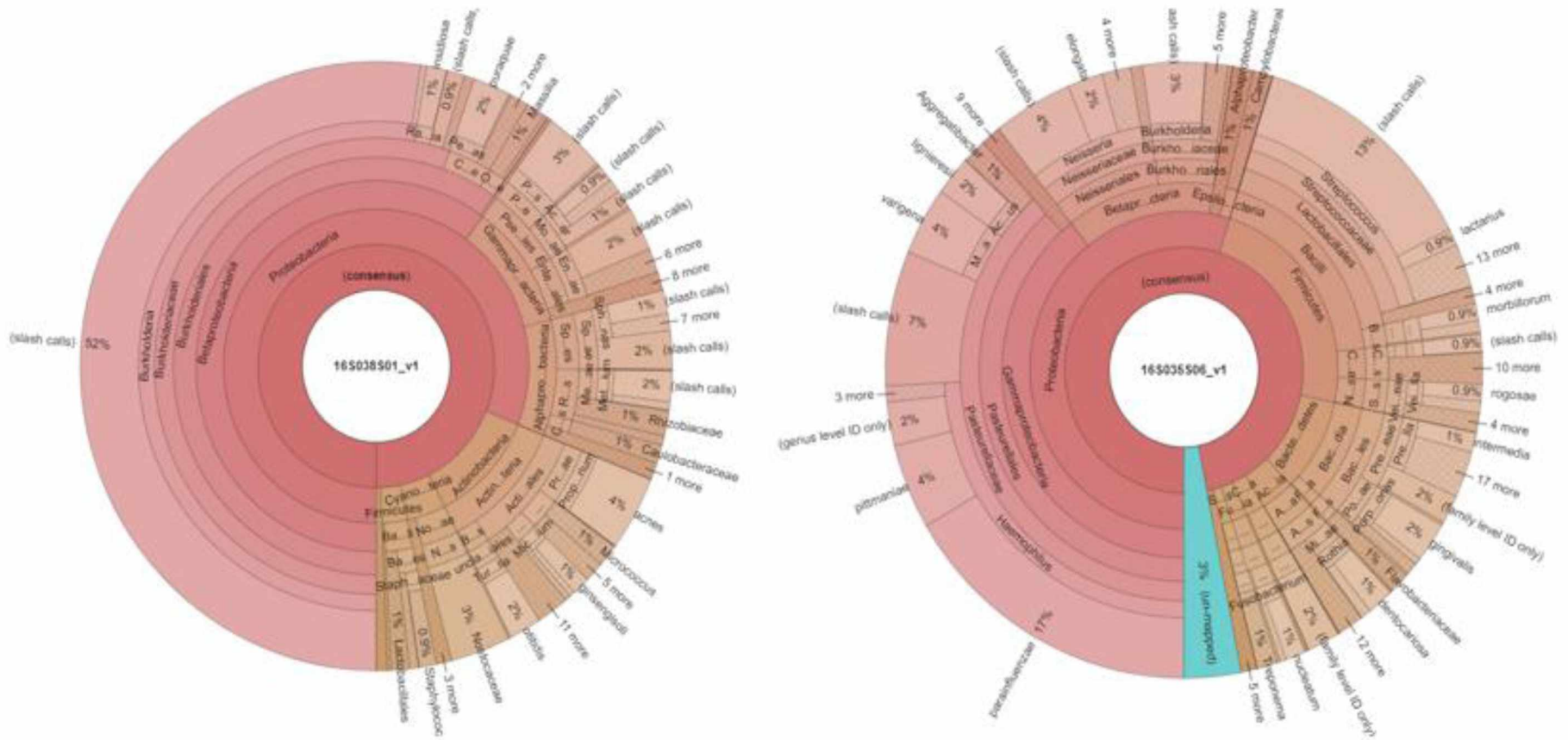


Εικόνα 22: Ποσοστά μικροοργανισμών σε δείγματα τραχήλου.

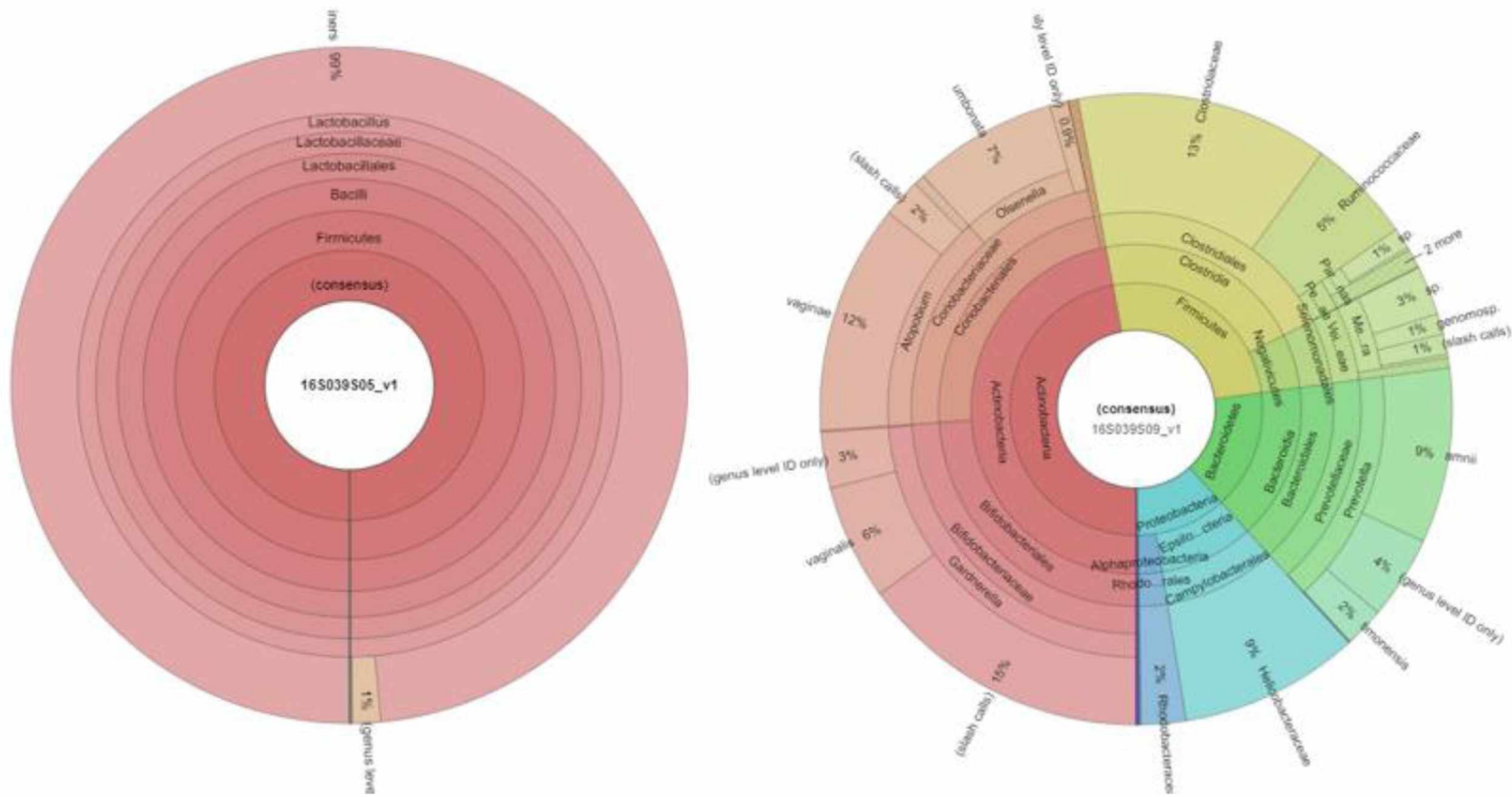
Τα δεδομένα που εξάγονται από το πρόγραμμα Ion Reporter έχουν τη μορφή ενός διαγράμματος Krona, το οποίο αποτελεί ένα διάγραμμα πίτας πολλαπλών στρωμάτων, που επιτρέπει τη διερεύνηση των ιεραρχικών σχέσεων μεταξύ των διαφόρων μικροοργανισμών που εντοπίζονται στο δείγμα. Παραδείγματα των διαγραμμάτων Krona που αντιστοιχούν στα δείγματα παραθέτονται παρακάτω, ενώ αναλυτικά όλα τα διαγράμματα Krona εντοπίζονται στο παράρτημα 3.



Εικόνα 23: Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα Krona δειγμάτων τραχήλου (16S035S01 και 16S035S04).

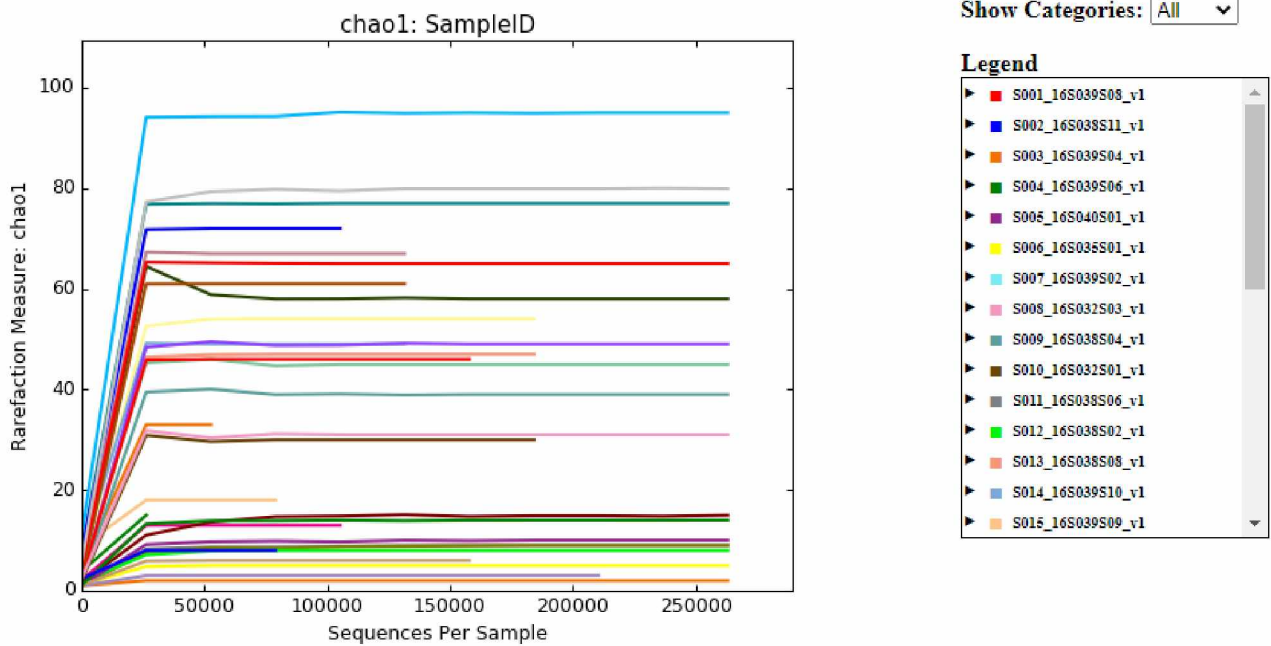


Εικόνα 24: Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα Κρονα δειγμάτων ενδομητρίου (16S038S01 και 16S035S06).

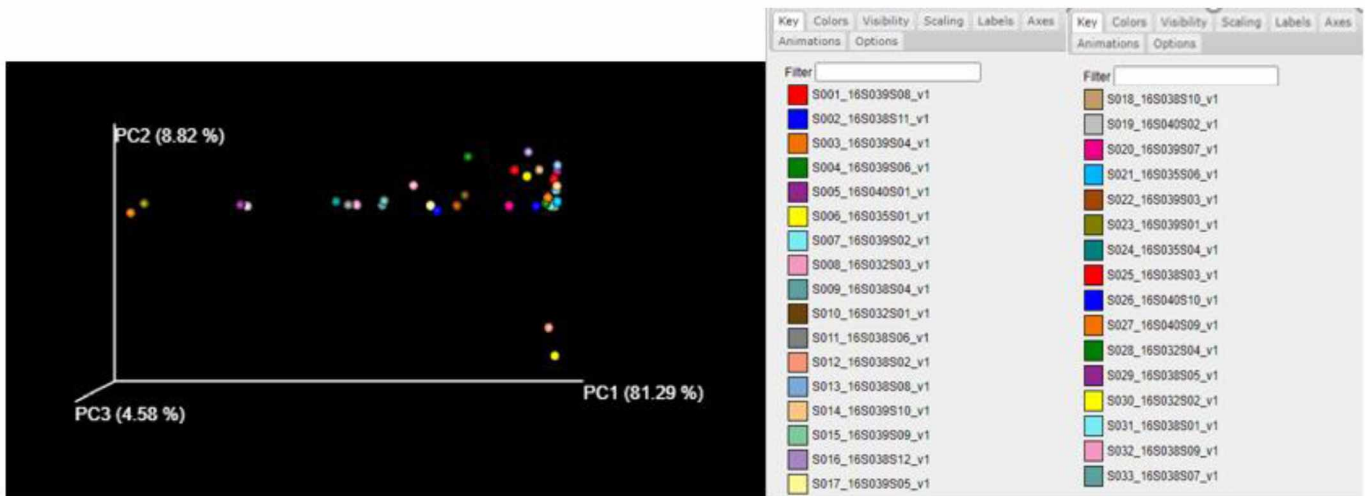


Εικόνα 25: Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα Κρονα δειγμάτων κόλπου (16S039S05 και 16S039S09).

Επιπλέον πληροφορίες που εξάγονται από τον Ion Reporter είναι αυτές των Alpha και Beta diversity, όπως παρουσιάζονται στις παρακάτω απεικονίσεις.



Εικόνα 26 : Alpha diversity στα δείγματα της μελέτης.



Εικόνα 27 : Beta diversity (Euclidean) στα δείγματα της μελέτης.

B.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

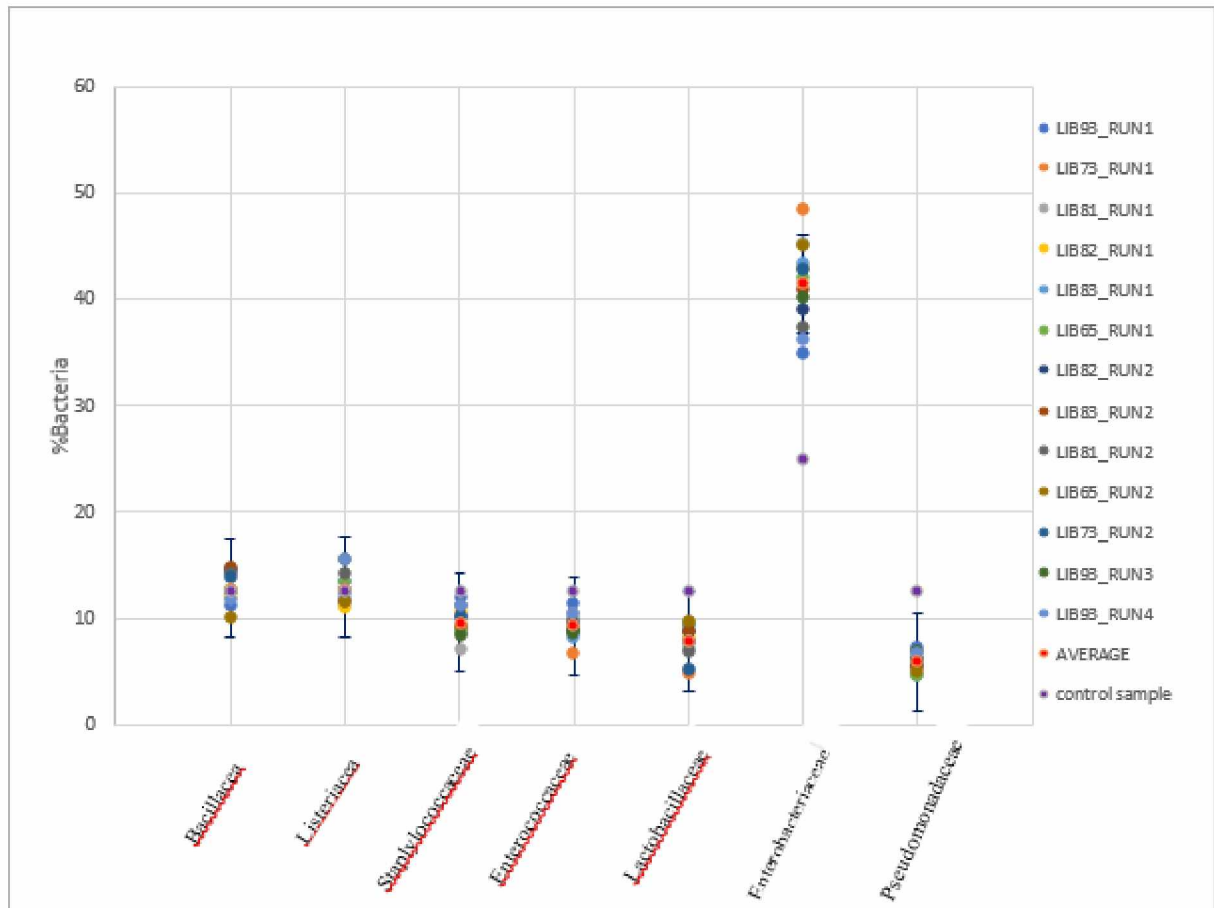
B.4.1 Επικύρωση της μεθόδου 16S Metagenomics

Διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα του κιτ Ion 16S Metagenomics Kit ως προς τον εντοπισμό των μικροβίων που υπήρχαν στο πρότυπο δείγμα ZymoBIOMICS Microbial Community Standard. Το ZymoBIOMICS Microbial Community Standard, το οποίο μιμείται μια μικτή μικροβιακή καλλιέργεια που περιέχει τρία βακτήρια Gram-αρνητικά, πέντε βακτήρια Gram-θετικά και δύο ζύμες. Καθώς η μέθοδος 16S Metagenomics δεν ανιχνεύει μύκητες και η ανάλυση γίνεται στο επίπεδο της οικογένειας, η θεωρητική σύσταση του δείγματος είναι: Bacillaceae 12,5%, Listeriaceae 12,5%, Staphylococcaceae 12,5%, Enterococcaceae 12,5%, Lactobacillaceae 12,5%, Enterobacteriaceae 25%, Pseudomonadaceae 12,5%.

Ως προς την αξιολόγηση του ποιοτικού του χαρακτήρα, το κιτ έχει 100% αποτελεσματικότητα στο επίπεδο της ευαισθησίας και της ειδικότητας καθώς σε όλες τις δοκιμές εντοπίστηκαν μόνο οι μικροοργανισμοί που εμπεριέχονταν σε αυτό, ενώ δεν παρατηρήθηκε ενίσχυση άλλων μικροοργανισμών, κάτι το οποίο αποκλείει την ύπαρξη επιμόλυνσης κατά τη διάρκεια χρήσης του Ion 16S Metagenomics Kit³⁶.

Για την αξιολόγηση της ημιποσοτικής εκτίμησης των διαφόρων βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές βιβλιοθηκών του ίδιου πρότυπου δείγματος, καθώς και επαναλήψεις της αλληλούχισης της ίδιας βιβλιοθήκης σε διαφορετικά πειράματα. Στις δοκιμές επαναληψιμότητας καταγράφηκε η σχετική αφθονία που παρατηρείται στις ταξονομικές ομάδες που εντοπίζονται στο ίδιο δείγμα και υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση (Εικ. 28).

Οι διακυμάνσεις που παρατηρήθηκαν ποικίλουν ανάλογα με τον οργανισμό. Στην περίπτωση των Bacillaceae, η τυπική απόκλιση είναι 1,4%, στους Listeriaceae 1,5%, στους Staphylococcaceae 1,4%, στους Enterococcaceae 1,2%, στους Lactobacillaceae 1,5%, στους Enterobacteriaceae 3,4% και στους Pseudomonadaceae 0,8%.

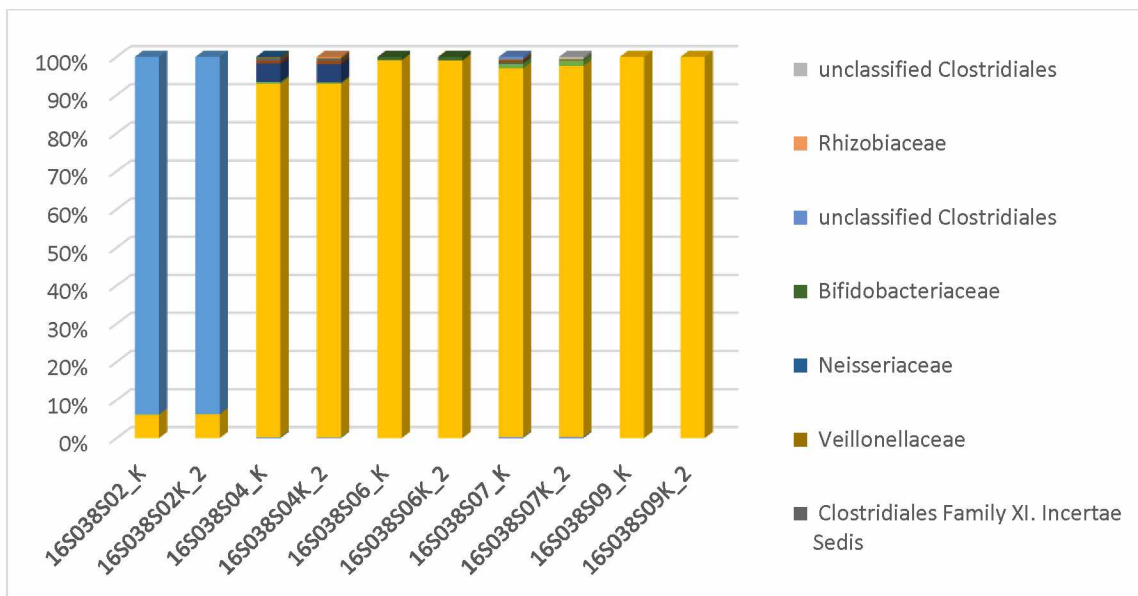


Εικόνα 28: Κατανομή των μικροοργανισμών στο πρότυπο δείγμα ZymoBIOMICS Microbial Community Standard

Παρατηρείται μία υπερτίμηση στα ποσοστά των Enterobacteriaceae, τα οποία αναμενόταν να αποτελούν το 25% του συνολικού πληθυσμού βακτηρίων στο δείγμα, ενώ αντιθέτως στις διαφορετικές δοκιμές κατέλαβαν από το 34% έως 48%. Από την άλλη υπάρχει μία υποεκτίμηση των ποσοστών των υπόλοιπων οργανισμών, οι οποίοι θα έπρεπε να καταλαμβάνουν ο καθένας το 12,5% του πληθυσμού βακτηρίων στο δείγμα, αντ' αυτού στους Bacillaceae, τα ποσοστά κυμαίνονται από 11% έως 14%, στους Listeriaceae από 10% έως 15%, στους Staphylococcaceae από 7% έως 12%, στους Enterococcaceae από 6% έως 11%, στους Lactobacillaceae από 4% έως 9%, και στους Pseudomonadaceae από 4% έως 7%.

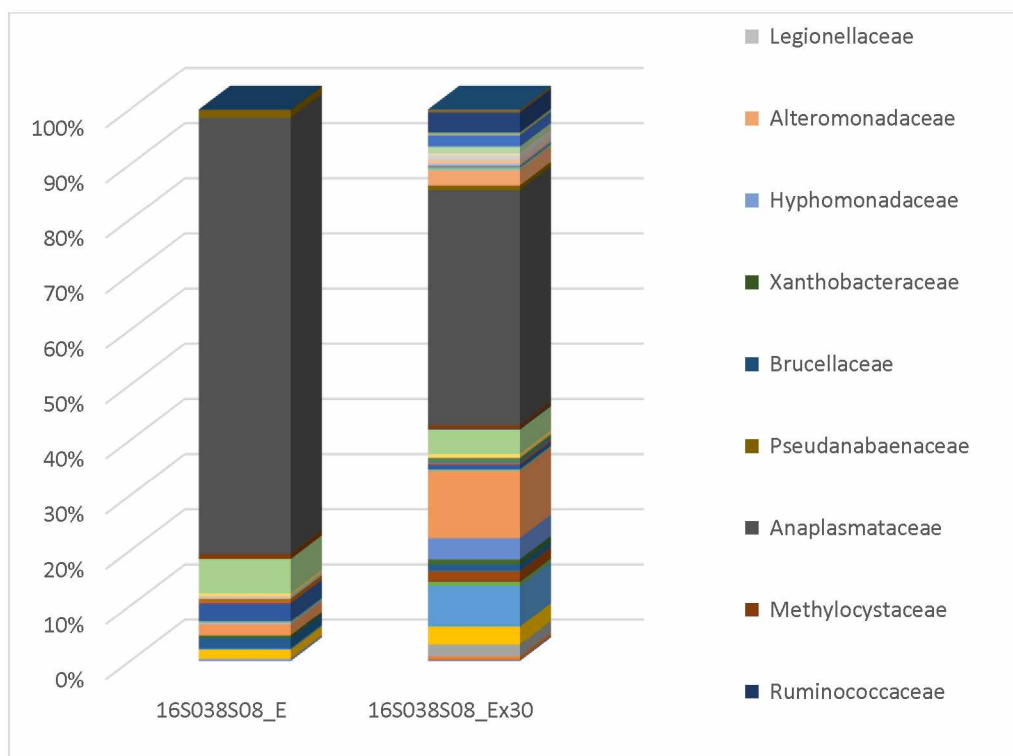
Αυτές οι διαφορές ανάμεσα στα παρατηρούμενα και τα αναμενόμενα από τον κατασκευαστή ποσοστά οργανισμών, μπορεί να οφείλονται στο πρωτόκολλο της PCR που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των υπερμεταβλητών περιοχών, στους εκκινητές ενίσχυσης αυτών των περιοχών, ακόμα και στη βάση δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων³⁷. Οι διακυμάνσεις στις τιμές των οργανισμών μεταξύ των πειραμάτων είναι μικρές, και δικαιολογούν το χαρακτηρισμό της μεθόδου ως ημιποσοτική.

Αξιολόγηση της επαναληψιμότητας της μεθόδου μεταξύ των πειραμάτων (inter-experiment variability) πραγματοποιήθηκε και με τυχαία δείγματα κόλλου, τα 16S038S02_K, 16S038S04_K, 16S038S06_K, 16S038S07_K, και 16S038S09_K. Δεν παρατηρήθηκαν αξιόλογες διαφορές μεταξύ των επαναλήψεων των βιβλιοθηκών σε διαφορετικά πειράματα, στο επίπεδο της ανίχνευσης των οργανισμών και στα ποσοστά των οργανισμών σε κάθε δείγμα, όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 29.



Εικόνα 29: Σύγκριση μεταξύ των ίδιων βιβλιοθηκών των δειγμάτων σε διαφορετικά πειράματα (inter-experiment variability).

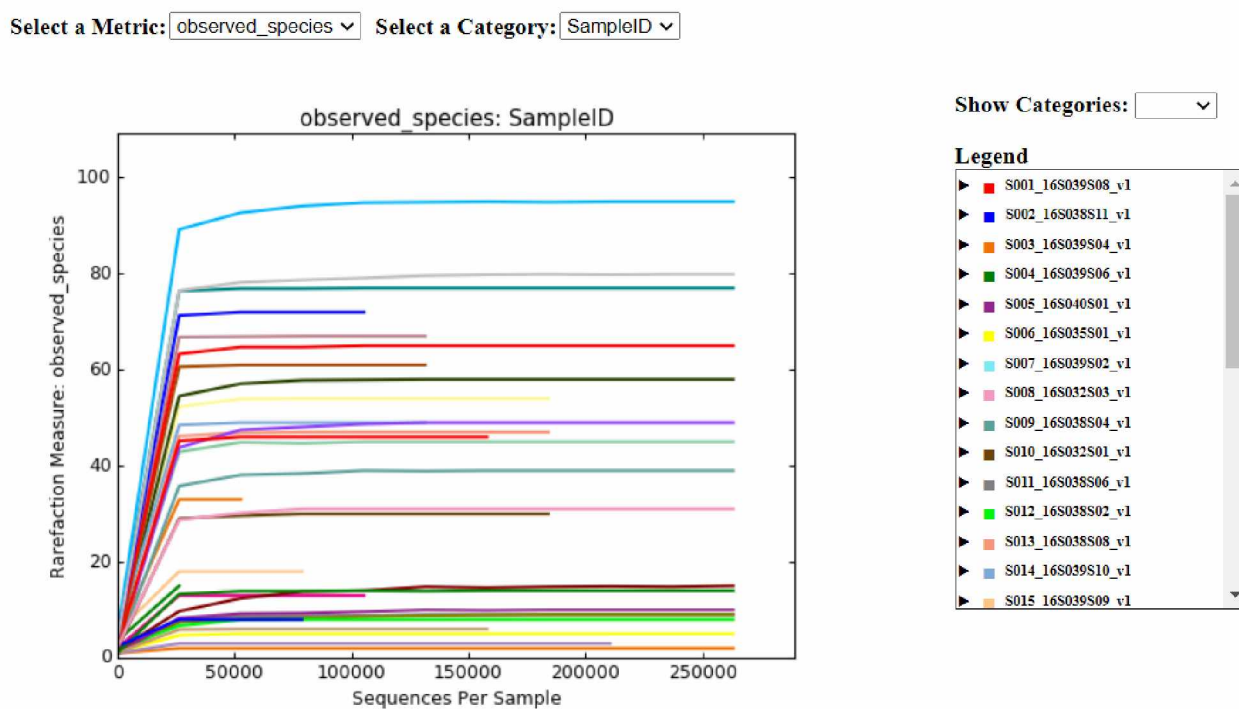
Τέλος, παρατηρήθηκε χαμηλή βιομάζα μικροοργανισμών στα δείγματα ενδομητρίου, η οποία γινόταν αντιληπτή μετά την ενίσχυση των υπερμεταβλητών περιοχών, όπου δεν υπήρχαν ευδιάκριτες ζώνες ενίσχυσης στο gel αγαρόζης, και η μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA με τη μέθοδο Qubit ήταν αρκετά χαμηλή (από 0,2 έως 0,9 ng/μL). Αντίστοιχα ήταν τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των βιβλιοθηκών των δειγμάτων ενδομητρίου μετά τη μέτρηση της Real Time PCR. Αντιθέτως οι αρχικές τιμές των συγκεντρώσεων των δειγμάτων, μετά την απομόνωση DNA από υγρό ενδομητρίου, ήταν αρκετά υψηλές, αλλά αυτό μπορεί να οφείλεται και στην παρουσία γενωμικού DNA, που πάρθηκε από τη γυναίκα κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας. Η pcr ενίσχυσης των υπερμεταβλητών περιοχών πραγματοποιούνταν στους 25 κύκλους για όλα τα δείγματα. Στην περίπτωση των δειγμάτων ενδομητρίου, κατ' εξαίρεση χρησιμοποιήθηκαν σε ένα δείγμα 30 κύκλοι pcr, έτσι ώστε να υπάρξει μεγαλύτερη ενίσχυση του προϊόντος. Παρατηρήθηκε διαφορά στα ποσοστά των κυρίαρχων οργανισμών στο δείγμα και μία μεγαλύτερη ποικιλότητα στα είδη οργανισμών στους 30 κύκλους pcr σε σχέση με τους 25 κύκλους. Πιο συγκεκριμένα, υπήρξε μία υποτίμηση του Burkholderiaceae, από 78,4% στους 25 κύκλους στο 41,89 στους 30 κύκλους, ενώ υπήρξε μία αύξηση στο ποσοστό των Propionibacteriaceae από 1,9% στους 25 κύκλους σε 11,9% στους 30. Οι αλλαγές στα ποσοστά των οργανισμών δε θεωρήθηκαν σημαντικές, συνεπώς στα υπόλοιπα δείγματα ενδομητρίου η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε στους 25 κύκλους.



Εικόνα 30: Σύγκριση των αποτελεσμάτων στο δείγμα ενδομητρίου 16S038S08 μετά την ενίσχυση των υπερμεταβλητών περιοχών σε διαφορετικές συνθήκες pcr (25 και 30 κύκλοι αντίστοιχα).

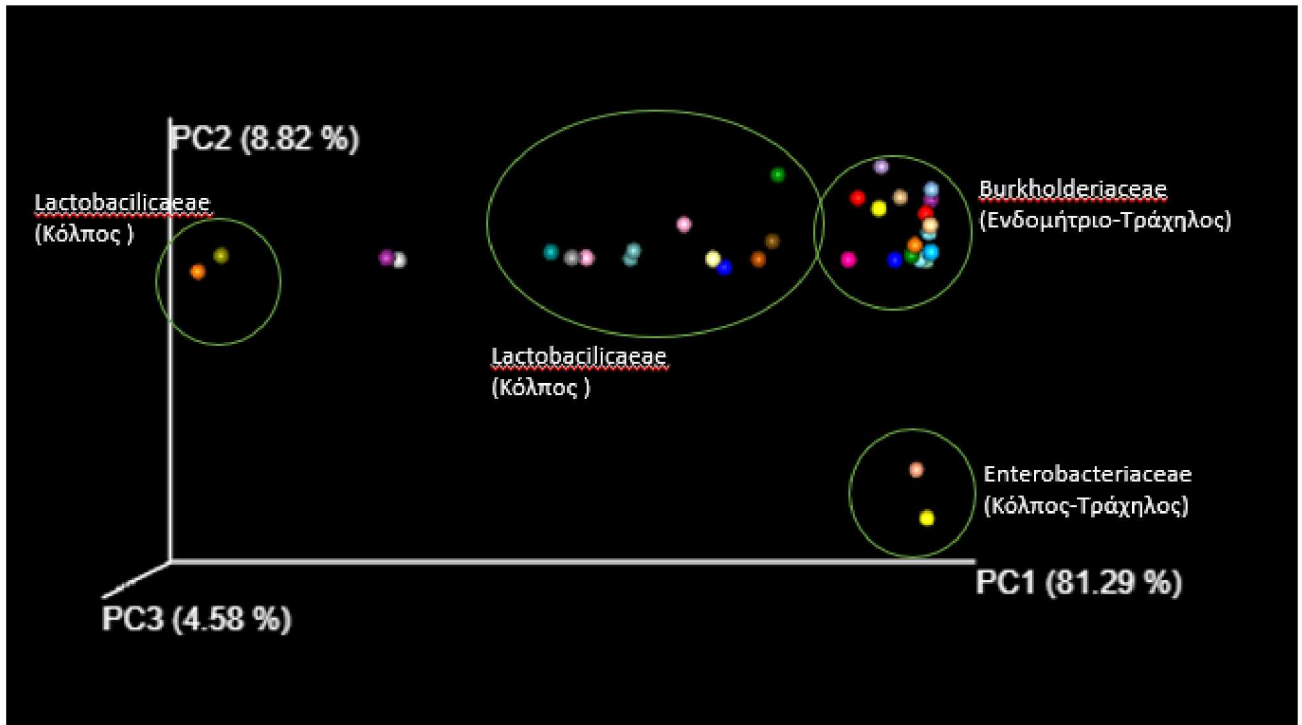
B.4.2 Alpha και Beta diversity

Τα αποτελέσματα Alpha diversity, αποτελούν έναν ποσοτικό δείκτη ο οποίος αντιπροσωπεύει την αφθονία και την ομοιομορφία των ειδών σε ένα συγκεκριμένο δείγμα. Στον άξονα x απεικονίζονται τα παρατηρούμενα είδη σε κάθε δείγμα, ενώ στον άξονα y εμφανίζονται τα Reads που έλαβε κάθε δείγμα κατά την διεξαγωγή του πειράματος έτσι ώστε να παραχθεί το ανάλογο αποτέλεσμα³⁸. Για να είναι αξιόπιστο ένα αποτέλεσμα, χρειάζεται ένα ελάχιστο ποσοστό διαβασμάτων της αλληλουχίας, της τάξεως των 20000. Παρατηρήθηκε πως τα περισσότερα δείγματα ξεπέρασαν κατά πολύ το ποσό των 20000 διαβασμάτων, και έφτασαν έως τα 250000. Αυτό το γεγονός εξαρτάται από το είδος του chip που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα (510, 520, 530), από το ποσό των δειγμάτων που υπήρξαν ταυτόχρονα στο πείραμα και στο ίδιο chip, αλλά και από τη γενική ποιότητα της πειραματικής διαδικασίας. Επιπλέον, διακρίνεται πως τα δείγματα με τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία είναι τα δείγματα ενδομητρίου, με τη μικρότερη ποικιλομορφία τα δείγματα κόλπου ενώ ενδιάμεσα βρίσκονται τα δείγματα τραχήλου.



Εικόνα 31: Alpha diversity με βάση την αφθονία των οικογενειών βακτηρίων στα δείγματα.

Τα αποτελέσματα Beta diversity, περιγράφουν την ποικιλότητα μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων που εμπεριέχονται στο πείραμα. Πράγματι, παρατηρείται μία ομαδοποίηση των δειγμάτων με βάση την προέλευσή τους, κάτι το οποίο υπονοεί πως στην πλειοψηφία τους τα δείγματα που προήλθαν από το ίδιο αρχικό υλικό (κόλπο, ενδομήτριο, τράχηλο) παρουσιάζουν και παρόμοιο μικροβίωμα.

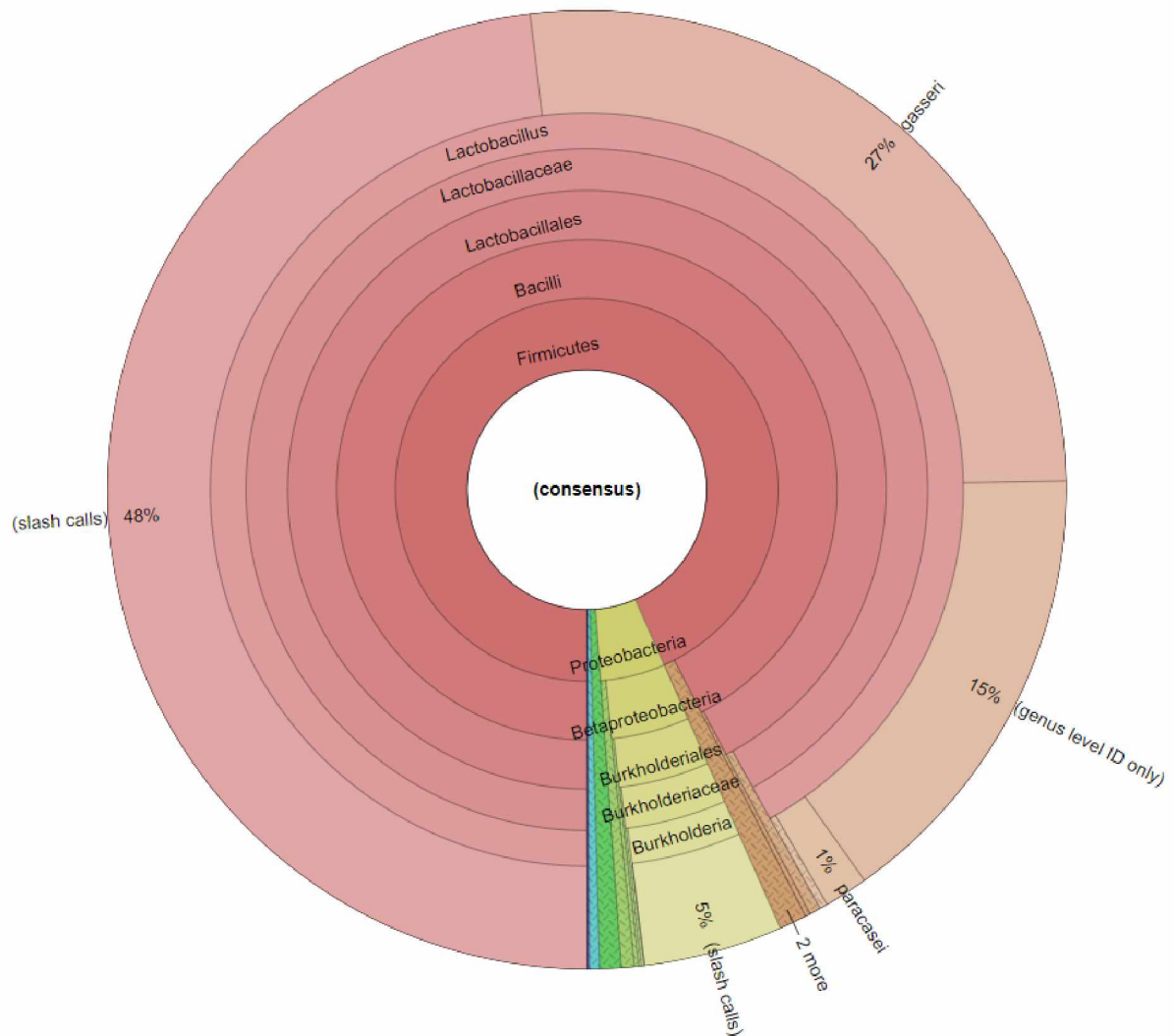


Εικόνα 32: Beta diversity σε δείγματα της μελέτης.

B.4.2 Αποτελέσματα σε δείγματα κόλπου

Στην πλειοψηφία των δειγμάτων κόλπου (9 από τα 13 δείγματα που εξετάστηκαν), παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά Lactobacillaceae, από 91% έως 99,9% του συνόλου των οργανισμών στο δείγμα. Τα είδη Lactobacillaceae που παρατηρήθηκαν στα εν λόγω δείγματα ήταν τα *Lactobacillus crispatus*, *delbrueckii*, *fornicalis*, *jensenii*, *vaginalis*, *gasseri*, *iners*, *johnsonii*, *paracasei*. Στην πλειοψηφία των δειγμάτων η μέθοδος δεν μπορεί να καταλήξει σε ένα συγκεκριμένο κυρίαρχο είδος Lactobacillaceae, αλλά τα αποτελέσματα εμφανίζονται με τη μορφή των slash calls (Εικ. 34). Πιθανώς οι λόγοι της αδυναμίας ταυτοποίησης των ειδών σε αρκετά δείγματα και της εμφάνισής τους ως slash calls, να βρίσκονται στα προγράμματα που χρησιμοποιούνται για την βιοπληροφορική ανάλυση των δειγμάτων και την ταυτοποίηση των οργανισμών, στις βάσεις Greengenes και MicroSEQ® 16S Reference Library, στους εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση των υπερμεταβλητών περιοχών, αλλά και στη μεγάλη ομοιότητα στην αλληλουχία του 16s rRNA μεταξύ των ειδών ίδιου

γένους. Στις οδηγίες του αλγορίθμου του προγράμματος Ion Reporter, περιγράφεται πως εάν ένα αποτέλεσμα από ένα διάβασμα αλληλουχίας περιέχει περισσότερα από ένα είδη σε ένα συγκεκριμένο εύρος, τα είδη στα αποτελέσματα εμφανίζονται ως slash calls, ενώ περισσότερες πληροφορίες για τα είδη που εμπεριέχονται στο συγκεκριμένο εύρος αλληλουχίας, μπορούν να βρεθούν στα raw δεδομένα του πειράματος³⁹.



Εικόνα 33: Αντιπροσωπευτικό διάγραμμα Krona (δείγμα 16S038S04), στο οποίο οι κυρίαρχοι οργανισμοί ανήκουν στην οικογένεια Lactobacillaceae (91,9%) , ενώ ταυτοποιείται το είδος *Lactobacillus gasseri* με 27%. Τα υπόλοιπα είδη *Lactobacillus* εμφανίζονται ως slash calls.

Το σύνολο των ειδών *Lactobacillus* που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα κόλπου, φαίνεται πως ανήκουν στις 5 κύριες ομάδες βακτηρίων που εντοπίζονται στον κόλπο γυναικών (CST I-V), αλλά λόγω της παρουσίας των slash calls δεν μπορεί να καθοριστεί ο ακριβής τύπος της κάθε γυναίκας⁴⁰.

Στο δείγμα 16S038S02_K, εντοπίστηκαν *Enterobacteriaceae* σε ποσοστό 93,79%. Η παρουσία των *Enterobacteriaceae* σε τόσο μεγάλο ποσοστό στο κολπικό περιβάλλον μπορεί να υποδεικνύει μία δυσβιωτική συνθήκη⁴¹. Στη γυναικολογία, *Enterobacteriaceae* έχουν περιγραφεί σε περιπτώσεις φλεγμονώδους νόσου της πυέλου (PID), που είναι μία φλεγμονή που προκαλείται από τη μόλυνση του ανώτερου γυναικείου γεννητικού συστήματος. Στην PID, μικροοργανισμοί συνήθως ανέρχονται από την περιοχή του κόλπου και του ενδοτραχήλου στο ενδομήτριο αλλά και σε άλλα σημεία του άνω γεννητικού συστήματος των γυναικών και μπορούν να προκαλέσουν ενδομητρίτιδα, σαλπινγίτιδα, παραμετρίτιδα, ωοφορίτιδα, σωληνοωθηκικό απόστημα και πυελική περιτονίτιδα. Τα *Enterobacteriaceae* και ο *Staphylococcus aureus* ευθύνονται για το 70% των περιπτώσεων PID σε γυναίκες⁴².

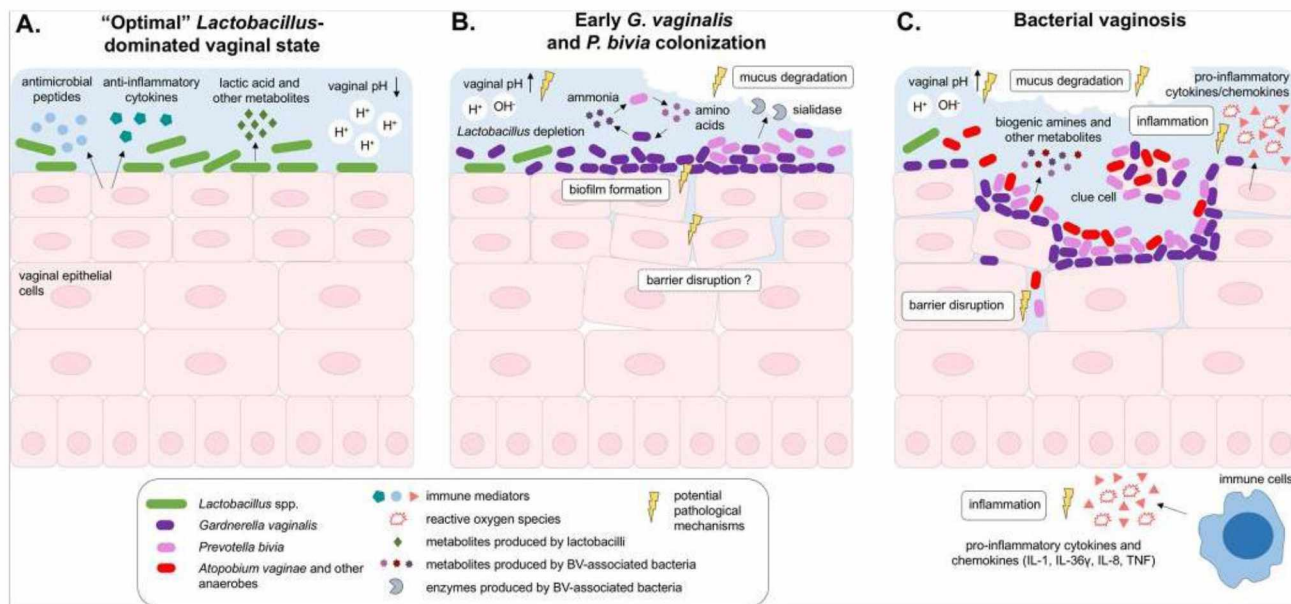
Τα δείγματα 16S038S11_K, 16S039S07_K και 16S039S09_K εμφάνισαν διαφορετικό μοτίβο κολπικού μικροβιώματος. Τα δείγματα 16S038S11_K και 16S039S07_K περιείχαν *Lactobacillaceae* σε ποσοστά μικρότερα του 90% (16S038S11_K-33,17% και 16S039S07_K-63,98%) ενώ υπήρχαν άλλες δύο επικρατούσες οικογένειες οργανισμών σε κάθε δείγμα, η *Coriobacteriaceae* και η *Bifidobacteriaceae* αντίστοιχα. Το δείγμα 16S039S09_K ήταν το πιο πολύπλοκο ανάμεσα στα κολπικά δείγματα, με τις κύριες οικογένειες οργανισμών να είναι οι *Coriobacteriaceae*(22,26%), *Bifidobacteriaceae*(23,92%), *Clostridiaceae*(12,39%) και *Prevotellaceae*(15,33%).

Η οικογένεια *Coriobacteriaceae* περιλαμβάνει το *Atopobium vaginae*. Το *Atopobium vaginae* είναι ένα νεοανακαλυφθέν βακτήριο που απαντάται συχνά σε γυναίκες με βακτηριακή κολπίτιδα(περισσότερο από 95%). Ο οργανισμός αυτός παρόλα αυτά έχει ανιχνευθεί και σε υγιείς γυναίκες χωρίς βακτηριακή κολπίτιδα (έως και 20%). Γενικά η οικογένεια των *Coriobacteriaceae* θεωρείται ο μοναδικός αιτιολογικός παράγοντας για εκδήλωση βακτηριακής κολπίτιδας, αλλά είναι ένας πιθανός συνένοχος και αυτή την παθολογική έκβαση⁴³.

Η οικογένεια των *Bifidobacteriaceae* σχετίζεται επίσης με τη βακτηριακή δυσβίωση στις γυναίκες και την εκδήλωση βακτηριακής κολπίτιδας. Πιο συγκεκριμένα τα *Bifidobacteria* εμφανίζονται αρχικά ανάμεσα στη φυσιολογική κολπική μικροχλωρίδα (στο 12% των ασθενών), η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε ανώμαλη μικροχλωρίδα (στο 41% των ασθενών) και στη συνέχεια σε βακτηριακή κολπίτιδα (στο 94% των ασθενών), σε αντίθεση με είδη όπως το *G.vaginalis* και *Mycoplasma hominis* που ανιχνεύονται μόνο στο τελευταίο στάδιο της βακτηριακής κολπίτιδας. Συνεπώς φαίνεται πως τα

Bifidobacteriaceae εμπλέκονται στη σταδιακή μετατροπή της φυσιολογικής μικροχλωρίδας σε μικροχλωρίδα βακτηριακής κολπίτιδας⁴⁴.

Τέλος οι Clostridiaceae και Prevotellaceae ανήκουν στα βακτήρια που συσχετίζονται με εκδήλωση βακτηριακής κολπίτιδας⁴⁵. Σε υγιή κατάσταση το κολπικό μικροβίωμα κυριαρχείται όπως είπαμε από είδη *Lactobacillus*. Οι γαλακτοβάκιλλοι παράγουν γαλακτικό οξύ το οποίο μειώνει το pH του κόλπου και τον προστατεύει από εισβολή παθογόνων. Τα επιθηλιακά κύτταρα συνθέτουν επίσης χαμηλά επίπεδα αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Επιπλέον, τα επιθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συμβάλλουν στην ομοιόσταση με την παραγωγή αντιφλεγμονώδων κυτοκινών. Η κολπική δυσβίωση μπορεί να ξεκινήσει με τον αποικισμό του κολπικού περιβάλλοντος από *Gardnerella vaginalis*. Ο *G.vaginalis* αποικίζει τα κολπικά επιθηλιακά κύτταρα, αντικαθιστά τους γαλακτοβάκιλλους και ξεκινά τη δημιουργία ενός βιοφίλμ. Μετά τον αποικισμό του *G.vaginalis*, η *Prevotella* προσλαμβάνεται στο βιοφίλμ. Οι *G.vaginalis* και *Prevotella* υποστηρίζουν την ανάπτυξή τους με τον μεταβολισμό της αμμωνίας και των αμινοξέων. Τόσο το *G.vaginalis* όσο και η *Prevotella* είναι ικανά να παράγουν ένζυμα τα οποία μπορούν να συμβάλουν στην αποδόμηση της βλέννας και κατά συνέπεια τη διάσπαση του φραγμού ενάντια στα παθογόνα. Δεν παρατηρείται εμφανής φλεγμονή μετά τον αποικισμό του κόλπου από τα συγκεκριμένα βακτήρια, κάτι το οποίο υποδηλώνει πως είναι σε θέση να αποφύγουν την ανοσοαπόκριση του ξενιστή μέσω άγνωστων μηχανισμών. Στη συνέχεια, άλλοι δευτερεύοντες αποικιστές, όπως οι *Atopobium vaginae* προσλαμβάνονται στο βιοφίλμ. Η παραγωγή βιογενών αμινών και άλλων μεταβολιτών από τα βακτήρια που σχετίζονται με την βακτηριακή κολπίτιδα, συμβάλλουν σε ένα αυξημένο κολπικό pH, το οποίο οδηγεί στην εκδήλωση συμπτωμάτων της βακτηριακής κολπίτιδας, όπως είναι η μυρωδιά ψαριού. Τα επιθηλιακά κύτταρα και τα στρατολογημένα ανοσοκύτταρα, παράγουν προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες και χημειοκίνες, οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε φλεγμονή των γεννητικών οργάνων (Εικ.33).⁴⁶



Εικόνα 34: Απεικόνιση υποθετικού μοντέλου για την καθιέρωση της βακτηριακής κολπίτιδας και οι ανοσολογικές και φυσιολογικές αλλαγές που σχετίζονται με τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε ξενιστή και μικρόβια. (Muzny et al. *Curr Opin Infect Dis.* 2020)

B.4.3 Αποτελέσματα σε δείγματα τραχήλου.

Το μικροβίωμα της περιοχής του τραχήλου αναμένεται να είναι παρόμοιο με αυτό του κόλπου, ενώ συχνά χαρακτηρίζεται τραχηλοκολπικό (cervicovaginal) μικροβίωμα. Πράγματι τα αποτελέσματα από δείγματα τραχήλου 6 διαφορετικών γυναικών περιείχαν Lactobacillaceae σε μεγάλα ποσοστά (5 γυναίκες από 31,8% έως 95% Lactobacillaceae), ενώ σε δείγμα τραχήλου μίας γυναίκας εμφανίστηκε Enterobacteriaceae σε ποσοστό 97,7%. Η μικροβίωση του τραχήλου ταξινομείται επίσης σε πέντε διακριτές ομάδες με βάση τη σύσταση των ειδών Lactobacillaceae σε αυτή (CST I-V). Σε περιπτώσεις τραχηλικής δυσβίωσης παρατηρούνται αντίστοιχα αναερόβιοι οργανισμοί όπως είναι οι *Gardnerella*, *Megasphera*, *Atopobium* και *Prevotella*. Ορισμένες γυναίκες με τραχηλοκολπική δυσβίωση αναπτύσσουν συμπτώματα όπως τη μη φυσιολογική κολπική έκκριση υγρών, τη φλεγμονή, την οσμή και τον κνησμό. Γενικά το γένος *Lactobacillus* εμφανίζει μεγάλη αφθονία στο τραχηλοκολπικό μικροβίωμα⁴⁷. Στην περίπτωση της γυναίκας με Enterobacteriaceae σε ποσοστό 97,7%, θα είχε ενδιαφέρον να γίνει ανάλυση και σε ένα κολπικό δείγμα έτσι ώστε να παρατηρηθεί εάν υπάρχει παρόμοια μικροβιακή σύσταση. Enterobacteriaceae στο περιβάλλον του τραχήλου σε τόσο μεγάλο ποσοστό θα μπορούσε να ανιχνευθεί στην περίπτωση της μικροβιακής δυσβίωσης και πιο συγκεκριμένα στην παθολογική συνθήκη PID⁴². Τα 5 δείγματα τραχήλου που

περιείχαν Lactobacillaceae περιείχαν επίσης και Burkholderiaceae (από 3,1% έως 63,4 %). Το Burkholderiaceae είναι ένας κοινός περιβαλλοντικός παράγοντας επιμόλυνσης και εντοπίζεται συχνά στο νερό. Ακόμα και αν τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε στείρες συνθήκες, είναι πιθανόν τα δείγματα να έχουν μολυνθεί με μικροβιακά νουκλεϊκά οξέα Burkholderia⁴⁸. Να σημειωθεί πως στα δείγματα που παρατηρείται η ύπαρξη Burkholderia σε αξιοσημείωτα ποσοστά, υπήρχε χαμηλή βιομάζα οργανισμών στο δείγμα, κάτι το οποίο μπορεί να ευνόησε την ενίσχυση διάφορων παραγόντων επιμόλυνσης (contaminants) που μπορεί να υπήρχαν στο δείγμα.

B.4.4 Αποτελέσματα σε δείγματα ενδομητρίου

Τα δείγματα ενδομητρίου παρουσίασαν μεγαλύτερη ποικιλότητα από τα δείγματα κόλπου και τραχήλου, όπως ήταν αναμενόμενο και από τη βιβλιογραφία⁴⁹. Από τα 14 δείγματα ενδομητρίου, στα 11 εντοπίστηκε Burkholderia σε ποσοστά από 26% έως 82%. Τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος Burkholderia είναι αρνητικά Gram βήτα-πρωτεοβακτήρια, που κατανέμονται ευρέως στο περιβάλλον. Διαθέτουν μεγάλη γονοτυπική και φαινοτυπική πλαστικότητα και είναι ικανά για ταχεία μετάλλαξη και προσαρμογή σε ακραία περιβάλλοντα. Τα Burkholderia μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές αναπνευστικές λοιμώξεις, σε ασθενείς με υποκείμενα νοσήματα, όπως την κυστική ίνωση και τη χρόνια κοκκιοματώδη νόσο (CGD). Τα Burkholderia έχουν επίσης την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται σε υδάτινα περιβάλλοντα, όπως είναι λίμνες, τα ποτάμια, το πόσιμο νερό και γενικά τα υγρά που περιέχουν μικρές ποσότητες θρεπτικών συστατικών. Επιπλέον, τα συγκεκριμένα βακτήρια περιγράφονται και ως οι κύριοι μολυσματικοί παράγοντες στείρων (π.χ. ενδοφλέβια φάρμακα και διαλύματα) και μη αποστειρωμένων φαρμακευτικών προϊόντων (π.χ. ρινικά σπρέι, προϊόντα με βάση το νερό, στοματικά διαλύματα, προεγχειρητικά διαλύματα δέρματος και απολυμαντικά χεριών), ενώ είναι η αιτία πολυάριθμων νοσοκομειακών εστιών μόλυνσης που καταγράφηκαν τις τελευταίες 2 δεκαετίες⁵⁰. Πολλά από αυτά τα επεισόδια επιμόλυνσης έχουν συσχετιστεί με την ικανότητα των βακτηρίων Burkholderia να ευδοκιμούν παρουσία αντιμικροβιακών απολυμαντικών, ιδιαίτερα των βιοκτόνων που χρησιμοποιούνται σε σκευάσματα φαρμακευτικών προϊόντων⁵¹.

Το Burkholderia έχει περιγραφεί και στο γυναικολογικό σύστημα σε σπάνιες περιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα, το Burkholderia προκαλεί μελιοείδωση (Meliodosis), μία ασθένεια που είναι ενδημική στο βορειοανατολικό τμήμα της Ταϊλάνδης, στη νοτιοανατολική Ασία και τη βόρεια Αυστραλία. Οι οδοί εισόδου του Burkholderia στον οργανισμό είναι μέσω του δέρματος, της εισπνοής και της κατάποσης, ενώ υπάρχουν παράγοντες που προσδίδουν μία προδιάθεση για μελιοείδωση, όπως είναι ο σακχαρώδης διαβήτης, η νεφρική ανεπάρκεια, η θαλασσαιμία, ο αλκοολισμός και η

χρόνια πνευμονική νόσος. Οι πιο κοινές κλινικές εκδηλώσεις της ασθένειας είναι η πνευμονία, το ηπατικό ή το σπληνικό απόστημα, η λοίμωξη του δέρματος και των μαλακών ιστών, η μόλυνση του ουροποιητικού συστήματος και η οστεοαρθρική λοίμωξη. Η εμφάνιση *Burkholderia* στο γυναικολογικό σύστημα είναι σπάνια, παρόλα αυτά υπάρχουν περιπτώσεις που ασθενείς με μελιοείδωση εμφάνισαν *Burkholderia* στο άνω γεννητικό σύστημα. Υπάρχει η υπόθεση πως η πρωτογενής λοίμωξη σε αυτούς τους ασθενείς προέκυψε από την επαφή των εξωτερικών γεννητικών οργάνων με το βακτήριο και στη συνέχεια αυτό προχώρησε μέσω της γεννητικής οδού όπου εγκαταστάθηκε στις σάλπιγγες και τις ωοθήκες. Η γυναικολογική εκδήλωση μετά από μόλυνση με *Burkholderia* περιλαμβάνει έλκος των γεννητικών οργάνων, τραχηλίτιδα, πυελική φλεγμονώδη νόσο και ωοθηκικό απόστημα. Οι επιπλοκές περιλαμβάνουν ηπατικά και σπληνικά αποστήματα. Η λοίμωξη με *Burkholderia* κατά τη διάρκεια της κύησης οδηγεί σε δυσάρεστα αποτελέσματα όπως είναι η σήψη στο νεογνό^{52,53,54}.

Το *Burkholderia* έχει εντοπιστεί και σε μελέτες με θέμα το μικροβίωμα της αναπαραγωγικής οδού και πιο συγκεκριμένα στις περιπτώσεις του μικροβιώματος του ενδομητρίου και του μικροβιώματος των σαλπίγγων. Στις μελέτες με θέμα το ενδομήτριο, το *Burkholderia* εμφανιζόταν ως κυρίαρχο σε αυτό, ενώ δεν υπήρχε μεγάλη αντιπροσώπευσή του σε κοιλικά δείγματα. Στην περίπτωση της διερεύνησης του μικροβιώματος στις σάλπιγγες, το *Burkholderia* εμφανιζόταν σε σημαντικά ποσοστά μεταξύ των *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* και *Pseudomonas*, αλλά δεν ήταν εφικτή η καλλιέργειά του σε σχέση με τα άλλα βακτήρια. Σε κάποιες περιπτώσεις το *Burkholderia* θεωρήθηκε ως ένας παράγοντας επιμόλυνσης των δειγμάτων ενδομητρίου και όχι ως ένας οργανισμός του μικροβιώματος, ενώ στις περισσότερες μελέτες δεν του αποδόθηκε κάποια συσχέτιση με τη θετική ή μη έκβαση της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Τέλος, η εμφάνιση του *Burkholderia* και η συσχέτισή του με τη δεκτικότητα του ενδομητρίου των γυναικών χρήζει περαιτέρω διερεύνησης^{48,55,59}.

Lactobacillaceae εντοπίστηκε στα 11 από τα 14 δείγματα ενδομητρίου σε ποσοστά από 1,5% έως 59%. Σε καμία από τις γυναίκες που έλαβαν μέρος στη μελέτη δεν παρατηρήθηκε συγκεκριμένο πρότυπο μικροβιώματος με ποσοστά *Lactobacillaceae* >90% (*Lactobacillus* dominated microbiota), όπως αναφέρεται σε ένα μεγάλο μέρος των μελετών που έχουν διεξαχθεί μέχρι τώρα. Το μικροβίωμα του ενδομητρίου διαθέτει μεγάλη ετερογένεια και μπορεί να σχετίζεται και αυτό, όπως και το μικροβίωμα του κόλπου, με την εθνικότητα και τις περιβαλλοντικές συνθήκες που βρίσκεται η κάθε γυναίκα.

Παράλληλα, οι περισσότερες μοριακές μελέτες που έχουν διεξαχθεί στο αντικείμενο του μικροβιώματος του ενδομητρίου, ανέλυσαν δείγματα τα οποία είχαν συλλεχθεί τραχηλικά. Αυτή η

προσέγγιση δειγματοληψίας είναι επιρρεπής σε επιμόλυνση του μικροβιώματος του ενδομητρίου με μικρόβια που βρίσκονται στο περιβάλλον του κόλπου ή του τραχήλου. Κατά συνέπεια η ευρεία επικράτηση Lactobacillaceae στα δείγματα ενδομητρίου μπορεί να οφείλεται σε επιμόλυνση κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας. Επιπλέον, το ενδομήτριο διαθέτει μικροβίωμα πολύ χαμηλής βιομάζας, συνεπώς ο μοριακός χαρακτηρισμός του είναι επιρρεπής σε παράγοντες επιμόλυνσης του κιτ απομόνωσης του αρχικού υλικού, ακόμη και των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR. Το μολυσμένο DNA μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό μέρος, αν όχι όλο, των παρατηρούμενων μικροβίων εντός του ενδομητρίου. Σε μελέτη που τα δείγματα για τη μελέτη του μικροβιώματος του ενδομητρίου λήφθηκαν από το μέσο του ενδομητρίου μετά από υστερεκτομή, η μικροβιακή σύσταση δεν περιείχε Lactobacillaceae σε μεγάλα ποσοστά. Αντιθέτως, τα ενδομητριακά βακτηριακά προφίλ κυριαρχούνταν σε μεγάλο βαθμό από τα Acinetobacter, Pseudomonas, Comamonadaceae και Cloacibacterium⁵⁶.

Στα δείγματα ενδομητρίου υπήρχε επίσης μία συστηματική εμφάνιση (σε 11 από τα 14 δείγματα), βακτηρίων που ανήκουν στην οικογένεια Rhizobiaceae σε ποσοστά από 1,3% έως 17%. Τα Rhizobia είναι πρωτεοβακτήρια και κύρια μέλη του μικροβιώματος των φυτών, καθώς βοηθούν τα φυτά με την πρόσληψη αζώτου. Στη γυναικολογία δεν έχουν περιγραφεί τα Rhizobia σαν μέλη του μικροβιώματος, ενώ σε παρόμοιες μελέτες ανάλυσης μικροβιώματος του ενδομητρίου έχουν αποκλειστεί από την τελική ανάλυση καθώς εμφανιζόταν σε πολύ μικρά ποσοστά.^{17,57}

Βακτήρια που ανήκουν στην οικογένεια των Propionibacteriaceae ήταν παρόντα σε 13 από τα 14 δείγματα ενδομητρίου σε ποσοστά από 0,5% έως 9,4%. Τα Propionibacteriaceae είναι βακτήρια που εντοπίζονται κατά κύριο λόγο σε γαλακτοκομικά προϊόντα, στο έντερο και στο δέρμα των ανθρώπων. Έχουν εντοπιστεί επίσης σαν μέλη του μικροβιώματος του ενδομητρίου σε αρκετές μελέτες. Ο Pelzer και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν ανάλυση του μικροβιώματος του ενδομητρίου γυναικών με δυσμηνόρροια. Η μελέτη συμπεριλάμβανε δείγματα γυναικών σε διάφορες φάσεις του εμμηνορροϊκού κύκλου μετά από υστεροσκόπηση(hysteroscopy) ή λαπαροσκόπηση. Το μικροβίωμα αυτών των γυναικών περιλάμβανε βακτήρια που ανήκαν στο γένος Lactobacillus, Propionibacterium, Staphylococcus και Pseudomonas⁵⁸. Propionibacteriaceae έχουν εντοπιστεί και στις σάλπιγγες γυναικών τόσο στο προ- όσο και στο μετά- κλιμακτηριακό στάδιο γυναικών, μεταξύ άλλων βακτηρίων όπως τα Staphylococcus, Lactobacillus και Enterococcus⁵⁹.

Στα δείγματα 16S040S02_E και 16S040S10_E, εκτός από Lactobacillaceae εντοπίστηκαν και Acetobacteraceae σε ποσοστά 20% και 40% αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί πως η απομόνωση DNA από υγρό ενδομητρίου σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε με το κιτ QIAamp DNA Microbiome

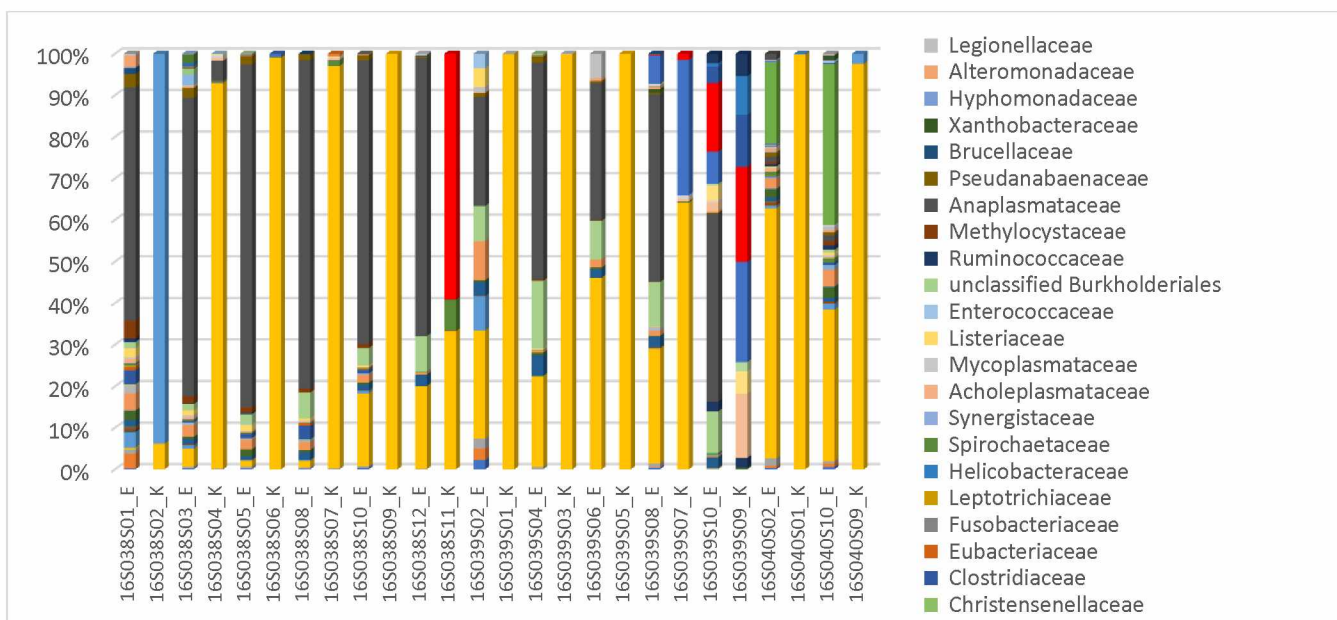
Kit με εξαίρεση τα δείγματα 16S040S02_E και 16S040S10_E, τα οποία απομονώθηκαν με το PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit. Τα βακτήρια Acetobacteraceae μπορούν να βρεθούν σε διάφορα περιβάλλοντα, χερσαία ή υδάτινα. Αποτελούν όπως και τα Burkholderia, έναν κοινό παράγοντα επιμόλυνσης, που μπορεί να γίνει διακριτός σε δείγματα με πολύ χαμηλή βιομάζα όπως αυτά του ενδομητρίου⁶⁰.

Το δείγμα 16S035S06_E παρουσίασε ένα μοναδικό μικροβιακό προφίλ μεταξύ των άλλων δειγμάτων, με τους κυρίαρχους οργανισμούς να ανήκουν στις οικογένειες Pasteurellaceae- 40% και Streptococcaceae- 16%. Οι Pasteurella είναι οργανισμοί που προκαλούν μολυσματικά σύνδρομα, όπως λοιμώξεις των μαλακών ιστών και πιο σπάνια βακτηριαιμία, μηνιγγίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, αυθόρμητη βακτηριακή περιτονίτιδα και ενδοκοιλιακό απόστημα. Παράλληλα αποτελεί μία σπάνια αιτία βακτηριαιμίας (bacteremia) κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο του εμβρύου⁶¹. Ταυτόχρονα, βακτήρια που ανήκουν στο γένος Streptococcus έχουν χαρακτηριστεί ως βακτήρια που απαρτίζουν ένα δυσβιωτικό μικροβίωμα ενδομητρίου, μαζί με τα Staphylococcus, Gardnerella, Mycoplasma, Ureoplasma, Chlamydia και Neisseria. Θεωρείται πως τα εν λόγω βακτήρια είναι υπεύθυνα για περιπτώσεις χρόνιας ενδομητρίωσης και πως επηρεάζουν αρνητικά τη διαδικασία εμφύτευσης της βλαστοκύστης. Παρόλα αυτά, φαίνεται πως η παθογονικότητα μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το είδος του Staphylococcus που εμφανίζεται στο ενδομήτριο³.

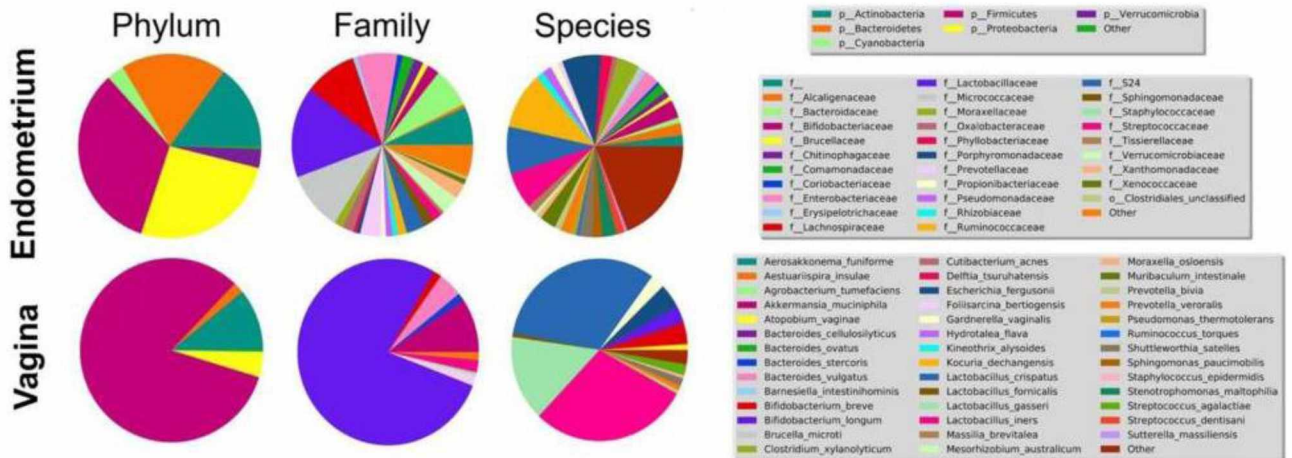
Εξαίρεση στα διαφορετικά μικροβιακά προφίλ μεταξύ των δειγμάτων κόλπου και ενδομητρίου από την ίδια γυναίκα αποτέλεσαν τα δείγματα 16S039S09_K και 16S039S10_E, που παρουσιάζουν παρόμοια μικροβιακά προφίλ, με εξαίρεση την εμφάνιση Burkholderia (44,8%) στο δείγμα ενδομητρίου. Στο δείγμα 16S039S10_E εντοπίστηκαν παράλληλα με το Burkholderia, Coriobacteriaceae(16,4%), Bifidobacteriaceae(7,7%), Clostridiaceae(3,84%) και Prevotellaceae(2%). Η παρουσία των παραπάνω βακτηρίων στον κόλπο, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, είναι χαρακτηριστική μιας δυσβιωτικής κατάστασης στο περιβάλλον του κόλπου, και πιο συγκεκριμένα της βακτηριακής κολπίτιδας. Η παρουσία αυτών των βακτηρίων στο ενδομήτριο μπορεί να οφείλεται στην άνοδο βακτηρίων από το περιβάλλον του κόλπου, μέσω του τραχήλου στο ενδομήτριο ή σε επιμόλυνση που έχει συμβεί κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας.

B.4.5 Σύγκριση δειγμάτων κόλπου-ενδομητρίου

Φαίνεται πως υπάρχουν διακριτές κοινότητες βακτηρίων στη γυναικεία αναπαραγωγική οδό, οι οποίες σχηματίζουν μία συνέχεια μικροβίων που ξεκινάει από τον κόλπο και φτάνει έως τις σάλπιγγες. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης καταδεικνύουν πως υπάρχουν διαφορές στη σύνθεση των μικροβίων μεταξύ του κολπικού και του ενδομητριακού μικροβιώματος. Το γένος *Lactobacillus* είναι το κυρίαρχο γένος στο κολπικό μικροβίωμα, ενώ το μικροβίωμα του ενδομητρίου χαρακτηρίζεται από μία πιο ετερογενή σύνθεση, με την παρουσία ειδών που δεν έχουν εντοπιστεί ακόμα στις ανθρώπινες γεννητικές περιοχές στο γενικό πληθυσμό όπως το *Burkholderia* και το *Rhizobiaceae* (Εικ.35). Παρόμοια αποτελέσματα ετερογένειας μεταξύ δειγμάτων κόλπου και ενδομητρίου από υπογόνιμες γυναίκες έχουν περιγραφεί μέχρι στιγμής σε διάφορες μελέτες (Εικ.36)⁶². Σε σύγκριση με το κολπικό μικροβίωμα, το ενδομήτριο φιλοξενεί σημαντικά μικρότερη ποσότητα μικροβίων, υποδηλώνοντας πως ο τράχηλος και το περιβάλλον της μήτρας χρησιμεύουν ως φράγμα για τους ανερχόμενους οργανισμούς. Δεδομένου πως οι *Lactobacillus* αντιπροσωπεύουν τα πιο κυρίαρχα βακτήρια στον κόλπο και τον τράχηλο, η εμφάνιση αυτών των ειδών στην κοιλότητα της μήτρας υποδηλώνει πως βακτήρια μεταφέρονται ενεργά από τον κόλπο, στον τράχηλο, τη μήτρα, έως και τις σάλπιγγες και τα ωοθυλάκια. Το γεγονός αυτό προκαλείται από τις αυθόρμητες συστολές της μήτρας, με την υψηλότερη συχνότητα συστολών κατά τη διάρκεια της ωορρηξίας και των οργασμών, οι οποίοι συμμετέχουν ενεργά στη μεταφορά σπερματοζωαρίων στις σάλπιγγες². Παράλληλα υπάρχει και η πιθανότητα επιμόλυνσης με *Lactobacillus* από το περιβάλλον του κόλπου και του τραχήλου κατά τη συλλογή του δείγματος⁶³.



Εικόνα 35: Αποτελέσματα δειγμάτων κόλπου-ενδομητρίου.



Εικόνα 36: Ετερογένεια σε δείγματα ενδομητρίου και κόλπου από 34 υπογόνιμες γυναίκες με τη χρήση 16S Metagenomics. (Riganelli L et al Front Cell Infect Microbiol. 2020)

B.4.6 Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στην απεικόνιση του μικροβιώματος της γεννητικής οδού (ενδομήτριο, κόλπο, τράχηλο), υπογόνιμων γυναικών, που βρίσκονται σε διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης. Η πλειοψηφία των δειγμάτων κόλπου εμφάνισαν ως κυρίαρχο μικροβίωμα είδη της οικογένειας Lactobacillaceae ενώ στα δείγματα ενδομητρίου και τραχήλου δεν υπήρξε κάποιο κυρίαρχο είδος οργανισμού. Η σύσταση των οργανισμών στα δείγματα ενδομητρίου χαρακτηριζόταν από μεγάλη ετερογένεια, ενώ δεν εντοπίστηκαν πολλές ομοιότητες στη σύσταση του μικροβιώματος μεταξύ κόλπου και ενδομητρίου.

Ένας από τους μεγαλύτερους περιορισμούς στη διερεύνηση του μικροβιώματος είναι η ποικιλία των τεχνικών που χρησιμοποιούνται όπως και οι βάσεις δεδομένων που συνδέονται με αυτές τις τεχνικές για τον εντοπισμό των ειδών και τον προσδιορισμό της σύνθεσης των μικροβίων. Τέτοιες διαφορές ενδέχεται να εισάγουν σημαντικές παραλλαγές στην ανάλυση ενώ αποτελούν σημαντική πηγή διαφορών στην ερμηνεία των δεδομένων. Παράλληλα, η πιθανότητα επιμόλυνσης του δείγματος αποτελεί ένα σημαντικό εμπόδιο για να διαπιστωθεί εάν τα βακτήρια που εντοπίζονται στη μήτρα αποτελούν στοιχεία του μικροβιώματός της, εισβολείς της γεννητικής οδού, ή bias λόγω της χαμηλής αφθονίας βακτηρίων στη μήτρα. Άλλος ένας βασικός περιορισμός στο συγκεκριμένο πεδίο, είναι το μέγεθος των δειγμάτων που υπάρχουν διαθέσιμα. Υπάρχει περιορισμένη προσέλευση ασθενών και τεχνικές προκλήσεις όσον αφορά τη λήψη δειγμάτων μήτρας. Κατά συνέπεια, ο μικρός αριθμός δειγμάτων μειώνει σημαντικά τη στατιστική ισχύ των μελετών. Επιπλέον υπάρχει έλλειψη εθνικής ποικιλομορφίας στις μελέτες μικρής κλίμακας. Όπως έχει αποδειχθεί, η βακτηριακή κολίτιδα διαφέρει σημαντικά στις Καυκάσιες γυναίκες σε σχέση με άλλες φυλετικές και εθνικές ομάδες,

συνεπώς είναι πιθανό το ίδιο να ισχύει και για το μικροβίωμα της μήτρας. Ένας αναπόφευκτος περιορισμός είναι η έλλειψη δειγμάτων από υγιείς γυναίκες, τα οποία μπορούν να χρησιμεύσουν ως δείγματα ελέγχου σε σχέση με τα δείγματα υπογόνιμων γυναικών. Τέλος, οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην αλληλούχηση του 16S rRNA γονιδίου, είναι μία πιθανή αιτία παραγωγής διαφορούμενων αποτελεσμάτων, καθώς ορισμένες περιοχές του γονιδίου έχει αποδειχθεί ότι υπερεκπροσωπούν ή υποεκπροσωπούν ορισμένες ομάδες βακτηρίων⁶⁴.

Συμπερασματικά, υπάρχουν αρκετές πειραματικές πρακτικές που θα μπορούσαν να χρησιμοποιούνται, ώστε μία μελέτη να καταλήγει σε μία αξιόπιστη σύσταση μικροβιώματος. Αρχικά οι μελέτες θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν μεγαλύτερα μεγέθη δειγμάτων, ταυτόχρονη χρήση διαφορετικών μεθόδων ανίχνευσης μικροβίων, αυστηρό έλεγχο των αντιδραστηρίων και του εξοπλισμού σε όλα τα στάδια της επεξεργασίας και της ανάλυσης των δειγμάτων για την παρουσία επιμολύνσεων, ενώ ο προσδιορισμός της σχετικής αφθονίας των βακτηριακών ομάδων θα πρέπει να προηγείται από την απόλυτη ποσοτικοποίηση του βακτηριακού φορτίου σε δείγματα και control και ταυτόχρονα θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η γεωγραφική κατανομή, η εθνική προέλευση και η κοινωνικές συνήθειες του πληθυσμού που περιλαμβάνεται στη μελέτη⁶⁵.

Τέλος, τα επόμενα βήματα της παρούσας μελέτης περιλαμβάνουν την ανάλυση μεγαλύτερου όγκου δειγμάτων από γυναίκες σε εξωσωματική γονιμοποίηση, αλλά και την παρακολούθηση της πορείας των συγκεκριμένων γυναικών μετά την εμφύτευση της βλαστοκύστης, έτσι ώστε να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του μικροβιώματος της γεννητικής οδού στην επιτυχία της εγκυμοσύνης από εξωσωματική γονιμοποίηση.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παράρτημα 1

Όνομα kit	Αντιδραστήριο	Αριθμός καταλόγου	Προέλευση
Ion 16S Metagenomics Kit	Kit ενίσχυσης υπερμεταβλητών περιοχών 16S rRNA γονιδίου	A26216	Thermo Fisher
Ion Plus Fragment Library Kit	Kit δημιουργίας βιβλιοθήκης	4471252	Thermo Fisher
Ion Xpress Barcode Adapters 1-96 kit	Προσαρμογείς-κωδικοί ιχνηλασιμότητας Ion Xpress™ 1-96 kit	ION-XBA7	One Lambda Inc
Ion Universal Library Quantification Kit	Kit καθορισμού συγκέντρωσης βιβλιοθηκών	A26217	Thermo Fisher
Ion S5™ ExT Chef Supplies	Ion S5™ ExT Chef διαλύματα αλληλούχισης	A30673	Thermo Fisher
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Qubit dsDNA HS Assay Kit	Q32854	Invitrogen
QIAamp DNA Microbiome Kit	Kit για απομόνωση βακτηριακού μικροβιώματος (DNA) από μικτούς πληθυσμούς	51704	Qiagen
PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit	Kit για απομόνωση βακτηριακού μικροβιώματος (DNA) από μικτούς πληθυσμούς	A29790	Thermo Fisher
RNAlater Solutions for RNA Stabilization and Storage	Σταθεροποίηση και αποθήκευση νουκλεϊκών οξέων		Thermo Fisher
CellMag Magnetic Beads for Nucleic Acid Purification	Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων	CMCB50	Celeemics

Πίνακας 4: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και τα χαρακτηριστικά τους.

Αναλώσιμα	Όνομα προϊόντος	Αριθμός καταλόγου	Προέλευση
Φιαλίδιο για PCR 0,5 ml	PCR TUBES 0.5 ml thin wall, clear	321-05-051	AXYGEN
Φιαλίδιο για PCR 0,2 ml	0.2-mL PCR tubes	6571	Costar
Φιαλίδιο για PCR 1.7ml	Microcentrifuge Tube 1.7ml	MCT-175-C	AXYGEN
Tips για πιπέτα P1000	TIPS DF1000ST	F171703	Gilson
Tips για πιπέτα P200	TIPS DF200ST	F171503	Gilson
Tips για πιπέτα P100	TIPS DF100ST	F171403	Gilson
Tips για πιπέτα P10	TIPS DFL10ST	F171203	Gilson
Tips για πιπέτα P20	TIPS DF30ST	F171303	Gilson
Πιάτο αντίδρασης χωρίς barcode	MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate no Barcode 10/pkg	N8010560	Applied Biosystems

Πίνακας 5: Αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και χαρακτηριστικά τους.

Εξοπλισμός	Όνομα	Αριθμός καταλόγου	Προέλευση
Θερμοκυκλοποιητής	Veriti® 96-well Thermal Cycler	2990224332	Life Technologies
Φθοριόμετρο Qubit® 4.0	Qubit® 4.0 Fluorometer	Q32866	Life Technologies
Φυγόκεντρος για πιάτο με 96 φρεάτια	96-well plate centrifuge	41011433	Thermo Fisher
Περιστροφικός αναδευτήρας πιάτου	Plate orbital shaker	5353AH710086	Eppendorf
Αναδευτήρας	Vortex	01.438340	Gilson
Ion Chef	4484178	242470092	Life Technologies
Μικροφυγόκεντρος	Microcentrifuge	40979526	Thermo Fisher
Σύστημα καθαρισμού του νερού	water purification system	41634724	Thermo Fisher
Ion Reporter server system	Torrent Server	743V8N2	Thermo Fisher
Ion S5	XL SYSTEM	2772817010125	Life Technologies
Real Time PCR system	ViiA7	278880296	AppliedBiosystems
πιπέτα P1000	Pipetman F123602 P1000	DA62146	Gilson
πιπέτα P200	PipetmanF123601 P200	DA50926	Gilson
πιπέτα P100	PipetmanF123615 P100	DA62031	Gilson
πιπέτα P10	Pipetman F144802 P10	CN62470	Gilson
πιπέτα P20	Pipetman F123600 P20	CM61741	Gilson

Πίνακας 6: Εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη.

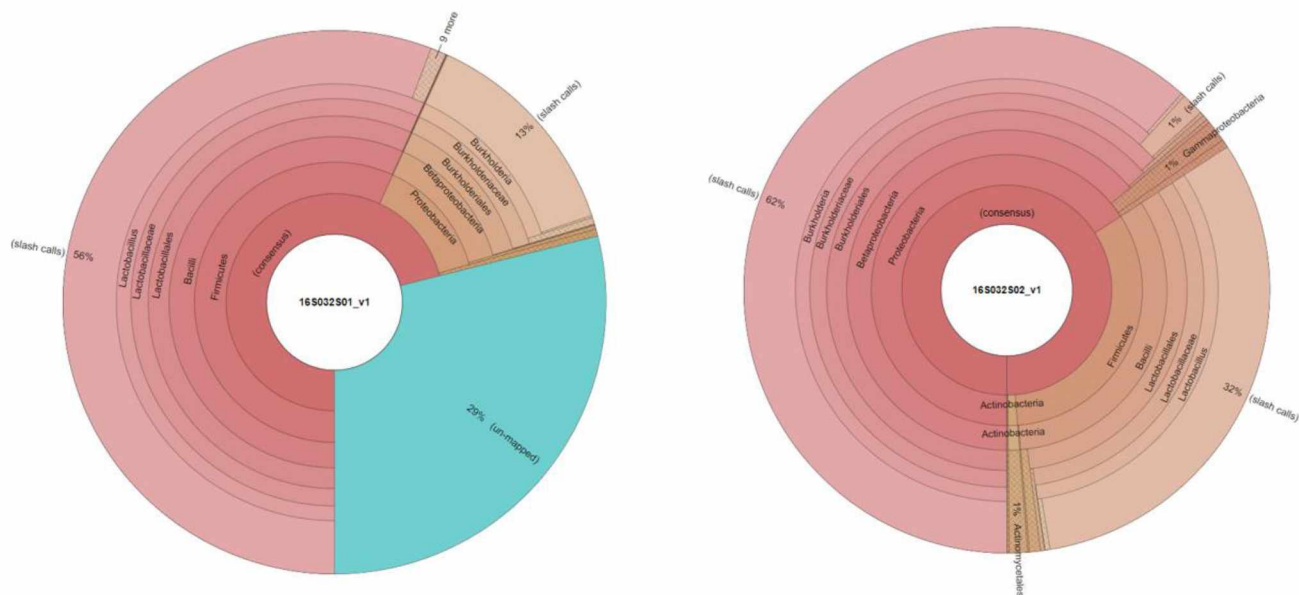
Παράρτημα 2

Ποσοστά των οργανισμών που εντοπίστηκαν στις 6 διαφορετικές βιβλιοθήκες του δείγματος ZymoBIOMICS Microbial Community Standard (TEST16S01), και στα διαφορετικά πειράματα που αναλύθηκαν έτσι ώστε να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου 16S Metagenomics.

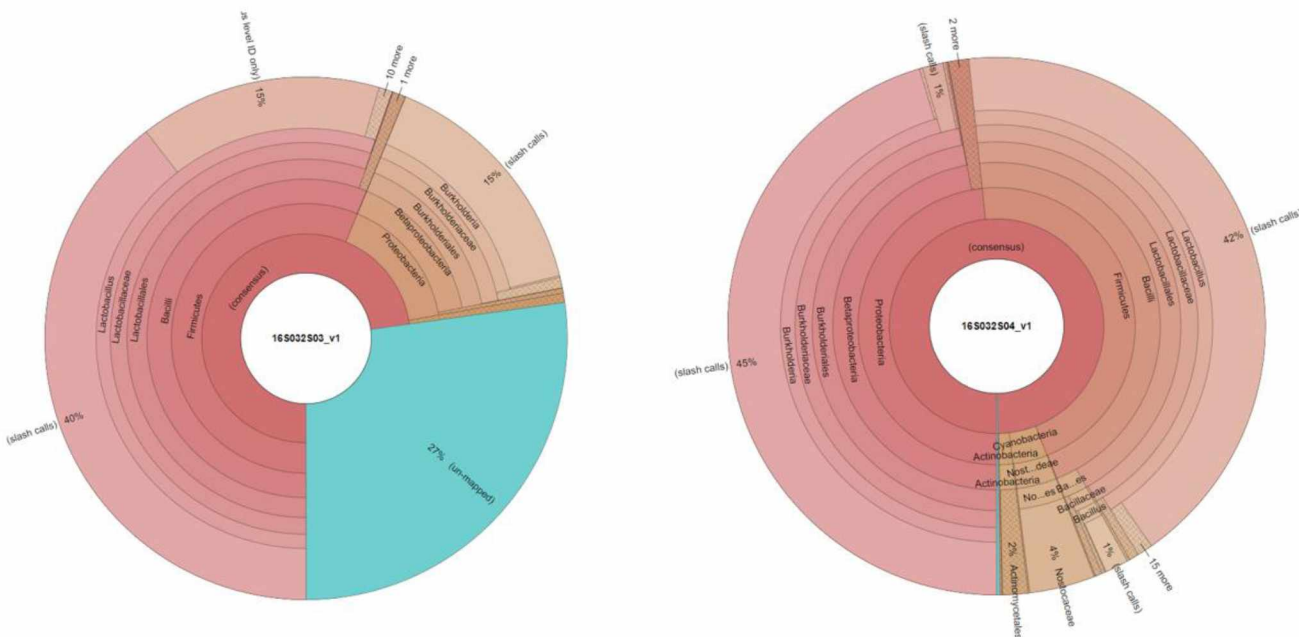
Family	LIB93_R UN1	LIB93_R UN2	LIB93_R UN3	LIB73_R UN1	LIB73_R UN2	LIB81_R UN1	LIB81_R UN2	LIB82_R UN1	LIB82_R UN2	LIB83_R UN1	LIB83_R UN2	LIB65_R UN1	LIB65_R UN2	contr ol samp le
Bacillaceae	11,35	12,51	11,76	12,42	13,85	12,48	14,16	12,03	14,63	14,4	14,89	12,75	10,16	12,5
Listeriaceae	13,52	15,49	15,46	12,55	12,86	11,34	14,19	10,9	12,51	12,07	11,61	13,48	11,69	12,5
Staphylococcaeae	12,07	8,47	11,24	8,85	10,29	7,15	11,23	10,58	10,09	8,76	9,34	8,68	9,09	12,5
Enterococcaeae	11,47	8,55	10,54	6,8	8,81	10,49	9,96	8,89	9,51	8,36	8,87	8,77	8,95	12,5
Lactobacillaeae	9,35	7,7	7,88	4,85	5,27	7,3	6,92	8,28	8,78	7,9	8,72	9,42	9,83	12,5
Enterobacteriaceae	34,92	40,2	36,24	48,55	42,8	45,32	37,49	42,97	39,18	43,46	40,97	42,21	45,08	25
Pseudomonadaceae	7,32	6,94	6,83	5,99	6,11	5,93	6,06	6,18	5,6	4,7	5,46	4,56	5,05	12,5

Παράρτημα 3

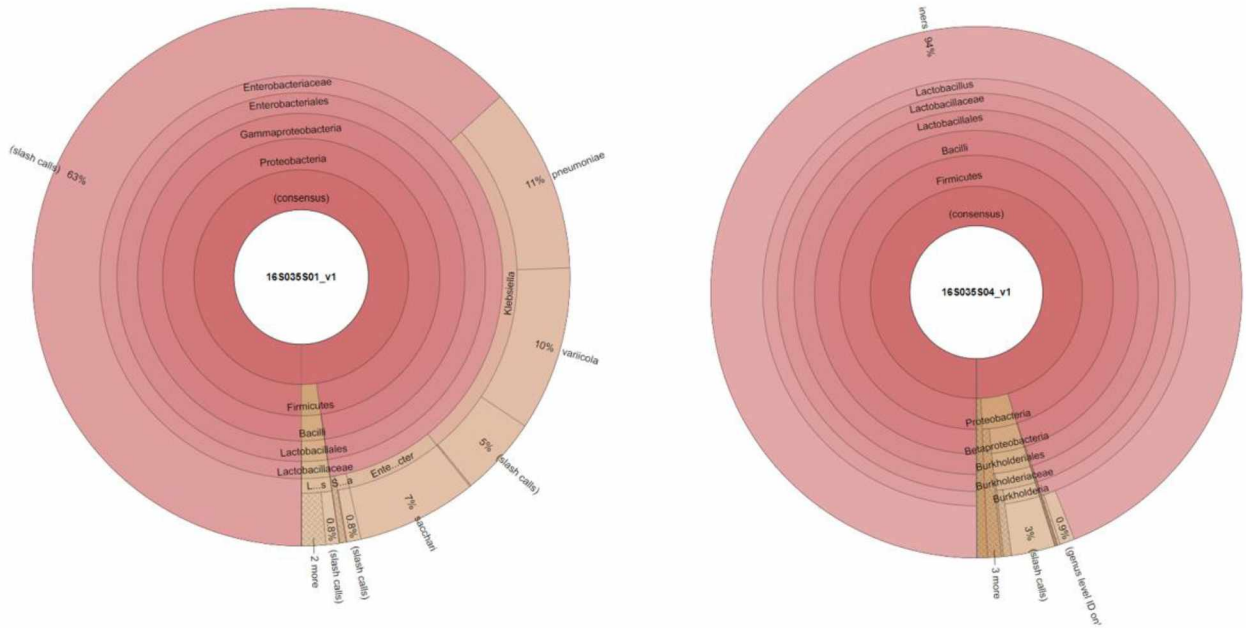
Διαγράμματα Κρονα των δειγμάτων που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.



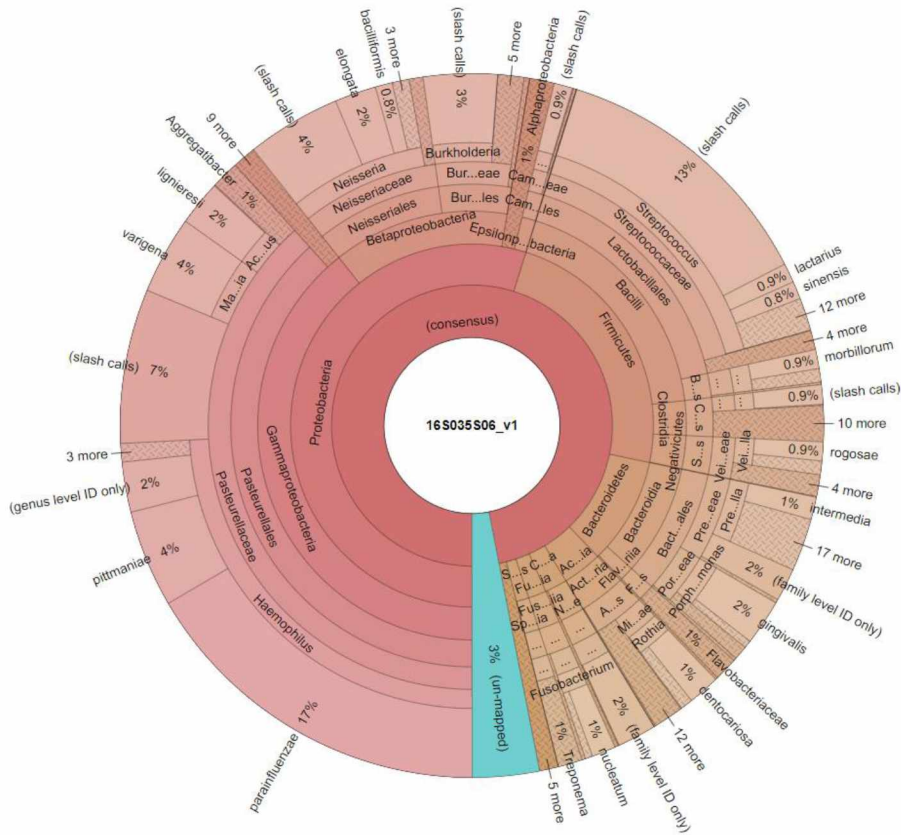
Εικόνα 37: Διαγράμματα Κρονα των δειγμάτων 16S032S01 και 16S032S02 (τυφλό και τράχηλος).



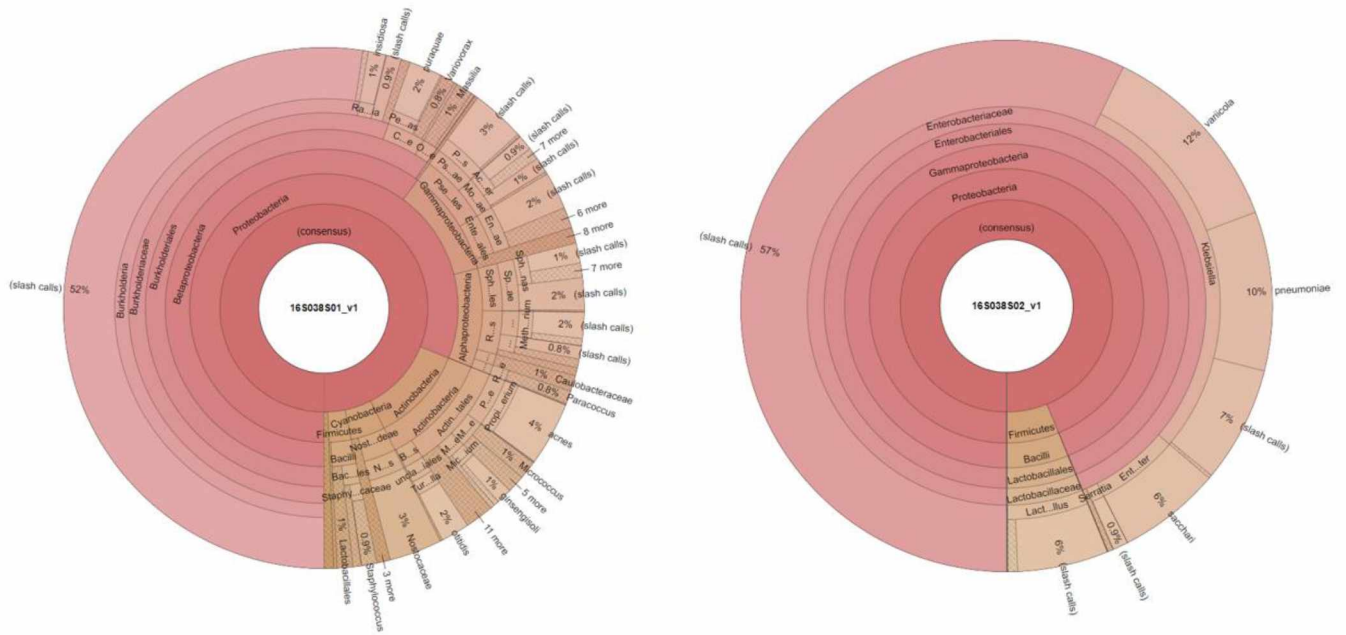
Εικόνα 38: Διαγράμματα Κρονα των δειγμάτων 16S032S03 και 16S032S04 (τράχηλος και τράχηλος).



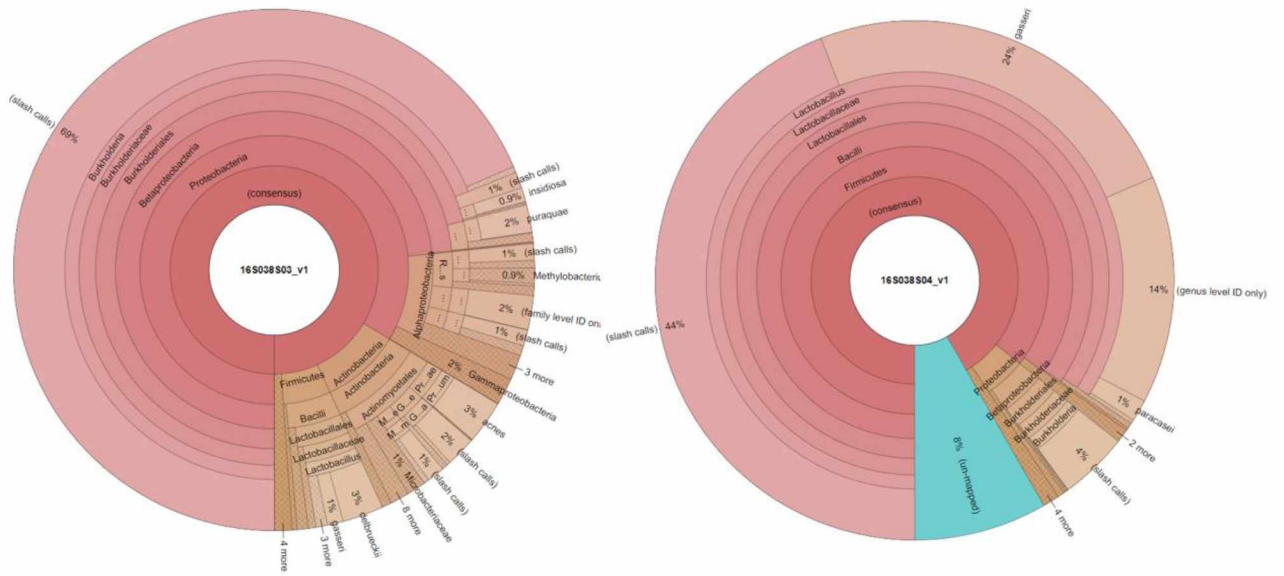
Εικόνα 39: Διαγράμματα Krona των δειγμάτων 16S035S01 και 16S035S04 (τράχηλος και τράχηλος).



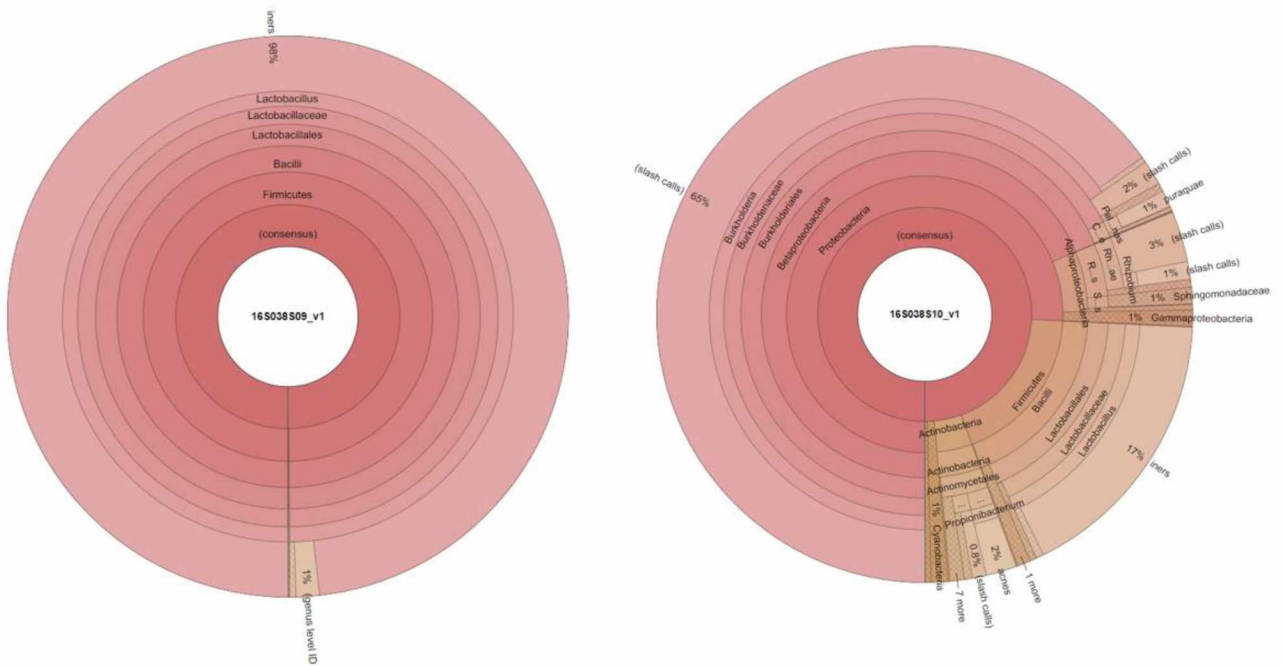
Εικόνα 40: Διάγραμμα Krona του δείγματος 16S035S06 (ενδομήτριο).



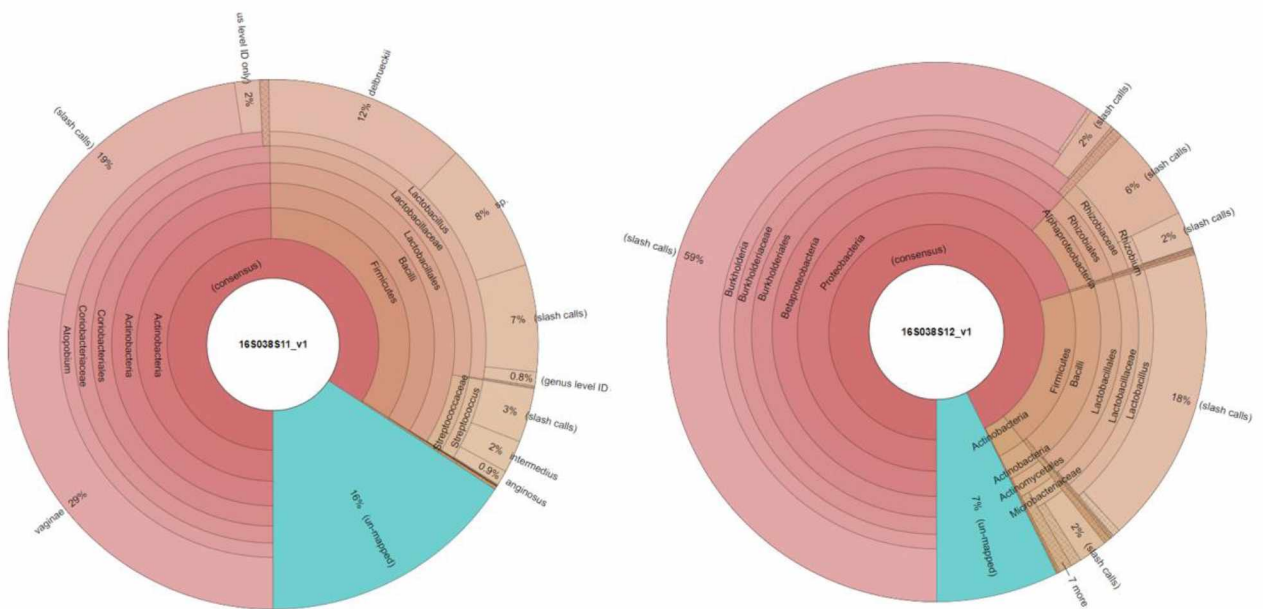
Εικόνα 41: Διαγράμματα Krona των δειγμάτων 16S038S01 και 16S038S02 (ενδομήτριο και κόλπος).



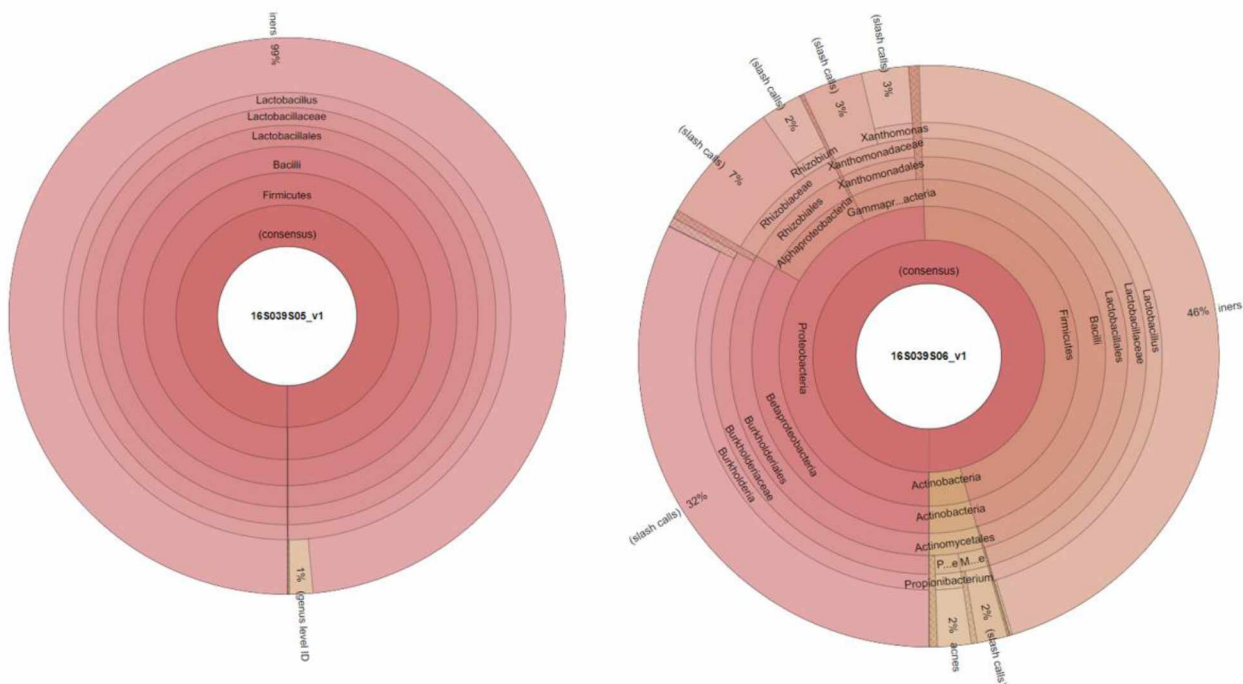
Εικόνα 42: Διαγράμματα Krona των δειγμάτων 16S038S03 και 16S038S04 (ενδομήτριο και κόλπος).



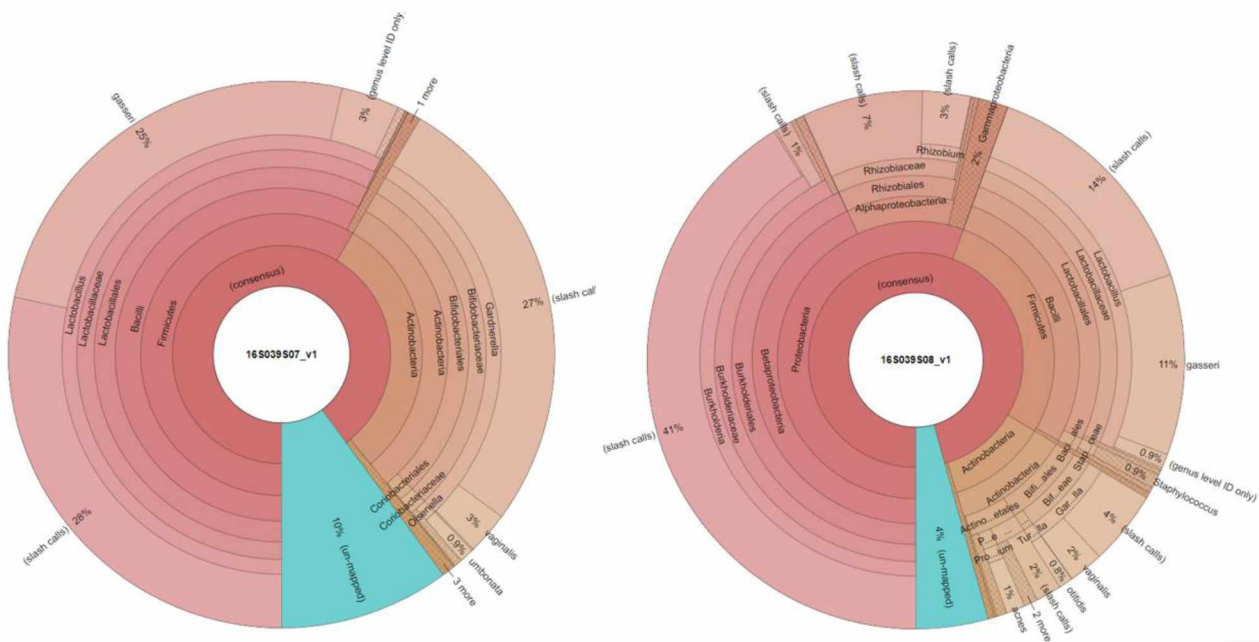
Εικόνα 45: Διαγράμματα Κρονα των δειγμάτων 16S038S09 και 16S038S10 (κόλπος και ενδομήτριο).



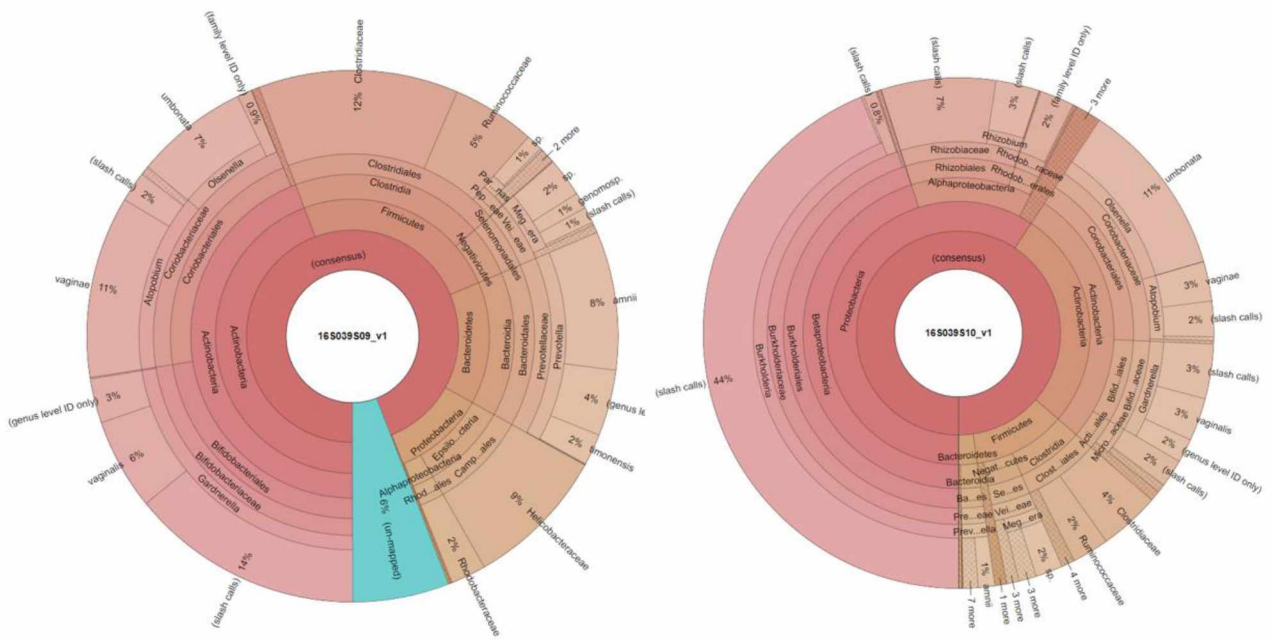
Εικόνα 46: Διαγράμματα Κρονα των δειγμάτων 16S038S11 και 16S038S12 (κόλπος και ενδομήτριο).



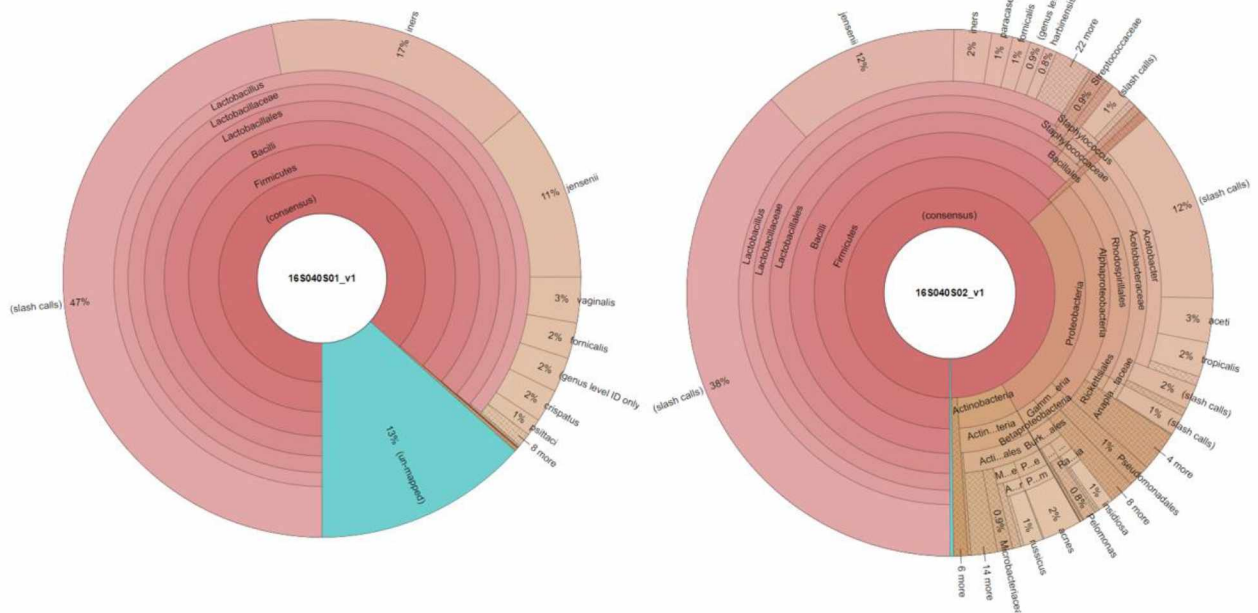
Εικόνα 49: Διαγράμματα Κρονα των δειγμάτων 16S039S05 και 16S039S06 (κόλπος και ενδομήτριο).



Εικόνα 50: Διαγράμματα Κρονα των δειγμάτων 16S039S07 και 16S039S08 (κόλπος και ενδομήτριο).



Εικόνα 51: Διαγράμματα Κροπα των δειγμάτων 16S039S09 και 16S039S10 (κόλπος και ενδομήτριο).



Εικόνα 52: Διαγράμματα Κροπα των δειγμάτων 16S040S01 και 16S040S02 (κόλπος και ενδομήτριο).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ¹ Peric A, Weiss J, Vulliemoz N, Baud D, Stojanov M. *Bacterial Colonization of the Female Upper Genital Tract*. Int J Mol Sci. 2019,20(14):3405. Published 2019 Jul 11
- ² Hansen LK, Becher N, Bastholm S, et al. *The cervical mucus plug inhibits, but does not block, the passage of ascending bacteria from the vagina during pregnancy*. Acta Obstet Gynecol Scand. 2014,93(1):102-108.
- ³ Hashimoto T, Kyono K. *Does dysbiotic endometrium affect blastocyst implantation in IVF patients?* J Assist Reprod Genet. 2019,36(12):2471-2479.
- ⁴ Wyklicky H, Skopec M. Ignaz Philipp Semmelweis, *the prophet of bacteriology*. Infect Control. 1983 Sep-Oct, 4(5):367-70.
- ⁵ Byndloss, M., Bäumlner, A. *The germ-organ theory of non-communicable diseases*. Nat Rev Microbiol 16, 103–110 (2018).
- ⁶ Jason M. Franasiak, Richard T. Scott, Introduction: *Microbiome in human reproduction, Fertility and Sterility*, Volume 104, Issue 6, 2015, Pages 1341-1343
- ⁷ Fox C, Eichelberger K. *Maternal microbiome and pregnancy outcomes*. 2015 Dec, 104(6):1358-63.
- ⁸ Cha J, Sun X, Dey SK. *Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy*. Nat Med. 2012 Dec, 18(12):1754-67.
- ⁹ Power, M.L., Quaglieri, C. & Schulkin, J. *Reproductive Microbiomes: A New Thread in the Microbial Network*. Reprod. Sci. 24, 1482–1492 (2017)
- ¹⁰ Anders AP, Gaddy JA, Doster RS, Aronoff DM. *Current concepts in maternal-fetal immunology: Recognition and response to microbial pathogens by decidual stromal cells*. Am J Reprod Immunol. 2017 Mar, 77(3):10.1111/aji.12623.
- ¹¹ Benner M, Ferwerda G, Joosten I, van der Molen RG. *How uterine microbiota might be responsible for a receptive, fertile endometrium*. Hum Reprod Update. 2018 Jul 1, 24(4):393-415
- ¹² Molina NM, Sola-Leyva A, Saez-Lara MJ, et al. *New Opportunities for Endometrial Health by Modifying Uterine Microbial Composition: Present or Future?* Biomolecules. 2020,10(4):593. Published 2020 Apr 11.
- ¹³ Eschenbach DA, Rosene K, Tompkins LS, Watkins H, Gravett MG. *Endometrial cultures obtained by a triple-lumen method from afebrile and febrile postpartum women*. J Infect Dis. 1986 Jun, 153(6):1038-45.

-
- ¹⁴ Mitchell CM, Haick A, Nkwopara E, Garcia R, Rendi M, Agnew K, Fredricks DN, Eschenbach D. *Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women*. Am J Obstet Gynecol. 2015 May,212(5):611.e1-9.
- ¹⁵ Chen, C., Song, X., Wei, W. *et al.* *The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases*. Nat Commun 8, 875 (2017).
- ¹⁶ Tomaiuolo R, Veneruso I, Cariati F, D'Argenio V. *Microbiota and Human Reproduction: The Case of Female Infertility*. 2020 May, 9(2):12.
- ¹⁷ Moreno I, Codoñer FM, Vilella F, Valbuena D, Martinez-Blanch JF, Jimenez-Almazán J, Alonso R, Alamá P, Remohí J, Pellicer A, Ramon D, Simon C. *Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure*. Am J Obstet Gynecol. 2016 Dec,215(6):684-703.
- ¹⁸ Kyono K, Hashimoto T, Nagai Y, Sakuraba Y. *Analysis of endometrial microbiota by 16S ribosomal RNA gene sequencing among infertile patients: a single-center pilot study*. Reprod Med Biol. 2018,17(3):297-306. Published 2018 May 6.
- ¹⁹ Lauder, A.P., Roche, A.M., Sherrill-Mix, S. *et al.* *Comparison of placenta samples with contamination controls does not provide evidence for a distinct placenta microbiota*. Microbiome 4, 29 (2016).
- ²⁰ Van de Wijgert JHHM. *The vaginal microbiome and sexually transmitted infections are interlinked: Consequences for treatment and prevention*. PLoS Med. 2017 Dec, 14(12):1002478.
- ²¹ Ceccarani, C., Foschi, C., Parolin, C. *et al.* *Diversity of vaginal microbiome and metabolome during genital infections*. Sci Rep 9, 14095 (2019).
- ²² Samuel J. Kroon, Jacques Ravel, Wilhelmina M. Huston, *Cervicovaginal microbiota, women's health, and reproductive outcomes*, Fertility and Sterility, Volume 110, Issue 3,2018,Pages 327-336,
- ²³ Huang B, Fettweis JM, Brooks JP, Jefferson KK, Buck GA. *The changing landscape of the vaginal microbiome*. Clin Lab Med. 2014, 34(4):747-761.
- ²⁴ Van de Wijgert JH, Borgdorff H, Verhelst R, Crucitti T, Francis S, Verstraelen H, Jespers V. *The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization?* PLoS One. 2014 Aug, 9(8):105998.
- ²⁵ France MT, Mendes-Soares H, Forney LJ. *Genomic Comparisons of Lactobacillus crispatus and Lactobacillus iners Reveal Potential Ecological Drivers of Community Composition in the Vagina*. Appl Environ Microbiol. 2016 Nov, 82(24):7063-7073.
- ²⁶ Chee, W.J.Y., Chew, S.Y. & Than, L.T.L. *Vaginal microbiota and the potential of Lactobacillus derivatives in maintaining vaginal health*. Microb Cell Fact 19, 203 (2020).
- ²⁷ Chao XP, Sun TT, Wang S, Fan QB, Shi HH, Zhu L, Lang JH. *Correlation between the diversity of vaginal microbiota and the risk of high-risk human papillomavirus infection*. Int J Gynecol Cancer. 2019 Jan, 29(1):28-34.

-
- ²⁸ Koedooder R, Mackens S, Budding A, Fares D, Blockeel C, Laven J, Schoenmakers S. *Identification and evaluation of the microbiome in the female and male reproductive tracts*. Hum Reprod Update. 2019 May, 25(3):298-325.
- ²⁹ Schwebke JR, Gaydos CA, Nyirjesy P, Paradis S, Kodsí S, Cooper CK. *Diagnostic Performance of a Molecular Test versus Clinician Assessment of Vaginitis*. J Clin Microbiol. 2018 May, 56(6):00252-18.
- ³⁰ Hiergeist A, Glásner J, Reischl U, Gessner A. *Analyses of Intestinal Microbiota: Culture versus Sequencing*. ILAR J. 2015, 56(2):228-40.
- ³¹ Watts GS, Youens-Clark K, Slepian MJ, Wolk DM, Oshiro MM, Metzger GS, Dhingra D, Cranmer LD, Hurwitz BL. *16S rRNA gene sequencing on a benchtop sequencer: accuracy for identification of clinically important bacteria*. J Appl Microbiol. 2017 Dec, 123(6):1584-1596.
- ³² Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. *16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates*. J Clin Microbiol. 2000 Oct, 38(10):3623-30.
- ³³ Clarridge JE 3rd. *Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases*. Clin Microbiol Rev. 2004 Oct, 17(4):840-62
- ³⁴ Ruud H. Deurenberg, Erik Bathoorn, Monika A. Chlebowicz, Natacha Couto, Mithila Ferdous, Silvia Garcia-Cobos, Anna M.D. Kooistra-Smid, Erwin C. Raangs, Sigrid Rosema, Alida C.M. Veloo, Kai Zhou, Alexander W. Friedrich, John W.A. Rossen, *Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention*, Journal of Biotechnology.
- ³⁵ Ion 16S Metagenomics Kit and Ion Reporter metagenomics workflow solution. Thermo Fisher
- ³⁶ Κατέρη Μαρία (2006): «ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ» Τμήμα Στατιστικής & Ασφ. Επιστήμης, Πανεπιστήμιο Πειραιώς.
- ³⁷ Haro Carmen, Anguita-Maeso Manuel, Metsis Madis, Navas-Cortés Juan A., Landa Blanca B., *Evaluation of Established Methods for DNA Extraction and Primer Pairs Targeting 16S rRNA Gene for Bacterial Microbiota Profiling of Olive Xylem Sap*, Frontiers in Plant Science, Volume 12, 2021
- ³⁸ Hills RD Jr, Pontefract BA, Mishcon HR, Black CA, Sutton SC, Theberge CR. *Gut Microbiome: Profound Implications for Diet and Disease*. Nutrients. 2019, 11(7):1613. Published 2019 Jul 16.
- ³⁹ Ion Reporter Metagenomics 16S algorithms overview. Thermo Fisher
- ⁴⁰ Ravel J, Gajer P, Abdo Z, et al. *Vaginal microbiome of reproductive-age women*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011
- ⁴¹ van de Wijgert JH, Borgdorff H, Verhelst R, Crucitti T, Francis S, Verstraelen H, Jaspers V. *The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization?* PLoS One. 2014 Aug 22; 9(8), e105998.

⁴² van de Wijgert JHHM, Jaspers V. *The global health impact of vaginal dysbiosis*. Res Microbiol. 2017 Nov-Dec, 168(9-10):859-864.

⁴³ Mendling W, Palmeira-de-Oliveira A, Biber S, Prasauskas V. *An update on the role of Atopobium vaginae in bacterial vaginosis: what to consider when choosing a treatment? A mini review*. Arch Gynecol Obstet. 2019, 300(1):1-6.

⁴⁴ Swidsinski A, Dörffel Y, Loening-Baucke V, Mendling W, Schilling J, Patterson JL, Verstraelen H. *Dissimilarity in the occurrence of Bifidobacteriaceae in vaginal and perianal microbiota in women with bacterial vaginosis*. Anaerobe. 2010 Oct; 16(5):478-82.

⁴⁵ Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. *Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis*. N Engl J Med. 2005 Nov 3; 353(18):1899-911.

⁴⁶ Muzny CA, Łaniewski P, Schwebke JR, Herbst-Kralovetz MM. *Host-vaginal microbiota interactions in the pathogenesis of bacterial vaginosis*. Curr Opin Infect Dis. 2020; 33(1):59-65.

⁴⁷ Curty G, de Carvalho PS, Soares MA. *The Role of the Cervicovaginal Microbiome on the Genesis and as a Biomarker of Premalignant Cervical Intraepithelial Neoplasia and Invasive Cervical Cancer*. Int J Mol Sci. 2019, 21(1):222. Published 2019 Dec 28.

⁴⁸ Jacobson JC, Turok DK, Dermish AI, Nygaard IE, Settles ML. *Vaginal microbiome changes with levonorgestrel intrauterine system placement*. Contraception. 2014 Aug, 90(2):130-5.

⁴⁹ Chen, C., Song, X., Wei, W. *et al*. *The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases*. Nat Commun 8, 875 (2017).

⁵⁰ Jimenez L. *Microbial diversity in pharmaceutical product recalls and environments*. PDA J Pharm Sci Technol. 2007 Sep-Oct; 61(5):383-99.

⁵¹ McDonnell G, Russell AD. *Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance* [published correction appears in Clin Microbiol Rev 2001 Jan; 14(1):227]. Clin Microbiol Rev. 1999; 12(1):147-179.

⁵² Hinjoy, S.; Hantrakun, V.; Kongyu, S.; Kaewrakmuk, J.; Wangrangsimakul, T.; Jitsuronk, S.; Saengchun, W.; Bhengsri, S.; Akarachotpong, T.; Thamthitiwat, S.; Sangwichian, O.; Anunnatsiri, S.; Sermswan, R.W.; Lertmemongkolchai, G.; Sitthidet Tharinjaroen, C.; Preechasuth, K.; Udpaun, R.; Chuensombut, P.; Waranyasirikul, N.; Anudit, C.; Narenpitak, S.; Jutrakul, Y.; Teparrukkul, P.; Teerawattanasook, N.; Thanvisej, K.; Suphan, A.; Sukbut, P.; Ploddi, K.; Sirichotirat, P.; Chiewchanyon, B.; Rukseree, K.; Hongsuwan, M.; Wongsuwan, G.; Sunthornsut, P.; Wuthiekanun, V.; Sachaphimukh, S.; Wannapinij, P.; Chierakul, W.; Chewapreecha, C.; Thaipadungpanit, J.; Chantratita, N.; Korbsrisate, S.; Taunyok, A.; Dunachie, S.; Palittapongarnpim, P.; Sirisinha, S.; Kitphati, R.; Iamsirithaworn, S.; Chaowagul, W.; Chetchotisak, P.; Whistler, T.; Wongratanacheewin, S.; Limmathurotsakul, D. *Melioidosis in Thailand: Present and Future*. Trop. Med. Infect. Dis. 2018, 3, 38

⁵³ Abbink FC, Orendi JM, de Beaufort AJ. *Mother-to-child transmission of Burkholderia pseudomallei*. N Engl J Med. 2001 Apr 12; 344(15):1171-2.

⁵⁴ Nernsai P, Sophonsritsuk A, Lertvikool S, Jinawath A, Chitasombat MN. *A case report of Tubo-ovarian abscess caused by Burkholderia pseudomallei*. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):73. Published 2018 Feb 8.

⁵⁵ Kitaya K, Nagai Y, Arai W, Sakuraba Y, Ishikawa T. *Characterization of Microbiota in Endometrial Fluid and Vaginal Secretions in Infertile Women with Repeated Implantation Failure*. *Mediators Inflamm*. 2019 May 21;2019:4893437.

⁵⁶ Winters, A.D., Romero, R., Gervasi, M. *et al*. *Does the endometrial cavity have a molecular microbial signature?* *Sci Rep* 9, 9905 (2019).

⁵⁷ Berendsen RL, Pieterse CM, Bakker PA. *The rhizosphere microbiome and plant health*. *Trends Plant Sci*. 2012 Aug;17(8):478-86. Epub 2012 May 5. PMID: 22564542.

⁵⁸ Pelzer ES, Willner D, Buttini M, Huygens F. *A role for the endometrial microbiome in dysfunctional menstrual bleeding*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2018 Jun;111(6):933-943. Epub 2018 Jan 3. PMID: 29299770.

⁵⁹ Pelzer ES, Willner D, Buttini M, Hafner LM, Theodoropoulos C, Huygens F. *The fallopian tube microbiome: implications for reproductive health*. *Oncotarget*. 2018 Apr 20;9(30):21541-21551 PMID: 29765558; PMCID: PMC5940370.

⁶⁰ Karstrup CC, Klitgaard K, Jensen TK, Agerholm JS, Pedersen HG. *Presence of bacteria in the endometrium and placentomes of pregnant cows*. *Theriogenology*. 2017 Sep 1;99:41-47. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.05.013. Epub 2017 May 23.

⁶¹ Waldor M, Roberts D, Kazanjian P. *In utero infection due to Pasteurella multocida in the first trimester of pregnancy: case report and review*. *Clin Infect Dis*. 1992 Feb, 14(2):497-500.

⁶² Riganelli L, Iebba V, Piccioni M, Illuminati I, Bonfiglio G, Neroni B, Calvo L, Gagliardi A, Levrero M, Merlini L, Mariani M, Capri O, Pietrangeli D, Schippa S, Guerrieri F. *Structural Variations of Vaginal and Endometrial Microbiota: Hints on Female Infertility*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Jul 14;10:350.

⁶³ Al-Nasiry S, Ambrosino E, Schlaepfer M, Morré SA, Wieten L, Voncken JW, Spinelli M, Mueller M, Kramer BW. *The Interplay Between Reproductive Tract Microbiota and Immunological System in Human Reproduction*. *Front Immunol*. 2020 Mar 16;11:378

⁶⁴ Baker JM, Chase DM, Herbst-Kralovetz MM. *Uterine Microbiota: Residents, Tourists, or Invaders?* *Front Immunol*. 2018;9:208. Published 2018 Mar 2.

⁶⁵ Al-Nasiry S, Ambrosino E, Schlaepfer M, et al. *The Interplay Between Reproductive Tract Microbiota and Immunological System in Human Reproduction*. *Front Immunol*. 2020;11:378. Published 2020 Mar 16