



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2016 60 stp
Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Vaginal mikrobiota hos mødre fra en probiotika studie

Silje Slangsvold
M.Sc. Mikrobiologi

Forord

Denne oppgaven ble utført på instituttet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM), ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Professor Knut Rudi var hovedveileder for denne oppgaven, mens Doktor Ekaterina Avershina var medveileder.

Jeg vil gjerne rette en stor takk til mine veiledere, Knut Rudi og Ekaterina Avershina, for at de alltid stilte opp, svarte på alle mine spørsmål og for at de stilte de kritiske spørsmålene som pekte meg i riktig retning. Jeg kunne alltid regne med at dere stilte opp og var positive gjennom hele prosessen.

Jeg vil også takke alle i MiDiv-gruppen for hjelp på laben og for oppmuntring hele veien. Dere tok imot meg med åpne armer og hjelpsomhet. Jeg vil også takke alle masterstudentene jeg har jobbet ved siden av på laben, og blitt kjent med i løpet av dette året. Takk for godt selskap, mye latter og gode råd. Det har vært gull verdt.

Tilslutt vil jeg få takke min fantastiske familie, venner og samboer for støtte og oppmuntring gjennom fem år med studier.

Ås, mai 2016

Silje Slangsvold

Sammendrag

Den vaginale mikrobiota er en viktig del av kroppens forsvar mot patogene mikroorganismer. De dominerende bakteriene i den vaginale mikrobiota produserer melkesyre, som skaper et surt miljø, som er med på å hindre vekst av patogene mikroorganismer. Det er hovedsakelig arter av *Lactobacillus* som produserer denne melkesyren. Probiotika er et uttrykk som refererer til ikke-patogene bakteriell- eller gjær mikrobiota som skal være gunstig for verten ved å alterere mikrobiota ved kolonisering. Det er svært vanlig å bruke melkesyreproduserende bakterier i probiotika. Probiotika har gunstig effekt på fordøyelsessystemet i forbindelse med ubalanse forårsaket av en antibiotikakur. Probiotikas effekt på den vaginale mikrobiota hos gravide kvinner var hovedmålet med denne oppgaven. I tillegg var målet å undersøke om den vaginale mikrobiota endret seg gjennom svangerskapet. Det siste delmålet innebar å undersøke om tilstedeværelsen av blod i prøvene endret den vaginale mikrobiota.

379 prøver fra uke 36 i svangerskapet eller ved fødselen utgjorde prøvematerialet i denne oppgaven. Metodene som ble brukt i forbindelse med denne oppgaven involverte genomisk DNA ekstraksjon, kvalitativ- og kvantitativ polymerase chain reaction (PCR), Illumina 16S index PCR, samt 16S rRNA metagenom sekvensering.

To operasjonelle taksonomiske enheter (OTU) var signifikante med hensyn til probiotika. OTU'ene ble identifisert til å være en ukjent udyrkbart bakterie og en bakterie som tilhørte familien Bifidobacteriaceae. Det ble observert en signifikant økning av proteobakterier, og en nedgang av clostridium bakterier. OTU'ene som forekom i flest sekvenser var *Lactobacillus iners*, en art fra Bifidobacteriaceae familien, en art fra Coriobacteriaceae familien, en art fra Megasphaera slekten, en art fra Enterobacteriaceae familien, en art fra Bifidobacterium slekten og fire andre arter som tilhørte slekten *Lactobacillus*.

Lactobacillus iners og potensielt de fire artene som tilhørte *Lactobacillus* slekten, samsvarer med tidligere observasjoner når det kommer til dominant vaginal mikrobiota. De fem andre OTU'ene skiller seg derimot ut. Megasphaera har blitt funnet å dominere den vaginale mikrobiota hos friske kvinner før, men den økte tilstedeværelsen av de fire siste OTU'ene har vist seg vanskelig å forklare. Probiotika hadde ikke endret den vaginale mikrobiota gjennom svangerskapet. Den vaginale mikrobiota hadde endret seg i løpet av svangerskapet, uavhengig av probiotika. Det ble det ikke funnet noen forskjell mellom prøvene med blod og uten blod. Den vaginale mikrobiota ble funnet til å være mer stabil innad individene over tid enn mellom individene.

Abstract

The vaginal microbiota is an important part of the human body's defense from pathogenic microorganisms. The dominating bacteria in the vaginal microbiota produce lactic acid which help create an acidic environment which prevents the growth of pathogenic microorganisms. There are mainly *Lactobacillus* spp. that produce this lactic acid. Probiotics is a term that refers to non-pathogenic bacterial- or yeast microbiota that are supposed to be beneficial for the host by changing the microbiota by colonization. It is very common to use lactic acid- producing bacteria in probiotics. Probiotics have a beneficial effect in conjunction with unbalance in the gut microbiota caused by antibiotics. Probiotics effect on the vaginal microbiota of pregnant women was the main question in this thesis. In addition, it was the aim to investigate if the vaginal microbiota changed during the pregnancy. Finally, it was the aim to investigate whether the presence of blood in the samples changed the vaginal microbiota.

The sample material in this thesis consisted of 379 samples from week 36 in the pregnancy or at birth. The methods used in this study involved genomic DNA extraction, qualitative and quantitative PCR, Illumina 16S index PCR and 16S rRNA metagenome sequencing.

Two operational taxonomic units (OTU) were significant with regards to probiotics. The OTUs were identified as an unknown unculturable bacteria and a bacteria belonging to the family Bifidobacteriaceae. It was observed a significant increase in proteobacteria, and a decrease in clostridium bacteria. The OTUs that occurred in the most sequences were *Lactobacillus iners*, a species from the Bifidobacteriaceae family, a species from the Coriobacteriaceae family, a species from the Megasphaera genus, a species from the Enterobacteriaceae family, a species from the Bifidobacterium genus and four other species that belonged to the genus *Lactobacillus*.

Lactobacillus iners and potentially the four species belonging to the genus *Lactobacillus*, are consistent with previous observations of dominant vaginal microbiota. The five other OTUs stands out from these observations. Megasphaera has been found to dominate the vaginal microbiota in healthy women before, but the increased presence of the four last OTUs has proved difficult to explain. Probiotics did not change the vaginal microbiota during the pregnancy. The vaginal microbiota had changed during the pregnancy, regardless of probiotics. It was not observed any difference between the samples with blood and the samples without blood. The vaginal microbiota was found to be more stable within individuals over time than between individuals.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag.....	II
Abstract	III
1 Innledning.....	1
1.1 Den humane mikrobiota	1
1.2 Vaginal mikrobiota.....	2
1.3 Probiotika	2
1.4 Taksonomiske markører	3
1.5 Dyrkningsuavhengige metoder for å studere bakterier	4
1.5.1 Kvalitativ polymerase chain reaction.....	4
1.5.2 Kvantitativ polymerase chain reaction.....	5
1.5.3 Illumina sekvensering	5
1.6 Målsetting.....	6
1.7 ProPACT studie.....	6
2 Materialer og metoder.....	7
2.1 Prøvemateriale.....	7
2.2 Genomisk DNA ekstraksjon.....	7
2.3 Polymerase chain reaction.....	8
2.3.1 Kvalitativ PCR.....	8
2.3.2 Kvantitativ PCR.....	8
2.3.3 Illumina 16S index PCR	9
2.4 Rensing av PCR-produkt.....	9
2.5 Illumina sekvensering.....	10
2.6 DNA-konsentrasjon og kvalitetskontroll.....	10
2.6.1 Qubit-målinger	10
2.6.2 Gelelektroforese	10
2.7 Dataanalyse	11
2.7.1 QIIME	11
2.7.2 Kruskal Wallis.....	11

2.7.3	MATLAB.....	11
3	Resultater	12
3.1	Ekstraksjon av genomisk DNA	12
3.2	Polymerase chain reaction.....	12
3.2.1	Bruk av kvantitativ PCR for å bestemme total mengde bakterielt DNA	12
3.2.2	Kvalitativ PCR, rensing av PCR-produkt og Illumina 16S index PCR.....	13
3.3	Illumina sekvensering.....	16
3.4	Omfang og signifikans av OTU'er	17
3.5	Alfa- og betadiversitet	21
3.6	Verifisering av signifikante OTU'er	28
3.7	Stabilitet av mikrobiota fra graviditet til fødsel	31
4	Diskusjon	33
4.1	Dominerende mikrobiota.....	33
4.2	Probiotikas påvirkning på den vaginale mikrobiota.....	33
4.3	Svangerskapets påvirkning på den vaginale mikrobiota	34
4.4	Relevansen av blod tilstede i prøvene	34
4.5	Stabiliteten av den vaginale mikrobiota fra graviditet til fødsel	35
4.6	Tekniske betraktninger	35
4.7	Fremtidig arbeid	36
5	Konklusjon.....	37
	Referanser	38
	Vedlegg	i
	Vedlegg A: Prøvemateriale	ii
	Vedlegg B: Primeroversikt.....	xv

1 Innledning

Menneskekroppen ble i lang tid ansett å være en organisme som selvstendig regulerer alle interne prosesser. I ettertid har vitenskapen om mikroorganismer revolusjonert kunnskapen om hvordan kroppen fungerer i samarbeid med bakterier og andre mikroorganismer.

Menneskekroppen kan sees på som et komplekst økosystem av mikroorganismer, som mest sannsynlig er et resultat av en evolusjonær koeksistens mellom menneskekroppen og bakterier. Bakterier finnes mange steder i kroppen, og er viktige for blant annet fordøyelse og stimulering av immunforsvaret (Ackerman, 2012, Muszer et al., 2015).

1.1 Den humane mikrobiota

Sammensetningen av den menneskelige mikrobiota er svært individuell, og er derfor vanskelig å definere. Det har blitt observert at den menneskelige mikrobiotas diversitet er større innad i kroppens ulike mikrobiota enn mellom ulike individer. Dette indikerer at kroppens såkalte økosystem er et svært variabelt mikrobiologisk system (Proctor, 2011, Ursell et al., 2012). Det er derimot mulig å definere kroppens mikrobiota basert på hvor i kroppen de er å finne.

Munnhulen er et optimalt habitat for mikroorganismer grunnet tilgangen på næring. Det er estimert at munnhulen inneholder minst 6 milliarder mikroorganismer. Disse mikroorganismene er Firmikuter (gram positive bakterier som for eksempel *Bacillus* og *Clostridia*), Bakteroider (gram negative bakterier som for eksempel *Prevotella*), Fusobakterier (gram negative bakterier som for eksempel *Fusobacterium*), Aktinobakterier (gram positive bakterier som for eksempel *Streptomyces* og *Actinomyces*) og Proteobakterier (gram negative bakterier som for eksempel *Escherichia*, *Yersinia* og *Salmonella*) (Dave et al., 2012, Muszer et al., 2015). Magens mikrobiota består hovedsakelig av Aktinobakterier, men det er også funnet *Helicobacter* bakterier (Bik et al., 2006, Muszer et al., 2015). Tynntarmen- og tykktarmens mikrobiota er kvalitativt relativt lik, men tykktarmen inneholder flere mikroorganismer enn tynntarmen. Den øvre delen av tynntarmens inneholder hovedsakelig *Lactobacillus* og *Enterococcus faecalis*, mens den midtre og nedre delen hovedsakelig består av koliforme bakterier og Bakteroider. Tykktarmens mikrobiota består av 9 bakterierekker, men Bakteroider og Firmikuter er de kvantitativt dominerende rekkene (Dave et al., 2012,

Muszer et al., 2015). Det har blitt funnet 19 ulike bakterierekker på den menneskelige huden. 4 av disse utgjør majoriteten av hudens mikrobiota: Aktinobakterier, Firmikuter, Bakteroider og Proteobakterier. Disse bakterierekkene finnes også i fordøyelsessystemet, men i andre konsentrasjoner (Grice et al., 2009, Grice and Segre, 2011, Muszer et al., 2015).

1.2 Vaginal mikrobiota

Den vaginale mikrobiota hos friske kvinner er som regel dominert av melkesyre-produserende bakterier (Gajer et al., 2012). Produksjonen av blant annet melkesyre skaper et surt miljø i vaginaen som er med på å hindre vekst av mange patogene mikroorganismer, og dermed holde individet friskt. I den vaginale mikrobiota til en frisk kvinne i reproduksjonsalder dominerer vanligvis en eller flere av følgende *Lactobacillus* arter: *L.iners*, *L.crispatus*, *L.gasseri* og *L.jensenii*. Det er også funnet friske kvinner hvor *Lactobacillus* arter enten er i mindretall eller tilsynelatende fraværende. I disse tilfellene har det vært andre melkesyre-produserende bakterier som har dominert: *Atopobium*, *Megasphaera* og *Leptotrichia* (Witkin et al., 2007, Balkus et al., 2012).

«The human vaginal microbiota seem to play a key role in preventing a number of urogenital diseases, such as bacterial vaginosis, yeast infections, sexually transmitted infections, urinary tract infections, and HIV infection» (Ravel et al., 2011). Melkesyreproduksjonen som hovedsakelig utføres av arter tilhørende *Lactobacillus* er delaktig i forsvaret av det vaginale bakterieinnholdet (Balkus et al., 2012). *Lactobacillus* hindrer etablering av hovedsakelig enteriske bakterier, men også andre bakterier som for eksempel *Candida albicans* og *Gardnerella vaginalis* som kan forårsake blant annet vaginose (Thorsen et al., 1998, Sobel, 2000). En annen viktig del av kampen mot patogener er *Lactobacillus* bakterienes evne til å produsere hydrogenperoksid (H_2O_2). *Lactobacillus jensenii* og *Lactobacillus crispatus* er blant de *Lactobacillus* bakteriene som oftest blir funnet i den vaginale mikrobiota. Majoriteten av stammer av disse bakteriene produserer H_2O_2 (Balkus et al., 2012).

1.3 Probiotika

Probiota er et uttrykk som refererer til ikke-patogen bakterie- eller gjær mikrobiota med probiotiske egenskaper som er gunstige for verten ved å alterere mikrobiota ved kolonisering. Hensikten ved inntak av probiotika er at en mikrobiota i ubalanse kan normaliseres og re-

koloniseres ved bruk av spesifikke probiotiske bakteriestammer. Tradisjonelt har probiotiske bakteriestammer blitt ekstrahert fra meieriprodukter, for eksempel yoghurt, som inneholder melkesyrebakterier. Det er en rekke bakteriearter som er mye brukt i probiotika i forbindelse med antibiotika-assosiert diaré: *Lactobacillus acidophilus*, *L.bulgaris*, *L.casei*, *L.rhamnosus*, *Bifidobacteria bifidum*, *B.longum*, *Streptococcus thermophilus*, *Saccharomyces boulardii* og *Clostridium butyicum* (Schrezenmeir and de Vrese, 2001, Goldenberg et al., 2015).

Probiotika kan være gunstig for kroppen med hensyn til diverse helserelaterte plager og sykdommer. Probiota kan blant annet minske frekvensen og varigheten av diaré ved inntak av antibiotika, ha positiv effekt på kroppen i forbindelse med infeksjon av rotavirus, traveler's diarrhea og kjemoterapi. Det er også bevis for at probiotika kan stimulere det humoral- og cellulær immunsystemet, og en lavere forekomst av uønskede metabolitter som for eksempel ammonium og kreftfremkallende enzymer i tykktarmen. Det er også forsket på om probiota kan være helsefremmende på andre områder, men dette er ikke fastslått. Her er noen av de gunstige effektene probiota potensielt medfører: Reduksjon av *Helicobacter pylori* infeksjon, lindring i forbindelse med forstoppelse, reduksjon av allergiske symptomer, lindring i forbindelse med IBS (irritabel tarm syndrom), positiv effekt på mineral metabolismen, forhindring av kreft og reduksjon av kolesterol. Det behøves mer forskning på probiotika for å finne ut om en eller flere av disse positive effektene medfører riktighet (Schrezenmeir and de Vrese, 2001, Goldenberg et al., 2015, Oh et al., 2015).

1.4 Taksonomiske markører

Dubnau et als oppdagelse av det prokariotiske 16S ribosomale RNA (rRNA) gen et revolusjonerte studiet av bakterier (Dubnau et al., 1965). 16S rRNA gensekvensen ble brukt til fylogenetiske analyser for første gang i 1985 (Lane et al., 1985). 16S rRNA gensekvensen inneholder både svært konserverte og hypervariable regioner. De konserverte regionene er nyttige for design av primere, mens de hypervariable brukes i prosessen av å identifisere mikroorganismer. Den fulle lengden av 16S rRNA inneholder 9 konserverte regioner og 9 hypervariable regioner. 16S rRNA er det mest brukte markørgenet i arbeidet med profilering av bakteriesamfunn. Markørgenets fulle lengde brukes sjeldent i eksperimenter, noe som medfører at valget av primere er svært viktig for å kunne studere bakterier i ulike miljøer (Yang et al., 2016, Tringe and Hugenholtz, 2008, Baker et al., 2003, Wang and Qian, 2009). Et annet markørgen som ikke er like mye brukt er 23S rRNA. 23S rRNA er ca. dobbelt så

stort som 16S rRNA. Yilmaz et al mente at det var fordeler ved å bruke 23S rRNA fremfor 16S rRNA. Som en evolusjonær markør ga 23S rRNA blant annet større sekvensvariasjon enn 16S rRNA. En ulempe ved å bruke 23S rRNA fremfor 16S rRNA er at sistnevnte har en større referansedatabase (Yilmaz et al., 2011). Et siste markørgen som vil bli omtalt i denne oppgaven er 18S. 18S rRNA genet brukes mye i studier av biodiversitet. 18S rRNA genet evolverer saktere enn andre gener (for eksempel *COI* genet) og er derfor en potensiell viktig markør for å skille mellom prøver på et høyere taksonomisk nivå (Wu et al., 2015)

1.5 Dyrkningsuavhengige metoder for å studere bakterier

Studiet av bakterier har med tiden blitt enklere ettersom bruken av dyrkningsuavhengige metoder har blitt mer og mer vanlig. Sekvensering og polymerase chain reactions (PCR) er metoder som er brukt over hele verden på tvers av forskningsmiljøer. Disse metodene gjør arbeidet med bakterier både mer effektivt og presist, særlig med tanke på den begrensede mengden bakterier som lar seg dyrke i et laboratorium. Nedenfor vil ulike typer PCR og Illumina sekvensering bli beskrevet.

1.5.1 Kvalitativ polymerase chain reaction

PCR er hovedsakelig en teknikk hvor en kort, spesifikk sekvens av deoksyribonukleinsyre (DNA) amplifiseres fra en prøve med få kopier til mange sekvens-identiske kopier. Prøven med DNA blandes med en rekke reagenser: Varmestabil DNA polymerase, spesifikke primere som er designet for fragmentet som skal amplifiseres, buffere, salter og deoxyribose nukleotid trifosfat (dNTP). En PCR reaksjon består av mange sykluser fordelt på tre ulike steg: Denaturering, annealing og elongering. Dette foregår på ulike temperaturer. I løpet av denne reaksjonen forlenges 3'OH enden av DNA templatet ved at DNA polymerase legger til komplementære nukleotider (dNTP). På denne måten kan få kopier i en prøve amplifiseres til et PCR-produkt med svært mange kopier av den opprinnelige sekvensen med DNA (Brunstein, 2013).

1.5.2 Kvantitativ polymerase chain reaction

Kvantitativ- eller real-time PCR, også forkortet som qPCR, baserer seg på de samme prinsippene som kvalitativ PCR, men hvor konvensjonell PCR kun detekterer produktet ved endepunktet, detekterer og amplifiserer qPCR fragmentet i real-time. qPCR viser hvor mye fragmentet har blitt amplifisert til enhver tid i løpet av reaksjonen. Deteksjonen skjer ved at fluorescens måles etter hver syklus. Mengden fluorescens er proporsjonal med den økte mengden PCR-produkt. Målingene av fluorescens er mulig fordi det tilsettes fluorescerende farge til alle prøvene. Fargen er enten spesifikk eller uspesifikk. Et uspesifikt fluorescerende fargestoff binder til dobbeltstrandet DNA (dsDNA) (for eksempel EvaGreen® eller SYBR® Green I), mens et spesifikt fargestoff bruker en probe som inneholder en fluorescens merking som kun emitterer fluorescens når den er bundet til en spesifikk sekvens (for eksempel TaqMan® probe) (Brankatschk et al., 2012).

1.5.3 Illumina sekvensering

Illumina sekvensering er en plattform innen Next generation sequencing (NGS), og er en av de mest brukte plattformene innen NGS.

Alle de enzymatiske prosessene av en Illumina sekvensering foregår inne i en såkalt flow cell. Illumina teknologien benytter seg av sequencing by synthesis (SBS) teknologi og bro-amplifisering. Forward- og revers oligo nukleotider (en med et kløyvbart sete) for amplifisering er komplementære til adapter sekvensen som blir introdusert under forberedelsene med biblioteket. Disse oligo nukleotidene fester seg på innsiden av overflaten på brønnen i flow cellen. Det første steget for å få overført biblioteket til flow cellen er denaturering av dsDNA fragmenter til individuelle enkeltstrandet DNA (ssDNA) molekyler. I flow cellen hybridiseres disse molekylene til oligo nukleotidene på overflaten av flow cellen. Oligo nukleotidene blir brukt som primere for å lage de første kopiene av de individuelle sekvenserings templat-molekylene. De første bibliotek-molekylene fjernes og de kopierte fragmentene, festet til flow cellen, brukes til å generere en kluster av identiske templat molekyler ved hjelp av isothermal amplifikasjon. Denne prosessen skjer ved at syklisk alternerende buffere medierer denaturering-, annealing- og elongeringsstegene som foregår ved 60 °C. 3'enden av de kopierte bibliotek molekylene hybridiserer til de komplementære oligo nukleotidene på flow cellen og danner på denne måten en bro. I slutfasen fjernes den

ene stranden i dsDNA fragmentene ved hjelp av det kløyvbare setet til oligo nukleotidene, og blokkerer 3'enden med ddNTP slik at 3'endene ikke er åpne og kan fungere som sekvenserings primer steder for bibliotek molekyler som er i nærheten. Ved optimal konsentrasjon av biblioteket og optimal lengde på molekylerne så vil en brønn i flow cellen inneholde 800-1000 tusen klustere per mm² (Buermans and den Dunnen, 2014).

1.6 Målsetting

Hovedmålet med denne oppgaven var å undersøke effekten av probiotika (Biola®) på vaginal mikrobiota under graviditet. Et av delmålene var å undersøke den vaginale mikrobiotas eventuelle endringer fra graviditet til fødselen. Et annet delmål var å undersøke om det fantes en mikrobiologisk forskjell mellom prøvene som inneholdt blod, og de som ikke inneholdt blod. Metodene som ble brukt i forbindelse med denne oppgaven involverte genomisk DNA ekstraksjon, kvalitativ og kvantitativ PCR, Illumina 16S index PCR, samt 16S rRNA metagenom sekvensering.

1.7 ProPACT studie

Temaet og prøvematerialet som ble brukt i denne oppgaven stammer fra ProPACT studiet som startet i Trondheim i 2003. ProPACT studiet er en randomisert dobbelt-blindet intervensjons kohortstudie. ProPACT står for Probiotics in the Prevention of Allergy among Children in Trondheim. Studien vil ikke bli beskrevet i detalj her da andre har gjort dette tidligere (Dotterud et al., 2010). I denne studien ble 415 kvinner rekruttert, og inntok enten fermentert melk med lavt fettinnhold (studiegruppe) eller varmebehandlet skummet melk uten probiotiske bakterier (placebo gruppe). Kvinnene mottok dette daglig fra uke 36 i svangerskapet og frem til 3 måneder etter fødselen. Den probiotiske melken inneholdt 5×10^{10} koloniformende enheter (cfu) av *Lactobacillus rhamnosus* GG og *Bifidobacterium animalis* underart *lactis* Bb-12, og 5×10^9 cfu av *Lactobacillus acidophilus* La-5. Majoriteten av barna ble født ved termin og ble ammet i minst 3 måneder. Vaginale prøver ble tatt av mødrene ved uke 36 i svangerskapet og ved fødselen og ble oppbevart ved -80 °C inntil videre. Andre typer prøver (avføringsprøver mm.) ble også tatt av disse mødrene, men disse vil ikke bli omtalt i denne oppgaven (Dotterud et al., 2015, Avershina et al., 2016)

2 Materialer og metoder

2.1 Prøvemateriale

Prøvematerialet besto av 18 prøver i piloteksperimentet og 379 i hovedeksperimentet. 255 av 379 prøver var fra uke 36 i graviditeten, mens resten var fra fødselen. Disse ble levert i forseglede esker med tørris. Disse ble oppbevart i en -40 °C fryser frem til bruk. Ved starten av eksperimentet ble prøvene sortert og registrert med et nytt prøvenummer. Komplette liste med oversikt over id nummer, prøvenummer, prøvetakning og prøvegruppe (uke 36 eller graviditet) er å finne i vedlegg A. Før DNA ekstraksjonen ble prøvene tint på is, vortex'et og bomullspinnene ble fjernet. Det var opprinnelig meningen å bruke bomullspinnene, men disse hadde gått i oppløsning. Det ble observert at flere av prøvene inneholdt blod, uavhengig av prøvetidspunktet. Dette ble registrert og inkludert i eksperimentet.

2.2 Genomisk DNA ekstraksjon

DNA ble isolert fra cellene ved kjemisk- og mekanisk lysering av celleveggene. 300 µl S.T.A.R. buffer (Roche, Tyskland) og 100 µl prøvemateriale ble tilsatt FastPrep- rør (Sarstedt, Tyskland) som inneholdt syrevaskede kuler (Sigma-Aldrich, <106 µm; 0,25 g) (Sigma-Aldrich, USA). Rørene ble prosessert to runder i MagNaLyser (Roche, Tyskland) ved 6500 rpm i 20 sekunder med 1 minutt kjølig hvile mellom hver runde. Etter den mekaniske lyseringen av cellene ble rørene sentrifugert ved 13000 rpm i 5 minutter, og 50 µl supernatant ble tatt ut for kjemisk lysering. Ekstraksjonen av genomisk DNA (gDNA) ble utført ved bruk av et MagLGC™ Total Nucleic Isolation kit (LGC Genomic, Tyskland), og ekstraksjonsstegene foregikk i en KingFisher Flex robot (Thermo Scientific, USA). Supernatant ble tilsatt 50 µl Lysis buffer, 5 µl Proteinase og inkubert ved 55 °C i 10 minutter i roboten ved bruk av programmet «ProteinaseLGC». Deretter ble programmet «MagMiniLGC» benyttet, hvor en rekke steg blir utført. I løpet av programmet ble negativt ladet DNA bundet til paramagnetiske kuler og tre vaskesteg ble utført for å fjerne salter og alkohol fra buffere. Det ekstraherte DNAet havnet tilslutt i en elueringsbuffer. Det genomiske DNAet ble oppbevart ved 4 °C inntil videre bruk.

2.3 Polymerase chain reaction

2.3.1 Kvalitativ PCR

For hver runde med PCR ble genomisk DNA blandet med en rekke reagenser. Hver reaksjon hadde et volum på 25 µl og inneholdt 1,25 U HotFirePol® DNA polymerase (Solis Biodyne, Estland), 1 x HotFirePol® buffer B2 (Solis Biodyne, Estland), 2,5 mM magnesium klorid (MgCl₂) (Solis Biodyne, Estland), 200 µM dNTP (Solis Biodyne, Estland), nukleasefritt vann (Amresco, USA), 200 µM av forward- og revers primer (Invitrogen™, Thermo Scientific, USA) og 5 µl templat.

I hver runde med PCR ble det brukt et spesifikt program som ble satt opp på en Thermal Cycler-maskin. Initial denaturering ved 95 °C i 15 minutter, etterfulgt av denaturering ved 95 °C i 30 sekunder (28 sykluser), annealing ved 55 °C i 30 sekunder (28 sykluser), elongering ved 72 °C i 30 sekunder (28 sykluser) og en siste elongering ved 72 °C i 7 minutter før et nedkjølingssteg ved 10 °C ∞. Alle kvalitative PCR reaksjoner ble utført ved bruk av en 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA). Både positiv- og negativ kontroll ble inkludert ved alle reaksjoner. *E. coli* (bearbeidet på MiDiv laben) og nukleasefritt vann (Amresco, USA) ble brukt som henholdsvis positiv- og negativ kontroll.

2.3.2 Kvantitativ PCR

For hver runde med qPCR ble genomisk DNA blandet med en rekke reagenser. Hver reaksjon hadde et volum på 20 µl og inneholdt 1 x HotFirePol® EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis Biodyne, Estland), nukleasefritt vann (Amresco, USA), 200 µM av forward- og revers primer (Invitrogen™, Thermo Scientific, USA) og 5 µl templat.

I hver runde med qPCR ble det brukt et spesifikt program som ble satt opp på en Light Cycler-maskin. Initial denaturering ved 95 °C i 15 minutter, etterfulgt av denaturering ved 95 °C i 30 sekunder (40 sykluser), annealing ved 55 °C i 30 sekunder (40 sykluser) og et elongeringssteg ved 72 °C i 45 sekunder (40 sykluser). Fluorescensen ble målt etter hver syklus av elongeringen. For hver runde med qPCR ble det inkludert en HRM (High resolution melting) curve analyse på slutten av kjøringen som en kvalitetskontroll. Alle kvantitative PCR reaksjoner ble utført ved bruk av en Light Cycler 480 II (Roche, Tyskland). Både positiv- og

negativ kontroll ble inkludert ved alle reaksjoner. *E. coli* (bearbeidet på MiDiv laben) og nukleasefritt vann (Amresco, USA) ble brukt som henholdsvis positiv- og negativ kontroll.

2.3.3 Illumina 16S index PCR

For hver runde med index PCR ble PCR-produktene blandet med en rekke reagenser. Hver prøve hadde en unik kombinasjon av forward- og revers primer. Oversikt over primerkombinasjonene kan sees i vedlegg B.

Hver reaksjon hadde et volum på 25 µl og inneholdt 1,25 U FirePol® DNA polymerase (Solis Biodyne, Estland), 1 x HotFirePol® buffer B2 (Solis Biodyne, Estland), 2,5 mM magnesium klorid (MgCl₂) (Solis Biodyne, Estland), 200 µM dNTP (Solis Biodyne, Estland), nukleasefritt vann (Amresco, USA), 200 µM av forward- og revers primer (Invitrogen™, Thermo Scientific, USA) og 2 µl templat.

I hver runde med index PCR ble det brukt et spesifikt program som ble satt opp på en Thermal Cycler-maskin. Initial denaturering ved 95 °C i 5 minutter, etterfulgt av denaturering ved 95 °C i 30 sekunder (10 sykluser), annealing ved 55 °C i 1 minutt (10 sykluser), elongering ved 72 °C i 45 sekunder (10 sykluser) og en siste elongering ved 72 °C i 7 minutter før et nedkjølingssteg ved 10 °C ∞. Alle index PCR reaksjoner ble utført ved bruk av en 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA). Både positiv- og negativ kontroll ble inkludert ved alle reaksjoner. *E. coli* (bearbeidet på MiDiv laben) og nukleasefritt vann (Amresco, USA) ble brukt som henholdsvis positiv- og negativ kontroll.

2.4 Rensing av PCR-produkt

De kvalitative PCR-produktene ble rensert før Illumina 16S index-PCR ble utført. Rensingen ble utført for å oppnå et renere produkt ved å fjerne salter, primerdimere, polymerase og andre kontaminanter. Alt arbeidet ble utført ved bruk av en Biomek® robot (Beckman Coulter, USA) og paramagnetiske kuler (Ampure, laget på MiDiv laben). De paramagnetiske kulene blir tiltrukket av en magnet. Når kulene kommer i kontakt med magneten binder DNA seg til kulene, og skilles dermed fra kontaminantene. Deretter blir kulene, med DNA bundet til seg, vasket to ganger med 80 % fersk etanol for å fjerne eventuelt flere kontaminanter. Tilslutt blir DNA eluert ut i nukleasefritt vann (Amresco, USA).

2.5 Illumina sekvensering

Index PCR-produktene ble samlet til en pool og normalisert ved bruk av en Biomek® robot (Beckman Coulter, USA). Utrekningene for hvor mye av hver prøve som skulle i poolen ble gjort ved hjelp av fluorescens verdier fra en BioTek™ FLx800™ Microplate Fluorescence Readers (BioTek, USA). DNA-konsentrasjonen ble kvantifisert ved bruk av Perfecta® NGS library quantification kit for Illumina sequencing platforms (Quanta Biosciences, USA). Amplicon biblioteket ble overført til flow cell med en konsentrasjon på 7 µM. Alt forberedende arbeid for sekvensering ble gjort ved å følge Illumina protokollen for 16S rRNA sekvensering. Tilslutt ble flow cellen satt inn i MiSeq® system (Illumina, USA).

2.6 DNA-konsentrasjon og kvalitetskontroll

2.6.1 Qubit-målinger

Det ble foretatt målinger av konsentrasjonen av DNA for både genomisk DNA og alle PCR-produktene. Disse ble målt ved bruk av maskinen Qubit™ fluorometer (Life Technologies, USA). Løsningene ble laget i henhold til produsentens anbefalinger om å tilsette 2 µl prøvemateriale til 198 µl working solution. Working solution inneholdt Quant-iT™ reagent med et 1:200 volum i en Quant-iT™ buffer. Positiv- og negativ kontroll ble inkludert i alle Qubit-målinger.

2.6.2 Gelelektroforese

PCR-produkter og Quanta-produkt ble kvalitetskontrollert ved bruk av 1% agarose gel. Gelen ble laget ved å oppløse agarose pulver (Sigma-Aldrich, Tyskland) i 1x tris-acetat EDTA (TAE) buffer ved oppvarming. Agarose er et lineært polysakkarid som består av gjentatte D- og L-galaktose subenheter som danner et ikke-kovalent nettverk av bånd når det dannes gel. Mengden agarose som brukes avgjør størrelsen på porene i gelen. De negativt ladede DNA-fragmentene blir skilt ved størrelse grunnet deres egenskaper til å flytte seg fra den positivt ladde elektroden i gelen, til den negativt ladde. Fragmenter av liten størrelse vandrer raskere enn større fragmenter. Gelen ble kjørt på 80 Volt i 30 minutter ved alle kontroller. Staining ble gjort ved bruk av PeqGreen (Peqlab, Tyskland). En 100bp DNA ladder (Solis BioDyne,

Estland) ble brukt som størrelsesmarkør, og The molecular Imager® Gel Doc™ XR Imaging system med Quantity One 1-D analysis software v.4.6.7 (Biorad, USA) ble brukt for å visualisere DNA båndene ved bruk av UV-lys.

2.7 Dataanalyse

I denne oppgaven ble det hovedsakelig brukt to ulike analyseverktøy: QIIME og Kruskal Wallis. Qiime ble brukt til å analysere data fra Illumina sekvenseringen, mens Kruskal Wallis ble bruk til å verifisere operasjonelle taksonomisk enheter fra Qiime og til å lage en sammenligning av mødres vaginale mikrobiota over tid. MATLAB ble brukt som et hjelpemiddel underveis i disse analysene.

2.7.1 QIIME

Qiime er en forkortelse for quantitative insights into microbial ecology. Qiime er en bioinformatisk pipeline som brukes til å utføre mikrobiom-analyser av rådata fra DNA sekvenseringsdata. Dette inkluderer separering (demultiplexing) og kvalitetsfiltrering, valg av operasjonell taksonomisk enhet (OTU), taksonomisk klassifisering, fylogenetisk rekonstruksjon og diversitetsanalyser og visualisering.

2.7.2 Kruskal Wallis

En Kruskal Wallis test er en ikke-parametrisk metode for å teste om prøver stammer fra den samme distributøren. Det brukes til å sammenligne to eller flere uavhengige prøver av samme eller ulik størrelse. Kruskal Wallis er en enveis-analyse av varians.

2.7.3 MATLAB

Matlab står for matrix laboratory, og er et matematikkprogram med et eget scriptspråk basert på programmeringsspråket C. Programmet tillater bruk av enkel matrisemanipulering, implementasjon av algoritmer, plotting av funksjoner og data, og opprettelse av brukergrensesnitt. Programmet har grensesnitt mot andre programmeringsspråk.

3 Resultater

3.1 Ekstraksjon av genomisk DNA

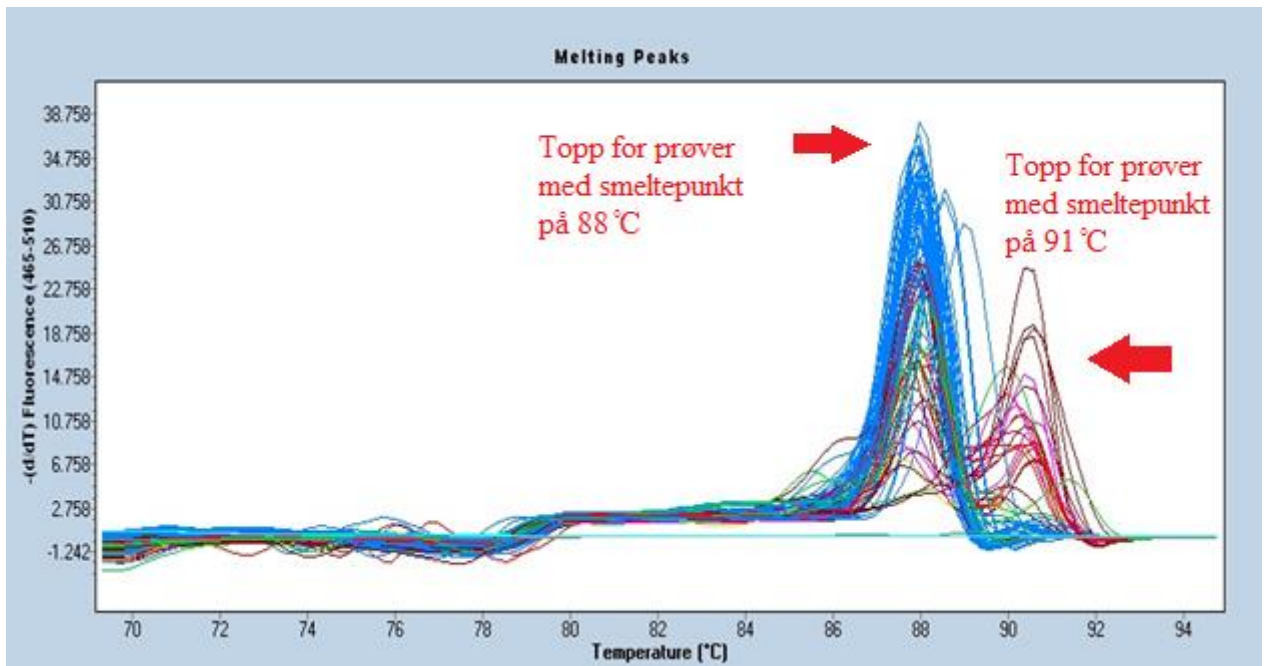
I forbindelse med DNA ekstraksjonen ble det utført Qubit-målinger for å undersøke mengden genomisk DNA i prøvene. Det ble utført 7-9 målinger for hver av platene med genomisk DNA. Den gjennomsnittlige mengden genomisk DNA var 1,03 µg/ml med et standardavvik på 1,44. Den høyeste konsentrasjonen var 7,32 µg/ml, mens den laveste var 0,06 µg/ml. De fleste målingene var jevne med en genomisk DNA konsentrasjon på rett under 1 µg/ml, men enkelte prøver hadde svært lave eller høye konsentrasjoner som var med på å gi et høyt standardavvik.

3.2 Polymerase chain reaction

3.2.1 Bruk av kvantitativ PCR for å bestemme total mengde bakterielt DNA

Etter DNA ekstraksjon ble det utført qPCR på alle prøvene. Fra qPCR ble det produsert CT-verdier og smeltepunktsskurver for prøvene. CT-gjennomsnittsverdier med standardavvik ble regnet ut for alle prøvene, og med hensyn til om prøvene var fra graviditeten eller fødselen. Gjennomsnittsverdien for alle prøvene var på 25,07 med et standardavvik på 3,59. Prøvene fra uke 36 i svangerskapet hadde en gjennomsnittsverdi på 25,29 med et standardavvik på 3,75, mens prøvene fra fødselen hadde en gjennomsnittsverdi på 24,62 med et standardavvik på 3,59. Verdiene viser at det var mye genomisk DNA tilstede i prøvene. De relativt lave standardavvikene viser at det ikke er store avvik fra gjennomsnittsverdien.

Gjennomsnittsverdiene og standardavvikene for graviditet og fødselen avvek lite fra hverandre. Smeltepunktsskurvene for de ulike platene viste at de fleste prøvene hadde et smeltepunkt på ca. 88 °C. Prøvene som skilte seg fra dette hadde et smeltepunkt i området 89-91 °C. Det var svært få prøver som hadde et smeltepunkt lavere enn 88 °C. Figur 1 viser smeltepunktsskurven fra plate 4, som er representativ for alle smeltepunktsskurvene.



Figur 1 Smeltepunktskurve fra kvantitativ PCR for plate 4

3.2.2 Kvalitativ PCR, rensing av PCR-produkt og Illumina 16S index PCR

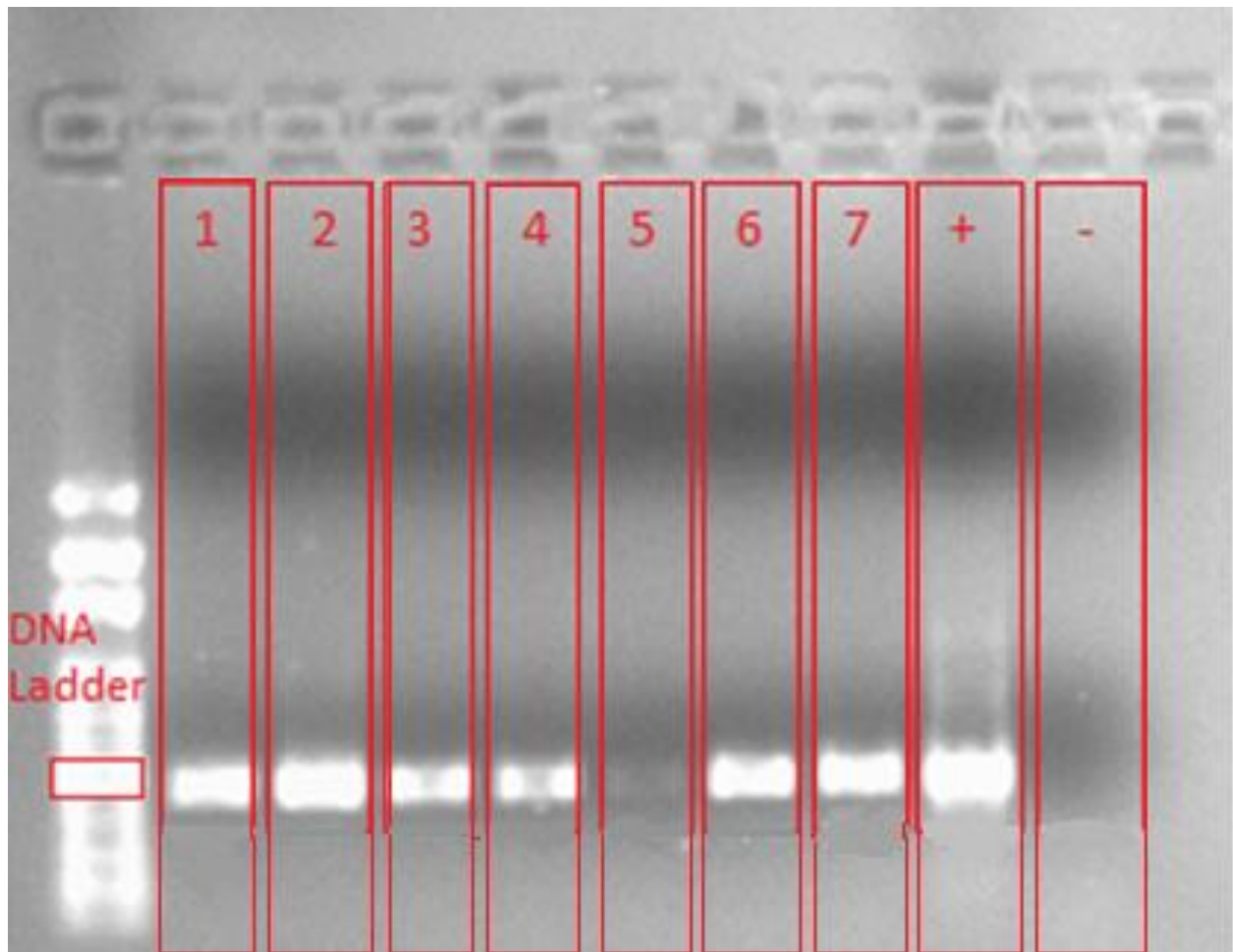
Etter ekstraksjon av genomisk DNA og qPCR ble det utført kvalitativ PCR, rensing av prøvene og Illumina 16S index PCR. I forbindelse med kvalitative PCR, rensing og index PCR ble det utført nye DNA-konsentrasjon-målinger. Tabell 1 viser disse Qubit-målingene. Alle målingene er fra plate 4 i eksperimentet. Målingene fra plate 4 ble valgt da disse var representative for det store utvalget av prøver som ble brukt i denne oppgaven. Tabellen viser at det er mye DNA tilstede i prøvene, men at det er store forskjeller mellom de enkelte prøvene. DNA-konsentrasjonene viser at målingene er konsekvente da prøve 22 933, 20 309 og 22 117 hadde noen av de høyeste verdiene ved alle kontrolltidene. Verdiene viser at det trolig er mye DNA tilstede i den store samlingen av prøver.

Tabell 1 DNA-konsentrasjon i µg/ml. Tabellen viser Qubit-målinger etter DNA ekstraksjon, etter kvalitativ PCR, etter rensing og etter index PCR.

ProPACT nummerering	DNA-konsentrasjon (µg/ml)			
	Etter genomisk DNA ekstraksjon	Etter kvalitativ PCR	Etter rensing	Etter index PCR
23 968	0,91	15,2	2,82	27,8
22 933	2,13	25	3,47	40,9
22 083	0,968	14,7	2,51	33,6
21 406	1,43	14,5	2,38	31,3
22 640	0,219	2,72	0,324	19
20 309	1,26	21,5	3,97	35,6
22 117	2,76	17,6	1,76	30,6
Positiv kontroll	1	43,9	8,83	32,3
Negativ kontroll		0,665	<0,005	0,636

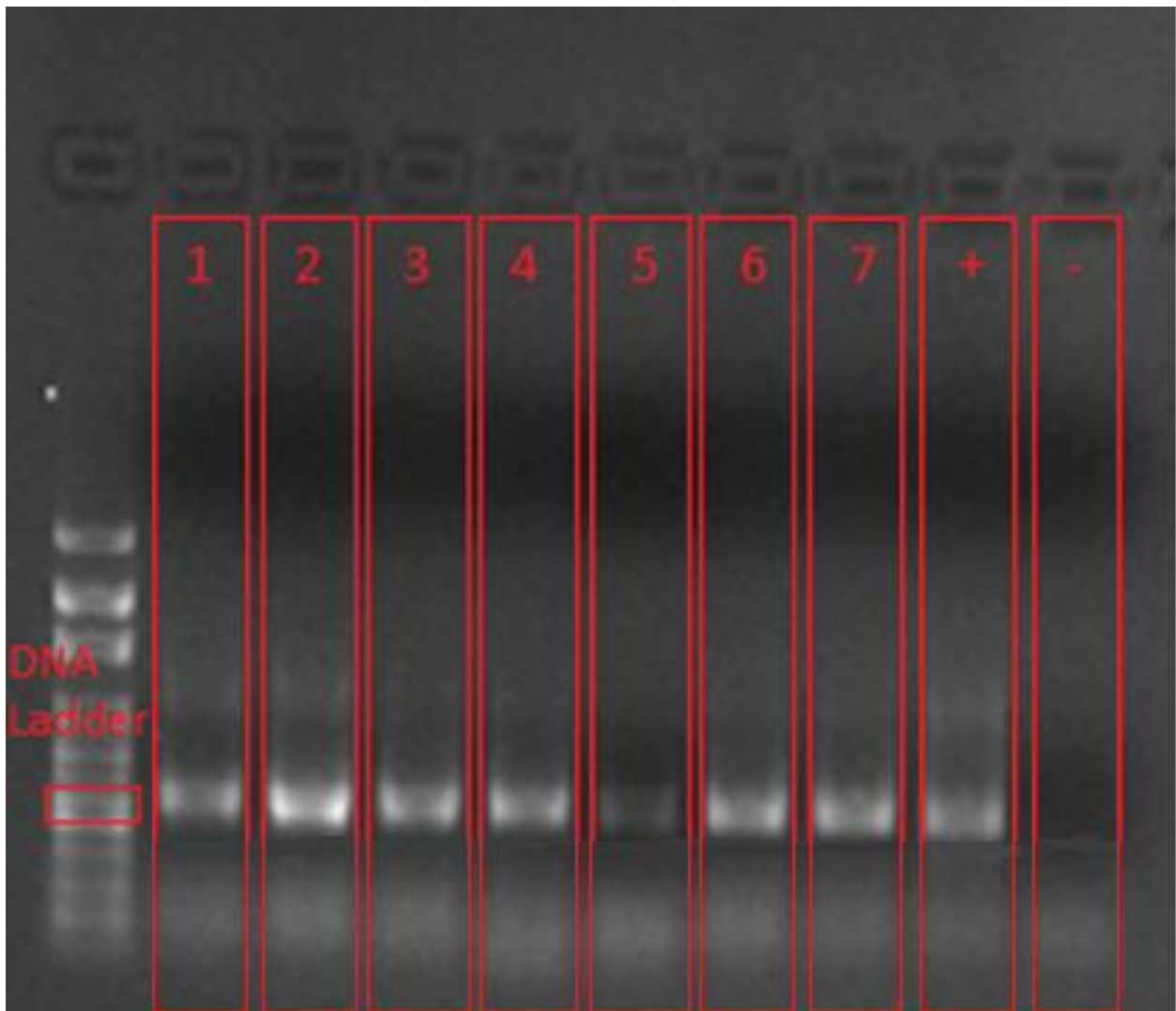
Etter kvalitativ PCR og index PCR ble prøvene sjekket ved bruk av gelelektroforese. Figur 2 viser gelbildet fra gelelektroforesen etter kvalitativ PCR for plate 4. Det samme utvalget prøver som ble brukt i tabell 1, ble brukt her og videre i figur 3. Ved alle gelelektroforeser ble det brukt 80 Volt i 30 minutter. Figur 2 viser sterke bånd, med unntak av den negative kontrollen som ikke er synlig i den tiende brønnen, og et svakt bånd i brønn nr.5, som er prøve 22 640. Dette stemmer godt overens med samtlige DNA konsentrasjonsmålinger for prøve 22 640 i tabell 1. Prøven hadde de laveste verdiene ved alle kontrollpunktene og kan derfor antas å ha den laveste mengden DNA.

¹ Kolonnen for genomisk DNA ekstraksjon inneholder ingen verdi for positiv- og negativ kontroll da det ikke ble brukt kontroller for den genomiske DNA ekstraksjonen.



Figur 2 Gelelektroforese av PCR-produkt etter kvalitativ PCR. I den første unummererte brønnen ble det tilsatt en 100 basepar (bp) DNA ladder som størrelsesmarkør. Båndet som er merket i den første brønnen er på ca. 500 bp. I brønn 2-8 var henholdsvis prøve 23 968, 22 933, 22 083, 21 406, 22 640, 20 309 og 22 117. Tallene 1-7 representerer disse syv prøvene. Den niende og tiende brønnen inneholdt henholdsvis den positive- og negative kontrollen.

Gelbildet på figur 3 viser også sterke bånd, med unntak av den negative kontrollen i den tiende brønnen og et svakt bånd for prøve 22 640 i brønn nr. 5. Dette stemmer godt overens med både Qubit-målinger og gelbildet fra kvalitativ PCR i figur 2.



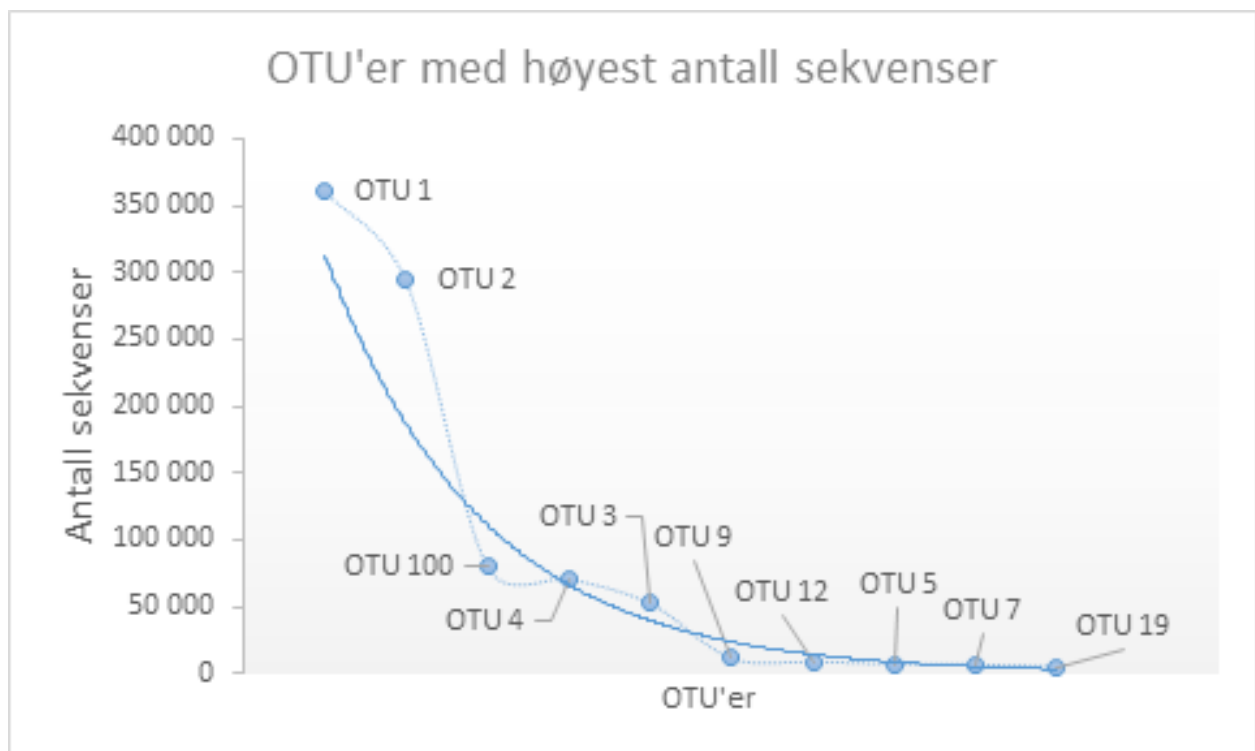
Figur 3 Gelelektroforese av PCR-produkt etter Illumina 16S index PCR. Den første unummererte brønnen inneholdt en 100 bp DNA ladder. Båndet som er merket i den første brønnen er på ca. 500 bp. I brønn 2-8 var henholdsvis prøve 23 968, 22 933, 22 083, 21 406, 22 640, 20 309 og 22 117. Tallene 1-7 representerer disse syv prøvene. Den niende og tiende brønnen inneholdt henholdsvis den positive- og negative kontrollen.

3.3 Illumina sekvensering

Etter kvalitets- og lengde filtrering gjensto det totalt 5 261 752 sekvenser fra Illumina sekvenseringen. Disse sekvensene kom fra 353 prøver (379 prøver totalt fra starten av eksperimentet). Minimum count var 17 sekvenser per prøve, mens maksimum var 45 798 sekvenser per prøve. Gjennomsnittet for antall sekvenser per prøve var på 14905 med et standardavvik på 9286. Det ble brukt en cutoff på 3000 sekvenser per prøve for videre analysering. Utfra denne cutoff'en ble 336 prøver brukt i videre analyser.

3.4 Omfang og signifikans av OTU'er

Rådata fra Illumina sekvenseringen ble analysert i Qiime. Analysene i Qiime viste at det var flere signifikante OTU'er. Figur 4 viser OTU'ene med flest antall sekvenser. Grafen viser at OTU 1 og OTU 2 forekommer i svært mange sekvenser, mens de resterende åtte andre OTU'ene på denne grafen forekommer betraktelig sjeldnere. OTU 1 og OTU 2 forekommer i 300 000-350 000 sekvenser, mens resten av OTU'ene forekommer i <100 000 sekvenser. Halvparten av OTU'ene tilhører slekten *Lactobacillus*.



Figur 4 OTU'ene med flest antall sekvenser. OTU 1, 2, 100, 4, 3, 9, 12, 5, 7 og 19 er henholdsvis *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus* (slekt), *Bifidobacteriaceae* (familie), *Lactobacillus* (slekt), *Lactobacillus* (slekt), *Coriobacteriaceae* (familie), *Megasphaera* (slekt), *Enterobacteriaceae* (familie), *Bifidobacterium* (slekt) og *Lactobacillus* (slekt).

Det ble utført analyser i Qiime med hensyn til Biola/Placebo, graviditet/ved fødselen (gruppe 312/313) og blod/ikke-blod. Tabell 2 viser signifikante OTU'er og OTU'er med lavest p-verdi fra prøvene med hensyn til graviditet (gruppe 312) og ved fødselen (gruppe 313). Tabellen viser at 11 av de 18 OTU'ene tilhører rekken proteobakterier. Alle disse 11 OTU'ene øker i omfang fra graviditet til fødselen. *Lactobacillus*- og *Clostridia* bakteriene (*Shuttleworthia*) synker derimot kraftig fra graviditeten til fødselen.

Tabell 2 Signifikante OTU'er og OTU'er med lavest p-verdi med hensyn til prøver fra graviditet eller fødsel. Prøvene som ikke er signifikante hadde en signifikant p-verdi, men ved korreksjon med bruk av FDR og Bonferroni var ikke OTU'ene signifikante.

OTU	FDR-P	Bonferroni-P	Gjennomsnitt fødsel	Gjennomsnitt uke 36	Taksonomi
27	<0,005	<0,005	35,9	2,27	Pseudomonas (slekt)
149	<0,005	<0,005	0,66	0,02	Janthinobacterium lividum
182	<0,005	<0,005	1,52	0,07	Pseudomonas (slekt)
168	<0,005	<0,005	1,65	0,02	Streptophyta (orden)
56	<0,005	<0,005	8,68	0,89	Ralstonia (slekt)
186	<0,005	<0,005	1,31	Ikke detektert	Oxalobacteraceae (familie)
209	<0,005	<0,005	3,62	0,05	Pseudomonas (slekt)
30	<0,005	<0,005	12,22	0,14	Delftia (slekt)
178	<0,005	<0,005	0,65	0,10	Uklassifisert
294	<0,005	0,005	0,56	0,03	Pseudomonas (slekt)
210	<0,005	0,023	0,86	0,01	Enterobacteriaceae (familie)
167	0,007	0,078	1,9	0,15	Burkholderia (slekt)
4	0,011	0,138	178,39	245,98	Lactobacillus (slekt)
46	0,012	0,168	17,39	2,66	Comamonadaceae (familie)
160	0,012	0,177	2,42	0,17	Sediminibacterium (slekt)
43	0,018	0,286	7,19	3,40	Staphylococcus (slekt)
277	0,024	0,403	0,25	0,02	Actinomycetales (orden)
6	0,048	0,867	Ikke detektert	18,11	Shuttleworthia (slekt)

Tabell 3 viser OTU'en med den laveste p-verdien med hensyn til Biola- eller Placebo inntak. Denne OTU'en ble i etterkant analysert i BLAST. BLAST resultatet viste at dette ikke var en Lactobacillus bakterie, men en ukjent ikke-dyrkbar bakterie. Tabell 4 viser de signifikante OTU'ene og OTU'ene med de laveste p-verdiene med hensyn til blod eller ikke-blod tilstede i prøvene. Tabellen viser at 8 av de 12 OTU'ene tilhører rekken proteobakterier. I følge gjennomsnittsverdiene er OTU'ene tilstede i større grad i prøvene med blod enn prøvene uten blod. Clostridia bakteriene (Ruminococcus og Ruminococcaceae) er også tilstede i større grad i prøvene med blod enn uten blod.

Tabell 3 OTU med lavest p-verdi med hensyn til Biola og placebo. OTU 4 hadde en signifikant p-verdi, men korrigering ved bruk av FDR og Bonferroni viste at OTU 4 ikke var signifikant.

OTU	FDR-P	Bonferroni-P	Gjennomsnitt Biola	Gjennomsnitt Placebo	Taksonomi
4	0,11	0,11	299,54	153,11	Lactobacillus (slekt)

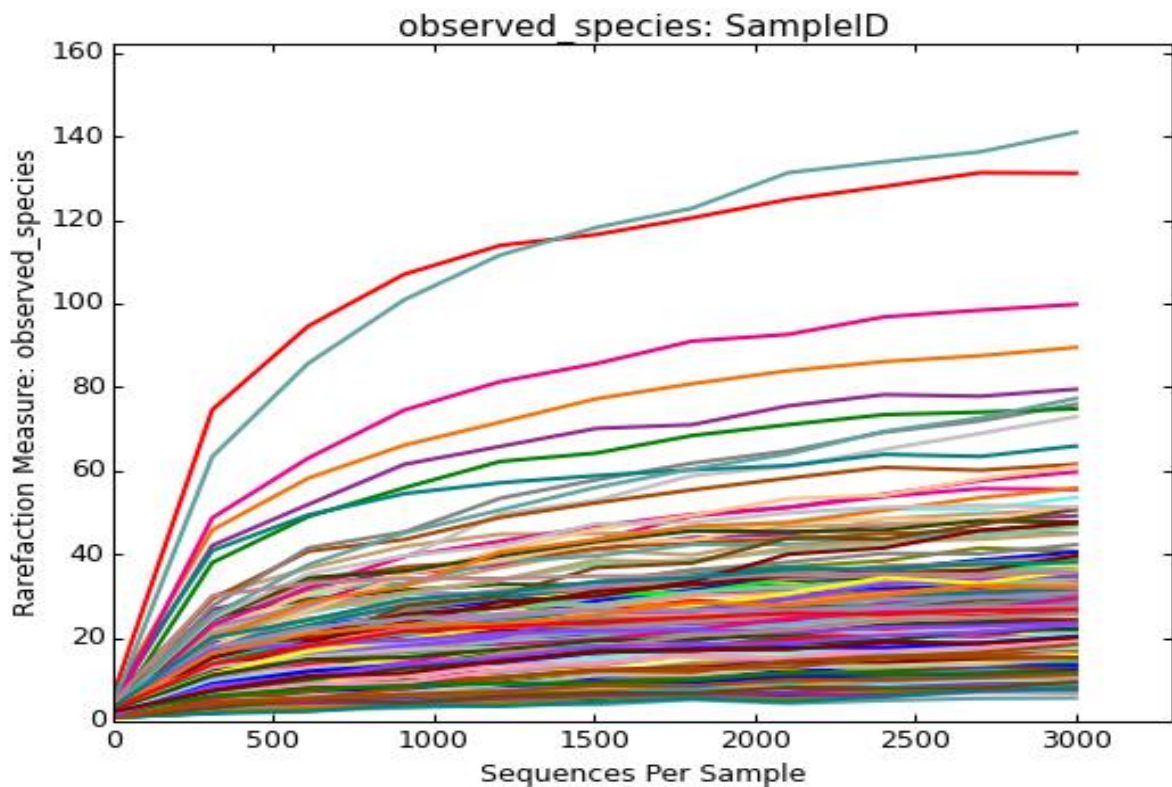
Tabell 4 Signifikante OTU'er og OUT'er med lavest p-verdi med hensyn til blod og ikke-blod. Alle OUT'ene hadde signifikant p-verdi, men korrigering ved bruk av FDR og Bonferroni viste at noen av OTU'ene ikke var signifikante.

OTU	FDR-P	Bonferroni-P	Gjennomsnitt Blod	Gjennomsnitt Ikke-blod	Taksonomi
27	<0,05	<0,05	35,56	11,47	Pseudomonas (slekt)
149	<0,05	<0,05	1,28	0,16	Janthinobacterium lividum
318	<0,05	0,012	0,22	Ikke detektert	Ruminococcus (slekt)
451	<0,05	0,012	0,11	Ikke detektert	Ruminococcaceae (familie)
311	<0,05	0,012	1,0	Ikke detektert	Devosia (slekt)
294	<0,05	0,023	1,22	0,14	Pseudomonas (slekt)
178	0,006	0,042	1,0	0,23	Uklassifisert
186	0,010	0,081	1,33	0,36	Oxalobacteraceae (familie)
306	0,020	0,183	1,17	0,08	Thermus (slekt)
210	0,022	0,233	0,56	0,26	Enterobacteriaceae (familie)
56	0,022	0,244	14,39	2,7	Ralstonia (slekt)
84	0,027	0,322	5,56	1,95	Methylobacterium (slekt)

3.5 Alfa- og betadiversitet

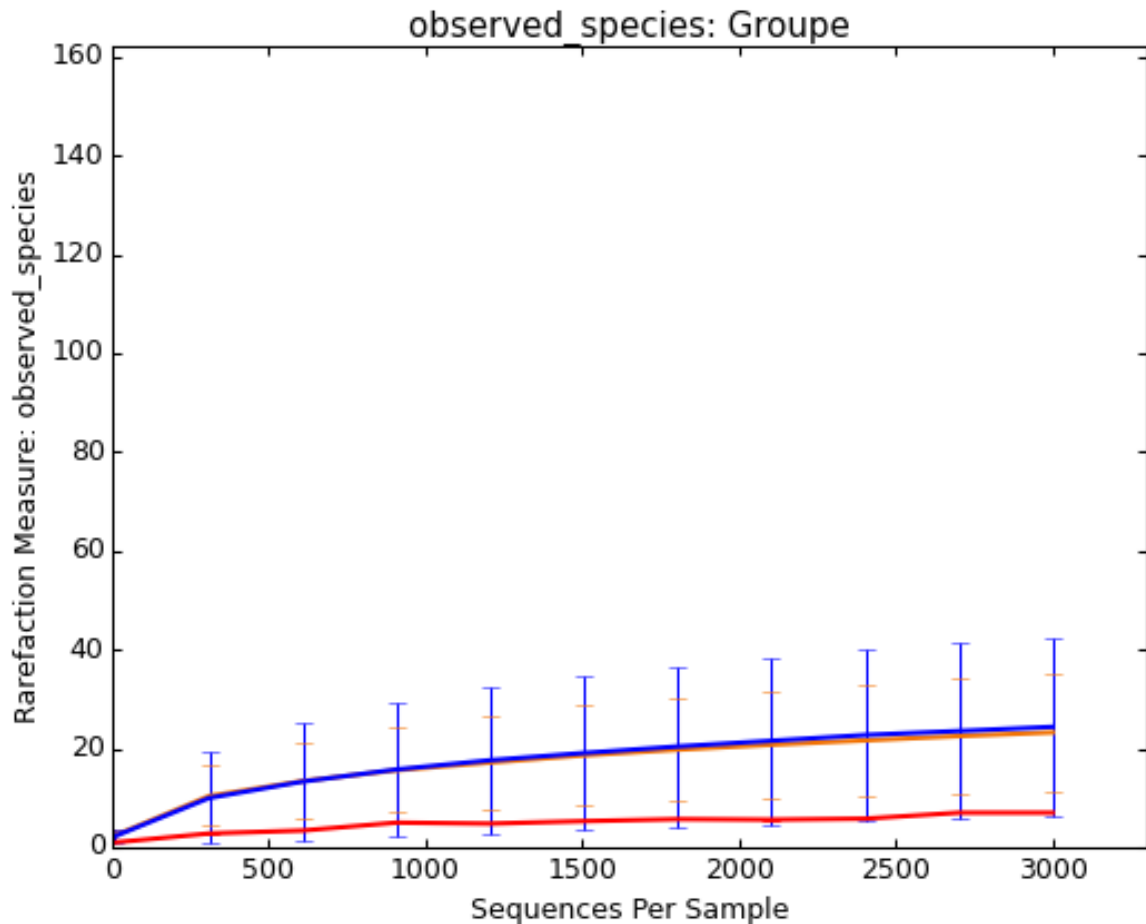
Alfa- og betadiversitet ble inkludert for å undersøke diversiteten innad og mellom prøvene, samt diversiteten innad og mellom prøvene med hensyn til Biola/placebo, graviditet/ved fødselen og blod/ikke-blod

Figur 5 viser antall observerte arter for alle prøvene. Figuren viser at de fleste prøvene inneholder 20-40 ulike arter, og at antall arter flater ut ved ca. 1500 sekvenser. 7 av de 336 prøvene som er illustrert på figuren har 40-140 ulike arter, og skiller seg ut fra de fleste prøvene. Noen av prøvene har også svært få ulike arter.



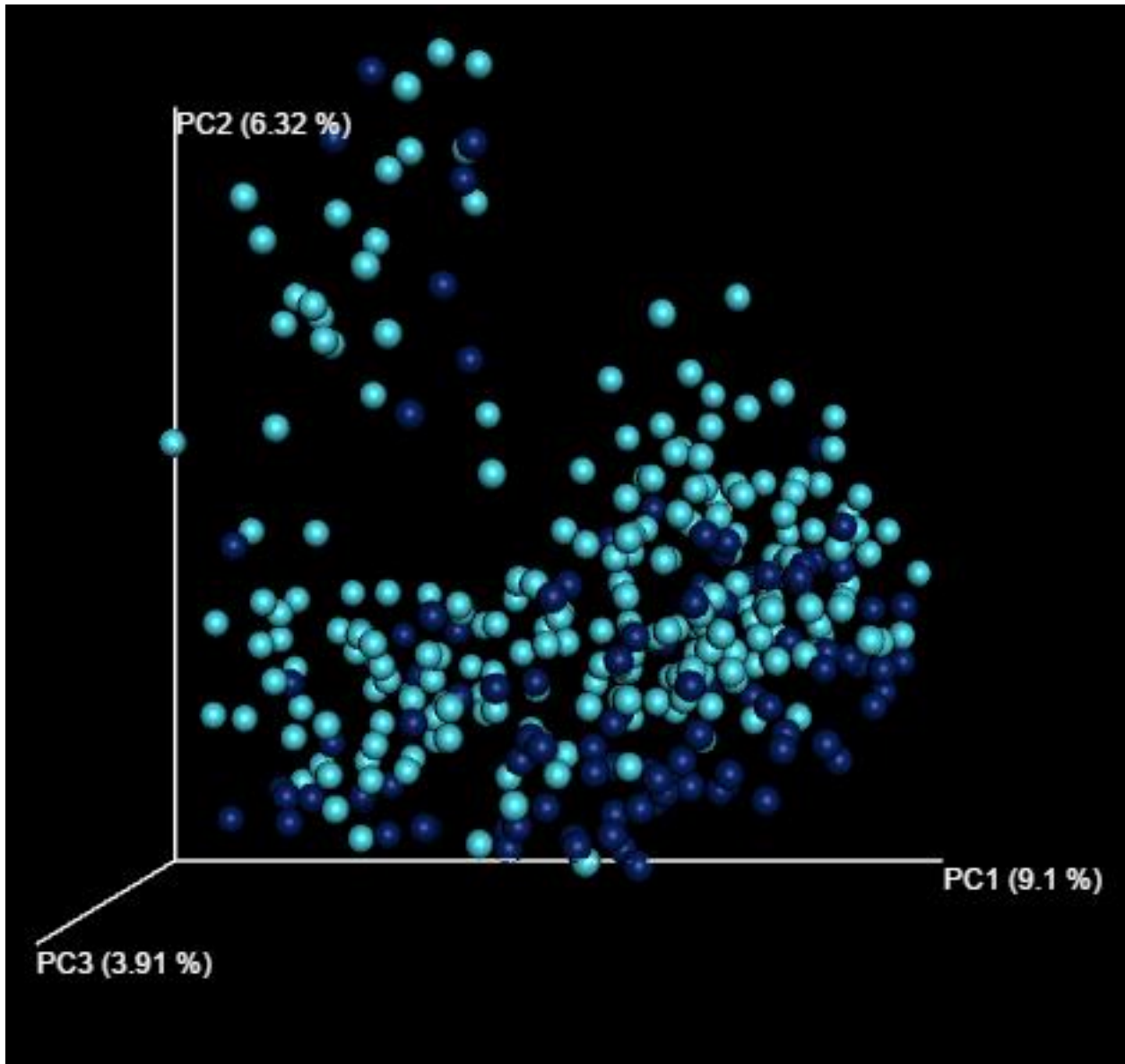
Figur 5 Alfadiversitet for totalt antall prøver representert gjennom en rarefaction kurve. Kurven viser observerte arter for alle prøvene. Hver av de fargede linjene representerer en bestemt prøve.

Figur 6 viser antall observerte arter for graviditet (gruppe 312) og ved fødselen (gruppe 313). Figuren viser at begge gruppene har ca. 20 ulike arter, og at antall arter flater ut ved ca. 2000 sekvenser. Figuren viser at det er lav alfadiversitet innad de to gruppene.



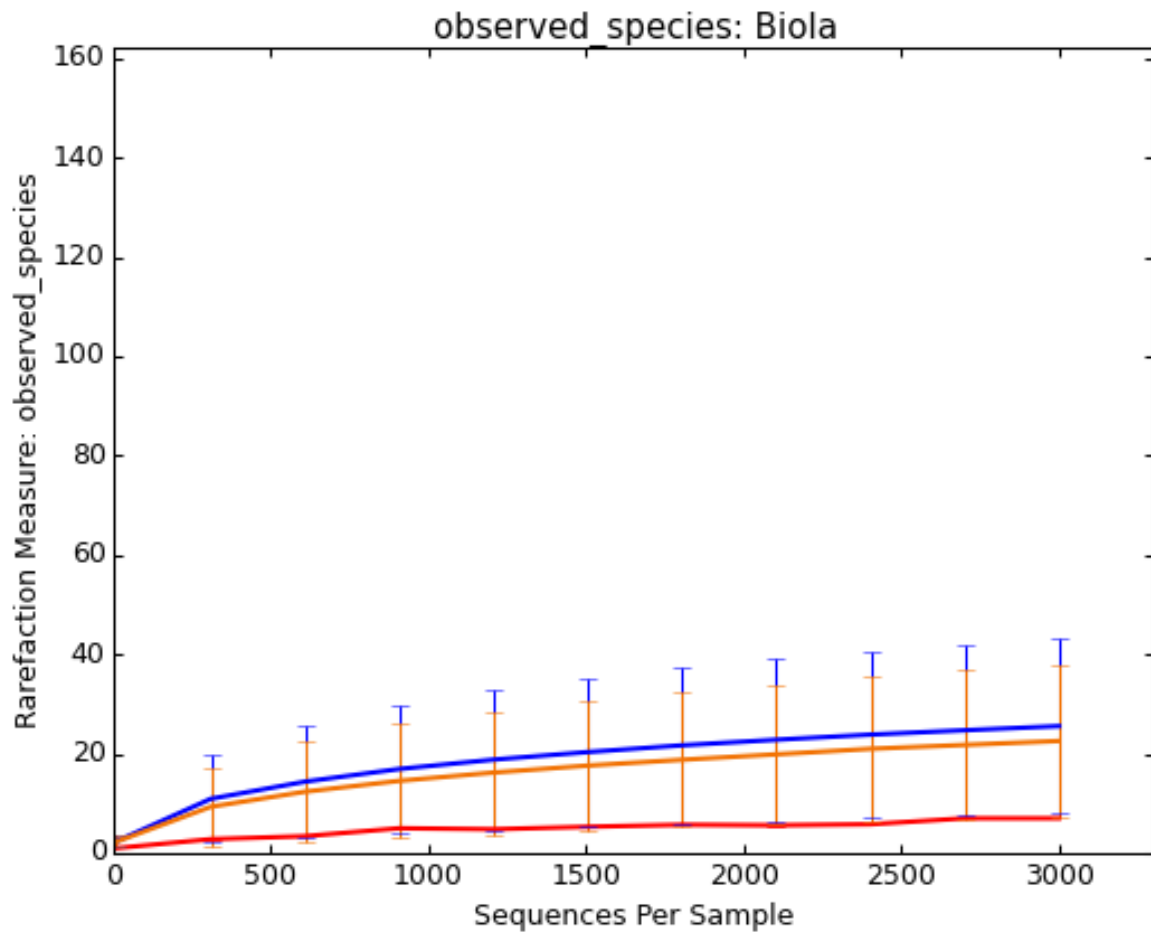
Figur 6 Alfadiversitet representert gjennom en rarefaction kurve. Kurven viser observerte arter med hensyn til graviditet og fødsel. Den røde streken representerer en positiv kontroll, mens den blå og den oransje streken representerer henholdsvis graviditet og ved fødselen.

Figur 7 viser betadiversiteten for prøvene fra graviditeten (gruppe 312) og fra fødselen (gruppe 313). Figuren viser i utgangspunktet at det er lav betadiversitet, men scatterplotet inneholder tre grupperinger. Den ene grupperingen ligger ved prinsipalkomponent 2 (PC2), mens den andre ligger ved PC3 og den tredje ligger ved PC1. Hver av grupperingene inneholder omtrent like mange lyseblå kuler for graviditet som mørkeblå kuler for fødsel.



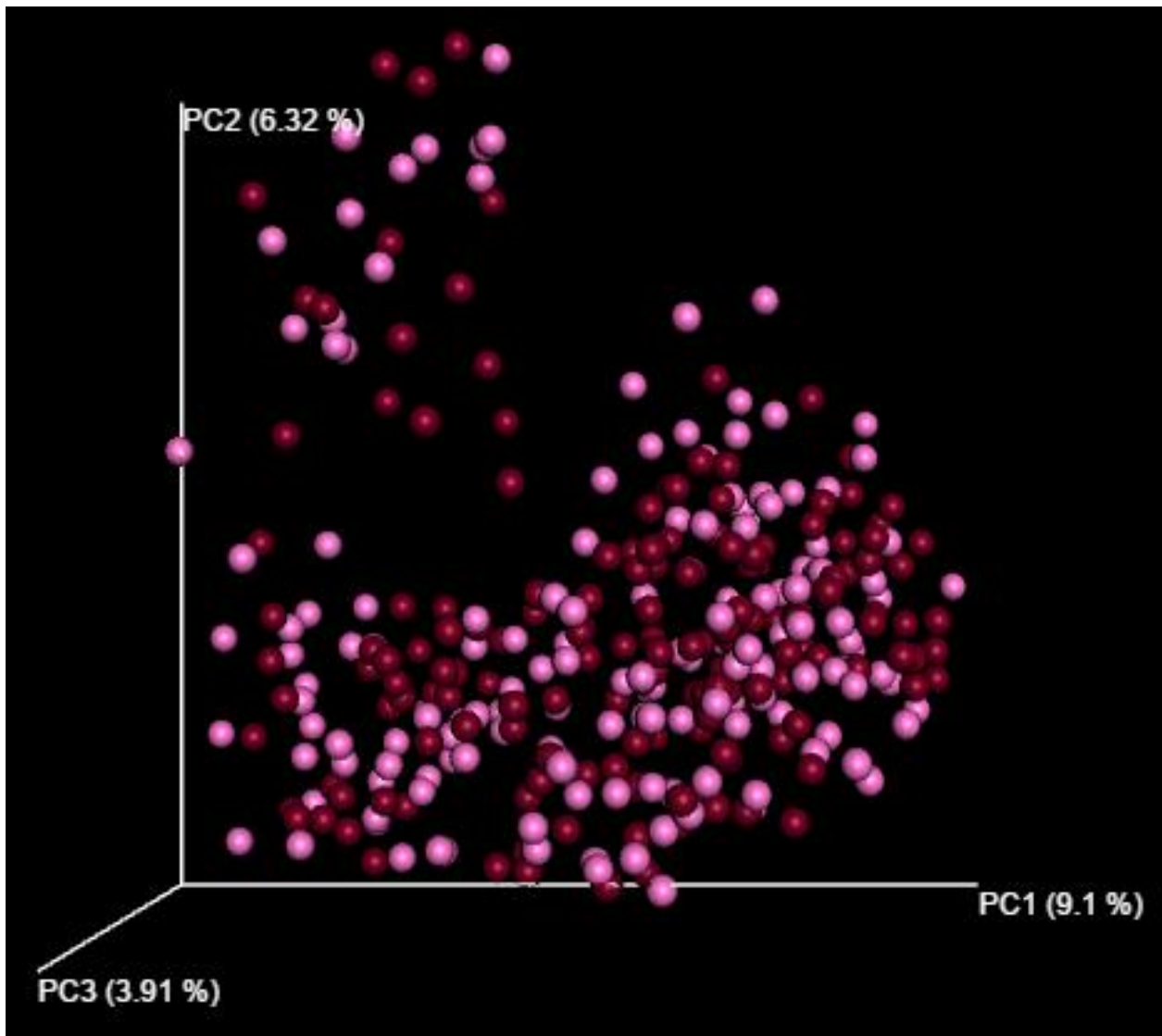
Figur 7 Betadiversitet representert ved et scatterplot med hensyn til graviditet og ved fødselen. De lyseblå kulene representerer graviditet, mens de mørkeblå representerer fødselen.

Figur 8 viser antall observerte arter for prøvene fra individene som har inntatt enten Biola eller Placebo. Figuren viser det samme som figur 6, både Biola og Placebo prøvene har ca. 20 ulike arter og antall arter flater ut ved ca. 2000 sekvenser. I likhet med figur 6, viser denne figuren en lav alfadiversitet.



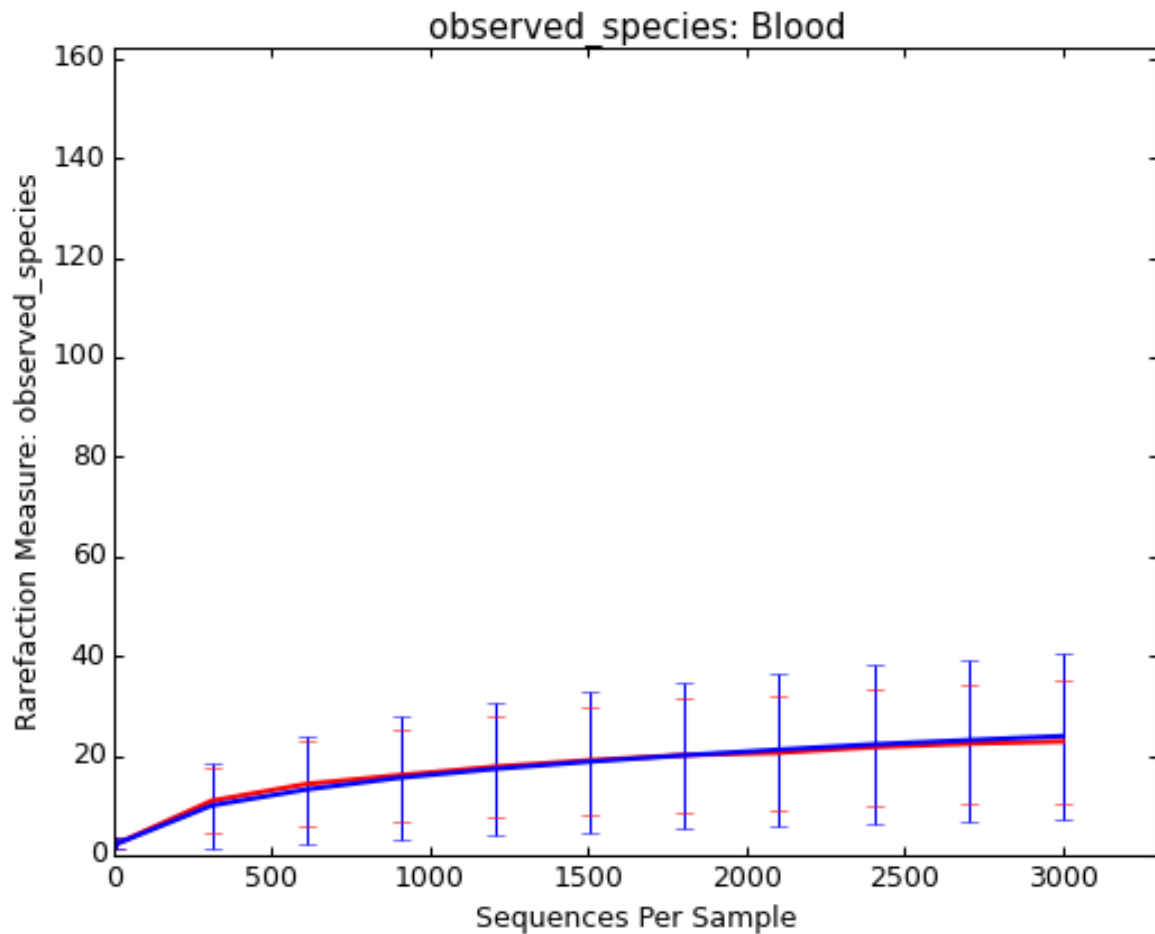
Figur 8 Alfadiversitet representert gjennom en rarefaction kurve. Kurven viser observerte arter med hensyn til Biola og Placebo. Den røde streken representerer en positiv kontroll, mens den blå og den oransje representerer henholdsvis Biola og Placebo

Figur 9 viser betadiversiteten for prøvene med hensyn til Biola eller Placebo inntak. I likhet med figur 7 viser figuren over at det er lav betadiversitet, men scatterplotet inneholder tre grupperinger. Den ene grupperingen ligger ved PC2, mens den andre ligger ved PC3 og den tredje ligger ved PC1. Hver av grupperingene inneholder omtrent like mange lyserosa kuler for Biola som burgunder røde kuler for placebo.



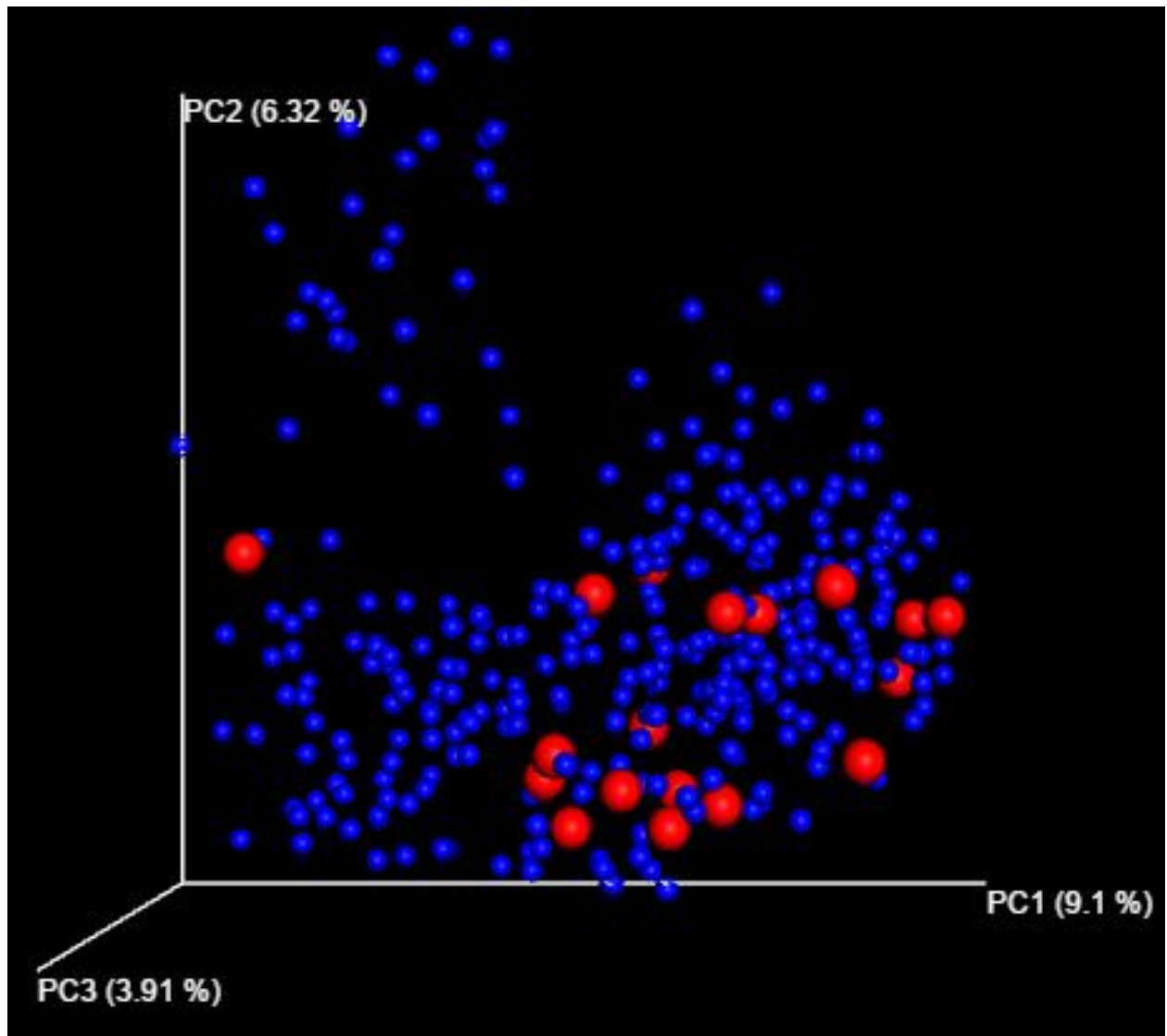
Figur 9 Betadiversitet representert ved et scatterplot med hensyn til Biola og Placebo. De lyserosa kulene representerer Biola, mens de burgunder røde representerer Placebo.

Figur 10 viser antall observerte arter for prøvene som inneholdt blod og ikke-blod. Figuren viser det samme som figur 6 og 8, både prøvene med og uten blod har ca. 20 ulike arter og antall arter flater ut ved ca. 2000 sekvenser. I likhet med figur 6 og 8, viser denne figuren en lav alfadiversitet.



Figur 10 Alfadiversitet representert gjennom en rarefaction kurve. Kurven viser observerte arter med hensyn til blod og ikke-blod. Den røde og den blå streken representerer henholdsvis blod og ikke-blod.

Figur 11 viser betadiversiteten for prøvene med hensyn til blod og ikke-blod. I likhet med figur 7 og 9 viser figuren over at det er lav betadiversitet, men scatterplotet inneholder tre grupperinger. Den ene grupperingen ligger ved PC2, mens den andre ligger ved PC3 og den tredje ligger ved PC1. Grupperingen ved PC2 inneholder bare blå kuler for prøver uten blod. Grupperingen ved PC3 inneholder en røde kule for blod, mens resten var blå. Den tredje grupperingen ved PC1 inneholder ca. 17 kuler for blod og mange kuler for prøver uten blod.



Figur 11 Betadiversitet representert ved et scatterplot med hensyn til blod og ikke-blod. De røde kulene representerer blod, mens de blå representerer ikke-blod.

3.6 Verifisering av signifikante OTU'er

Tabell 5 Reanalyse i Kruskal Wallis av signifikante OTU'er med hensyn til Biola og Placebo.

Under graviditeten							Ved fødselen						
OTU nr.	KrWallis		Biola (n = 115)		Placebo (n = 116)		OTU nr.	KrWallis		Biola (n = 50)		Placebo (n = 54)	
	P-verdi	FDR korr	G ₂	St.av	G	St.av		P-verdi	FDR korr	G	St.av	G	St.av
OTU 1	0,36	0,07	100,5,27	1218,01	1181,12	1202,29	OTU 1	0,85	0,42	1106,32	1223,15	1137,89	1151,56
OTU 2	0,57	0,09	936,10	1235,61	877,16	1215,70	OTU 2	0,20	0,26	786,76	1229,22	844,19	1220,55
OTU 4	0,00	0,00	328,08	774,21	159,16	548,37	OTU 4	0,55	0,37	221,44	629,88	141,59	537,81
OTU 100	0,83	0,12	221,24	476,68	219,74	462,02	OTU 100	0,90	0,36	297,54	641,48	307,07	567,70
OTU 3	0,14	0,05	131,07	372,69	245,55	530,80	OTU _3	0,78	0,45	92,44	202,52	136,67	387,22
OTU 9	0,20	0,05	22,03	72,86	46,44	173,78	OTU _10	0,88	0,39	54,74	309,08	34,74	219,29
OTU 12	0,35	0,07	32,89	101,27	29,33	93,19	OTU 27	0,27	0,27	36,14	103,57	36,04	148,17
OTU _7	0,08	0,05	43,90	282,31	1,33	11,09	OTU _9	0,40	0,32	15,90	70,53	49,13	157,75
OTU _6	0,13	0,06	8,28	87,74	27,90	215,47	OTU _7	0,01	0,04	55,82	263,02	0,04	0,27
OTU _5	0,84	0,11	17,77	182,81	16,88	156,57	OTU _13	0,06	0,11	16,44	55,19	36,13	89,06

² Bokstaven G står for gjennomsnitt.

Siden tidligere analyser ikke tok hensyn til om prøvene kom fra graviditet eller fødsel ble det utført reanalyser i Kruskal Wallis. Reanalysene ble gjennomført for å undersøke effekten av OTU'ene. Tabell 5 viser en analyse av de ti mest signifikante OTU'ene med hensyn til Biola og Placebo. Denne analysen viste at kun OTU4 og OTU7 var signifikante ved reanalyse med hensyn til Biola og Placebo, men ingen av disse var signifikante over tid. OTU4 var signifikant under graviditeten, mens OTU7 var signifikant ved fødselen. Begge OTU'ene ble analysert i BLAST for en mer korrekt identifisering. OTU 4 var en ukjent, udyrkbar bakterie. OTU 7 ble identifisert som *Bifidobacterium longum*, men hadde en identitet på bare 95 %. Det er derfor mer riktig å si at OTU'en er en del av familien Bifidobacteriaceae

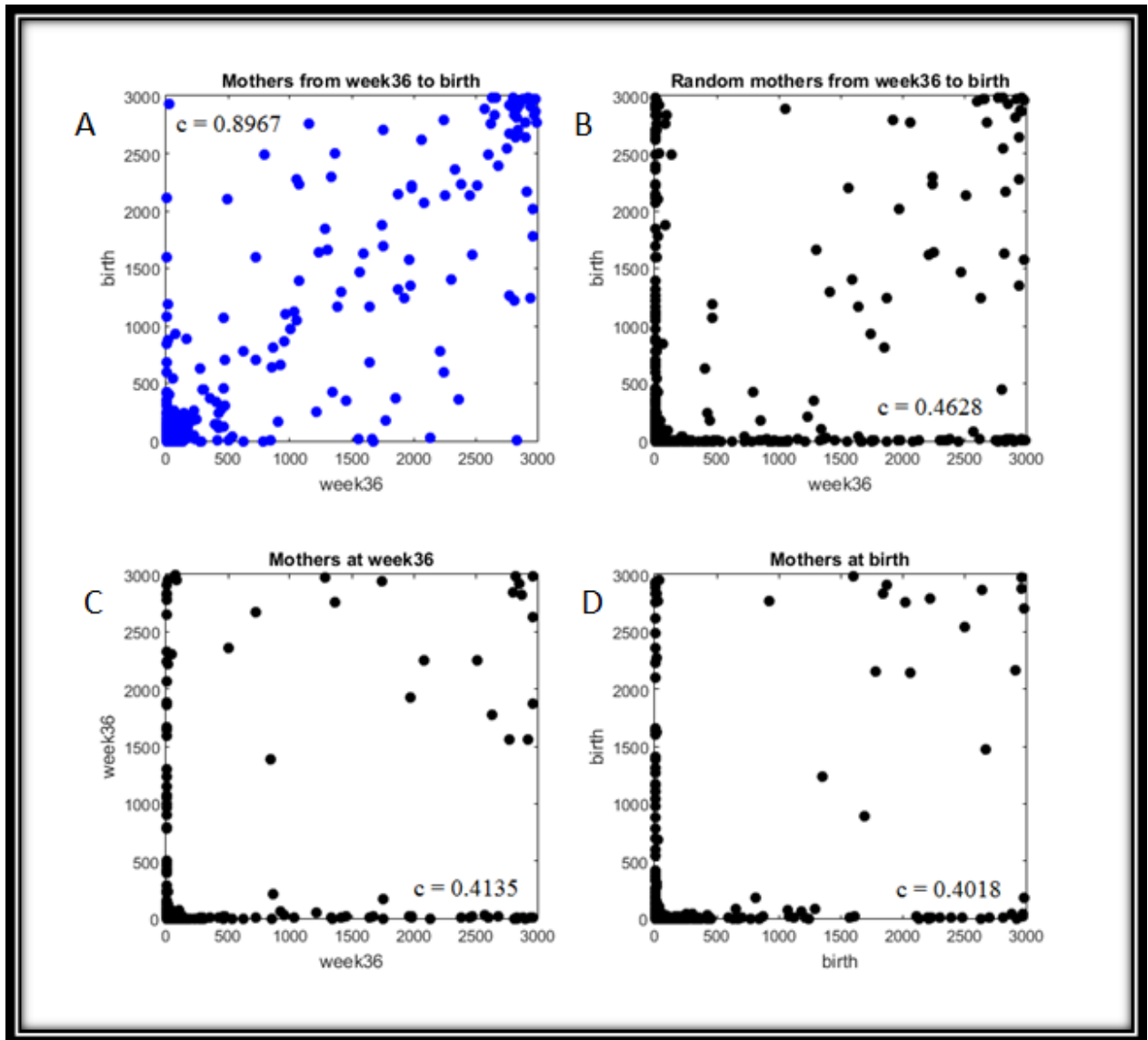
Tabell 6 viser også en Kruskal Wallis analyse av de ti mest signifikante OTU'ene, men med hensyn til blod og ikke-blod. Denne analysen viste at ingen av OTU'ene ved reanalyse var signifikante med hensyn til blod og ikke-blod.

Tabell 6 Reanalyse i Kruskal Wallis av signifikante OTU'er med hensyn til blod og ikke-blod.

Under graviditeten						Ved fødselen					
OTU nr.	KrWal lis	Blod (n = 15)		Ikke-blod (n = 216)		OTU nr.	KrWal lis	Blod (n = 18)		Ikke-blod (n = 86)	
		G ³	St.av	G	St.av			G	St.av	G	St.av
OTU 1	0,80	1294,47	1298,03	1079,31	1205,44	OTU 1	0,73	1041,72	1240,84	1136,02	1173,76
OTU 2	0,62	866,27	1179,78	908,70	1228,06	OTU 2	0,54	989,22	1313,76	782,22	1202,94
OTU 4	0,37	129,40	490,69	252,94	688,77	OTU 4	0,72	155,78	371,42	185,19	619,73
OTU 100	0,46	218,80	456,80	219,65	468,08	OTU 100	0,59	308,06	586,85	304,80	610,84
OTU 3	0,30	197,20	690,00	189,20	446,20	OTU 3	0,50	60,06	163,28	126,94	334,86
OTU 9	0,52	17,27	48,61	34,58	133,54	OTU 10	0,96	87,72	370,68	34,74	236,61
OTU 12	0,13	41,80	76,31	30,56	99,93	OTU 27	0,07	35,56	56,03	36,30	137,58
OTU 7	0,56	70,60	273,43	19,01	192,85	OTU 9	0,83	4,28	10,12	39,16	134,36
OTU 6	0,75	0,07	0,26	19,28	169,64	OTU 7	0,76	79,89	338,44	17,28	142,74
OTU 5	0,39	0,20	0,56	18,38	173,95	OTU 13	0,41	17,22	33,73	28,10	81,31

³ Bokstaven G står for gjennomsnitt.

3.7 Stabilitet av mikrobiota fra graviditet til fødsel



Figur 12 Mor-barn sammenligning laget ved bruk av en korrelasjonsanalyse i Kruskal Wallis. Laget i samarbeid med Doktor Ekatarina Avershina. Figuren er inndelt i fire deler hvor hver del representerer henholdsvis mødre fra uke 36 til fødselen, tilfeldige mødre fra uke 36 til fødselen, mødre i uke 36 og mødre ved fødselen. ⁴

Figur 12 viser en sammenligning mellom mor og barn som ble laget ved hjelp av en korrelasjonsanalyse i Kruskal Wallis. Figuren viser at den vaginale mikrobiota er mer stabil

⁴ c står for korrelasjonskoeffisient

innad individene over tid, enn mellom individene. Korrelasjonskoeffisient c kan observeres på hver av delene i figur 12. Plot A, som representerer mødre fra uke 36 i svangerskapet til fødselen, har den høyeste korrelasjonskoeffisienten. Plot B, som representerer tilfeldige mødre fra uke 36 i svangerskapet til fødsel, har tilnærmet lik korrelasjonskoeffisient som plot C og D, som henholdsvis representerer mødre ved uke 36 i svangerskapet og mødre ved fødselen. På tross av at plot A har den klart høyeste verdien er verdiene for plot B, C og D relativt høye. Den vaginale mikrobiota er mer stabil innad mødrene over tid, men de ulike mødrene har også relativt stabil mikrobiota imellom seg over tid.

4 Diskusjon

4.1 Dominerende mikrobiota

Ved å sammenligne tidligere observasjoner om de dominerende bakteriene i den vaginale mikrobiota og hvilke OTU'er som blir funnet i denne oppgaven, kan det observeres både likheter og ulikheter. Tidligere observasjoner har observert at den vaginale mikrobiota vanligvis domineres av ulike *Lactobacillus* arter, deriblant: *L.iners*, *L.crispatus*, *L.gasseri* og *L.jensenii* (Witkin et al., 2007, Aagaard et al., 2012, Balkus et al., 2012, Martin et al., 2015). De ti OTU'ene som forekom i flest sekvenser i synkende rekkefølge i denne oppgaven var: *Lactobacillus iners*, tilhørte Bifidobacteriaceae familien, tilhørte Coriobacteriaceae familien, tilhørte Megasphaera slekten, tilhørte Enterobacteriaceae familien, tilhørte Bifidobacterium slekten og fire andre arter som tilhørte slekten *Lactobacillus*. *Lactobacillus iners* og potensielt de fire artene som tilhørte *Lactobacillus* slekten, samsvarer med tidligere observasjoner. De fem andre OTU'ene skiller seg derimot ut. *Megasphaera* har funnet å dominere den vaginale mikrobiota hos friske kvinner før, men den økte tilstedeværelsen av de fire siste OTU'ene har vist seg vanskelig å forklare (Witkin et al., 2007)

4.2 Probiotikas påvirkning på den vaginale mikrobiota

Analysene viser at det ikke kan bevises noen endring i vaginal mikrobiota som er forårsaket av inntak av Biola under graviditeten. Analysen i tabell 5 viser at det er to ulike OTU'er som er signifikante med hensyn til Biola og Placebo, men ingen av disse er signifikante over tid. Begge OTU'ene ble analysert i BLAST for en mer korrekt identifisering. OTU 4 var en ukjent udyrkbare bakterie, og var kun signifikant ved uke 36. OTU 7 ble identifisert som en del av familien Bifidobacteriaceae, og var kun signifikant ved fødselen. Dette indikerer at forekomsten av disse OTU'ene ikke var påvirket av inntaket av Biola. Den vaginale mikrobiota kan ha blitt endret av Biola, men det har ikke blitt funnet noe som tyder på at dette er tilfellet i denne oppgaven. Derimot finnes det beviser på at tarm mikrobiota kan endres av probiotika. En studie fra 2015 brukte probiotika for å lindre bivirkninger fra antibiotika og annen behandling av pasienter med *Helicobacter pylori* infeksjon. Studien viste at probiotika kan hindre ubalanse i tarm mikrobiota forårsaket av antibiotika, samt begrense vekst av antibiotikaresistente bakterier og øke suksessraten for behandling av *Helicobacter pylori* (Oh

et al., 2015). Dotterud et al har også vist at probiotika kan endrer tarmens mikrobiota (Dotterud et al., 2015).

4.3 Svangerskapets påvirkning på den vaginale mikrobiota

Derimot ble det observert andre endringer i den vaginale mikrobiota fra graviditet til fødselen. Mengden proteobakterier økte i omfang, mens clostridium bakterier sank. Det har ikke blitt funnet annen forskning hvor mengden proteobakterier i den vaginale mikrobiota har endret seg, så grunnen til denne spesifikke økningen er vanskelig å anta. Endringen av mengden clostridia bakterier hos friske kvinner har heller ikke blitt funnet i annen forskning. Forskning på den vaginale mikrobiota er relativ ung, noe som kan forklare manglende artikler for sammenligning. Økningen av proteobakterier og minkingen av clostridium bakterier kan muligens være et mindre skifte i den vaginale mikrobiota forårsaket av de fysiologiske endringene kroppen går igjennom i løpet av en graviditet. En studie fra 2015 utført på mus viste at mødres kosthold påvirket tarm mikrobiota gjennom graviditeten (Gohir et al., 2015). Kostholdet til mødrene kan muligens ha påvirket den vaginale mikrobiota. Hvis kostholdet forandret mikrobiota i tarmen, er det ikke umulig at det kan ha påvirket andre av kroppens mikrobiota.

4.4 Relevansen av blod tilstede i prøvene

Det ble observert tidlig i eksperimentet at en del av de vaginale prøvene inneholdt blod. Det var interessant å undersøke om prøvene som inneholdt blod skilte seg fra de andre prøvene på et mikrobiologisk nivå. Dette var særlig med tanke på bakterienes tilgang på jernet i blodet som var tilstede. Det har blitt foreslått at tilgang på Fe^{3+} er gunstig for *Lactobacillus* produksjon av H_2O_2 for å opprettholde en frisk vaginale mikrobiota (Martin et al., 2015). Dette virket som en lovende hypotese etter en rekke analyser av data fra sekvenseringen. Analysene viste at det var 12 signifikante OTU'er (signifikant p-verdi) med hensyn til blod, og scatterplot for betadiversitet med hensyn til blod viste to grupperinger av prøvene som inneholdt blod. Videre analysering av disse prøvene ved bruk av Kruskal Wallis viste derimot at det ikke var noen signifikante OTU'er. Dette var uventet da det var forventet å finne økte mengder med *Lactobacillus* grunnet deres økte tilgang til jern (Martin et al., 2015). Basert på

resultatene i denne oppgaven er det tvilsomt at prøvene med blod skiller seg fra prøvene uten blod med hensyn til bakterieinnhold.

4.5 Stabiliteten av den vaginale mikrobiota fra graviditet til fødsel

Den vaginale mikrobiota viste seg å være mer stabil innad individene over tid enn mellom de ulike individene. Dette kan tyde på at den vaginale mikrobiota er relativt unik for hvert enkelt individ. Dette ville være logisk å anta da hvert enkelt individ har ulike liv med ulike faktorer som påvirker kroppens ulike mikrobiotaer ulikt. Faktorer som personlig hygiene, menstruasjonssyklus, seksuell liv og kosthold, for å nevne noen, kan påvirke den vaginale mikrobiota (Gajer et al., 2012). Til sammenligning har det blitt funnet at tarm mikrobiota ikke gjennomgår et skifte med hensyn til mikrobiota under et svangerskap. Dette indikerer at tarm mikrobiota er stabil (Avershina et al., 2014). Det kan virke som om kroppens ulike mikrobiotaer er relativt stabile uavhengig av svangerskap.

4.6 Tekniske betraktninger

Målingene av DNA konsentrasjon etter den genomiske DNA ekstraksjonen ga høye verdier av genomisk DNA, noe som tilsa at ekstraksjonen ga et optimalt utgangspunkt for videre arbeid med prøvematerialet. qPCR bekreftet også dette ved tilfredsstillende CT-verdier. Målingene av DNA konsentrasjon etter kvalitativ- og Illumina index PCR ga også høye verdier, og bekreftet at DNA hadde blitt korrekt amplifisert, rensset og klargjort for sekvensering. Etter kvalitets- og lengde filtrering gjensto det i overkant av 5 millioner sekvenser fra Illumina sekvenseringen. Med en cutoff på 3000 sekvenser ble rett under 90 % av de 379 prøvene inkludert. Det er positivt at så mange av prøvene gjensto kvalitetskontrollen.

Det er relevant å nevne eventuelle feilgrep som kan ha oppstått på lab. Det kan være tilfellet at analysene ikke fanget opp eventuelle forskjeller når det kommer til Biola eller blodinnhold, eller at resultatene er påvirket av menneskelig svikt. Noen av prøvene med mindre blodinnhold var vanskelig å skille fra prøvene uten blod. Dette kan ha forårsaket at prøver med mindre mengder blod ikke ble oppdaget og dermed havnet feilaktig i gruppen som ble

kategorisert som ikke-blod. Dette kan ha forårsaket at en eventuell forskjell mellom prøvene ikke ble oppdaget.

4.7 Fremtidig arbeid

I fremtidige eksperimenter knyttet til den vaginale mikrobiota ville det vært interessant å inkludere glykogen- og pH-målinger fra ulike tidspunkter i individenes liv: før fødselen, fra de ulike trimesterene i graviditeten, ved fødselen og etter fødselen. Dette kunne også vært interessant å ta like mange mikrobiologiske prøver. Inkludering av flere prøvetakninger kunne gitt et bedre bilde på hvordan den vaginale mikrobiota forandrer seg gjennom graviditet. Det er også behov for mere forskning på den vaginale mikrobiota da mye av forskningen som eksisterer hovedsakelig fokuserer på HIV (Human immunodeficiency virus), HPV (Human papillomavirus) og BV (bakteriell vaginose). Mer forskning på dette feltet kan avsløre mer om hvordan og hvilke bakterier som koloniserer ulike steder i kroppen, og hvordan de ulike mikrobiotaene eksisterer i forhold til hverandre og hvordan de påvirker hverandre i kroppen.

5 Konklusjon

Det ble ikke funnet noen effekt av Biola på den vaginale mikrobiota hos de gravide kvinnene. Derimot ble det oppdaget en endring i den vaginale mikrobiota over tid. Mengden proteobakterier økte fra uke 36 og til fødselen, mens clostridium bakterier sank. Prøvene som inneholdt blod skilte seg ikke fra prøvene uten blod med hensyn til den mikrobiologiske sammensetningen.

For videre arbeid med den vaginale mikrobiota foreslås det å inkludere flere prøver fra flere tidspunkt i individenes liv, samt glykogen- og pH-målinger.

Referanser

- AAGAARD, K., RIEHLE, K., MA, J., SEGATA, N., MISTRETTA, T. A., COARFA, C., RAZA, S., ROSENBAUM, S., VAN DEN VEYVER, I., MILOSAVLJEVIC, A., GEVERS, D., HUTTENHOWER, C., PETROSINO, J. & VERSALOVIC, J. 2012. A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PLoS One*, 7, e36466.
- ACKERMAN, J. 2012. The ultimate social network. *Sci Am*, 306, 36-43.
- AVERSHINA, E., LUNDGARD, K., SEKELJA, M., DOTTERUD, C., STORRO, O., OIEN, T., JOHNSEN, R. & RUDI, K. 2016. Transition from infant- to adult-like gut microbiota. *Environ Microbiol.*
- AVERSHINA, E., STORRO, O., OIEN, T., JOHNSEN, R., POPE, P. & RUDI, K. 2014. Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children. *FEMS Microbiol Ecol*, 87, 280-90.
- BAKER, G. C., SMITH, J. J. & COWAN, D. A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods*, 55, 541-55.
- BALKUS, J. E., MITCHELL, C., AGNEW, K., LIU, C., FIEDLER, T., COHN, S. E., LUQUE, A., COOMBS, R., FREDRICKS, D. N. & HITTI, J. 2012. Detection of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in the vagina: a comparison of culture and quantitative PCR among HIV-1 seropositive women. *BMC Infect Dis*, 12, 188.
- BIK, E. M., ECKBURG, P. B., GILL, S. R., NELSON, K. E., PURDOM, E. A., FRANCOIS, F., PEREZ-PEREZ, G., BLASER, M. J. & RELMAN, D. A. 2006. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 732-7.
- BRANKATSCHK, R., BODENHAUSEN, N., ZEYER, J. & BURGMANN, H. 2012. Simple absolute quantification method correcting for quantitative PCR efficiency variations for microbial community samples. *Appl Environ Microbiol*, 78, 4481-9.
- BRUNSTEIN, J. 2013. PCR: the basics of the polymerase chain reaction. *MLO Med Lab Obs*, 45, 32, 34-5.
- BUERMANS, H. P. & DEN DUNNEN, J. T. 2014. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim Biophys Acta*, 1842, 1932-1941.
- DAVE, M., HIGGINS, P. D., MIDDHA, S. & RIOUX, K. P. 2012. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Transl Res*, 160, 246-57.
- DOTTERUD, C. K., AVERSHINA, E., SEKELJA, M., SIMPSON, M. R., RUDI, K., STORRO, O., JOHNSEN, R. & OIEN, T. 2015. Does Maternal Perinatal Probiotic Supplementation Alter the Intestinal Microbiota of Mother and Child? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 61, 200-7.
- DOTTERUD, C. K., STORRO, O., JOHNSEN, R. & OIEN, T. 2010. Probiotics in pregnant women to prevent allergic disease: a randomized, double-blind trial. *Br J Dermatol*, 163, 616-23.
- DUBNAU, D., SMITH, I. & MARMUR, J. 1965. Gene conservation in *Bacillus* species. II. The location of genes concerned with the synthesis of ribosomal components and soluble RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 54, 724-30.
- GAJER, P., BROTMAN, R. M., BAI, G., SAKAMOTO, J., SCHUTTE, U. M., ZHONG, X., KOENIG, S. S., FU, L., MA, Z. S., ZHOU, X., ABDO, Z., FORNEY, L. J. & RAVEL, J. 2012. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med*, 4, 132ra52.

- GOHIR, W., WHELAN, F. J., SURETTE, M. G., MOORE, C., SCHERTZER, J. D. & SLOBODA, D. M. 2015. Pregnancy-related changes in the maternal gut microbiota are dependent upon the mother's periconceptual diet. *Gut Microbes*, 6, 310-20.
- GOLDENBERG, J. Z., LYTUVYN, L., STEURICH, J., PARKIN, P., MAHANT, S. & JOHNSTON, B. C. 2015. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev*, 12, CD004827.
- GRICE, E. A., KONG, H. H., CONLAN, S., DEMING, C. B., DAVIS, J., YOUNG, A. C., PROGRAM, N. C. S., BOUFFARD, G. G., BLAKESLEY, R. W., MURRAY, P. R., GREEN, E. D., TURNER, M. L. & SEGRE, J. A. 2009. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*, 324, 1190-2.
- GRICE, E. A. & SEGRE, J. A. 2011. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*, 9, 244-53.
- LANE, D. J., PACE, B., OLSEN, G. J., STAHL, D. A., SOGIN, M. L. & PACE, N. R. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 6955-9.
- MARTIN, R., SANCHEZ, B., URDACI, M. C., LANGELLA, P., SUAREZ, J. E. & BERMUDEZ-HUMARAN, L. G. 2015. Effect of iron on the probiotic properties of the vaginal isolate *Lactobacillus jensenii* CECT 4306. *Microbiology*, 161, 708-18.
- MUSZER, M., NOSZCZYNSKA, M., KASPERKIEWICZ, K. & SKURNIK, M. 2015. Human Microbiome: When a Friend Becomes an Enemy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 63, 287-98.
- OH, B., KIM, B. S., KIM, J. W., KIM, J. S., KOH, S. J., KIM, B. G., LEE, K. L. & CHUN, J. 2015. The Effect of Probiotics on Gut Microbiota during the *Helicobacter pylori* Eradication: Randomized Controlled Trial. *Helicobacter*.
- PROCTOR, L. M. 2011. The Human Microbiome Project in 2011 and beyond. *Cell Host Microbe*, 10, 287-91.
- RAVEL, J., GAJER, P., ABDO, Z., SCHNEIDER, G. M., KOENIG, S. S., MCCULLE, S. L., KARLEBACH, S., GORLE, R., RUSSELL, J., TACKET, C. O., BROTMAN, R. M., DAVIS, C. C., AULT, K., PERALTA, L. & FORNEY, L. J. 2011. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 Suppl 1, 4680-7.
- SCHREZENMEIR, J. & DE VRESE, M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *Am J Clin Nutr*, 73, 361S-364S.
- SOBEL, J. D. 2000. Bacterial vaginosis. *Annu Rev Med*, 51, 349-56.
- THORSEN, P., JENSEN, I. P., JEUNE, B., EBBESEN, N., ARPI, M., BREMMELGAARD, A. & MOLLER, B. R. 1998. Few microorganisms associated with bacterial vaginosis may constitute the pathologic core: a population-based microbiologic study among 3596 pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*, 178, 580-7.
- TRINGE, S. G. & HUGENHOLTZ, P. 2008. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr Opin Microbiol*, 11, 442-6.
- URSELL, L. K., METCALF, J. L., PARFREY, L. W. & KNIGHT, R. 2012. Defining the human microbiome. *Nutr Rev*, 70 Suppl 1, S38-44.
- WANG, Y. & QIAN, P. Y. 2009. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One*, 4, e7401.
- WITKIN, S. S., LINHARES, I. M. & GIRALDO, P. 2007. Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 21, 347-54.
- WU, S., XIONG, J. & YU, Y. 2015. Taxonomic resolutions based on 18S rRNA genes: a case study of subclass copepoda. *PLoS One*, 10, e0131498.

- YANG, B., WANG, Y. & QIAN, P. Y. 2016. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 17, 135.
- YILMAZ, P., KOTTMANN, R., PRUESSE, E., QUAST, C. & GLOCKNER, F. O. 2011. Analysis of 23S rRNA genes in metagenomes - a case study from the Global Ocean Sampling Expedition. *Syst Appl Microbiol*, 34, 462-9.

Vedlegg

Vedlegg A: Prøvemateriale

Vedlegg B: Primeroversikt

Vedlegg A: Prøvemateriale

Tabell A.1 Detaljer om prøvematerialet brukt i denne oppgaven. Tabellen inneholder den opprinnelige identifikasjonen til prøvene, det nye prøvenummeret, hvilken kategori prøvene hører til og når prøvene ble tatt. Kategoriene 312 og 313 representerer henholdsvis uke 36 i svangerskapet og ved fødselen.

ID	Prøvegruppe	Prøvetakning	Prøvenummer på lab
23440	312	13.04.2005	1
22797	312	18.02.2005	2
23107	312	27.05.2005	3
22629	312	10.05.2004	4
21834	312	22.03.2004	5
23650	312	23.08.2005	6
22883	312	10.01.2005	7
20793	312	02.06.2004	8
22784	312	06.03.2005	9
22193	312	08.06.2004	10
21825	312	05.04.2004	11
23226	312	06.03.2005	12
23462	312	07.04.2005	13
20318	312	11.02.2004	14
22199	312	11.06.2004	15
22496	312	28.04.2004	16
22858	312	29.08.2004	17
23726	312	08.09.2005	18
21844	312	26.11.2003	19
23108	312	03.01.2005	20
22490	312	27.02.2005	21
22933	312	04.09.2004	22

22822	312	08.11.2004	23
22205	312	23.07.2004	24
20292	312	27.02.2004	25
22327	312	13.03.2004	26
23352	312	14.03.2005	27
23150	312	07.03.2005	28
22293	312	07.01.2004	29
20268	312	24.03.2004	30
22170	312	08.10.2004	31
23323	312	15.02.2005	32
21831	312	10.03.2004	33
22150	312	10.06.2004	34
22684	312	17.10.2004	35
22664	312	04.08.2004	36
22627	312	24.04.2004	37
22049	312	04.03.2004	38
22596	312	11.05.2005	39
23157	312	28.04.2005	40
23073	312	31.08.2004	41
22769	312	02.02.2005	42
23764	312	14.03.2005	43
22668	312	01.07.2004	44
23363	312	11.03.2005	45
22802	312	23.04.2005	46
22716	312	09.08.2004	47
22239	312	29.03.2004	48
22212	312	08.05.2004	49
22350	312	29.06.2004	50
23457	312	11.04.2005	51
21504	312	01.04.2004	52
22512	312	19.07.2004	53

22751	312	24.11.2004	54
22843	312	01.07.2004	55
21452	312	02.02.2004	56
22523	312	25.02.2004	57
23302	312	13.02.2005	58
23191	312	29.03.2005	59
21557	312	04.10.2003	60
22256	312	17.07.2004	61
22694	312	28.04.2004	62
23137	312	28.11.2004	63
20309	312	24.10.2003	64
23530	312	26.05.2005	65
21852	312	27.04.2004	66
23774	312	16.08.2005	67
23770	312	15.08.2005	68
21646	312	12.02.2004	69
22410	312	07.07.2004	70
22803	312	11.05.2005	71
23334	312	16.02.2005	72
21039	312	02.02.2004	73
23544	312	27.02.2005	74
23358	312	10.03.2005	75
22440	312	02.05.2004	76
22764	312	04.07.2004	77
22529	312	17.06.2004	78
22148	312	19.06.2004	79
22903	312	03.08.2004	80
22479	312	13.08.2004	81
23212	312	15.11.2004	82
22264	312	04.03.2004	83
23083	312	15.03.2005	84

23349	312	22.03.2005	85
22871	312	21.10.2004	86
22117	312	02.01.2004	87
22774	312	10.01.2005	88
23298	312	16.07.2005	89
20316	312	18.01.2004	90
22714	312	06.08.2004	91
22419	312	10.01.2005	92
23512	312	12.09.2005	93
22200	312	16.06.2004	94
21275	312	04.11.2003	95
23313	312	08.05.2005	96
23459	312	03.01.2005	97
21908	312	29.01.2004	98
20220	312	20.11.2003	99
22808	312	17.11.2004	100
22083	312	20.12.2004	101
22767	312	17.09.2004	102
20251	312	02.03.2004	103
22925	312	16.08.2004	104
21294	312	29.11.2003	105
22666	312	10.07.2004	106
22670	312	10.07.2004	107
20794	312	26.04.2004	108
22134	312	24.11.2004	109
22059	312	05.09.2003	110
21933	312	05.09.2004	111
22260	312	23.08.2004	112
23362	312	28.03.2005	113
21574	312	27.10.2003	114
22480	312	31.08.2004	115

21838	312	10.01.2004	116
22175	312	05.08.2004	117
21912	312	13.01.2004	118
22396	312	23.05.2004	119
22399	312	14.06.2004	120
21332	312	01.11.2003	121
22720	312	16.08.2004	122
21406	312	09.11.2003	123
21822	312	15.03.2004	124
23795	312	09.03.2005	125
22724	312	30.11.2004	126
21117	312	02.04.2004	127
22650	312	01.07.2004	128
23474	312	25.05.2005	129
22609	312	03.06.2004	130
22622	312	08.05.2004	131
22457	312	10.04.2004	132
22810	312	03.09.2004	133
22589	312	31.03.2005	134
23152	312	10.04.2005	135
21297	312	31.01.2004	136
21050	312	12.01.2004	137
22977	312	03.12.2004	138
23237	312	09.01.2005	139
22341	312	30.03.2004	140
21851	312	03.12.2003	141
23421	312	01.04.2005	142
21251	312	05.02.2004	143
20933	312	10.06.2005	144
21922	312	18.05.2004	145
22640	312	30.06.2004	146

22904	312	04.06.2004	147
22585	312	01.03.2005	148
22303	312	19.03.2004	149
20850	312	05.12.2003	150
21905	312	22.12.2003	151
21942	312	08.01.2005	152
23418	312	07.03.2005	153
22894	312	20.01.2005	154
21727	312	21.03.2004	155
23232	312	21.02.2005	156
23253	312	02.06.2005	157
22470	312	31.05.2004	158
23717	312	08.09.2005	159
22270	312	31.03.2004	160
22135	312	23.05.2004	161
23160	312	09.05.2005	162
22546	312	08.04.2004	163
21339	312	24.12.2003	164
23455	312	24.05.2005	165
21288	312	17.02.2004	166
21407	312	20.09.2003	167
20938	312	02.04.2004	168
23819	312	19.06.2005	169
22491	312	03.02.2005	170
20865	312	15.09.2003	171
23124	312	10.01.2005	172
20257	312	18.12.2003	173
20317	312	28.02.2004	174
21693	312	12.12.2003	175
21554	312	12.11.2003	176
23254	312	26.08.2005	177

20799	312	25.06.2004	178
23023	312	14.05.2005	179
23545	312	22.02.2005	180
21968	312	20.02.2004	181
21286	312	10.12.2003	182
21285	312	30.01.2004	183
22643	312	08.08.2004	184
22004	312	16.11.2003	185
22593	312	07.04.2005	186
22915	312	03.07.2004	187
22554	312	23.06.2004	188
20297	312	25.03.2004	189
20308	312	01.11.2003	190
22155	312	24.06.2005	191
22046	312	23.02.2004	192
22577	312	15.09.2004	193
22973	312	06.10.2004	194
23174	312	15.04.2005	195
22034	312	04.12.2004	196
20785	312	09.09.2003	197
21116	312	09.03.2004	198
23431	312	13.04.2005	199
22827	312	06.12.2004	200
22182	312	29.03.2004	201
23317	312	25.01.2005	202
22673	312	09.08.2004	203
21947	312	21.03.2005	204
22508	312	Ingen dato	205
22648	312	23.02.2004	206
22072	312	18.02.2004	207
20293	312	22.10.2003	208

23628	312	06.09.2005	209
22821	312	07.11.2004	210
22352	312	30.06.2004	211
21643	312	21.01.2004	212
20469	312	25.05.2005	213
22434	312	23.03.2004	214
22208	312	28.06.2004	215
23483	312	27.05.2005	216
20787	312	Ingen dato	217
21403	312	23.09.2003	218
23268	312	17.09.2005	219
22149	312	25.06.2004	220
22533	312	09.05.2004	221
23968	312	14.06.2005	222
23290	312	26.05.2005	223
22215	312	10.08.2004	224
23009	312	17.02.2005	225
23190	312	14.03.2005	226
22796	312	06.11.2004	227
23156	312	09.05.2005	228
21514	312	19.10.2003	229
22073	312	27.02.2004	230
23041	312	06.11.2004	231
21291	312	17.03.2004	232
22201	312	16.06.2004	233
19193	312	14.11.2003	234
21853	312	01.09.2004	235
23075	312	05.01.2005	236
21725	312	15.09.2003	237
21821	312	09.01.2004	238
21876	312	10.06.2004	239

22242	312	18.05.2004	240
21327	312	29.09.2003	241
20301	312	24.11.2003	242
22296	312	27.01.2004	243
20937	312	09.06.2005	244
22053	312	16.03.2004	245
22095	312	08.11.2003	246
22592	312	02.04.2005	247
21445	312	02.12.2003	248
21962	312	29.01.2004	249
20464	312	15.09.2003	250
23074	312	07.12.2004	251
22017	312	27.11.2003	252
22475	312	24.04.2004	253
21777	312	04.01.2004	254
22759	312	18.03.2004	255
22296	313	24.02.2004	256
22078	313	28.05.2004	257
22821	313	16.12.2004	258
22396	313	Ingen dato	259
22470	313	23.06.2004	260
21968	313	26.03.2004	261
23726	313	01.10.2005	262
22883	313	25.02.2005	263
22508	313	24.07.2004	264
22149	313	30.07.2004	265
20933	313	05.07.2005	266
23237	313	28.02.2005	267
22554	313	15.07.2004	268
21905	313	06.02.2004	269
22810	313	30.09.2004	270

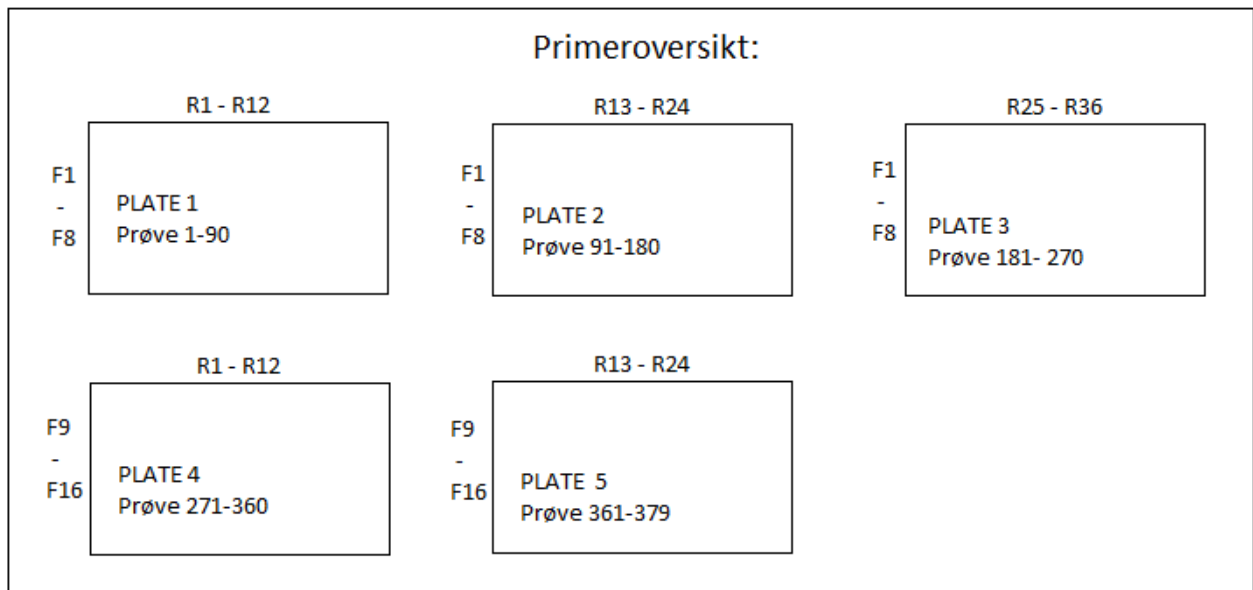
22200	313	24.07.2004	271
21942	313	31.01.2005	272
23459	313	24.01.2005	273
22239	313	07.05.2004	274
22623	313	Ingen dato	275
21922	313	16.06.2004	276
21504	313	29.04.2004	277
23968	313	18.07.2005	278
20301	313	11.12.2003	279
20787	313	20.10.2003	280
22004	313	06.01.2004	281
23396	313	30.07.2005	282
23212	313	17.12.2004	283
22148	313	01.08.2004	284
22822	313	06.12.2004	285
22479	313	22.09.2004	286
23232	313	16.03.2005	287
23545	313	13.03.2005	288
22933	313	11.10.2004	289
21554	313	14.12.2003	290
22778	313	Ingen dato	291
22410	313	06.08.2004	292
22085	313	07.02.2005	293
21853	313	14.09.2004	294
22480	313	26.09.2004	295
20469	313	26.06.2005	296
20793	313	16.07.2004	297
21117	313	02.05.2004	298
22903	313	14.09.2004	299
22577	313	14.10.2004	300
22083	313	11.01.2005	301

22400	313	20.08.2004	302
22629	313	13.06.2004	303
22767	313	27.10.2004	304
22648	313	24.03.2004	305
22751	313	30.12.2004	306
20251	313	09.04.2004	307
21275	313	13.12.2003	308
21332	313	26.12.2003	309
22303	313	18.04.2004	310
21285	313	13.02.2004	311
23136	313	17.02.2005	312
21406	313	09.11.2003	313
22808	313	30.12.2004	314
22049	313	06.04.2004	315
21286	313	06.01.2004	316
22670	313	22.08.2004	317
22774	313	02.02.2005	318
23302	313	08.03.2005	319
22609	313	Ingen dato	320
22716	313	26.08.2004	321
22684	313	30.10.2004	322
21050	313	22.01.2004	323
23774	313	22.09.2005	324
22640	313	14.08.2004	325
22913	313	15.11.2004	326
22858	313	03.10.2004	327
22668	313	07.08.2004	328
22643	313	27.08.2004	329
22529	313	22.07.2004	330
21727	313	29.04.2004	331
21643	313	02.02.2004	332

22796	313	02.12.2004	333
21339	313	02.01.2004	334
22068	313	22.02.2004	335
21822	313	22.03.2004	336
20309	313	29.11.2003	337
22894	313	01.03.2005	338
23819	313	19.07.2005	339
21777	313	27.01.2004	340
20257	313	14.01.2004	341
22150	313	30.06.2004	342
23530	313	30.06.2007	343
21844	313	16.12.2003	344
22017	313	28.12.2003	345
21838	313	13.02.2004	346
21835	313	11.04.2004	347
22205	313	09.09.2004	348
22117	313	06.02.2004	349
22759	313	29.03.2004	350
22199	313	11.07.2004	351
20293	313	25.11.2003	352
20850	313	12.01.2004	353
22533	313	16.06.2004	354
22977	313	28.12.2004	355
21693	313	22.01.2004	356
22769	313	15.03.2005	357
21327	313	10.11.2003	358
22764	313	10.08.2004	359
21464	313	24.01.2004	360
22046	313	31.03.2004	361
20318	313	22.03.2004	362
21445	313	09.12.2003	363

20297	313	03.05.2004	364
21933	313	20.10.2004	365
22170	313	16.11.2004	366
23041	313	12.11.2004	367
21452	313	17.02.2004	368
21638	313	12.12.2003	369
20308	313	04.12.2003	370
22144	313	14.06.2004	371
22475	313	19.05.2004	372
23137	313	08.01.2005	373
21851	313	03.01.2004	374
22666	313	05.08.2004	375
21389	313	29.07.2004	376
21962	313	02.03.2004	377
22784	313	22.03.2005	378
20865	313	15.10.2003	379

Vedlegg B: Primeroversikt



Figur B.1 Primeroversikt for Illumina 16S index PCR



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway