

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Riinu Kiiker

**Ureaplasmad ja laktobatsillid viljatute paaride suguteede
mikrobiotas ning seksuaalvahekorra mõju tupe
mikroobikooslusele**

Magistritöö

Juhendajad: PhD Reet Mändar

PhD Jaanis Juhanson

TARTU 2013

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	4
1. SISSEJUHATUS	5
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
2.1. Inimese mikrobiota.....	6
2.2. Inimese mikrobiota uurimismeetodid.....	7
2.3. Tupe mikrobiota	9
2.3.1. <i>Lactobacillus</i> domineerivad mikroobikooslused	10
2.3.2. Tupe mikrobiota muutlikkus	13
2.3.3. Mitmekesine anaeroobsete bakterite kooslus.....	14
2.3.4. Bakteriaalne vaginoos kui mikroökoloogilise tasakaalu häire.....	15
2.4. Meeste genitaaltrakti mikrobiota.....	19
2.5. Mükoplasmad nais- ja meessuguteede mikrobiotas	21
2.6. Seksuaalvahekorra mõju tupe mikrobiotale	22
2.7. Suguteede mikroobide seos viljatuse ja teiste reproduktiivfunktsiooni häiretega	24
3. EESMÄRGID	26
4. MATERJAL JA METOODIKA	27
4.1. Uuritavad paarid	27
4.2. Uuritav materjal.....	28
4.3. DNA eraldamine.....	29
4.4. Kvantitatiivne PCR (qPCR)	30
4.4.1. qPCR standardite valmistamine	30
4.4.2. qPCR reaktsiooni teostamine	33
4.4.3. qPCR-i andmete kvaliteedi analüüs	34

4.5. Mikroobikoosluste liigilise koosseisu määramine 16S rRNA fragmentide amplikonide järjestamise abil	35
4.5.1. 16S rRNA V6 amplifikatsioon.....	35
4.5.2. PCR produktide kontsentratsiooni määramine.....	36
4.5.3. PCR produktide segu puhastamine ja DNA raamatukogu valmistamine .	36
4.5.4. Sekveneerimine ja järjestuste analüüs.....	36
4.6. Andmeanalüüs	37
5. TULEMUSED	38
5.1. Tupe ja sperma mikroobikooslused viljatutel paaridel 16S rRNA amplikonide järjestamise alusel.....	38
5.2. Laktobatsillide ja ureaplastide hulga tupeproovides qPCR-i alusel	42
5.3. Laktobatsillide ja ureaplastide hulga spermaproovides qPCR-i alusel.....	46
5.4. qPCR meetodiga ja 16S rRNA amplikonide järjestamisel saadud geenide osakaalude võrdlus	48
6. ARUTELU.....	50
JÄRELDUSED	56
KOKKUVÕTE.....	57
SUMMARY	59
TÄNUAVALDUSED	61
KASUTATUD KIRJANDUS	62
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	80
LISA 1	81
LISA 2	83
LIHTLITSENTS	85

KASUTATUD LÜHENDID

16S rRNA	bakteriaalse ribosoomi väikene subühik
bp	aluspaar (<i>base pair</i>)
BV	bakteriaalne vaginoos
BVAB	bakteriaalse vaginoosiga seotud bakterid (<i>bacterial vaginosis associated bacteria</i>)
<i>Clue</i> -rakud	epiteelirakud, millele on kinnitunud bakterid
CPSI	kroonilise prostatiidi sümptomindeks (<i>Chronic Prostatitis Symptom Index</i>)
HIV	inimese immuunpuudulikkuse viirus (<i>Human immunodeficiency virus</i>)
KOH	kaaliumhüdroksiid
LAC klass	<i>Lactobacillus</i> klass
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
PAMPs	patogeeniga seotud molekulaarsed mustrid (<i>pathogen associated molecular patterns</i>)
PBS	fosfaatpuhverdatud soolalahus (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	polümeraasiahelreaktsioon (<i>polymerase chain reaction</i>)
PID	väikevaagnapõletik (<i>pelvic inflammatory disease</i>)
qPCR	kvantitatiivne polümeraasiahelreaktsioon (<i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
ROS	reaktiivsed hapnikuühendid (<i>reactive oxygen species</i>)
sp.	liik (<i>species</i>)
spp.	liigid (<i>species</i>)
TAE	Tris-atsetaat-EDTA
Tris	tris(hüdrosümetüül)aminometaan
WBC	vere leukotsüüdid (<i>white blood cells</i>)
WHO	Maailma Tervishoiuorganisatsioon (<i>World Health Organisation</i>)

1. SISSEJUHATUS

Inimese kehapind ja –õõnsused (seede- ja urogenitaaltrakt) on elupaigaks suurele hulgale bakteritele, mis võivad peremeesorganismile tuua nii kasu kui ka kahju. Naise tupekeskkond ja sealne mikrobiota on omavahel peenelt tasakaalustatud mutualistlikus suhtes. Bakterid saavad tupekeskkonnast enda kasvuks vajalikke toitaineid ja vastutasuks kaitsevad potentsiaalselt patogeensete organismide kolonisatsiooni eest. Tervete asümptomaatiliste naiste tupebakteriomiota võib üsna varieeruv ja keeruline olla, enamasti domineerivad piimhapet tootvad *Lactobacillus* liigid, sellele vastupidiselt leidub ka naisi, kelle tupebakteriomiota koosneb mitmekesisest anaeroobsete bakterite kooslusest. Tupe limaskest pakub kaitset sissetungivate mikroobide eest ja osaleb immunsüsteemi töös, samal ajal on tupekeskkond avatud ökosüsteem, mida võib oluliselt mõjutada seksuaalvahekord. Kokkupuude spermaga muudab tupekeskkonna aluseliseks, mis võib oluliselt mõjutada mikrobiotat ning põhjustada bakteriaalset vaginoot, urogenitaaltrakti infektsioone ja viljatust. Genitaaltrakti ureaplasma roll ei ole selge ja seniste uuringute tulemused on olnud vastukäivad. Kuna viljatuse korral võib ureaplasma arvukus olla suurenenud, siis käesolevas töös seda võimalust kontrollitakse. Kuna viljatuse on seotud nii nais- kui ka meespartneriga, on vajalik nende samaaegne uuring, mis käsitleb seksuaalvahekorra otsese mõju hindamist naise genitaaltraktile.

Käesolevas töös hinnatakse mees- ja naissuguteede mikrobiota seisundit viljatutel paaridel koosluse 16S rRNA geenifragmentide amplikonide järjestamise tulemuste alusel ning järgnevalt selgitatakse kvantitatiivse PCR abil kahe ureaplasma liigi (*U. urealyticum*, *U. parvum*) ja kahe potentsiaalselt kaitset pakkuva laktobatsilli (*L. iners*, *L. crispatus*) hulka ja olemasolu, samuti nende muutusi seoses seksuaalvahekorraga.

2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

2.1. Inimese mikrobiota

Inimkeha on elupaigaks suurele hulgatele bakteritele, arhedele, viirustele ja eukariootsetele organismidele, mis asustavad konkreetseid kehapiirkondi ja ületavad meie somaatiliste ja sugurakkude arvu ühe suurusjärgu võrra (Turnbaugh *et al.*, 2007). Mikrobiota moodustavad kõik ühes kindlas mikrobiotoobis (inimese kehapiirkonnas) elavad mikroorganismid. Mikrobiom on geenide ja genoomide kogum selles samas mikroobikoosluses (Eloe-Fadrosh & Rasko, 2013). Mikrobioomi varieeruvus ületab inimese geneetilise varieeruvuse ning mikrobioomi muutlikkus võimaldab seda tervise edendamise huvides ära kasutada, seega on inimese genoomi ja mikrobioomi uuringute koostöö oluline personaalmeditsiini edendamisel. Erinevate indiviidide vahel on mikroorganismide koosluse varieeruvus samas kehapiirkonnas märkimisväärne, mis takistab normaalse terve ja haigusega seotud mikroobikoosluse kohta üldistuste tegemist.

Inimesega seotud mikrobiota roll tervises ja haiguses on individuaalne ning selgub alles nende organismide metaboolsete ja funktsionaalsete võimete kindlakstegemisel (Hess *et al.*, 2011). Siiani on kõige rohkem uuritud seedetrakti mikrobiotat, nendel kooslustel on oluline roll inimese organismi jaoks vajalike toitainete omastamisel ja sünteesil, energia metabolismis, vitamiinide sünteesil, epiteeli arengus ja immuunvastuse kujunemisel (Tappenden & Deutch, 2007). Kuna naise tupekeskkonda mõjutavad erinevad tegurid (seksuaalvahekord, tsüklilised muutused jm), siis sealse mikroobikoosluse peamine funktsioon on kaitsta potentsiaalselt patogeensete mikroorganismide sissetungi ja infektsioonide eest (Srinivasan *et al.*, 2010; Jaspers *et al.*, 2012). Inimese nahk on suur ja heterogeenne organ ning erinevate piirkondade mikroobikoosluste kompleksus ja stabiilsus võivad omavahel oluliselt erineda. Naha mikrobiotal on arvatavasti oluline roll erinevate nahahaiguste (atoopiline ja seborroiline dermatiit, psoriaas, akne) patofüsioloogias (Grice *et al.*, 2009).

2.2. Inimese mikrobiota uurimismeetodid

Inimese mikrobiotat uuriti algselt mikroskoobiga. Meetodikate arenedes õpiti baktereid isoleerima ja identifitseerima kultiveerimispõhiste meetoditega, mis võimaldavad määrata vaid neid mikroorganisme, mis kasutatavatel söötmetel ja keskkonnatingimustel kasvavad, mistõttu need tulemused on puudulikud ja võivad viia mikrobiota koosseisu hindamisel valede järeldusteni (Larsen & Monif, 2001). Meie piiratud võimekus võib olla tingitud bakterite rangetest kasvutingimustest nagu toitainete optimaalne kombinatsioon, kasvutemperatuur, lahustunud hapniku tase ja vajalik kooskultiveerimine mõne teise mikroorganismiga (Amann *et al.*, 1995; Eckburg *et al.*, 2005).

Enamus meie teadmisi inimkehaga seotud mikroobikoosluste koosseisu, metaboolse funktsiooni ja ökoloogia kohta pärineb uuringutest, mis põhinevad mikroorganismide kasvatusemeetoditel. Enne 2002. aastal avaldatud Burton ja Reid'i tööd pärines peaaegu kogu teadmine tupemikrobiota kohta bakterite kultiveerimisest ja nende fenotüübilisest identifitseerimisest. Seoses molekulaarsete meetodite laialdasema kasutuselevõtuga 1990datel hakati inimese mikrobiota uurimisel rakendama kvantitatiivset PCR, mis on väga kasulik meetod bakterite identifitseerimiseks ja mikroobide koosseisu ning arvukuse muutuste hindamiseks pikaajalistel uuringutel (Fredricks *et al.*, 2009; Srinivasan *et al.*, 2010; Fethers *et al.*, 2012; Jaspers *et al.*, 2012). Teoreetiliselt on võimalik sobivate laiaulatusega PCR praimerite või erinevate praimeripaaride kombinatsioonidega tuvastada kõiki seni teadaolevaid bakteriliike.

Alates 1990. aastatest on paljud inimesega seotud mikrobiota uuringud keskendunud bakterite koosseisu määramisele äärmiselt konserveerunud ribosoomi väikse subühiku (16S rRNA) geeni (~1540 bp) võrdleva molekulaarjärjestuste analüüsi abil. Kuigi 16S rRNA geen on olemas kõikidel bakteritel, võib erinevatel liikidel genoomis olla erinev arv selle geeni operone (1-15) (Hugenholtz & Pace, 1996; Hugenholtz *et al.*, 1998; Torsvik & Ovreas, 2002; Baker *et al.*, 2003; <http://greengenes.lbl.gov/>). Bakteriaalne 16S rRNA on väga hea geneetiline marker tänu praimerite seondumiseks vajalikele konserveerunud regioonidele ning kiiresti arenevatele (hüpervarieeruvatele) aladele bakterite fülogeneetiliseks eristamiseks. Väga oluline on sealjuures ka ulatuslike andmebaaside olemasolu, mis sisaldavad miljoneid 16S rRNA järjestusi

(<http://greengenes.lbl.gov/>; <http://rdp.cme.msu.edu/>; <http://www.arb-home.de/>). 16S rRNA geeni järjestuste andmed kirjeldavad mikrobioomi ainult osaliselt, kuna amplifitseerimiseks kasutatavad praimerid ei sobi ühtemoodi kõikide liikide järjestuste amplifitseerimiseks.

Tänase seisuga on mikroobikoosluse rühmade ja liikide määramisel parim meetod kõikide proovis olevate 16S rRNA geeni järjestuste sekveneerimine. Kõikides seni läbiviidud inimese mikrobioomi uuringutes on kasutatud kolme põhilist sekveneerimisplatvormi: Sangeri sekveneerimine (Applied Biosystems 3730xl), pürosekveneerimine (Roche 454 GS FLX ja FLX Titanium), Illumina klonaalikiibid (Illumina GAIIx, HiSeq 2000, MiSeq). Sekveneerimisel saadud järjestused joondatakse ning võrreldakse suurte 16S rRNA andmebaasidega (<http://greengenes.lbl.gov/>; <http://rdp.cme.msu.edu/>; <http://www.arb-home.de/>), et tuletada fülogeneetilisi suhteid teadaolevate liikidega. Igal tehnoloogial on kindlad omadused, hõlmates sekveneeritavate järjestuste pikkust, katvust, täpsust, ulatust, hinda ja andmete saamiseks kuluvat aega. Sellest hoolimata ei ole välja kujunenud ühest sekveneerimisplatvormi, meetodikat või bioinformaatilisi vahendeid, mida sama ala uurijad kõik kasutaksid, muutes jätkuvalt erinevate uurimistöde võrdlemise keeruliseks. Sekveneerimise tehnoloogiad on edasiarendanud mikroorganismide koosluste uurimist suurendades läbilaskevõimet ning seeläbi võimaldanud luua ulatuslikku kataloogi erinevate kehapiirkondadega (seedetrakti, naha, tupega) seotud mikroorganismide fülogeneetilistest rühmadest (Eckburg *et al.*, 2005; Grice *et al.*, 2009; Ravel *et al.*, 2011).

Kuigi molekulaarsete meetodite kasutamisel on eelised kultiveerimispõhiste meetodite ees bakterikoosluse mitmekesisuse hindamisel, on neil ka piiranguid seoses sobiva DNA eraldamise meetodika, praimerite valiku, amplifikatsiooni efektiivsuse, sekveneerimise iseärasuste ja järjestuste analüüsiga (Forney *et al.*, 2004). Kõige täiuslikuma pildi mikrobiotast annab siiski erinevate kultiveerimispõhiste ja molekulaarsete meetodide koos rakendamine.

2.3. Tupe mikrobiota

Naise tupekeskkond ja sealne mikrobiota on omavahel peenelt tasakaalustatud mutualistlikus suhtes. Bakterid saavad tupekeskkonnast enda kasvuks vajalikke toitaineid ja vastutasuks kaitsevad potentsiaalselt patogeensete organismide kolonisatsiooni eest, mis on seotud sümptomaatilise bakteriaalse vaginooosi (BV), pärmseente, sugulisel teel levivate haiguste ja kuseteede infektsioonidega (Hillier *et al.*, 1993; Sewankambo *et al.*, 1997; Gupta *et al.*, 1998; Sobel, 2000; Wiesenfeld *et al.*, 2003; Zozaya-Hinchliffe *et al.*, 2010).

Tervete asümptomaatiliste naiste tupemikrobiota võib olla üsna varieeruv ja keeruline, enamasti domineerivad *Lactobacillus* liigid, sellele vastupidiselt leidub ka naisi, kelle tupemikrobiota koosneb mitmekesisest piimhapet tootvate anaeroobsete bakterite kooslusest (Ma *et al.*, 2012). Erinevate mikroorganismide vahel toimub pidev konkureerimine ruumi ja toitainete pärast. Metaboolse aktiivsuse kaudu, seal hulgas piimhappe, vesinikperoksiidi ja bakteriotsiinide tootmise ning tupe limaskestas koloniseerimise abil muudavad mikroorganismid ümbritsevat keskkonda viisidel, mis lihtsustavad või takistavad teiste bakterite kolonisatsiooni (Dover *et al.*, 2008; O'Hanlon *et al.*, 2011).

Ka peremeesorganism mõjutab koosluste koosseisu tupesekreedi, lima, piimhappe tootmise, epiteelirakkude retseptorite ja immuunsüsteemi kaudu (Wira *et al.*, 2005; Witkin *et al.*, 2007; Linhares *et al.*, 2010). Kaasasündinud immuunsüsteemi komponendid, epiteel ja selle poolt sekreteeritavad antimikroobsed ühendid (nt defensiinid), komplemendi süsteem, fagotsüüdid (makrofaagid ja neutrofiilid) ja nende poolt toodetud reaktiivsed hapnikuühendid (ROS – *reactive oxygen species*) ning nitraatoksiid on vajalikud patogeenide äratundmiseks ja eemaldamiseks. Fagotsüteerivad rakud omavad spetsiifilisi pinnaretseptoreid, mille abil tunnevad ära patogeeni seotud molekulaarseid mustreid (PAMPs - *pathogen associated molecular patterns*) (Janeway & Medzhitov, 2002; Akira *et al.*, 2006), mille tagajärjel toodavad ja vabastavad nad keskkonda proinflammatoorseid tsütokiine ning esitlevad patogeeni antigeeni lümfotsüütidele. Sellega aktiveeritakse omandatud immuunsüsteem, T-lümfotsüütide alamhulkade (T-abistajarakud ja tsütotoksilised T-lümfotsüüdid) ning B-lümfotsüütide ja nende poolt sekreteeritud antikehade vahendatud immuunvastus

(Witkin *et al.*, 2007; Takeuchi & Akira, 2010). Erinevad leukotsüüdid toodavad ja sekreteerivad tsütokiine ja kemokiine, mis aktiveerivad teisi immuunrakke, bakterite ja viiruste vastaseid ühendeid, mis tagavad kaitse, kui omandatud immuunsüsteem on suguhormoonide poolt allareguleeritud (Wira *et al.*, 2005).

Tupemikrobiota stabiilsus ja paindlikkus on väga varieeruvad, kuna tupekeskkond on välismõjudele avatud ning esinevad peremeesorganismide vahelised erinevused. Loomulike koosluste liigiline koosseis ja struktuur erinevad naiste seas, mis omakorda tähendab erinevat tundlikkust urogenitaaltrakti infektsioonide suhtes (Hickey *et al.*, 2012). Vaatamata mikrobiota olulisusele on üsna vähe teada, kuidas nende koosseis ja funktsioon erinevad inimeste vahel ja kuidas erinevad mikroorganismid üksteist ja peremeesorganismi vastastikku mõjutavad, et moodustuks dünaamiline ökosüsteem, mis reageerib väliskeskkonnale (Ma *et al.*, 2012).

2.3.1. *Lactobacillus* domineerivad mikroobikoobikooslused

Perekond *Lactobacillus* liike on enamasti peetud normaalse või terve tupekeskkonna tunnuseks (Gupta *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1999; Donders *et al.*, 2000b). Alates sellest ajast, kui Döderlein üheksateistkümnenda sajandi lõpus need esmakordselt tupesekreedist tuvastas, on laktobatsille peetud üliolulisteks tupekeskkonna kaitsjateks potentsiaalselt patogeensete organismide vastu (Döderlein, 1892; Thomas, 1928; Rogosa & Sharpe, 1960). See on võimalik tänu piimhappe tootmisele, mis tagab keskkonnas madala ja kaitsva pH (4.0-5.0) (Kashket, 1987; Redondo-Lopez *et al.*, 1990; Boskey *et al.*, 2001; Alakomi *et al.*, 2000). On leitud, et sugulisel teel levivate HIV ja *Neisseria gonorrhoeae* vastu on piimhappe mikrobitsiidina palju efektiivsem, kui lihtsalt happeline keskkond (Lai *et al.*, 2009; Graver & Wade, 2011).

Tervete reproduktiivses eas naiste tupemikrobiotas, kus domineerivad laktobatsillid, on 16S rRNA geeni sekveneerimise abil määratud põhilised liigid *L. iners*, *L. gasseri*, *L. jensenii* ja *L. crispatus* (Verhelst *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004; 2007; Zozaya-Hinchliffe *et al.*, 2010; Ravel *et al.*, 2011; Srinivasan *et al.*, 2012; Drell *et al.*, 2013). *L. crispatus* ja *L. gasseri* domineerivad kooslused on stabiilsed, väheste üleminekutega teisteks kooslusetüüpideks, mis on põhiliselt seotud menstruatsiooniga (Gajer *et al.*, 2012; Jespers *et al.*, 2012). *L. crispatus* 1 on oluline roll terve tupeökosüsteemi

säilimisel ja ta on positiivses korrelatsioonis *L. jensenii* ja *L. gasseri*´ga (Srinivasan *et al.*, 2012). Alles molekulaarsete meetoditega tuvastati *L. iners*, mida on keeruline kasvatada ja mis ei kasva traditsioonilistel laktobatsillide jaoks valmistatud söötmetel (Falsen *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2004). Erinevalt teistest liikidest, mis võivad kergesti asendada patogeenidega, on *L. iners* tupemikrobiotas väga püsiv ka keskkonnatingimuste muutumisel näiteks menstruatsiooni, infektsioonide ja BV korral. Seega on ta oluline normaalse mikrobiota taastumisel ja püsimisel, aga samas on *L. iners* domineerivad kooslused väga varieeruva bakterite koosseisu, stabiilsuse ja pH väärtustega (Ferris *et al.*, 2007; Verstraelen *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2009; Hummelen *et al.*, 2010; Zozaya-Hinchliffe *et al.*, 2010; Gajer *et al.*, 2012; Jespers *et al.*, 2012; Srinivasan *et al.*, 2012).

Põhja-Ameerikas läbiviidud suuremahulises 396 tervet asümptomaatilist naist käsitlevas uuringus selgus, et *L. iners* leidus 84 % naistel ja domineeris 34 % kooslustes, *L. crispatus*, *L. gasseri* ja *L. jensenii* tuvastati vastavalt 65, 43 ja 48 % naistel ning need domineerisid vastavalt 26, 6 ja 5 % kooslustes (Ravel *et al.*, 2011). Tupes leiduvad bakterikooslused, mille liigiline koosseis ja arvukused on sarnased, saab jagada viieks kooslusetüübiks (Ravel *et al.*, 2011). Neist neli, kus domineerivad *Lactobacillus* liigid, moodustavad üle 70 % kõigist proovidest, kuid erineva etnilise päritoluga inimeste seas on nende koosluste esinemine väga varieeruv (Zhou *et al.*, 2007; 2010; Ravel *et al.*, 2011).

Ameerikas läbiviidud uuringus selgus ka, et valgete ja Aasia naiste tupemikrobiotas domineerivad laktobatsillid suurema tõenäosusega kui Hispaania ja mustadel naistel, samuti leiti, et valgete ja Aasia naiste tupekeskkonna pH on madalam, vastavalt pH 4.2 ja 4.4, võrrelduna mustade ja Hispaania naistega, vastavalt pH 4.7 ja 5.0 (Ravel *et al.*, 2011). Zhou jt (2007) jõudsid oma töös sarnase tulemuseni, et *Lactobacillus* domineerivad kooslused on enam levinud valgetel (91 %) kui mustadel tervetel naistel (68 %) ning mitmekesise anaeroobsete bakteritega koosluseid on rohkem mustadel (32 %) kui valgetel tervetel naistel (8 %). See toetab hüpoteesi, et peremeesorganismi faktorid mõjutavad oluliselt tupemikrobiota koosseisu ja struktuuri.

Drell'i ja tema kaastöötajate (2013) poolt teostatud laiaulatuslikus uuringus iseloomustati 432 asümptomaatilise reproduktiivses eas eestlase tupe mikro- ja mükobiomi. Selles töös leiti 99 % proovidest *Lactobacillus*, 71 % *Gardnerella*, 56 %

Prevotella, 41 % *Ureaplasma*, 38 % *Atopobium*. Tupekooslused jaotati sarnase bakteriliikide suhtelise arvukuse järgi viieks rühmaks, 29 % proovidest, mis olid mitmekesise anaeroobsete bakterite kooslusega, ei klassifitseerinud ühtegi gruppi (0-grupp). I rühmas domineeris *L. iners*, II leitud suures hulgas nii *L. iners* kui ka *L. crispatus*, III *L. crispatus*, IV *Gardnerella* sp., V olid enam-vähem võrdselt esindatud *L. crispatus* ja *Gardnerella* sp. Ravel *et al.* (2011) tulemustele sarnaselt domineerisid *L. iners* 39 % ja *L. crispatus* 29 % kooslustes (Drell *et al.*, 2013). Mikroorganismide mitmekesisus koosluses oli suurem kõrgematel keskkonna pH väärtustel ja halvapärase tupevooluse esinemisel, mis võib viidata asümptomaatilisele BV-le.

Statistiliselt olulisi erinevusi on saadud võrreldes erinevate *Lactobacillus* liikide võimet langetada pH-d erinevates kooslusetüüpides. *L. crispatus* domineerivas koosluses langeb pH 4.0-ni, teistes jääb pH vahemikku 4.4-5.0 (Ravel *et al.*, 2011). Kuigi madala pH kindlustamises on kõige suurem roll laktobatsillidel, võivad ka teised bakterid sellesse panustada tootes või kasutades piimhapet. Isegi sama liigi tüved, millel on genoomis erinevusi, võivad olla spetsiifiliste füsioloogiliste ja biokeemiliste omadustega. Näiteks *Escherichia coli* tüvede genoomid võivad varieeruda 25 % ulatuses (Ochman & Jones, 2000), tüpe koloniseerivate *Lactobacillus* liikide kohta võrdleva genoomika andmed puuduvad.

Lisaks piimhappele toodavad laktobatsillid antimikroobseid ühendeid nagu märklaudspetsiifilised bakteritsiinid (valgulised bakteritsiidid) (Aroutcheva *et al.*, 2001; Alpay-Karaoglu *et al.*, 2002) ja laia toimespektriga vesinikperoksiid (H_2O_2) (Eschenbach *et al.*, 1989; Hawes *et al.*, 1996). Bakteritsiinide antimikroobne aktiivsus on seotud märklaudraku membraani permeabiliseerimisega (Oscariz & Pisabarro, 2001), tipes on neil suur roll patogeensete ja võõrorganismide kasvu ja leviku takistamisel (Dover *et al.*, 2008). *In vitro* aeroobses keskkonnas toodavad *Lactobacillus* liigid vesinikperoksiidi, aga kuna tupekeskkond on tegelikult anaeroobne keskkond, milles lahustunud hapniku tase on madal, on vähetõenäoline, et toodetud H_2O_2 kogus ulatuks toksilise tasemeni. Hiljutine uuring näitas, et H_2O_2 füsioloogilisel kontsentratsioonil ei ole märkimisväärset mõju 17 BV-ga seotud bakterile anaeroobsetes kasvutingimustes ning tupesekret takistab H_2O_2 antimikroobset aktiivsust (O'Hanlon *et al.*, 2011). Kõrge H_2O_2 kontsentratsioon on tupe *Lactobacillus* liikidele palju toksilisem kui BV-ga seotud bakteritele ja töö autorid arvasid, et piimhappe tootmisel on tupemikrobiota kaitsmisel

suurem roll kui H₂O₂-l (O'Hanlon *et al.*, 2011). H₂O₂ tootmine on laktobatsillidel liigi- ja tüvespetsiifiline võime, põhilised produtseerijad on *L. crispatus* ja *L. jensenii*, mida seostatakse stabiilse ja terve tupemikrobiota säilimisega (Antonio *et al.*, 1999; Verstraelen *et al.*, 2009; Lapp *et al.*, 2012; 2013). Seda omadust on kasutatud kasulike ja mittekasulike *Lactobacillus* liikide eristamiseks (Antonio *et al.*, 1999) ning on arvatud, et H₂O₂ tootvad *Lactobacillus* liigid kaitsevad paremini BV vastu (Hawes *et al.*, 1996).

2.3.2. Tupe mikrobiota muutlikkus

Peremeesorganismile omane mikroobikooslus võib takistada potentsiaalsete patogeenide sissetungi ja koloniseerimist. Samas võivad erinevad endo- ja eksogeensed mõjurid (organismi kaasasündinud ja omandatud immuunsüsteem, seksuaalvahekord, menstruaaltsükli erinevad faasid, rasedus, kontraseptiivid, antibiootikumid ja muud ravimid, hügieen, pesemisvahendid) oluliselt mõjutada mikroobikoosluse stabiilsust (Priestley *et al.*, 1997; Schwebke *et al.*, 1999; Eschenbach *et al.*, 2000; 2001; Srinivasan *et al.*, 2010; Gajer *et al.*, 2012; Aagaard *et al.*, 2012; Jaspers *et al.*, 2012). Erineva bakterite koosseisuga mikroobikooslused on varieeruva vastupidavusega erinevate tegurite mõjule (Zhou *et al.*, 2007; 2010). Ökoloogiline teooria väidab, et mida ebastabiilsem on kooslus, seda suurem on tundlikkus sissetungivate organismide suhtes (Dunstan & Johnson, 2006).

Menstruaaltsükli jooksul muutub tupes hormoonide ja glükogeeni tase, menstruaalveri mõjutab pH-d ja on substraadiks paljudele mikroobidele. *G. vaginalis* ja *L. iners* arvukused on suurimad menstruatsiooni ajal, millele vastupidiselt on samaaegselt madalaima kontsentratsiooniga *L. jensenii* ja *L. crispatus* (Eschenbach *et al.*, 2000; Srinivasan *et al.*, 2010). Laktobatsillide hulga vähenemist või kadumist tupest on seostatud seksuaalvahekorra ja antibiootikumiraviga (Schwebke *et al.*, 1999; Lopes dos Santos Santiago *et al.*, 2012).

Hiljutine pikaajaline uuring käsitles 32 tervet naist, kellelt koguti 16 nädala jooksul kaks korda nädalas tupeproove (Gajer *et al.*, 2012). Proovid jagunesid vastavalt liigilisele koosseisule ja nende suhtelisele arvukusele viie erineva kooslusetüübi vahel ning samuti oli võimalik jälgida ka nende kooslusetüüpide muutumist ja vaheldumist. Neljas

kooslusetüübis domineerisid erinevad *Lactobacillus* liigid ja viiendas rühmas olid rangelt anaeroobsed bakterid (*Atopobium*, *Prevotella*, *Gardnerella*, *Mobiluncus* jt. liigid). Tulemused näitasid, et 35 % kooslusetüüpidest ei püsi kauem kui üks nädal, oluline negatiivne mõju mikroobikoosluse püsivusele oli seksuaalsel aktiivsusel. Gajer ja tema kaastöötajate (2012) poolt läbiviidud pikaajaline uuring näitas, et tupemikrobiota stabiilsus on seotud koosluses domineerivate piimhapet tootvate bakteritega. Kui domineerisid *L. crispatus* või *L. gasseri*, oli tupeproovide Nugent'i skoor madal ja toimus vähe kooslusetüüpide vaheldumisi ja muutumisi (põhiliselt menstruaaltsükliga seotud), mis viitas tervele tupekeskkonna seisundile. Kuigi mikroobikooslused on menstruatsiooni ajal ebastabiilsemad, ei tähenda see ilmingimata, et koosluse mitmekesisus suureneks (Gajer *et al.*, 2012). Mikrobiota koosseis ja selle seotus erinevate keskkonnateguritega näitab, et tupekeskkonnas on mikroobikooslus periooditi nii ülimalt stabiilne kui ka ekstreemselt varieeruv.

2.3.3. Mitmekesine anaeroobsete bakterite kooslus

20-30 % asümptomaatilistel tervetel naistel, lausa 40 % Hispaania ja mustadel naistel, moodustavad tupemikrobiota fakultatiivselt või rangelt anaeroobsed bakterid, mis on seotud kõrgema tupekeskkonna pH-ga (5.3-5.5) kui *Lactobacillus* domineerivates kooslustes. Sellises mikroobikoosluses leidub *Atopobium*, *Corynebacterium*, *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Prevotella*, *Gardnerella*, *Sneathia*, *Eggerthella*, *Mobiluncus*, *Finegoldia* ja teisi liike (Verhelst *et al.*, 2004; Hyman *et al.*, 2005; Forney *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2004, 2007, 2010; Ravel *et al.*, 2011; Gajer *et al.*, 2012; Drell *et al.*, 2013). Lisaks *Lactobacillus* liikidele teostavad piimhappekäärimist ka *Atopobium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Megasphaera* ja *Leptotrichia* liigid (Zhou *et al.*, 2004). Sõltumata konkreetsetest domineerivatest bakteriliikidest terve reproduktiivses eas naise tupes on kindel, et piimhappe tootmine on hädavajalik terve tupekeskkonna püsimiseks, kuna happeline pH takistab potentsiaalselt patogeensete mikroobide ülemäärast kasvu (Pavlova *et al.*, 2002; Ravel *et al.*, 2011). Pikaajalised uuringud on näidanud, et tupe mikrobiota allub tsüklistele muutustele ja menstruatsiooni ajal on mitte-laktobatsillide osakaal oluliselt suurenenud (Gajer *et al.*,

2012), seega on uuringute läbiviimisel oluline, et proovid oleksid võetud samas menstruaaltsükli faasis.

Nende bakteriliikide tuvastamisel tupest on ekslikult diagnoositud BV, kuna *Megasphaera* ja *Leptotrichia* liigid toodavad ebameeldiva lõhnaga metaboliite ja *Atopobium vaginae* 1 on väga varieeruv morfoloogia, mistõttu on teda Grami järgi värvimisel segamini aetud teiste patogeensete bakteritega (Verhelst *et al.*, 2004). Fethers jt (2012) läbiviidud uuringus selgus, et sugulises vahekorras mitteolnud tervete tütarlaste tupest praktiliselt ei leitud (ainult 2 % tuvastati) *Megasphaera* ja *Leptotrichia* liike, aga 71 % uuritavates proovides leidis *A. vaginae*.

Mitmekesine kooslus ei väljenda tervislikku seisundit, kuna igale inimesele on omased erinevad mikroorganismid, ja ainult pikaajaliste uuringutega, mis hõlmavad suuri valimeid, on võimalik tuvastada erinevaid mikroobikooslusi, mis on seotud tervise ja haigusega. Pigem on tegemist ökoloogilise tasakaalu häirega, mis võib teatud tingimustel tasakaalu tagasi minna. Ravel ja Gajer ning nende kaastöötajate poolt läbiviidud uuringutes selgus, et ühe inimese proovid võivad olla väga mitmekesise koosseisuga (Ravel *et al.*, 2011; Gajer *et al.*, 2012). Kuid siiski on sellised kooslused tupekeskkonna kaitsmisel palju kehvema võimekusega kui *Lactobacillus* domineerivad kooslused (Borovkova *et al.*, 2011).

2.3.4. Bakteriaalne vaginosis kui mikroökoloogilise tasakaalu häire

Bakteriaalne vaginosis (BV) on väga levinud tupekeskkonna häire reproduktiivses eas naistel, sellest hoolimata on diagnoosimine ja ravi ebaefektiivsed. Hoolimata pikaajalisest uurimisest ei ole suudetud ühte kindlat BV põhjustavat organismi kindlaks teha. Pigem on tegemist ökosüsteemi häirega, millega seoses muutub tupe mikroobikoosluse koosseis ja struktuur, piimhapet tootvate bakterite arvukus väheneb ja fakultatiivselt anaeroobsete ja rangelt anaeroobsete mikroobide (*Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Prevotella* spp., *Clostridium* spp., *Mobiluncus* spp., *Porphyromonas* spp., *Bacteroides* spp., *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma* spp. jt.) mitmekesisus ja arvukus suureneb (Hillier *et al.*, 1993; Verhelst *et al.*, 2004; Fredricks *et al.*, 2005; Spear *et al.*, 2008; Ling *et al.*, 2010; Hummelen *et al.*, 2010; Srinivasan *et al.*, 2012). Hiljutises töös, kus kasutati tervete ja BV-ga naiste tupemikrobiota

määramiseks pürosekveneerimist, näidati 47 bakteritaksoni seotust BV-ga (Srinivasan *et al.*, 2012). BV korral esinev mikrobiota sarnaneb asümptomaatiliste tervete naiste tupe kooslusetüübiga, kus on vähe *Lactobacillus* liike, aga palju erinevaid anaeroobseid mikroorganisme. Erinevus seisneb selles, et BV korral on anaeroobsete bakterite arvukus suurem. Samas varieeruvad bakteriliikide mitmekesisus ja suhteline arvukus tupes väga palju nii tervetel kui ka sümptomaatilise BV-ga naistel omavahel (Ferris *et al.*, 2004; Fredricks *et al.*, 2005).

G. vaginalis (algselt nimetatud *Haemophilus vaginalis*) kirjeldati esmakordselt 1953. aastal, seda bakterit on seostatud nii prostatiidi, emakaelapõletiku kui ka BV-ga (Leopold, 1953; Gardner & Dukes, 1955). Kuna *G. vaginalis* jaoks on üks olulisemaid kasvufaktoreid raud, siis suureneb bakteriliigi arvukus tupes menstruatsiooni ajal oluliselt, seda on näidatud kvantitatiivse PCR analüüsiga (Srinivasan *et al.*, 2010). *G. vaginalis* püsivust tupes on seostatud ka seksuaalse aktiivsuse ja partnerite arvuga (Fethers *et al.*, 2012).

A. vaginae identifitseeriti tupe bakterite uurimisel 1999. aastal (Rodriguez *et al.*, 1999), seda liiki leidub vähem terve naise tupemikrobiotas, aga sagedasti tuvastatakse teda BV korral (Ferris *et al.*, 2004; Verhelst *et al.*, 2004). *A. vaginae* on 16S rRNA analüüsil tuvastatud kuni 96 % BV-ga ja 12-19 % normaalse terve tupemikrobiotaga naistel, mistõttu peetakse seda bakterit BV tuvastamisel kõige spetsiifilisemaks (Verhelst *et al.*, 2004; Fredricks *et al.*, 2005; Bradshaw *et al.*, 2006a). Enamasti on tupest samaaegselt tuvastatud ka *G. vaginalis*, mida esineb 99 % BV-ga naistel ja 60 % tervetel naistel. Koos esinevad *A. vaginae* ja *G. vaginalis* 78-96 % BV-ga ja 5-10 % tervetel naistel (Bradshaw *et al.*, 2006a).

Prevotella spp. on olulised mikrobiota liigid, mida esineb palju nii terve kui ka BV diagnoosiga naiste tupes (Hillier *et al.*, 1993; Oakley *et al.*, 2008; Spear *et al.*, 2008; Zozaya-Hinchliffe *et al.*, 2010). Nad omavad positiivset mõju *G. vaginalis* ja *Peptostreptococcus anaerobius* kasvule, kuna toodavad nende jaoks olulisi toitaineid (ammoniaak, aminohapped) (Pybus & Onderdonk, 1997, 1998).

Molekulaarsete meetoditega on identifitseeritud seltsi *Clostridiales* kuuluvad potentsiaalsed BV seotud bakterid 1, 2 ja 3 (BVAB1, BVAB2, BVAB3), mida ei ole võimalik traditsiooniliste kasvatuspõhiste meetoditega tuvastada (Fredricks *et al.*, 2005). *Clostridiales* seltsi kuuluvad bakterid toodavad glükoosi, teiste süsivesinike ja

aminohapete metabolismi käigus halvalõhnalisi ühendeid (orgaanilised happed, amiinid, tiolid) (Madigan *et al.*, 1997), mis on ka üks BV diagnoosimise kriteeriume Amsel'i meetodi järgi (Amsel *et al.*, 1983). Tamrakar ja tema kaastöötajate (2007) uurimusest selgus, et BVAB2 on seotud Nugent'i skooriga. Kui seda bakterit on proovis palju, siis on Nugent'i skoor kõrge ja esineb BV. Ei ole teada, kas BVAB on patogeendid, mis põhjustavad BV, või oportunistlikud mikroorganismid, mis kasutavad oma arvukuse suurendamiseks ära ajutiselt kõrgema pH-ga keskkonda.

BV on seotud suguhaiguste vastuvõtlikkuse (Martin *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 2000; Cherpes *et al.*, 2003; Wiesenfeld *et al.*, 2003; Yoshimura *et al.*, 2009), väikevaagnapõletiku (Ness *et al.*, 2005), endometriidi (Haggerty *et al.*, 2004), viljatuse, rasedusaegsete komplikatsioonide, enneaegse sünnituse ja madala sünnikaaluga laste sündimise riskiga (Hillier *et al.*, 1995; Hay, 1994, 2004). BV tekkimist mõjutavad paljud tegurid sealhulgas menstruatsioon, uus seksuaalpartner, tupe pesemine, suitsetamine, kondoomita vahekord (Hay *et al.*, 1997; Schwebke *et al.*, 1999; Hellberg *et al.*, 2000; Beigi *et al.*, 2005; Hutchinson *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2007; Brotman *et al.*, 2008). Neid riskifaktoreid ei pea ilmtingimata olema, diagnoosi on pandud ka noortele suguelu mitte elavatele neidudele (Yen *et al.*, 2003). Kuna arst võtab sümptomaatilise BV naistelt diagnoosimiseks ühe proovi, ei ole võimalik BV tekkepõhjuseid kindlaks teha, kui puuduvad sellele eelnevalt võetud terve tupe proovid ja käitumuslikud andmed. On leitud seos BV ja rassi vahel, mustadel naistel on seos suurem kui valgetel (Allsworth & Peipert, 2007), Srinivasan ja tema kaastöötajate (2012) töös selgus, et 28 BV-ga seotud bakterirühma (seal hulgas *Leptotrichia amnionii*, *Atopobium vaginae* ja BVAB1) olid seotud rassiga, olles enam levinud mustadel naistel.

2.3.4.1. Bakteriaalne biofilm bakteriaalse vaginooosi korral

Bakterite ulatusliku kasvuga seoses moodustub tupe limaskestale tihe biofilm, millel on primaarne roll BV välja kujunemisel (Swidsinki *et al.*, 2005). Tupeepiteelile tihedalt kinnitunud biofilm koosneb fibrillaarsest polüsahharidiide võrgustikust ja selle sisse pakitud bakterirakkudest (Scott *et al.*, 1989), eriti püsivama biofilmi moodustavad *G. vaginalis* ja *A. vaginae* koos (Fredricks *et al.*, 2005; Swidsinki *et al.*, 2005, 2008). Biofilmi koostise ja struktuuri uurimisel selgus, et *G. vaginalis* moodustab 60-95 %

biofilmi massist, *A. vaginae* 1-40 % ning *Lactobacillus* liigid 5 % (Swidsinski *et al.*, 2005). Biofilmiga seotult kasvab bakterite arvukus (kuni 10^{11} bakterit/ml) rohkem kui tupesekreedis olles, kuna nii on bakterid peremehe immuunsüsteemi ja antimikroobsete ühendite eest paremini kaitstud (Hay, 2000; Swidsinski *et al.*, 2008). Seetõttu ei ole ravi tihti tõhus ja BV võib korduma hakata (Hay, 2000). Uuringud on näidanud, et tihe biofilm katab vähemalt pool kogu tupeepiteeli pinnast 90% BV patsientidest ja 10% tervetel naistel (Swidsinski *et al.*, 2005; Costerton *et al.*, 2003).

2.3.4.2. Bakteriaalse vaginooosi diagnoosimine

BV diagnoositakse enamasti kliiniliste sümptomite põhjal Amsel'i kriteeriumite järgi (Amsel *et al.*, 1983). Amsel'i kriteeriumid on hallikas-valge homogeenne voolus, tupeeritise pH >4.5, tupeeritisele 10 % KOH lisamisel tekib kalalõhn (viitab amiinide tootmisele), äigepreparaadis on mikroskoobi all näha *Clue*-rakud (Amsel *et al.*, 1983). Uuemad uuringud on näidanud, et kõigi nelja Amsel'i kriteeriumiga on positiivselt seotud ainult *Eggerthella* spp. ja *Leptotrichia amnionii*, kolme kriteeriumiga on seotud *G. vaginalis* ja *A. vaginae* (Srinivasan *et al.*, 2012).

Teine lihtne ja odav diagnoosimeetod on Nugent'i skoori ja võtmerakkude määramine Grami järgi värvitud preparaadi alusel (Nugent *et al.*, 1991). Nugent'i skoor määratakse tupeeritises leiduvate bakterite morfootüüpide skooride summa (0-10) järgi. Kui Nugent'i skoor on 7-10, esineb preparaadis vähe *Lactobacillus* morfootüüpe, aga palju *G. vaginalis* ja *Mobiluncus* spp. morfootüüpe. Sel juhul on tegemist BV-ga. Skoor 4-6 on vahepealne ja skoor 0-3 on terve tupe mikrobiota korral. Viimasel juhul esineb palju *Lactobacillus* rakke (Nugent *et al.*, 1991). Nugenti skooriga ei ole võimalik määrata mitmeid BV korral esinevaid baktereid, näiteks *Mycoplasma* spp., kellel puudub rakukest, ja *A. vaginae*, kellel on varieeruv morfoloogia ja võib seetõttu identifitseerimata jääda (Verhelst *et al.*, 2004; Ferris *et al.*, 2004b). Ka Nugent'i skoori järgi määratud vahepeelses tupemikrobiotas esineb suuri sarnasusi BV mikrobiotaga, 70-92 % proovidest esineb *G. vaginalis*, 78-84 % *A. vaginae* ja 57-75 % mõlemad koos (Bradshaw *et al.*, 2006a; Menard *et al.*, 2008).

Täiendavalt on võimalik hinnata tupevooluse äigepreparaadis leiduvaid *Lactobacillus* morfootüüpe (Donders *et al.*, 2000a) (<http://euro.perearstikeskus.ee/gyn/37.pdf>).

Tupevooluse äigepreparaadis hinnatakse erinevate bakterite olemasolu ja määratakse proovi *Lactobacillus* (LAC) klass. LAC klass I vastab normaalsele mikroobikooslusele, kus on palju *Lactobacillus* rakke ja vähe kerakujulisi baktereid. LAC klass II (vahepealne kooslus) vastab mitmekesisele kooslusele, kus esineb ka suures hulgas *Lactobacillus*'d. LAC klass III (BV) mikroobikooslus on mitmekesine ja seal ei esine *Lactobacillus* rakke (Donders *et al.*, 2000a). Mikroskoopilist meetodit kasutatakse kiire, lihtsa ja kasuliku vastuse pärast (Yoshimura *et al.*, 2011).

Eelnevalt nimetatud meetodid on BV diagnoosimisel kiired ja odavad, kuid nende tundlikkus võrreldes molekulaarse meetodiga nagu kvantitatiivne PCR on veidi madalamad. Cartwright ja tema kaastöötajad (2012) näitasid, et qPCR kolme markerorganismi kombinatsiooniga (*A. vaginae*, BVAB2, *Megasphaera* tüüp 1) on >90 % tundlikkuse ja spetsiifilisusega BV diagnoosimiseks. Shipitsyna töörühm (2013) leidis, BV prognoosimisel on parima tundlikkuse ja spetsiifilisusega *Megasphaera* tüüp 1, *Eggerthella* ja BVAB2 kombinatsioon.

2.4. Meeste genitaaltrakti mikrobiota

Mikroorganisme leidub mehe alumistes suguteedes (kusitis), tervetel meestel on tuvastatud *Lactobacillus* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Corynebacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Prevotella* spp., *Atopobium* sp., *Megasphaera* spp., *Mobiluncus* spp. (Bowie *et al.*, 1977; Willen *et al.*, 1996; Montagnini Spaine *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2010). Genitaaltrakti *Mycoplasma* spp. ja *Ureaplasma* spp. on leitud ainult seksuaalselt aktiivsetel meestel (Chambers *et al.*, 1987; Takahashi *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2012). Meeste kusiti ja uriini mikrobiomid on pürosekveneerimise tulemuste järgi üsna identsed (Dong *et al.*, 2011).

Rohkem uuringuid on tehtud eesnäärme-spetsiifiliste proovidega (eesnäärme sekreet, massaažijärgne uriin, sperma) selleks, et selgitada laialt levinud, kuid seni lõpuni mittemõistetud prostatiidi ehk eesnäärme põletiku olemust ja erinevate mikroorganismide seotust sellega. Hinnanguliselt 50% meestest põevad oma elu jooksul eesnäärmepõletikku (Naber & Weidner, 2000). Genitaaltrakti põletikule viitab leukotsütoospermia (leukotsüütide esinemine spermas), eesnäärme põletiku

diagnoosimise piiriks on Maailma Tervishoiu Organisatsioon (WHO 1999) määranud 1×10^6 rakku/ml. Leukotsüüdid tekitavad reaktiivseid hapniku ühendeid, mis kahjustavad spermide metabolismi, liikuvust ja pärilikkusainet ning mõjuvad negatiivselt mehe viljakusele (Sharma *et al.*, 2001; Erenpreiss *et al.*, 2006).

Prostatiidi korral tehakse sageli vaid aeroobseid külve ning seepärast ei ole kliiniline pilt korrelatsioonis mikrobioloogilise leiuga. Eestis läbiviidud uuringu järgi oli peamine erinevus põletikulise prostatiidiga patsientide ja tervete meeste spermas olevate mikroorganismide vahel kvantitatiivne, nimelt oli haigusseisundiga meeste spermas bakterite kontsentratsioon suurem (keskmiselt 10^5 CFU/ml) ja erinevaid liike rohkem (keskmiselt 5) kui tervetel meestel (10^3 CFU/ml ja 3 liiki). Prostatiidi korral esinesid polümükrööbsed rohkelt anaeroobe sisaldavad kooslused, mis viitavad genitaaltrakti mikrobiota ebasoodsatele muutustele (Kermes *et al.*, 2003; Punab *et al.*, 2003; Korrovits *et al.*, 2006). Prostatiidiga patsientide spermast on oluliselt sagedamini leitud mükoplasmasid kui tervetel meestel, *U. parvum* ja *M. genitalium* esinesid ainult prostatiidi korral (Türk *et al.*, 2010). Venemaal teostatud uuringu käigus isoleeriti prostatiidiga ja tervete meeste spermast *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Micrococcus* spp., *Streptococcus* spp., ainult prostatiidiga meeste proovidest isoleeriti *S. epidermidis*, *C. equi*, *C. seminale*, *Enterococcus faecalis* ja *Escherichia coli* (Ivanov *et al.*, 2009). *C. seminale* on tuvastatud nii tervete kui ka prostatiidihaigete Eesti meeste spermast (Türk *et al.*, 2007).

Sperma koosneb spermatoosoididest ja seemnepõiekestest, eesnäärme ja bulbouretaalnäärmete sekreetidest, mis kõik on normaalselt steriilsed (Fowler, 1981). Ureetrast pärit mikroorganisme (*Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.) on võimalik isoleerida enamikest spermaproovidest, kuigi paljudel meestel üldse puuduvad suguteede bakteriaalsele infektsioonile viitavad sümptomid (Magnanelli *et al.*, 1990; Bukharin *et al.*, 2000). Samas pärineb sperma ülemistest suguteedest ning peegeldab sealseid põletikke, seetõttu on sperma mikrobioloogilisi uuringuid läbiviidud leidmaks seoseid genitaaltrakti mikrobiota ja viljatuse vahel. Viljatute meeste sperma polümükrööbsed kooslused on varieeruvamad ja suurema bakterite kontsentratsiooniga võrreldes viljakate meestega. Leitud on arvukalt mikroobe, sh suguhaiguste tekitajaid, aga ka *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Anaerococcus* spp., *Fingoldia magna*, *Pseudomonas putida*, *Ureaplasma* spp.,

Mycoplasma spp. ja teisi baktereid (Rehewy *et al.*, 1979; Kiessling *et al.*, 2008; Gdoura *et al.*, 2008).

Antud töös hinnati viljatute paaride meespartnerite sperma mikrobiootat leukotsütoospermia esinemise ja mitteesinemise korral esmakordselt kvantitatiivse PCR-ga, et selgitada, kas erinevus spermas leiduvate *Lactobacillus* ja *Ureaplasma* liikide ning üldise bakterikoosluse vahel on kvantitatiivne. Mikroobikooslusi iseloomustati täiendavalt bakteriaalse 16S rRNA mass-sekveneerimisega.

2.5. Mükoplasmad nais- ja meessuguteede mikrobiotas

Mükoplasmad on pleomorfsed rakuseinata väikse genoomiga (0.58-1.21 Mb) parasitise eluviisiga bakterid. Elutegevuseks vajavad nad kolesterooli, mida nad saavad epiteelirakkudest. Genitaaltrakti mükoplasmad hõlmavad *Ureaplasma* ja *Mycoplasma* liike, kes on võimelised ülekanduma partnerite vahel sugulisel teel, emalt lapsele sünnitusel või siirdatud nakatunud kudede kaudu. Inimesega seotud 16 mükoplasma liigist 6 elavad põhiliselt urogenitaaltraktis (Taylor-Robinson, 2007).

Mycoplasma liigid, genitaaltraktis põhiliselt *M. genitalium* ja *M. hominis*, on naistel seotud koorionamnioniidi, enneaegse sünnituse, vaagna- ja emakakaelapõletikuga ning meestel mittegonokokilise uretriidiga (Maeda *et al.*, 2001, Usui *et al.*, 2002; Manhart *et al.*, 2003; Haggerty & Taylor, 2011). Kuna *M. genitalium* on emakakaelapõletikku põhjustav mikroorganism, siis on alust arvata, et ta põhjustab ka ülemiste suguteede infektsioone, iga seitsmenda patsiendi proovidest on määratud *M. genitalium* (Simms *et al.*, 2003; Haggerty *et al.*, 2006).

Ureaplasma perekonnas on ainult kaks liiki, *U. urealyticum* (serovarid 2, 4, 5, 7-13) ja urogenitaaltraktis sagedasem *U. parvum* (serovarid 1, 3, 6, 14) ning neile on omane urea hüdrolüüsimine energia saamise eesmärgil (Kong *et al.*, 1999). *Ureaplasma* spp. on seostatud naise viljatuse ja rasedusaegsete komplikatsioonidega (Berg *et al.*, 1999; Yoon *et al.*, 2003; Kataoka *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2009). Spermast tuvastatud *U. urealyticum* on seostatud vähenenud seemnerakkude liikuvuse ja kontsentratsiooniga (Upadhyaya *et al.*, 1984; De Jong *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2006).

Seletamatu viljatusega naistelt (38 %) isoleeriti genitaaltraktist erinevaid mükoplasmasid (32 % *U. urealyticum*, 6 % *M. hominis*), võrreldes 12 % viljakate

naistega (Gupta *et al.*, 2009). See näitas, et *U. urealyticum* on seotud seletamatu viljatusega. Eesti viljatute paaride uuringus osalenud 59 % naiste tupemikrobiotas leidis *U. parvum*, eraldi vaadates 80 % prostatiidiga meeste naistel ja 50 % tervete meeste naistel, kuid võrdluseks puudusid viljakate paaride proovid (Borovkova *et al.*, 2011). Viljatute meeste spermast on leitud kõiki põhilisi genitaaltrakti koloniseerivaid mükoplasmasid (*M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum*, *U. parvum*) (Kjaergaard *et al.*, 1997; Knox *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006; Gdoura *et al.*, 2007; 2008).

Tervete rasedate jaapanlannade tupeproovides leidis ühte mükoplasma liiki 64 % ja *U. parvum* määrati lausa 51 % proovides (Kataoka *et al.*, 2006). 64 tervelt (Nugent'i skoor 0-3) rasedalt Mehhiko naiselt võetud tupeproovidest tuvastati 16S rRNA geeni järgi seitseteist erinevat mikroorganismi, kes on seotud häiritud tupekeskkonna ja bakteriaalse vaginosisiga ning 22 % proovides leidis *U. urealyticum* (Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2011). Mükoplasmade isoleerimine viljakatelt naistelt viitab sellele, et nad on genitaaltrakti kkommensaalid ja teatud tingimustel (alatoitumine, nõrgenenud immuunsüsteem, endokrinoloogilised muutused) võivad nad pääseda ülemistesse suguteedesse ja põhjustada probleeme viljastumise ja raseduse püsimisega.

Kuna mükoplasmasid on palju leitud ka tervetel inimestel, siis on võimalik, et nad muutuvad kliiniliselt oluliseks, kui nende hulk ülemäära suureks kasvab või esineb liigisisene tüvede erinevus ja probleemid tekivad patogeensema tüvega nakatumisel. Seda esimest võimalust on püütud käesolevas töös kontrollida.

2.6. Seksuaalvahekorra mõju tupe mikrobiotale

Tupe limaskest koos kolonisatsiooniresistentsuse eest vastutava tupe mikrobiotaga pakub kaitset sissetungivate mikroobide eest ja osaleb immuunsüsteemi töös. Samal ajal on tupemikrobiota avatud ökosüsteem, mida võib oluliselt mõjutada seksuaalvahekord. Mehe sperma sisaldab meessuguhormoone, põletikumarkereid ja mikroorganisme. Seksuaalvahekord ja kokkupuude spermaga muudavad tupekeskkonna aluseliseks ning võivad oluliselt mõjutada mikrobiotat ning põhjustada BV, urogenitaaltrakti infektsioone ja viljatust (Schwebke *et al.*, 1999; Beigi *et al.*, 2005; Cherpes *et al.*, 2008). Hiljutine uuring näitas, et monogaamsed seksuaalpartnerid jagavad samu BV seotud *Gardnerella vaginalis* tüvesid (Eren *et al.*, 2011). Suguelu mitteelavate tütarlaste tupe

leidub väga vähe või üldsegi mitte *Sneathia*, BVAB, *Leptotrichia*, *Megasphaera* liike, kuid sagedased seksuaalvahekorrad on seotud suurenenud *Sneathia*, *Leptotrichia*, *G. vaginalis* ja BVAB3 hulgaga tupes (Fethers *et al.*, 2012). Samas ei ole mitmetes uuringutes tõestatud seksuaalvahekorra ja BV vahelist seost (Morison *et al.* 2005). Praeguste teadmiste alusel peetakse BV-d mitte seksuaalselt ülekantavaks, vaid seksuaalselt soodustatud haiguseks (*sexually enhanced disease*). Selle teooria kohaselt toimub kondoomita vahekorra järel tupekeskkonna alkaliniseerumine, mis soodustab mitte-laktobatsillaarse mikrobioota kasvu. Samuti soodustab vahekord lahklihal olevate (sh rektaalsete) bakterite mehhaanilist sisseviimist tuppe (Verstraelen *et al.*, 2010).

Eschenbach'i ja tema kaastöötajate (2001) uuringust selgub, et kondoomi mittekasutanud naiste tupes suurenes *Escherichia coli* arvukus vahekorrajärgselt tunduvalt rohkem, kui kaitsevahendit kasutanud naistel. Kummaski grupis ei mõjutanud seksuaalvahekord tupe *Lactobacillus* liikide hulka ning keskkonna pH-d. Jaspers jt (2012) täheldasid pärast seksuaalvahekorda võetud tupeproovides vähenenud *L. crispatus* hulka ja suurenenud *L. iners* ja *L. gasseri* hulka.

Kuigi mehe genitaaltrakti mikrobioota otseselt mõjutab naise oma, on paaride genitaaltrakti bakterikoosluste kohta seni läbiviidud ainult üksikuid uuringuid. Wittmer jt (2004) töös kasvatati mikroobe emakakaelast, tupest ja spermast võetud proovidest enne *in vitro* viljastamise läbiviimist. Emakakaelast võetud proovide bakterid olid seotud vähenenud implantatsiooni määraga, tupe ja sperma mikroorganismid olid seotud kliiniliste raseduste hulga vähenemise ja suurenenud spontaansete nurisünnituste arvuga. Kjaergaard jt (1997) töö tulemus näitas, et mehe genitaaltrakti mikrobioota on seotud enneaegse membraanide rebenemise riskiga nende rasedatel naistel.

Prostatiidi korral on mehe genitaaltrakti mikroobikooslused häiritud ja tõenäoliselt mõjutab see naise tupemikrobiootat. Vastavalt Borovkova jt (2011) andmetele suurenes 35 % naistel vahekorrajärgselt Nugent'i skoor, mis oli seotud muutustega mikrobioota koosseisus, eriti avaldusid need muutused prostatiidiga meeste partnerite tupe mikroobikoosluses. Vähem toimus kõikumisi madalama Nugent'i skooriga naistel, kellel oli *Lactobacillus* domineeriv mikrobioota (Borovkova *et al.*, 2011). Sama trendi kinnitas hilisem mass-sekveneerimine (Mändar 2012; 2013). Käesolevas töös täiendati eelnevalt kirjeldatud varasemate tööde tulemusi nende samade viljatute paaride ja veel lisaks kogutud proovidele tehtud kvantitatiivse PCR-i analüüsi ja mass-

sekvenerimisega, et selgitada, kuidas mehe genitaaltrakti mikroorganismid ja seksuaalvahekord mõjutavad mikroorganismide hulka naispartneri tupes. Seni ei ole läbi viidud uuringut, kus naiste enne ja pärast vahekorda võetud tupeproovid oleksid kogutud samas ajavahemikus, samas menstruaaltsükli faasis ja seksuaalvahekorra mõju mikrobiota liikidele hinnatakse kvantitatiivselt.

2.7. Suguteede mikroobide seos viljatuse ja teiste reproduktiivfunktsiooni häiretega

Naisepoolne viljatus on sageli seotud sugulisel teel levivate haigustega – nende tekitajad (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*) võivad mõnedel naistel astsendeeruda alumistest naissuguteedest ülemistesse, mille tagajärjeks võib olla väikevaagnapõletiku (*Pelvic Inflammatory Disease*, PID) teke ning sellega seotud munajuhade põletik võib põhjustada munajuhade sulgust (Pellati *et al.*, 2008). Viljatusega on seostatud ka bakteriaalset vaginooosi, mille puhul emakakaela sekreedist leitakse kõrgeenenud proinflammatoorsete tsütokiinide väärtusi, mis võivad häirida viljastumist. BV esinemine suurendab ka seksuaalsel teel levivate haiguste vastuvõtlikkust, mis omakorda soodustab PID teket (Weissenbacher *et al.*, 2010; Brotman, 2011).

Mehepoolset viljatust on samuti seostatud ülelnimetatud sugulisel teel levivate haigustega, mis võivad põhjustada suguteede sulgust ning mõjutada sperma kvaliteeti (Pellati *et al.*, 2008). Mehepoolse viljatuse üheks võimalikuks põhjuseks peetakse ka prostatiiti, mis võib samuti põhjustada sugutrakti obstruktsiooni ning häirida spermatogeneesi ning spermide funktsioneerimist läbi mitmete mehhanismide (Moretti *et al.*, 2009; Weidner *et al.*, 2008).

Samuti on viljatuse puhul leitud ureaplastide sagedasemat esinemist suguteedes, nende võimalikku rolli viljatuses on täpsemalt käsitletud peatükis 2.5.

Genitaaltrakti infektsioonid ja BV on oluliselt seotud ka enneaegse sünnituse ja nurisünnituse esinemise riskiga (Kurki *et al.*, 1992; Hay *et al.*, 1994; Donders *et al.*, 2000c; Svare *et al.*, 2006; Leitch & Kiss, 2006). Enneaegse sünnitusega seoses on platsentast isoleeritud *U. urealyticum* (47 %) ja *G. vaginalis* (26 %) (Hay *et al.*, 1994). Nende mikroorganismide kõrge kontsentratsioon on seotud leukotsüütide hulga

vähenevad, suurenenud endotoksiinide ja proteaasi ensüümide tasemega, mis stimuleerivad proinflammatoorsete tsütokiinide tootmist, selle tagajärjel võib tekkida platsenta põletik, koorionimembraani nõrgenemine ja isegi loote surm (Gibbs, 1993; Howe *et al.*, 1999; Romero *et al.*, 2005).

Llahf-Camp ja tema kaastöötajad (1996) näitasid, et sagedase BV esinemistõenäosus on suurem nendel naistel, kellel on olnud vähemalt üks hiline nurisünnitus (21 %), kui nendel, kellel on korduvalt olnud varajasi raseduse katkemisi (8 %), sarnase tulemuseni on jõudnud ka teised töörühmad (Ralph *et al.*, 1999; Oakeshott *et al.*, 2002). Donders jt (2000c) töös diagnoositi 48 % varase spontaanse abordiga naistel BV, 24 % isoleeriti *G. vaginalis*, 24 % *U. urealyticum*, 19 % *M. hominis*. Eelnevad rasedusekatkemised ja nimetatud bakteriliikide esinemine tupes on seotud ka järgnevate nurisünnitustega, BV esinemine enne 14 rasedusnädalat võib prognoosida varajase spontaanse aborti toimumist 36 % naistel ning BV puudumine normaalset sünnitust 93 % naistel (Donders *et al.*, 2000c).

3. EESMÄRGID

Käesoleva uurimistöö eesmärgiks oli selgitada suguteede mikrobioota koostist paari viljatuse korral, pöörates erilist tähelepanu ureaplasmadele. Selleks püstitati järgmised uurimisülesanded:

- kirjeldada viljatute paaride genitaaltrakti mikroobikooslusi;
- hinnata muutusi naise tupe mikrobiootas pärast seksuaalvahekorda ja nende seost meespartneri prostatiidiga;
- hinnata soo, suguteede põletike ja vahekorra seost ureaplasmade esinemise ja hulgaga suguteedes.

4. MATERJAL JA METOODIKA

4.1. Uuritavad paarid

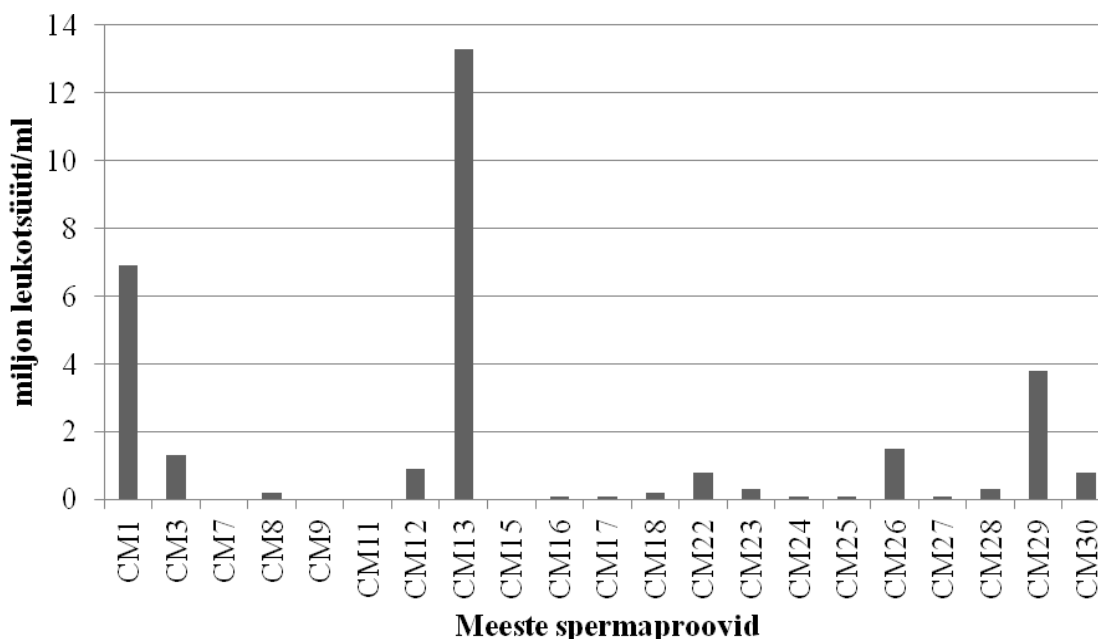
Uurimisrühmas oli 21 paari, kes käisid Tartu Ülikooli Kliinikumi Androloogiakeskuse arsti vastuvõtul seoses paari viljatusega. Esimesel visiidil teostati meestele sperma tavaanalüüsid. Sperma viljakuse parameetrid (sperma maht, spermatooside kontsentratsioon, üldhulk ja liikuvus) määrati vastavalt WHO juhendile (WHO 1999). Sperma põletikureaktsiooni hinnati tsütoloogilise analüüsiga (Bryan-Leishmani meetodil värvitud preparaate mikroskopeerimisel), leukotsüütide hulk arvutati 1 ml sperma kohta. Prostatiiidi diagnoosimisel kasutati kroonilise prostatiiidi sümptomindeksit (*NIH-CPSI*) ja Giesseni Ülikoolis välja töötatud prostatiiidiküsimustikku (vt LISA 1 ja 2). Nende analüüside alusel selgus mehe sobivus uuringusse ning mõlema partneri nõusolekul toimus paari nõustamine proovide võtmiseks.

Meespartnerite uuringusse kaasamise kriteeriumiteks olid kaebus paari viljatusele ja vanus 20-45 aastat. Inklusioonikriteeriumiks oli prostatiiidiga patsientidele tugev leukotsütospermia ehk $>1 \times 10^6$ leukotsüüti/ml. Inklusioonikriteeriumid kontrollgrupi meestele olid prostatiiidi sümptomite mitte esinemine ja $<1 \times 10^6$ leukotsüüti/ml spermaproovis. Meespartnerite väljaarvamiskriteeriumid määrati vastavalt NIH Kroonilise Prostatiiidi Töögrupi (1995) soovitudele: antibiootikumravi viimase kolme kuu jooksul, muude ravimite tarvitamine pidevalt viimase kahe nädala jooksul, uretriidi tunnused/kaebused, urogenitaaltrakti kasvaja, aktiivne kuseteede kivitõbi, perirektaalne põletik, soolepõletik, vaagnapiirkonna kiiritus ja kemoteraapia anamneesis, põiesisene kemoteraapia anamneesis, ureetra struktuur, põiepiirkonna neuroloogiline haigus, prostataoperatsioon viimase kolme kuu jooksul, samuti muud kroonilised haigused ja võistlussport.

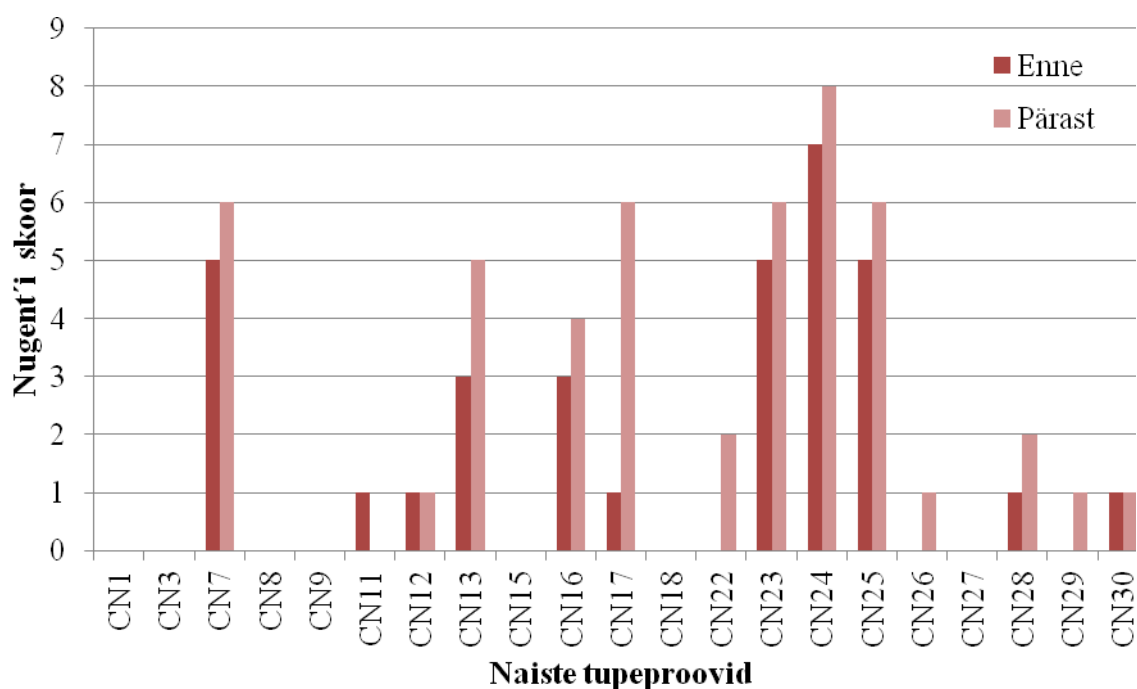
Naispartnerite uuringusse kaasamise kriteeriumiks oli partnersuhte kestvus rohkem kui 12 kuud ainult uuringugruppi kuuluva mehega. Naispartnerite väljaarvamiskriteeriumiteks olid antibiootikumravi viimase kolme kuu jooksul, muude ravimite tarvitamine pidevalt viimase kahe nädala jooksul, kroonilised haigused, võistlussport, hormoonsüsteemi muutev ravi (näiteks endometrioosi ravi).

4.2. Uuritav materjal

Meeste spermaproov (tähistatud CM) koguti naispartneri menstruatsiooni ajal. 16 mehel ei tuvastatud eesnäärme põletikku, 5 mehe proovis (proovi numbrid 1, 3, 13, 26, 29) oli $>1 \times 10^6$ leukotsüüti/ml ja esines prostatiit (Joonis 1). Naiste kaks tupeproovi võeti steriilse vatitampooniga 3-5 päeva pärast menstruatsiooni (tsükli 6.-8. päeval) vahetult enne seksuaalvahekorda (tähistatud CN A) ja 8-12 tundi pärast vahekorda (tähistatud CN B). Proove hoiti enne külmutamist maksimaalselt 12 tundi 4°C juures. Tupeproovide algmaterjali äigepreparaadi abil määrati mikroorganismide morfoloogiliste suhte alusel Nugent'i skoor, normaalse terve mikroobikoosluse skoor on 0-3, vahepealne skoor 4-6, bakteriaalse vaginosisi skoor 7-10 (Nugent *et al.*, 1991). Neljateistkümmel naisel olid enne ja pärast seksuaalvahekorda võetud tupeproovide Nugent'i skoor 0-3 (terve mikrobioota), kolmel naisel 4-6 (vahepealne kooslus) ja ühel naisel 7-10 (bakteriaalse vaginosisi mikrobioota) (Joonis 2). Kolmel naisel oli enne vahekorda võetud proovi skoor 0-3 ja pärast vahekorda võetud proovil 4-6. Kõikide proovide Nugent skoori keskmine oli enne 1,57 ja pärast vahekorda võetud proovides 2,33.



Joonis 1. Leukotsütospermia esinemine uuritavate meeste spermaproovides.



Joonis 2. Naiste tupemikrobiota Nugent'i skoor enne ja pärast seksuaalvahekorda võetud proovides.

Uuringu läbiviimiseks saadi luba Tartu Ülikooli Inimuringute eetika komiteelt. Osalejate isikuandmed kodeeriti ega kuulu avalikustamisele, isikuandmed ja mõõtmistulemused hoitakse eraldi. Uuringus osalemine oli vabatahtlik, kõikidelt osalejatelt saadi informeeritud nõusolek. Kontrollrühmana ei ole kasutatud viljakaid paare, kuna uurimistöö läbiviimine on keeruline ja nõuded on ranged ning terved paarid ei ole piisavalt motiveeritud osalema. Eespool kirjeldatud proovide ja andmete kogumises antud töö autor ei osalenud.

4.3. DNA eraldamine

Tupeproovide vatitampoone suspendeeriti 1 ml 1x PBS-s ja tseentrifuugiti 16 060 g juures 20 min. Supernatant eemaldati, sadet suspendeeriti 200 µl 1x PBS-s. Spermaproovide kogus viidi 200 µl-ni lisades proovile vajalik hulk 1x PBS-i. DNA eraldati tootjapoolse juhendi järgi *QIAamp® DNA Blood Mini Kit*'ga vastavalt tootjapoolsele protokollile (QIAGEN Hamburg GmbH, Saksamaa) ning elueeriti lõppmahus 100 µl (tupeproovid) ja 50 µl (spermaproovid). Kõikide proovide DNA

konsentratsiooni ja kvaliteeti kontrolliti NanoDrop™ 2000 spektrofotomeetriga (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA).

4.4. Kvantitatiivne PCR (qPCR)

4.4.1. qPCR standardite valmistamine

Kogu mikroobikoosluse 16S rRNA geeni arvukuse määramiseks proovides kasutati Tartu Ülikoolis teadur Hiie Nõlvaku poolt valmistatud standardit (10^9 geenikoopiat/ μ l), millest tehti standardkõvera jaoks vajalik lahjendusterida: 10^8 - 10^2 (kümnekordsed lahjendused), 50 ja 25 geenikoopiat/ μ l. Erinevate bakteriliikide (*Lactobacillus iners*, *L. crispatus*, *Ureaplasma urealyticum*, *U. parvum*) kvantifitseerimiseks telliti vastavat *de novo* sünteesitud DNA järjestust (Tabel 2) sisaldavad plasmiidid (Eurofins MWG Operon, Saksamaa). Lühidalt, sünteesiti erinevad geenijärjestused *de novo*, mis kloneeriti vektorisse pEX-A (2450 bp), inserdi õigsust kontrolliti kaksikahelalise DNA järjestuste sekveneerimisega ja määrati plasmiidse DNA kontsentratsioon (Eurofins MWG Operon, Saksamaa).

Lüofiliseeritud plasmiidne DNA lahustati 500 μ l 10 mM Tris puhvris ja arvutati DNA kontsentratsioon lahuses. Leiti geenikoopiate arv plasmiidse DNA lahuses (Valem 1), kasutades plasmidi (2450 bp) ja sinna kloneeritud geenifragmendi pikkuse (Tabel 2) summat. Valmistati *L. iners*, *L. crispatus*, *U. urealyticum* ja *U. parvum* standardid ($3,5 \times 10^9$ geenikoopiat/ μ l), millest tehti steriilset destilleeritud vett kasutades standardkõvera jaoks vajalik kümnekordsete lahjenduste rida $3,5 \times 10^8$ -35 geenikoopiat/ μ l.

$$N = \frac{c}{m} Na \quad (\text{Valem 1})$$

kus:

N – geenikoopiate arv (geenikoopiat/l)

c – plasmiidse DNA kontsentratsioon (g/l)

m – plasmidi + geenifragmendi mass Daltonites (Da), (1 bp = 660 Da)

Na – Avogadro arv ($Na = 6,022 \times 10^{23}$)

Standardkõverate ulatused jäid 16S rRNA puhul vahemikku 10^3 - 10^8 ja liigispetsiifilistel standarditel $3,5 \times 10^3$ - $3,5 \times 10^8$ geenikoopiat/ μ l (Tabel 1). Standardite reaktsiooniefektiivsused ($E_{tõus}$) jäid 1,8-2,1 vahele, *L. crispatus*, *U. urealyticum* ja *U. parvum* efektiivsused jäid veidi välja soovitud hea reaktsiooniefektiivsuse vahemikust 1,9-2,1 (efektiivsus 90-110 %). Kõikide standardkõverate korrelatsiooni koefitsiendi R^2 väärtused (v. a. *U. urealyticum*) olid suuremad kui 0,99, mis näitab standardite head kvaliteeti (Invitrogen).

Tabel 1. qPCR standardite omadused.

Standard	Praimerid	Standardi ulatus (geenikoopiat/ μ l)	Standardi tõus	R^2	$E_{tõus} = 10^{\left(-\frac{1}{tõus}\right)}$	Sulamis- temperatuur (°C)
16S rRNA	Forward Reverse	10^3 - 10^8	-3,340	0,998	1,993	80,79
<i>L. iners</i>	InersFw InersRev	$3,5 \times 10^3$ - $3,5 \times 10^8$	-3,104	0,998	2,100	80,76
<i>L. crispatus</i>	LcrisF LcrisR	$3,5 \times 10^3$ - $3,5 \times 10^8$	-3,621	0,995	1,889	80,44
<i>U. urealyticum</i>	UUureF UUureR	$3,5 \times 10^3$ - $3,5 \times 10^8$	-3,978	0,989	1,784	74,17
<i>U. parvum</i>	UPureF UPureR	$3,5 \times 10^3$ - $3,5 \times 10^8$	-3,998	0,992	1,779	72,22

Tabel 2. qPCR-i standardite märklaudgeenid ja vastavad praimerid.

Märklaud-geen	Standardi jaoks kasutatud mikroorganism (GenBank)	Praimer	Praimeri järjestus (5'–3')	Produkti pikkus (bp)	Praimerite seondumistemperatuur (°C)	Viide
<i>Lactobacillus iners</i> 16S rRNA	<i>L. iners</i> tüvi DSM 13335 (NR_036982)	InersFw InersRev	GTCTGCCTTGAAGATCGG ACAGTTGATAGGCATCATC	158	58	De Backer <i>et al.</i> , 2007
<i>Lactobacillus crispatus</i> 16S rRNA	<i>L. crispatus</i> tüvi ST1 (NR_074986)	LcrisF LcrisR	AGCGAGCGGAACTAACAGATTTAC AGCTGATCATGCGATCTGCTT	154	60	Byun <i>et al.</i> , 2004
<i>Ureaplasma urealyticum</i> ureaasi lisavalgu UreG geen	<i>U. urealyticum</i> serovar 10 tüvi ATCC 33699 (NC_011374)	UUureF UUureR	ATCGACGTTGCCCAAGGGGA TTAGCACCAACATAAGGAGCTAAATC	110	60	Cao <i>et al.</i> , 2007
<i>Ureaplasma parvum</i> ureaasi lisavalgu UreG geen	<i>U. parvum</i> serovar 3 tüvi ATCC 27815 (NC_010503)	UPureF UPureR	CATTGATGTTGCACAAGGAGAAA TTAGCACCAACATAAGGAGCTAAATC	111	60	Cao <i>et al.</i> , 2007
Universaalne 16S rRNA hüpervarieeruv piirkond V6	<i>Pseudomonas mendocina</i> PC1	Forward Reverse	CAACGCGARGAACCTTACC# ACAACACGAGCTGACGAC	112	54	Gloor <i>et al.</i> , 2010

– R tähistab A või G nukleotiidi.

Tabel 3. 16S rRNA V6 hüpervarieeruva piirkonna amplifitseerimiseks (PCR) ja geenifragmentide kvantifitseerimiseks (qPCR) kasutatud ja sulamiskõverate analüüsi programmid.

PCR programm	qPCR programm	Sulamiskõverate analüüs
Esialgne denaturatsioon 98°C 3 min. 6 tsükli: 98°C 5 s, 62°C 30 s (iga tsükliga alandades temperatuuri 1°C võrra, 62°C kuni 57°C), 72°C 10 s. 19 tsükli: 98°C 5 s, 57°C 30 s, 72°C 10 s. DNA süntees 72°C 5 min.	UDG eeltötlus 50°C 2 min. Esialgne denaturatsioon 95°C 10 min. 40 tsükli: 95°C 15 s, X°C 30 s, 72°C 30 s.	65-90°C, 1%, 3 s

X – vastav praimerite seondumistemperatuur (Tabel 2)

4.4.2. qPCR reaktsiooni teostamine

Antud töös kasutati geenikoopiate arvu määramiseks uuritavates proovides qPCR-i standardkõvera meetodit, mis teostati 7500 Fast Real-Time PCR System masinal (Applied Biosystems, USA). qPCR segu lõppmahus 10 µl sisaldas vastavaid primereid (Tabel 2), *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)* 1-kordse lõppkontsentratsiooniga (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA), 1 µl proovi või uuritava geeni plasmiidse DNA lahjendust ja ülejäänud hulgas steriilset destilleeritud vett. Praimerite lõppkontsentratsioon segus oli 0,4 µM, välja arvatud InersFw/InersRev praimerid, millel 0,8 µM. Igale reaktsiooniplaadile lisati vastava standardi lahjendusterida. Kõiki standardi lahjendusi ja proove amplifitseeriti kolmes korduses. Võimaliku DNA saastuse avastamiseks kasutati negatiivset kontrolli, mille qPCR segus olid olemas kõik komponendid peale märklaud DNA. qPCR programmid on toodud Tabelis 3.

4.4.3. qPCR-i andmete kvaliteedi analüüs

Kõikide proovide qPCR tulemusi analüüsiti arvestades ja hinnates 7500 Software version 2.0.4 programmi poolt määratud standardkõverate lineaarsust, sulamiskõverate asukohti ja kuju, paralleelide amplifikatsioonikõverate ühtlust ja geenifragmentide paljundamise efektiivsust. Iga proovi individuaalse amplifikatsiooni efektiivsuse hindamiseks kasutati programmi LinRegPCR versiooni 2013.0 (Ruijter *et al.*, 2009). Viidi läbi võõrväärtuste eemaldamine (*outlier detection*) – arvutati välja iga individuaalse proovi amplifikatsiooni efektiivsused ning eemaldati proovid, mille efektiivsuse kõrvalekalle keskmisest oli äärmuslik, $|Z| > 1,96$ (Valem 2) (Bar *et al.*, 2003).

$$Z = \frac{x_{eff} - \mu_{eff}}{\sigma_{eff}} \quad (\text{Valem 2})$$

Kus:

x_{eff} – proovi individuaalne amplifikatsiooni efektiivsus

μ_{eff} – kõikide proovide keskmine amplifikatsiooni efektiivsus

σ_{eff} – kõikide proovide amplifikatsiooni efektiivsuste standardhälve

Uuritud märklaudgeenide koopiaarvud määrati pärast kvaliteedikontrolli, võrreldes proovide amplifikatsiooni tulemusi standardkõveratega. Kõikide uuritud geenide koopiaarvud väljendati 1 ml algse proovi kohta.

Iga proovi korduste põhjal arvutati proovi keskmine amplifikatsiooni efektiivsus. Ideaalsetes tingimustes kahekordistub DNA kogus iga qPCR-i amplifikatsioonitsükliga (efektiivsus on 2), enamasti jääb efektiivsus vahemikku 1-2. Arvutati erinevate bakteriliikide (*L. iners*, *L. crispatus*, *U. urealyticum*, *U. parvum*) geenide koopiaarvude suhted koosluse 16S rRNA geenikoopiate arvukuse suhtes (Valem 3) (Ruijter *et al.*, 2009).

$$X = \frac{Eff(16S)^{Ct(16S)}}{Eff(L)^{Ct(L)}} \times 100\% \quad (\text{Valem 3})$$

Kus:

Eff(16S)– proovi keskmine 16S rRNA geeni amplifikatsiooni efektiivsus

Ct(16S)– lävendi ületamiseks vajalike amplifikatsioonitsükli arv 16S rRNA geeni korral

Eff(L)– proovi keskmine liigispetsiifilise geeni amplifikatsiooni efektiivsus
Ct(L)– lävendi ületamiseks vajalike amplifikatsioonitsüklite arv liigispetsiifilise geeni korral

LinRegPCR analüüsi järgi jäid uurimisproovide 16S rRNA, *L. iners*, *L. crispatus*, *U. urealyticum* geenide keskmised amplifikatsiooniefektiivsused vahemikku 1,8-1,9 (standardhälve 0-0,2). Ainult *U. parvum* geenil oli keskmine efektiivsus madalam 1,7 (standardhälve 0,1).

4.5. Mikroobikoosluste liigilise koosseisu määramine 16S rRNA fragmentide amplikonide järjestamise abil

4.5.1. 16S rRNA V6 amplifikatsioon

Proovide täiendavaks iseloomustamiseks sekveneeriti kõikide proovide bakterikooslused 16S rRNA geeni alusel. Selleks amplifitseeriti 16S rRNA geeni V6 hüpervarieeruv piirkond, milleks kasutati samu Forward ja Reverse praimereid, mida qPCR-l (Tabel 2), aga kummagi praimeri 5` otsa oli lisatud 6 nukleotiidi pikkune unikaalne DNA triipkood (*barcode*) (Parameswaran *et al.*, 2007). Iga proovi PCR segus oli unikaalne praimeripaari kombinatsioon, mille abil saab hiljem sekveneeritud proove üks teisest eristada. DNA triipkoodid disainis Reproduktiivmeditsiini TAK spetsialist Jens-Konrad Preem.

PCR reaktsioonisegu sisaldas *Phusion Master Mix with GC Buffer* (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) 1-kordse lõppkontsentratsiooniga, Forward ja Reverse praimereid lõppkontsentratsiooniga 0,5 µM, DNA märklaudjärjestust lisati 1 µl ning kuni lõppmahuni (20 µl) steriilset destilleeritud vett. PCR programm on toodud Tabelis 3, reaktsioon viidi läbi Mastercycler® pro vapo.protect™ (Eppendorf AG, Saksamaa) tsükliseerivas termostaadis. Võimaliku DNA saastuse avastamiseks kasutati negatiivset kontrolli, mille PCR segus olid olemas kõik komponendid peale märklaud DNA.

Produkti olemasolu, selle õiget pikkust ja negatiivse kontrolli puhtust kontrolliti geelelektroforeesil, 2% agarosgeel oli valmistatud 1x TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA; pH 8.2) ja sisaldas etiidiumbromiidi 0,5 µg/ml. Geelile kanti 5 µl

proovi segatuna 1 µl laadimispuhvriga (*6x MassRuler Loading Dye Solution*) ja suurusmarker *GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA). Elektroforees toimus 1x TAE puhvris toatemperatuuril 100 V pinge all 20 minutit. Geeli pildistati UV valguse all. Igast proovist valmistati kolm 20 µl PCR produkti ning segati need kokku.

4.5.2. PCR produktide kontsentratsiooni määramine

PCR produktide kontsentratsioonide mõõtmiseks tehti 2%-line agarosgeel 1x TAE puhvris (50 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA; pH 8.2), millele lisati etiidiumbromiidi kontsentratsiooniga 0,5 µg/ml. Geelile kanti proovid segatuna laadimispuhvriga (*6x MassRuler Loading Dye Solution*) ja suurusmarkerid *MassRuler Express LR Forward and Reverse DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA). Elektroforees teostati 1x TAE puhvris 100 V pinge juures 30 minuti jooksul. Geeli pildistati UV valguses Molecular Imager GelDoc™ XR+ -ga (Bio-Rad Laboratories, USA), sama masina tarkvara abil määrati proovide kontsentratsioonid.

4.5.3. PCR produktide segu puhastamine ja DNA raamatukogu valmistamine

Seejärel segati kõikide proovide PCR produktid võrdsetes osakaaludes kokku ning saadud segu puhastati ning kontseentreeriti *NucleoSpin® Extract II kit*-ga (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co, Saksamaa) protokoll järgides. PCR produktide segu lõppkontsentratsioon mõõdeti Agilent 2100 Bioanalyzer-ga (Agilent Technologies, Inc., USA). DNA raamatukogu valmistamiseks kasutati *NEXTflex™ PCR-Free DNA Sequencing Kit*'i ja tootjapoolset protokoll (BIOO Scientific Corp., USA).

4.5.4. Sekvenerimine ja järjestuste analüüs

Sekvenerimine teostati Illumina® HiSeq 2000 platvormil (Illumina, Inc., USA). Sekveneritud 16S rRNA geeni järjestuste fragmentide analüüsi viis läbi Reproduktiivmeditsiini TAK spetsialist Jens-Konrad Preem, kasutades Mothur 1.24.0

tarkvara (Schloss *et al.*, 2009). Analüüsi esimeses etapis viidi läbi ka järjestuste kvaliteedikontroll, mille käigus eemaldati madala keskmise kvaliteediskooriga, tundmatuid nukleotiide sisaldavad ja pikkade homopolümeeridega järjestused. Alles jäänud järjestused joondati kasutades SILVA-ga ühilduvat andmebaasi (Pruesse *et al.*, 2007), mille abil leiti järjestuste kattuvad alad järgmisteks etappideks. Järjestuste klassifitseerimiseks kasutati Greengenes võrdlusandmebaasi (McDonald *et al.*, 2011), fülotüübid leiti CROP tarkvara abil (Hao *et al.*, 2011).

4.6. Andmeanalüüs

Microsoft Excel 2007, R versioon 2.14.1. ja Sigmaplot 12.5 programme kasutades tehti graafikud ja joonised ning analüüsiti ja testiti tulemusi. Wilcoxon'i astakmargitestiga võrreldi enne ja pärast vahekorda võetud tupeproovides ja spermaproovides määratud bakteriliikide geenide arvukusi. Tunnuste omavahelisi seoseid hinnati mittepameetrilise Spearmani korrelatsioonikordaja abil.

5. TULEMUSED

5.1. Tupe ja sperma mikroobikooslused viljatutel paaridel 16S rRNA amplikonide järjestamise alusel

Viljatute paaride meeste spermaproovide ning naiste enne ja pärast vahekorda võetud tupeproovide mikrobiota iseloomustamiseks sekveneeriti 16S rRNA geeni fragmendi amplikonid. Koosluse liigilise koosseisu iseloomustamiseks kasutati 16S rRNA V6 regiooni, amplifitseeritavad geenifragmentide pikkused jäid 110-130 bp vahele, kindlustades selle, et enamus *paired-end* lugemid kattuvad Illumina sekveneerimisel. Need V6 regiooni praimerid seonduvad enamiku tupemikrobiota liikide järjestustega, aga näiteks *Sneathia* spp., *Leptotrichia* spp., *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma* spp. järjestuste amplifikatsioon võib toimuda madalama efektiivsusega (Gloor *et al.*, 2010). Sekveneerimistulemuste kvaliteedikontrolli läbisid 19 paari proovid, mida analüüsiti edasi.

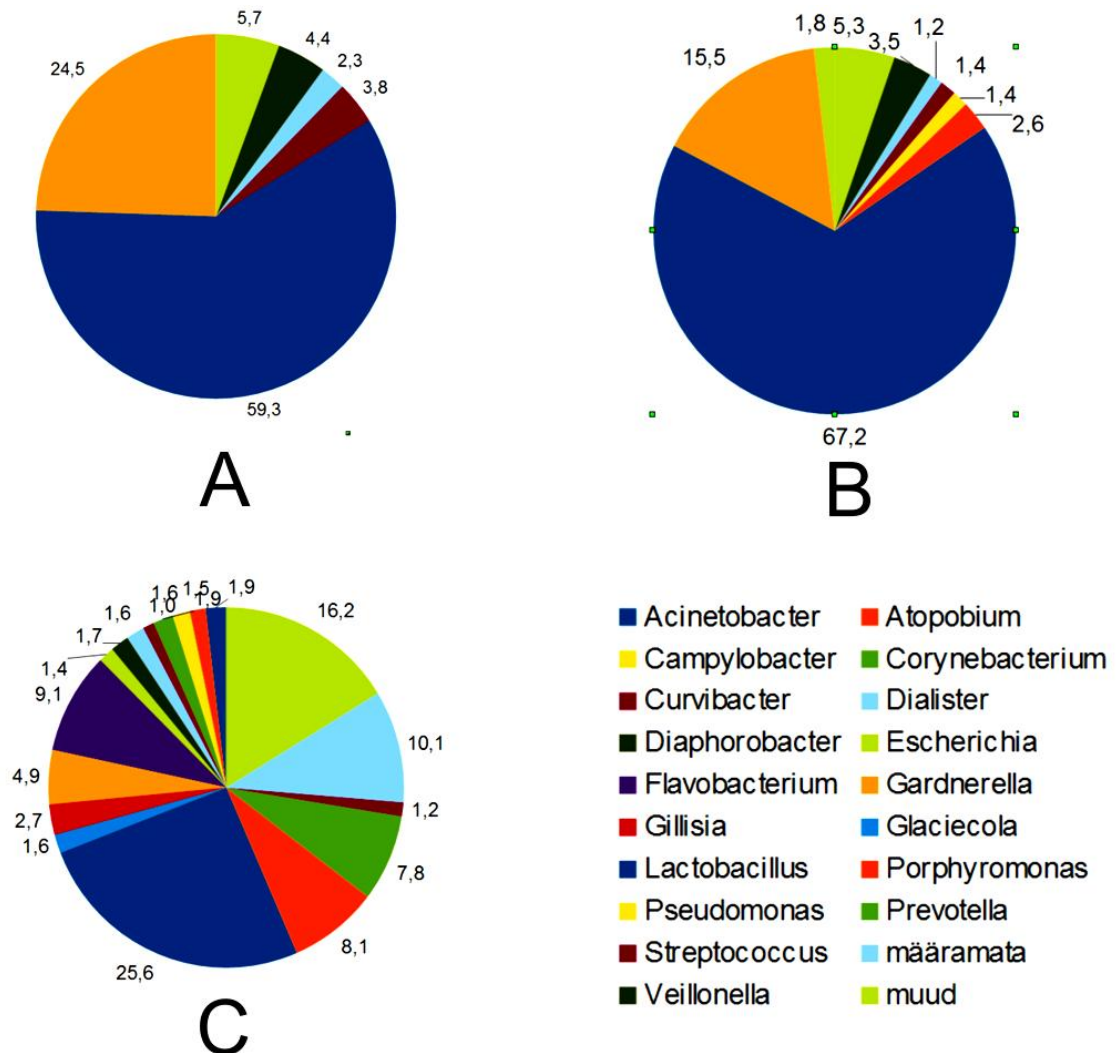
Naiste tupeproovides oli keskmiselt kõige rohkem perekond *Lactobacillus* järjestusi, sellele järgnesid perekonnad *Gardnerella* ja *Veillonella*, teiste mikroobirühmade (näiteks *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Atopobium*) esindajaid oli proovides keskmiselt vähem kui 2 % (Joonised 1A ja 1B). Vahekorrajärgselt oli proovides rohkem *Streptococcus* spp., *Porphyromonas* spp., *Anaerococcus hydrogenalis* ja vähem *Lactobacillus* spp. (v.a *L. iners*), *A. vaginae*, *Enterobacteriaceae* spp., *Dialister* sp., *Bacteroides ureolyticum* ning *Leptotrichia amnionii* järjestusi (Tabel 4). Igas tupeproovis oli üks domineeriv bakter, mille järjestused moodustasid kõikidest proovis leitud järjestustest üle 50 %, nendeks olid *Lactobacillus*, *Gardnerella* ja *Veillonella* perekondade liigid.

Tabel 4. Erinevate bakterite fülotüüpide esinemine (> 1 % proovis olevatest järjestustest) ja domineerimine (> 50 % proovis olevatest järjestustest) naiste tupeproovides 16S rRNA fragmendi amplikonide järjestamise alusel.

Bakterirühm	Proovid enne vahekorda (n=19)		Proovid pärast vahekorda (n=19)	
	Esinemine	Domineerimine	Esinemine	Domineerimine
<i>L. iners</i>	79 %	47 %	79 %	58 %
<i>L. crispatus</i>	79 %	32 %	74 %	21 %
Teised <i>Lactobacillus</i> spp.	79 %	5 %	68 %	5 %
<i>Gardnerella vaginalis</i>	53 %	11 %	53 %	11 %
<i>Prevotella</i> spp.	26 %	0	26 %	0
<i>Atopobium vaginae</i>	11 %	0	5 %	0
<i>Enterobacteriaceae</i> sp.	11 %	0	5 %	0
<i>Veillonella</i> sp.	5 %	5 %	5 %	5 %
<i>Porphyromonas</i> spp.	5 %	0	11 %	0
<i>Streptococcus</i> spp.	5 %	0	21 %	0
<i>Dialister</i> sp.	5 %	0	0	0
<i>Leptotrichia amnionii</i>	5 %	0	0	0
<i>Anaerococcus hydrogenalis</i>	5 %	0	11 %	0
<i>Bacteroides ureolyticum</i>	5 %	0	0	0

Meeste spermaproovide mikroobikooslused olid palju mitmekesisema koosseisuga kui naiste tupeproovid. Spermaproovides oli sarnaselt tupeproovidele keskmiselt kõige rohkem perekond *Lactobacillus* järjestusi, palju oli ka *Flavobacterium*, *Gardnerella*, *Porphyromonas*, *Diaphorobacter*, *Cupriavidus*, *Prevotella* ja vähem teiste rühmade järjestusi (Joonis 1C). Kõikides eesnäärme põletikuga ja tervete meeste proovides oli *Flavobacterium* sp., *L. iners*, *L. crispatus* järjestusi (Tabel 5). Spermaproovide mikrobiota oli väga varieeruva liigilise koosseisuga, domineeriva bakterirühma järjestused moodustasid proovides kõikidest järjestustest keskmiselt ainult 20 %. Spermaproovides olid domineerijateks *Lactobacillus*, *Flavobacterium* ja *Prevotella* perekondade liigid, üheksas proovis esines kooslus, kus *Flavobacterium* sp. ja *L. iners*

ja/või *L. crispatus* olid peamised mikroorganismid. Kuna tervete meeste proove oli palju rohkem (15) ja prostatiidiga patsiente oli ainult neli, ei ole võimalik teha olulisi järeldusi terve ja eesnäärme põletikuga rühmade vaheliste koosluse erinevuste kohta.



Joonis 1. Enne (A) ja pärast (B) vahekorda võetud naiste tupeproovide ning meeste sperma (C) mikrobiota keskmine koosseis perekondade tasemel. Diagrammil on näidatud mitu protsenti moodustavad mikroobiperekonna järjestused keskmiselt kogu proovide järjestuste hulgast. Muud järjestused on need, mille osakaal oli väiksem kui 1 %.

Tabel 5. Erinevate bakterite fülötüüpide esinemine (> 1 % proovis olevatest järjestustest) ja domineerimine meeste spermaproovides 16S rRNA fragmendi amplikonide järjestamise alusel.

Bakterirühm	Terved proovid (n=15)		Prostatiidiga proovid (n=4)	
	Esinemine	Domineerimine	Esinemine	Domineerimine
<i>Flavobacterium</i> sp.	100 %	40 %	100 %	50 %
<i>L. iners</i>	100 %	33 %	100 %	25 %
<i>L. crispatus</i>	100 %	13 %	100 %	0
<i>Gardnerella vaginalis</i>	100 %	0	75 %	0
Teised <i>Lactobacillus</i> spp.	93 %	0	100 %	0
<i>Porphyromonas</i> spp.	93 %	7 %	100 %	0
klassifitseerimata <i>Gammaproteobacteria</i>	93 %	0	50 %	0
<i>Flavobacteriaceae</i> spp.	73 %	0	100 %	0
<i>Enterobacteriaceae</i> spp.	73 %	0	100 %	0
<i>Diaphorobacter</i> sp.	67 %	0	50 %	0
<i>Cupriavidus necator</i>	60 %	0	50 %	0
<i>Prevotella</i> spp.	60 %	7 %	100 %	25 %
<i>Fingoldia</i> sp.	47 %	0	25 %	0
<i>Atopobium vaginae</i>	40 %	0	25 %	0
<i>Curvibacter</i> sp.	40 %	0	25 %	0
<i>Clostridiales</i> spp.	33 %	0	25 %	0
<i>Corynebacterium seminale</i>	27 %	0	0	0
<i>Acidovorax delafieldii</i>	27 %	0	25 %	0
<i>Varibaculum cambriense</i>	20 %	0	0	0
<i>Dialaster</i> sp.	20 %	0	25 %	0
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	13 %	0	50 %	0
<i>Shuttleworthia</i> sp.	13 %	0	25 %	0
<i>Veillonella</i> sp.	13 %	0	25 %	0
<i>Streptococcus</i> spp.	7 %	0	50 %	0
<i>Sphingobacteriales</i> spp.	7 %	0	50 %	0

Kuna töös kasutatud 16S rRNA V6 regiooniga seonduvate praimerite korral toimub ureaplasmade järjestuste amplifikatsioon madalama efektiivsusega, siis uuritavatest proovidest neid genee määrata ei õnnestunud. Selleks, et kindlaks teha potentsiaalsete patogeenide (*U. urealyticum*, *U. parvum*) ja kahe peamise laktobatsilli (*L. iners*, *L. crispatus*) olemasolu ja arvukust genitaaltraktis, kasutati kvantitatiivset PCR-i.

5.2. Laktobatsillide ja ureaplasmade hulgad tupeproovides qPCR-i alusel

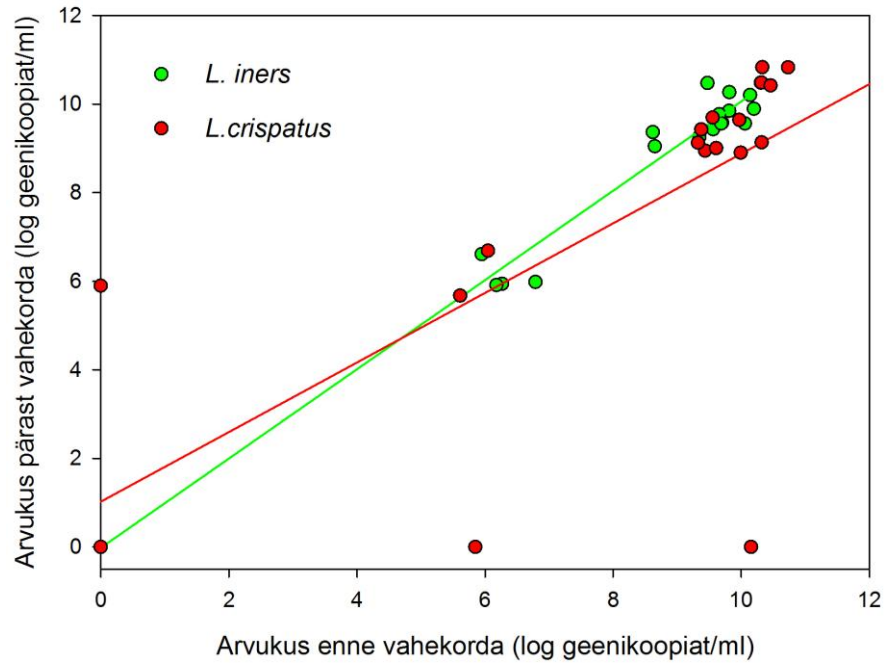
Tupeproovide koosluse 16S rRNA oli kvantifitseeritav kõikide naiste (n=21) proovides, ühe naise enne (CN3A) ja ühe naise pärast vahekorda võetud proovist (CN11B) ei olnud ükski uuritav *Lactobacillus* ega *Ureaplasma* liigi geen määratav. Proovidest amplifitseeritud geenide kvantifitseerimistulemused on esitatud Tabelis 6.

Laktobatsillide seos seksuaalvahekorraga

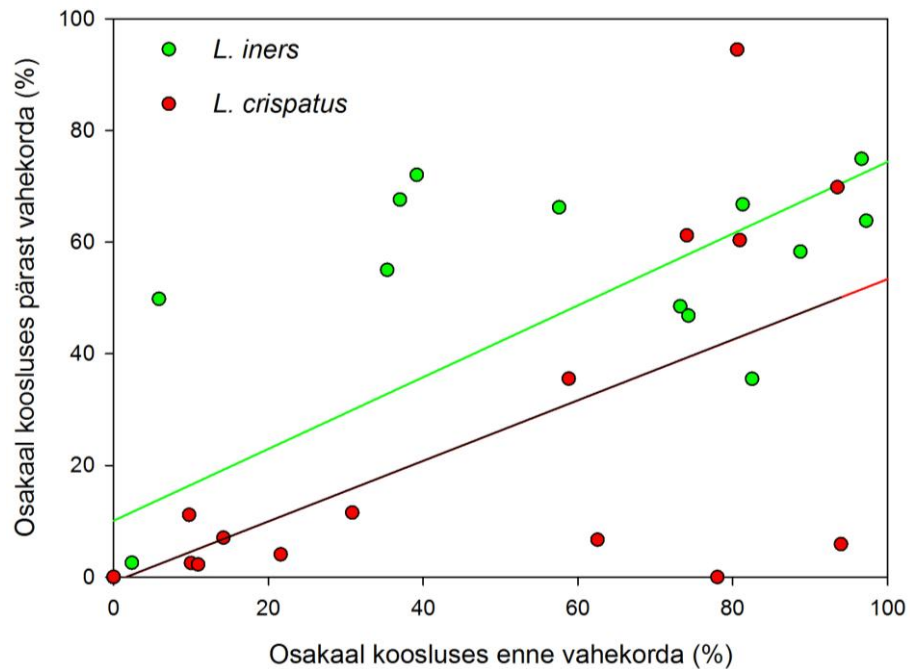
Nelja naise proovidest ei tuvastatud üldse *L. iners*'t, 17 naise (81 %) proovides esines *L. iners* nii enne kui ka pärast vahekorda võetud proovides. *L. iners* arvukus enne vahekorda korreleerus tugevalt arvukusega pärast vahekorda ($r=0.90$, $P<0.001$) (Joonis 2). 15 naisel (71 %) oli *L. crispatus* kvantifitseeritav mõlemas proovis. Kolmel naisel ei leidunud kummaski proovis *L. crispatus*'t, kahe naise proovidest tuvastati seda liiki ainult enne vahekorda võetud proovides. Ühel naisel esines *L. crispatus* ainult vahekorrajärgselt (1.59×10^6 geenikoopiat/ml), tema mehe spermaproovist seda liiki ei detekteeritud. Ka *L. crispatus* arvukus enne vahekorda korreleerus tugevalt arvukusega pärast vahekorda ($r=0.79$, $P<0.001$) (Joonis 2).

qPCR analüüsil leitud *L. iners* osakaal koosluses näitas, et *L. iners* domineerivate koosluste (n=9, 43 %) püsivust ei mõjutanud seksuaalvahekord. Seevastu *L. crispatus* domineeriv kooslus säilis vaid nelja naise (19 %) mõlemas proovis. Lisaks toimus kolme naise (14 %) puhul üleminek *L. crispatus* domineerivalt koosluselt *L. iners* domineerivale, proovide keskmine Nugent'i skoor tõusis 1-lt 2.7-le. *L. crispatus* domineerivate koosluste Nugent'i skoor oli keskmiselt 0.6, aga *L. iners* puhul tunduvalt kõrgem 2.4. Ühel naisel domineeris enne *L. crispatus*, aga pärast võetud proovides ei olnud kumbki laktobatsilli liik määratav. Neljal naisel (19 %) ei domineerinud

tupeproovides kumbki laktobatsill. Wilcoxon testi põhjal vähenes *L. crispatus* osakaal mikroobikoosluses pärast vahekorda keskmiselt kaks korda (keskmised vastavalt 34.3 ± 35.7 % ja 17.7 ± 27.8 %) ($P < 0.01$). *L. iners* ja *L. crispatus* osakaalud koosluses enne ja pärast vahekorda korreleerusid omavahel (vastavalt $r = 0.82$ ja $r = 0.73$, $P < 0.001$) (Joonis 3).



Joonis 2. *L. iners* ja *L. crispatus* arvukus (\log_{10}) tupe mikroobikoosluses enne ja pärast vahekorda. Mõlema liigi puhul on joonisele lisatud lineaarne regressioonijoon.



Joonis 3. *L. iners* ja *L. crispatus* osakaal tupe mikroobikoosluses enne ja pärast vahekorda. Mõlema liigi puhul on joonisele lisatud lineaarne regressioonijoon.

Ureaplastmade seos seksuaalvahekorraga

Kolmel naisel oli *U. urealyticum* mõlemas proovis kvantifitseeritav. Kolmel naisel leidis *U. urealyticum* ainult enne ja neljal ainult pärast vahekorda võetud proovis. 11 naisel (52 %) ei olnud kummaski proovis *U. urealyticum* määratav. qPCR analüüsil leitud *U. urealyticum* osakaalud koosluse 16S rRNA suhtes olid enne 0–0,01 % ja pärast vahekorda 0–0,14 %. Teine ureaplastma liik, *U. parvum* oli üheteistkümmel naisel (52 %) mõlemast tupeproovist määratav ning ülejäänud kümne (48 %) naise proovides seda liiki ei esinenud. *U. parvum* geeni osakaalud koosluse 16S rRNA suhtes olid enne 0–0,14 % ja pärast vahekorda enamasti 0–3,87 % ning osakaalu suurenemine pärast vahekorda oli statistiliselt oluline (Wilcoxon test, $P < 0.05$). Üheksa naise (43 %) enne ja seitsme naise (33 %) pärast vahekorda võetud proovis ei olnud kumbki *Ureaplasma* liik detekteeritav. Viiel naisel (24 %) enne ja neljal naisel (19 %) pärast vahekorda võetud proovis leidis mõlemat *Ureaplasma* liiki.

Tabel 6. Erinevate bakteriliikide geenide ja üldise 16S rRNA keskmised geenikoopiate arvukused, standardhälve ja 95 % usaldusintervall tupeproovides (geenikoopiat/ml).

Geen/ bakteriliik	Proovid enne vahekorda				Proovid pärast vahekorda			
	Proovide arv [#]	Keskmine	Standardhälve	95 % usaldus- intervall	Proovide arv [#]	Keskmine	Standardhälve	95 % usaldus- intervall
16S rRNA	21	6,35x10 ⁹	2,10	4,54 x10 ⁹ — 8,89x10 ⁹	21	6,03x10 ⁹	3,95	3,23x10 ⁹ — 1,13x10 ¹⁰
<i>L. iners</i>	21	1,37x10 ⁷	6,26x10 ³	2,56x10 ⁵ — 7,33x10 ⁸	21	1,50x10 ⁷	7,10x10 ³	2,65x10 ⁵ — 8,51x10 ⁸
	17	6,55x10 ⁸	32,47	1,09x10 ⁸ — 3,92x10 ⁹	17	7,33x10 ⁸	41,97	1,07x10 ⁸ — 5,01x10 ⁹
<i>L. crispatus</i>	21	3,11x10 ⁷	1,04x10 ⁴	4,62x10 ⁵ — 2,10x10 ⁹	21	8,20x10 ⁶	1,61x10 ⁴	9,98x10 ⁴ — 6,74x10 ⁸
	17	1,80x10 ⁹	48,38	2,46x10 ⁸ — 1,33x10 ¹⁰	16	1,19x10 ⁹	43,20	1,60x10 ⁸ — 8,83x10 ⁹
<i>U. urealyticum</i>	21	5,57x10	6,86x10 ²	2,85— 1,09x10 ³	21	1,07x10 ²	1,01x10 ³	4,60— 2,50x10 ³
	6	1,29x10 ⁶	2,74	4,47x10 ⁵ — 3,71x10 ⁶	7	1,23x10 ⁶	12,67	1,18x10 ⁵ — 1,29x10 ⁷
<i>U. parvum</i>	21	8,69x10 ³	7,29x10 ³	1,52x10 ² — 4,98x10 ⁵	21	1,02x10 ⁴	8,50x10 ³	1,66x10 ² — 6,28x10 ⁵
	11	3,31x10 ⁷	2,91	1,61x10 ⁷ — 6,79x10 ⁷	11	4,51x10 ⁷	2,72	2,30x10 ⁷ — 8,84x10 ⁷

[#]– Kõikide proovide arv on 21, ainult positiivsete proovide arv <21.

5.3. Laktobatsillide ja ureaplastide hulgas spermaproovides qPCR-i alusel

Spermaproove oli kokku 21, nendest viiel diagnoositi eesnäärme põletik. Bakterikoosluse 16S rRNA oli kvantifitseeritav kõigis proovides, 7 mehe proovist ei olnud ükski uuritav *Lactobacillus* ega *Ureaplasma* liigi 16S rRNA/UreG geen määratav. Proovidest amplifitseeritud geenide kvantifitseerimistulemused on esitatud Tabelis 7.

Kahes eesnäärme põletikuga ja 44 % (n=7) tervetes spermaproovides oli *L. iners* kvantifitseeritav, samal ajal oli see liik määratav ka 80 % (n=4) prostatiidiga mehe naisel ja 81 % (n=13) terve mehe naisel. qPCR analüüsil leitud *L. iners* geeni osakaalud koosluse 16S rRNA suhtes olid eesnäärme põletikuga meeste proovides 0–6,02 % ja tervete meeste spermas 0–1,87 %. Kahel prostatiidiga ja 56 % (n=9) tervetes spermaproovides oli *L. crispatus* määratav, aga sarnaselt *L. iners* tulemustele oli ta leitav 80 % (n=4) eesnäärme põletikuga mehe naisel ja 81 % (n=13) terve mehe naisel. qPCR analüüsil arvatud *L. crispatus* geeni osakaalud koosluse 16S rRNA suhtes olid eesnäärme põletikuga meeste spermas 0–0,03 % ja tervete meeste proovides 0–0,1 %. Ühes eesnäärme põletiku diagnoosiga (CM1) ja viies terves (31 %) proovis olid mõlemad *Lactobacillus* liigi geenid kvantifitseeritavad.

U. urealyticum ei olnud võimalik mitte ühestki spermaproovist kvantifitseerida, kuigi kahe eesnäärme põletikuga mehe ja 31 % (n=5) terve mehe naise tupeproovides oli *U. urealyticum* tuvastatav. *U. parvum* oli määratav kolmes (19 %) terve mehe spermaproovis, aga mitte üheski põletikuga proovis. Nendes kolmes proovis (CM8, CM9, CM16) olid määratavad ka *L. iners* ja *L. crispatus* geenid. qPCR analüüsil arvatud *U. parvum* geeni osakaalud koosluse 16S rRNA suhtes olid nendes proovides 0,01–0,07 %. *U. parvum* leidis ka nende kolme mehe naiste tupeproovides.

Tabel 7. Erinevate bakteriliikide geenide ja üldise 16S rRNA keskmised geenikoopiate arvukused, standardhälve ja 95 % usaldusintervall spermaproovides (geenikoopiat/ml).

Geen/ bakteriliik	Prostatiidiga proovid				Terved proovid			
	Proovide arv [#]	Keskmine	Standardhälve	95 % usaldus- intervall	Proovide arv [*]	Keskmine	Standardhälve	95 % usaldus- intervall
16S rRNA	5	7,01x10 ⁶	0,58	1,33x10 ⁶ — 3,70x10 ⁷	16	9,33x10 ⁶	2,50	5,73x10 ⁶ — 1,52x10 ⁷
<i>L. iners</i>	5	1,60x10 ²	1,11x10 ³	2,64x10 ⁻² — 9,68x10 ⁵	16	1,71x10 ²	4,53x10 ²	6,57— 4,44x10 ³
	2	3,24x10 ⁵	0,82	—	7	1,27x10 ⁵	5,46	2,64x10 ⁴ — 6,09x10 ⁵
<i>L. crispatus</i>	5	8,75x10	4,57x10 ²	4,36x10 ⁻² — 1,76x10 ⁵	16	6,11x10 ²	3,49x10 ²	2,70x10— 1,38x10 ⁴
	2	7,16x10 ⁴	0,13	—	9	8,98x10 ⁴	1,64	6,14x10 ⁴ — 1,31x10 ⁵
<i>U. urealyticum</i>	N				N			
	N				N			
<i>U. parvum</i>	N				16	1,39x10 ¹	2,87x10 ²	6,81x10 ⁻¹ — 2,83x10 ²
	N				3	1,24x10 ⁶	1,32	6,23x10 ⁵ — 2,49x10 ⁶

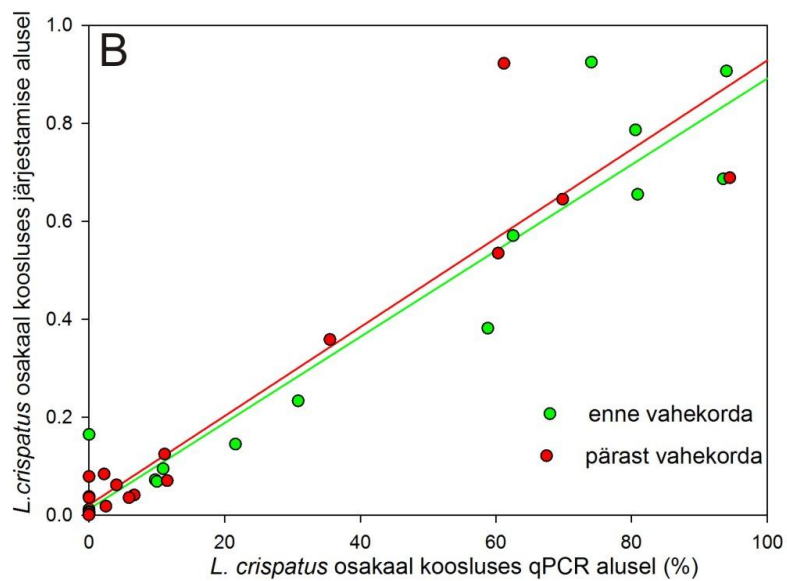
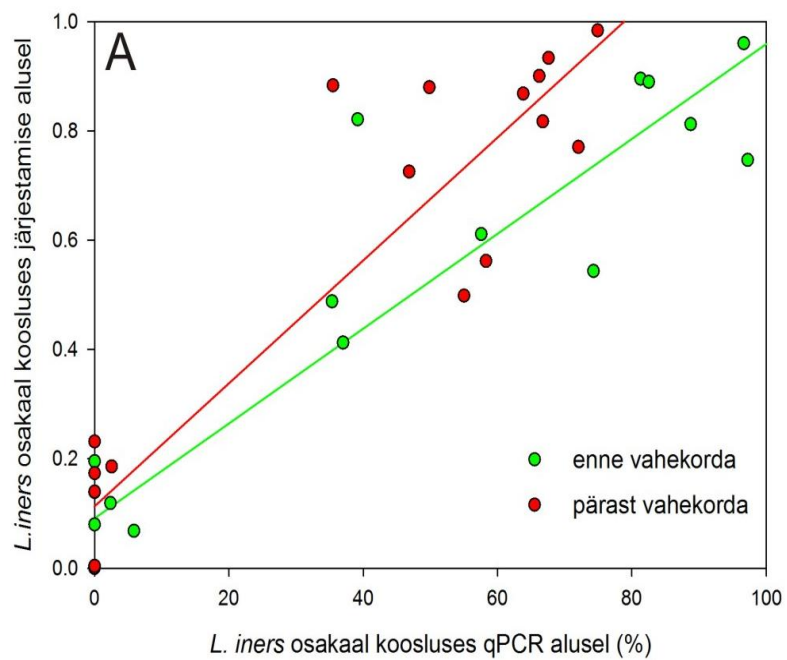
[#]– Kõikide eesnäärme põletikuga proovide arv 5, ainult positiivsete proovide arv <5.

^{*}– Kõikide tervete proovide arv 16, ainult positiivsete proovide arv <16.

N – Proovid, kus bakteriliigi geeni ei olnud võimalik kvantifitseerida.

5.4. qPCR meetodiga ja 16S rRNA ampliconide järjestamisel saadud geenide osakaalude võrdlus

Kui võrreldi omavahel kvantitatiivse qPCR meetodiga ja 16S rRNA ampliconide järjestamisel saadud *L. iners* ja *L. crispatus* geenide osakaalusid koosluse 16S rRNA geeni suhtes, korreleerusid *L. crispatus* tulemused omavahel tugevasti ($r=0,92$, $P<0.001$), *L. iners* puhul oli seos veidi nõrgem ($r=0.87$, $P<0.001$) (Joonis 4). Jooniselt 4A ja 4B on näha, et seos eri meetoditel leitud *L. iners* osakaalude vahel on veidi erinev enne ja pärast vahekorda tupe mikroobikooslustes, samas kui *L. crispatus* puhul on seos sama. Wilcoxon'i testi põhjal vähenes *L. crispatus* osakaal tupe koosluses pärast vahekorda ($P<0.01$).



Joonis 4. qPCR-i ja 16S rRNA amplikonide järjestamise alusel saadud *L. iners* (A) ja *L. crispatus* (B) osakaalude vahelised seosed koosluses enne ja pärast vahekorda proovides. Mõlema liigi puhul on joonistele lisatud lineaarsed regressioonijooned.

6. ARUTELU

Käesolev töö on esimene omataoline töö, kus iseloomustati viljatute paaride mees- ja naispartnerite genitaaltrakti bakterikooslusi 16S rRNA geeni fragmendi amplikonide järjestamisega (sh naistel enne ja pärast vahekorda) ning määrati täiendavalt mõningaid mikrobioota liike ja nende muutlikkust qPCR meetodiga. Naiste tupeproovides leidis kõige rohkem perekond *Lactobacillus* järjestusi (enamasti *L. crispatus* ja *L. iners*), järgnesid *Gardnerella* ja *Veillonella* perekondade liigid. Vahekorrajärgselt suurenes proovides *Streptococcus*, *Porphyromonas*, *Anaerococcus* järjestuste arv ja vähenes *Lactobacillus* (v.a *L. iners*), *Atopobium*, *Enterobacteriaceae*, *Dialister*, *Bacteroides* ning *Leptotrichia* järjestuse arv. qPCR järgi leidis *L. iners* rohkem kui 80 % ja *L. crispatus* üle 70 % naiste tupeproovides, need bakterid olid kooslustes ka peamised domineerivad liigid. Seksuaalvahekorra negatiivne mõju oli rohkem märgatav *L. crispatus* domineerivatele kooslustele, *L. iners* oli palju püsivam. *Ureaplasma* perekonna liigid esinesid rohkem kui pooltes tupeproovides, sealjuures esines *U. parvum* palju sagedamini kui *U. urealyticum*, kuid tupekooslusest moodustasid nende järjestused väga väikese osa (enamasti <1 %).

Meeste spermaproovide mikroobikooslused olid oluliselt mitmekesisema koosseisuga kui tupeproovid, samas oli mikroorganismide arvukus nendes tunduvalt madalam. Kõige rohkem esines *Lactobacillus* perekonna järjestusi, neile järgnesid *Flavobacterium*, *Gardnerella*, *Porphyromonas*, *Enterobacteriaceae*, *Diaphorobacter*, *Cupriavidus*, *Prevotella* ja teiste rühmade järjestused. Prostatiidiga ja tervete meeste sperma mikrobioota olid mõneti erinevad. qPCR alusel olid *L. iners* ja *L. crispatus* geenid määratavad kahes esnäärme põletikuga mehe spermaproovis ja ligi pooltes tervete meeste proovides. *U. urealyticum* ei olnud spermaproovidest määratav ja *U. parvum* esines ainult kolme terve mehe proovis.

Naise tupekeskkond ja sealne mikrobioota on omavahel peenelt tasakaalustatud mutualistlikus suhtes. Tervete naiste tupemikrobioota võib üsna varieeruv ja keeruline olla, enamasti domineerivad piimhapet tootvad bakterid sealhulgas *Lactobacillus* liigid (Ma *et al.*, 2012). Molekulaarsete meetoditega on tupeproovidest kõige sagedamini leitud nelja laktobatsilli: *L. iners*, *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri*. Valisime qPCR analüüsi jaoks *L. iners* ja *L. crispatus*, kuna neid leidis 16S rRNA amplikonide

järjestamise järgi tupeproovides kõige arvukamalt ja nad olid esindatud ka meeste spermaproovides. Meie uuringus olid *L. iners* ja *L. crispatus* järjestused mõlema meetodiga määratavad üle ¾ naiste tupeproovides. Vähemalt ühes naise tupeproovis domineeris üle 80 % juhtudel *Lactobacillus* perekonna liik, sealjuures rohkem *L. iners* kui *L. crispatus*. Sarnaseid tulemusi on ka teised uurimisrühmad saanud. Suuremahulistes uuringutes Põhja-Ameerikas leidus naiste tupeproovides samuti kõige rohkem laktobatsille, domineerisid peamiselt *L. iners* ja *L. crispatus* (Ravel *et al.*, 2011; Srinivasan *et al.*, 2012). Ühes varasemas Eesti naiste uuringus leiti pürosekveneerimisega 99 % tupeproovides *Lactobacillus* liike, kusjuures peamised domineerivad bakterid olid *L. iners* ja *L. crispatus* (Drell *et al.*, 2013), mis langeb kokku meie tulemustega.

Käesolevas uuringus kuulusid tupe mikrobiota koosseisu lisaks laktobatsillidele *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella* spp., *Atopobium vaginae*, *Enterobacteriaceae* sp., *Veillonella* sp., *Porphyromonas* spp., *Streptococcus* spp. ja teised. Neidsamu bakterirühmasid on tupeproovides määratud ka teistes uuringutes (Ravel *et al.*, 2011; Srinivasan *et al.*, 2012; Drell *et al.*, 2013). Kuigi erinevad uurimisgrupid on tupemikrobiota koosseisu määramisel kasutanud erinevaid 16S rRNA praimereid, sekveneerimisplatvorme ja analüüsimetoodikat, on tulemused üsna sarnased ja omavahel võrreldavad. See viitab ka sellele, et geograafilised erinevused ei ole tõenäoliselt suured.

Seksuaalvahekord ja kokkupuude spermaga võivad oluliselt mõjutada tupemikrobiootat ja põhjustada erinevaid infektsioone ja viljatust. Käesolevas töös suurenes 11 naisel (52,4 %) vahekorrajärgselt Nugent'i skoor, mis viitab tupemikrobiota muutusele, vähem toimus muutusi madalama Nugent'i skooriga (0-1) naistel, kus laktobatsillid domineerivad. See osutab piimhappebakterite olulisele mikrobiota tasakaalu tagavale mõjule. Sekveneerimise tulemuste alusel leiti pärast vahekorda võetud proovides rohkem *Streptococcus* spp., *Porphyromonas* spp., *Anaerococcus hydrogenalis*, *Prevotella* spp. 16S rRNA geeni järjestusi. Varem on külvimeetodit kasutades saadud sarnaseid tulemusi – vahekorrajärgselt suurenes *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Prevotella* sp. jt hulk (Borovkova *et al.*, 2011). Laktobatsillide arvukuse määramisel qPCR meetodil leiti, et naiste tupeproovide keskmine *L. iners* geenikoopiate arv proovis pisut tõusis vahekorrajärgselt, *L. crispatus*

vastupidiselt vähenes. *L. iners* geenid olid määratavad nii enne kui ka pärast vahekorda võetud samade naiste tupeproovides. *L. iners* domineerivate koosluste püsivust seksuaalvahekord ei mõjutanud, samas kui *L. crispatus* domineerivad kooslused kas püsisid või muutusid hoopis *L. iners* domineerivateks. Ka Jespers ja tema kaastöötajad (2012) täheldasid pärast seksuaalvahekorda võetud tupeproovides vähenenud *L. crispatus* ja suurenenud *L. iners* hulka. Gajer ja tema kaastöötajad (2012) leidsid tupemikrobiota pikaajalises uuringus, et seksuaalsel aktiivsusel oli oluline negatiivne efekt koosluse püsimisele, aga see-eest *L. crispatus* domineerivad kooslused on üsna stabiilsed. *L. iners* domineerivad kooslused on enamasti väga varieeruva bakterite liigilise koosseisu, stabiilsuse ja pH väärtustega, aga samas on *L. iners* ise tupemikrobiotas väga püsiv ka keskkonnatingimuste muutumisel, mida on näidatud mitmetes varasemates töödes (Jespers *et al.*, 2012; Gajer *et al.*, 2012; Srinivasan *et al.*, 2012). Lopes dos Santos Santiago jt. (2012) pikaajalises uuringus selgus, et *L. crispatus* kõrge kontsentratsioon proovides, tagab piisava H₂O₂ tootmise ja kaitse tupe ökosüsteemis. Praeguses uurimisrühmas oli 13 naise proovides *L. crispatus* kontsentratsioon üle 1x10⁹ geenikoopiat/ml, neljal naisel (>2x10¹⁰ geenikoopiat/ml) püsis *L. crispatus* domineeriv kooslus ka vahekorrajärgselt.

Ureaplasmade määramisel qPCR meetodil leiti, et keskmine *U. parvum* geenikoopiate arv naiste tupe mikrobiotas pisut tõusis vahekorrajärgselt, samas kui *U. urealyticum* vähenes. Pooltel naistel oli *U. urealyticum* geen kvantifitseeritav vähemalt ühes proovis, kuid ainult 14 % mõlemas proovis. *U. parvum* oli oluliselt stabiilsem – tema geen oli määratav samuti pooltel naistel, kuid sealjuures nii enne kui ka pärast vahekorda võetud proovis. Kogu koosluse 16S rRNA hulgast moodustasid ureaplasmad väga väikese osa (enamasti <1 %). Siiski oli kahes vahekorrajärgses proovis *U. parvum* liigi osakaal suurem (vastavalt 2 % ja 4 %). Need arvud on veidi kõrgemad kui Gupta jt töös (2009), kus külvipõhiste meetoditega isoleeriti 38 % seletamatu viljatusega naistelt erinevaid mükoplasmasid, enamasti *U. urealyticum*, võrreldes 12 % viljakate naistega. See näitas, et ureaplasmasid esineb rohkem viljatutel kui viljakatel naistel. Mehhikos läbi viidud uuringus leiti iga neljanda terve raseda naise tupeproovist *U. urealyticum* (Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2011). *U. parvum* tuvastati lausa pooltel tervetel jaapanlannadel (Kataoka *et al.*, 2006). Ühes teises Jaapanis läbiviidud uuringus määrati vähem kui poolte tervete naiste tupeproovides *U. parvum* ja igal kümnendal *U. urealyticum*

(Yamazaki *et al.*, 2012). Tervete Eesti naiste tupe mikrobioota uuringu järgi leidis 41 % proovides *Ureaplasma* liike (Drell *et al.*, 2013). Ureaplasma leidmine tervete ja viljakate naiste proovidest viitab sellele, et nad on genitaaltrakti kommensaalid, kuid teatud tingimustel võivad erinevad liigisisised tüved põhjustada probleeme viljastumise ja raseduse püsimisega. *U. parvum* serovar 3 ja 6 puhul on näidatud, et pinnaantigeeni (MBA) varieeruvus on seotud nende patogeensuse ja probleemidega raseduse püsimisel (Knox *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 2013).

Viljatute paaride ühegi mehe spermaproovist ei olnud meie uuringus *U. urealyticum* UreG geen kvantifitseeritav ja ainult kolmest terve mehe proovist (14 %) oli *U. parvum* määratav. See tulemus, et prostatiidiga meeste spermaproovides ei tuvastatud *Ureaplasma* spp., on vastupidine varasemate leidudega Eesti uuritavatel (Mändar *et al.*, 2005; Türk *et al.*, 2010), kus *U. parvum* esines palju sagedamini prostatiidiga kui tervete meeste spermast. Teiste uurijate andmetel on 16 % viljatute meeste spermast tuvastatud *U. urealyticum* (Virecoulon *et al.*, 2005), ühes teises uuringus leiti 15 % viljatute meeste spermast *U. urealyticum* ja 4 % *U. parvum* (Gdoura *et al.*, 2007).

Käesolevas töös on osaliselt kasutatud Borovkova ja kaasautorite (2011) uuringuga samade viljatute paaride proove. Nende poolt avaldatud tulemustest selgus, et viljatute paaride uuringus osalenud 59 % naiste tupemikrobiotas leidis *U. parvum*, mis on veidi rohkem, kui praeguses proovide rühmas (52 %). See on hea kokkulangevus, kuna uurimisrühmad täpselt ei kattu. Samas oli eelnevas töös kolmandikul eesnäärme põletikuga mehe ja kolmandikul terve mehe naise tupeproovides ka *U. urealyticum* tuvastatav. Käesolevas ja eelnevas töös on kasutatud erinevaid DNA eraldamise meetodeid ja DNA amplifikatsioonil erinevaid primereid, mis võivad olla tulemuste erinevuse põhjusteks.

Meessuguteedes on laktobatsille uuritud suhteliselt vähe. Varem on *Lactobacillus* spp. leitud alla 60 % tervete meeste ja kolmandikul kroonilise prostatiidiga meeste spermast (Ivanov *et al.*, 2009). Käesolevas töös uuritud meeste spermaproovides olid *Lactobacillus* spp. väga levinud, *L. iners* oli qPCR meetodiga kvantifitseeritav vähem kui pooltes põletikulistes ja tervetes proovides ning *L. crispatus* samuti, kuid tervetes spermaproovides veidi rohkem kui prostatiidiga proovides. Sekvencerimise tulemuste järgi leidis *L. iners* ja *L. crispatus* lausa kõikides proovides. Borovkova ja tema kaasautorite töös (2011) ei õnnestunud tervete ega prostatiidi haigete meeste

spermaproovidest ühtegi *Lactobacillus* liiki kasvatada. Seega võib oletada, et meessuguteede laktobatsillid on põhiosas tavameetoditega mittekultiveeritavad.

Antud töös ei leitud statistiliselt olulist seost leukotsütoospermia ja suunatuult uuritud bakterite (*Ureaplasma* spp., *Lactobacillus* spp.) arvukuse ega osakaalude vahel. Samas olid meie uurimisgrupid ka suhteliselt väikesed, põletikulise prostatiidiga mehi oli vaid 5. Sarnase tulemuseni, et sperma bakterikoosluse ja leukotsütoospermia ($>10^6$ leukotsüüti/ml) vahel ei ole seost, on jõudnud ka mitmed varasemad uurijad (Cottell *et al.*, 2000; Virecoulon *et al.*, 2005). Vastupidiselt sellele on teistes töödes leitud, et prostatiidi haigete meeste sperma leukotsütoospermia ja isoleeritud bakteriliikide arvu vahel ning leukotsütoospermia ja kogu mikroorganismide hulga ning spektri vahel siiski on seos. Prostatiidiga meeste spermast on võrreldes tervete meestega isoleeritud rohkem streptokokke, enterokokke, korüünebaktereid, koliformseid baktereid, peptostreptokokke, *Bacteroides ureolyticus*, *Prevotella* sp., bifidobaktereid jt (Punab *et al.*, 2003; Korrovits *et al.*, 2006; Türk *et al.*, 2010). Siiski leiti käesolevas uuringus sekveneerimise järgi eesnäärme põletikuga meeste spermast rohkem *Porphyromonas* spp., *Flavobacteriaceae* spp., *Enterobacteriaceae* sp., *Prevotella* spp., *Bacteroides ureolyticus*, *Streptococcus* spp., *Sphingobacteriales* sp. järjestusi.

Viljatute meeste sperma mikrobiotat iseloomustati esmakordselt 16S rRNA fragmentide amplikonide järjestamise abil. Mitmekesise koosseisuga kooslustes leidis enim *Lactobacillus* spp., *Flavobacterium* sp., *G. vaginalis*, *Porphyromonas* spp., *Enterobacteriaceae* sp., *Prevotella* spp. jt järjestusi. Keskmiselt veerandi kõikidest spermaproovis olevatest järjestustest moodustasid laktobatsillide omad (enamasti *L. iners* ja *L. crispatus*). Need tulemused erinevad oluliselt varasematest uuringutest, kus on viljatute meeste sperma mikroobikoosluse iseloomustamiseks kasutatud Sangeri sekveneerimist. Jarvi ja kaasautorite (1996) uuringus leiti enim *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Eubacterium*, *Corynebacterium* perekondade liikide järjestusi. Ühes teises uuringus olid levinuimad *Peptoniphilus*, *Anaerococcus*, *Finegoldia*, *Peptostreptococcus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus* jt (Kiessling *et al.*, 2008). Käesolevas töös näitasid sekveneerimise tulemused *Lactobacillus* ja *Flavobacterium* järjestuste kõige suuremat osakaalu viljatute paaride meeste spermast, varasemalt on laktobatsillide hulk spermaproovides väiksem olnud ja seni ei ole *Flavobacterium* perekonna liike spermast üldse määratud.

Antud töö puuduseks on viljakate paaride kontrollgrupi puudumine. Seda tüüpi uurimus on korralduslikult väga keerukas ning tervetel paaridel ei ole motivatsiooni osalemiseks. Samas olid meie uuringu tupeproovid kõik ühes menstruaaltsükli faasis võetud (6.-8. tsükli päeval) ning seega on omavahel hästi võrreldavad.

JÄRELDUSED

- Enamikul naistest domineerivad tupe mikrobiootas laktobatsillid, üksikutes kooslustes domineerivad teised mikroobid (*G. vaginalis*, *Veillonella* sp.).
- Spermaproovide mikroobikooslused on mitmekesised ja erinevad omavahel, kuid laktobatsillid moodustavad keskmiselt veerandi kooslusest. Mõned mikroorganismid seostuvad eesnäärmepõletikuga positiivselt (*Enterobacteriaceae* sp., *Prevotella* spp., *Bacteroides ureolyticus*, *Streptococcus* spp., *Sphingobacteriales* sp.), teised negatiivselt (*Fingoldia* sp., *A. vaginae*, *Curvibacter* sp., *Corynebacterium seminale*), kuid uurimigrühm on liiga väike, et teha olulisi järeldusi terve ja eesnäärme põletikuga rühma vaheliste koosluse erinevuste kohta.
- Seksuaalvahekord mõjutab tupemikrobiootat, vähendades oluliselt *L. crispatus* osakaalu koosluses, paremini püsivad kooslused, kus domineerib *L. iners*. Vahekorrajärgselt suureneb (fakultatiivsete) anaeroobide (*G. vaginalis*, *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.) hulk.
- Ureaplasmad on leitavad iga teise viljatu paari naise tupeproovis, sealjuures on *U. parvum* püsiv, kuid *U. urealyticum* suhteliselt ebapüsiv. *U. parvum* arvukus kasvab vahekorrajärgselt. Samal ajal esineb meestel ureaplasmasid oluliselt vähem – *U. urealyticum* ei ole määratav ning *U. parvum* esineb vaid kuuendikul meestest.

KOKKUVÕTE

Viljatusega on seostatud mitmete bakteriliikide esinemist ning mikroökoloogilise tasakaalu häireid suguteedes. Kuna viljatus on seotud nii nais- kui ka meespartneriga, on vajalik nende paralleelne uuring, mis käsitleb seksuaalvahekorra otsese mõju hindamist naise genitaaltraktile.

Käesolevas töös käsitleti mees- ja naissuguteede mikrobioota seisundit viljatutel paaridel 16S rRNA fragmentide amplikonide järjestamise tulemuste alusel ning järgnevalt selgitati kvantitatiivse PCR abil kahe ureaplasma liigi (*U. urealyticum*, *U. parvum*) ja kahe potentsiaalselt kaitset pakkuva laktobatsilli liigi (*L. iners*, *L. crispatus*) hulka ja olemasolu, samuti nende muutusi seoses seksuaalvahekorraga. Uuringus osalesid 5 põletikulise prostatiidiga (leukotsütospermiaga) ja 16 leukotsütospermiata meest ning nende naispartnerid.

Naiste tupe mikrobioota koosnes põhiliselt *Lactobacillus* perekonna liikidest (kõige arvukamalt *L. iners* ja *L. crispatus*), vähem oli *Gardnerella vaginalis*, *Veillonella* sp., *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Atopobium vaginae* ja teisi baktereid. Üle poolte viljatute paaride naispartnerite tupeproovides esines vähemalt üks *Ureaplasma* spp., sagedamini *U. parvum*.

Seksuaalvahekorra tagajärjel *L. iners* ja *U. parvum* arvukus kasvas, *L. crispatus* ja *U. urealyticum* vähenes. Reeglina *L. iners* domineerivad kooslused säilisid, *L. crispatus* korral võisid kooslused püsida või muutusid *L. iners* domineerivaks. Sekveneerimise alusel esines vahekorrajärgselt rohkem *Streptococcus* spp., *Porphyromonas* spp., *Anaerococcus hydrogenalis* ja vähem *Lactobacillus* spp. (v.a *L. iners*), *A. vaginae*, *Enterobacteriaceae* sp., *Dialister* sp., *Bacteroides ureolyticum* ning *Leptotrichia amnionii* järjestusi. Koosluse Nugent'i skoor tõusis üle poolte naiste tupeproovides.

Eesnäärme põletikuga ja tervete meeste spermaproovide mikrobioota sekveneerimise tulemuste võrdlemisel selgus, et mõlemal juhul on koosluses väga levinud *Lactobacillus* spp. *Flavobacterium* sp., *G. vaginalis* ja *Porphyromonas* spp. Prostatiidi korral esineb rohkem *Enterobacteriaceae* sp., *Prevotella* spp., *Bacteroides ureolyticus*, *Streptococcus* spp., *Sphingobacteriales* sp. järjestusi ja vähem *Fingoldia* sp., *A. vaginae*, *Curvibacter* sp., *Corynebacterium seminale*. Ainult 14 % leukotsütospermiata meeste proovis oli *U. parvum* määratav ning *U. urealyticum*'i ei leitud üheski proovis.

Seega on *L. iners* ja *L. crispatus* väga levinud viljatute paaride mõlema partneri suguteede mikroobikoosluses ning *Ureaplasma* spp. esineb sagedamini naistel kui meestel. Seksuaalvahekorral on oluline mõju naise tupe mikrobiotale.

Ureaplasmas and lactobacilli in the genital tract microbiota of infertile couples and influence of sexual intercourse on vaginal microbial community

Riinu Kiiker

SUMMARY

Infertility has been associated with the presence of some bacterial species and microecological disturbances in the genital tract. Since infertility affects both partners, then it is necessary to study them in parallel and assess the direct impact of sexual intercourse on female genital tract.

In the present study the genital tract microbiota of infertile couples was profiled by sequencing the V6 region of 16S rRNA by applying Illumina paired-end protocol on HiSeq 2000 platform. Furthermore, abundance and prevalence of two ureaplasma species (*U. urealyticum*, *U. parvum*) and two potentially beneficial lactobacillus species (*L. iners*, *L. crispatus*) and their changes in relation to sexual intercourse were assessed using quantitative PCR.

Vaginal microbiota consisted mainly of *Lactobacillus* spp. (*L. iners*, *L. crispatus*), but also *Gardnerella vaginalis*, *Veillonella* sp., *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Atopobium vaginae* and others. *Ureaplasma* spp. (*U. parvum* more often than *U. urealyticum*) were present in every second vaginal microbial community.

Abundance of *L. iners* and *U. parvum* increased while that of *L. crispatus* and *U. urealyticum* abundance decreased after sexual intercourse. *L. iners* dominated communities were persistent, while *L. crispatus* dominated communities were less stable. After intercourse the prevalence of *Streptococcus* spp., *Porphyromonas* spp., *Anaerococcus* sp. increased and *Lactobacillus* spp. except *L. iners*, *A. vaginae*, *Enterobacteriaceae* sp., *Dialister* sp., *Bacteroides ureolyticum* and *Leptotrichia amnionii* decreased. Nugent score increased in more than half of the vaginal samples.

Bacterial communities of semen were less abundant while more diverse than the vaginal communities. *Lactobacillus* spp., *Flavobacterium* sp., *G. vaginalis* and *Porphyromonas* spp. were very common in all the semen samples. There were more *Enterobacteriaceae* sp., *Prevotella* spp., *Bacteroides ureolyticus*, *Streptococcus* spp., *Sphingobacteriales* sp.

and less *Fingoldia* sp., *A. vaginae*, *Curvibacter* sp. and *Corynebacterium seminale* in the semen samples of prostatitis patients compared to healthy males. *U. parvum* occurred only in 3 (14 %) of the samples without leukocytospermia. *U. urealyticum* was not found in any of the semen samples.

In conclusion, *L. iners* and *L. crispatus* are the most prevalent species in the genital tract microbiota of infertile couples. *Ureaplasma* spp. occurs more frequently in women than in men. Sexual intercourse has a significant influence on vaginal microbial community.

TÄNUAVALDUSED

Suure abi ja toetuse eest käesoleva töö valmimisel tänan oma juhendajaid Reet Mändarit ja Jaanis Juhansonit. Viljatutelt paaridelt saadud uurimismaterjali eest tänan TÜK Androloogiakeskuse arste dr. Margus Punab, dr. Paul Korrovits ja dr. Kristo Ausmees ning kõiki teisi androloogiakeskuse töötajaid. Täna Jens-Konrad Preemi sekveneeritud järjestuste analüüsi eest. Suured tänud Jaak Truule, Hiie Nõlvakule ja kõigile teistele heade nõuannete, suure toetuse ja igakülgse abi eest.

Uuring toimus EASi granti EU30200 toel.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Aagaard, K., Riehle, K., Ma, J., Segata, N., Mistretta, T.-A., *et al.* (2012). A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PLoS ONE*. 7(6): e36466.
- Alakomi, H. L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., Helander, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (5): 2001–2005.
- Allsworth, J. E., Peipert, J. F. (2007). Prevalence of bacterial vaginosis: 2001–2004 National Health and Nutrition Examination Survey data. *Obstet. Gynecol.* 109 (1): 114–120.
- Alpay-Karaoglu, S., Aydin, F., Kilic, S. S., Kilic, A. O. (2002). Antimicrobial activity and characteristics of bacteriocins produced by vaginal lactobacilli. *Turk. J. Med. Sci.* 33: 7–12.
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59 (1): 143–169.
- Amsel, R., Totten, P. A., Spiegel, C. A., Chen, K. C., Eschenbach, D., Holmes, K. K. (1983). Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am. J. Med.* 74 (1): 14-22.
- Antonio, M. A., Hawes, S. E., Hillier, S. L. (1999). The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J. Infect. Dis.* 180 (6): 1950–1956.
- Aroutcheva, A., Gariti, D., Simon, M., Shott, S., Faro, J., Simoes, J. A., Gurquis, A., Faro, S. (2001). Defense factors of vaginal lactobacilli. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 185 (2): 375–379.
- Baker, G. C., Smith, J. J., Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods.* 55 (3): 541–555.
- Bar, T., Ståhlberg, A., Muszta, A., Kubista, M. (2003). Kinetic Outlier Detection (KOD) in real-time PCR. *Nucleic. Acids. Res.* 31 (17): e105.
- Beigi, R. H., Wiesenfeld, H. C., Hillier, S. L., Straw, T., Krohn, M. A. (2005). Factors associated with absence of H₂O₂-producing *Lactobacillus* among women with bacterial vaginosis. *J. Infect. Dis.* 191 (6): 924–929.

- Berg, T. G., Philpot, K. L., Welsh, M. S., Sanger, W. G., Smith, C. V. (1999). *Ureaplasma/mycoplasma*-infected amniotic fluid: pregnancy outcome in treated and nontreated patients. *J. Perinatol.* 19 (4): 275–277.
- Borovkova, N., Korrovits, P., Ausmees, K., Türk, S., Jöers, K., Punab, M., Mändar, R. (2011). Influence of sexual intercourse on genital tract microbiota in infertile couples. *Anaerobe.* 17 (6): 414–418.
- Boskey, E. R., Cone, R. A., Whaley, K. J., Moench, T. R. (2001). Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Hum. Reprod.* 16 (9): 1809–1813.
- Bowie, W. R., Pollock, H. M., Forsyth, P. S., Floyd, J. F., Alexander, E. R., Wang, S. P., Holmes, K. K. (1977). Bacteriology of the urethra in normal men and men with nongonococcal urethritis. *J. Clin. Microbiol.* 6 (5): 482–488.
- Bradshaw, C. S., Tabrizi, S. N., Fairley, C. K., Morton, A. N., Rudland, E., Garland, S. M. (2006). The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy. *J. Infect. Dis.* 194 (6): 828–836.
- Brotman, R. M., Klebanoff, M. A., Nansel, T. R., Andrews, W. W., Schwebke, J. R., *et al.* (2008). A longitudinal study of vaginal douching and bacterial vaginosis—a marginal structural modeling analysis. *Am. J. Epidemiol.* 168 (2): 188–196.
- Brotman, R. M. (2011). Vaginal microbiome and sexually transmitted infections: an epidemiologic perspective. *J. Clin. Invest.* 121: 4610–4617.
- Bukharin, O. V., Kuzmin, M. D., Ivanov, I. B. (2000). The role of the microbial factor in the pathogenesis of male infertility. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2: 106–110.
- Burton, J. P., Reid, G. (2002). Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. *J. Infect. Dis.* 186 (12): 1770–1780.
- Cartwright, C. P., Lembke, B. D., Ramachandran, K., Body, B. A., Nye, M. B., Rivers, C. A., Schwebke, J. R. (2012). Development and validation of a semiquantitative, multitarget PCR assay for diagnosis of bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* 50 (7): 2321–2329.
- Chambers, C. V., Shafer, M. A., Adger, H., Ohm-Smith, M., Millstein, S. G., Irwin, C. E. Jr., Schachter, J., Sweet, R. (1987). Microflora of the urethra in adolescent boys:

- relationships to sexual activity and nongonococcal urethritis. *J. Pediatr.* 110 (2): 314–321.
- Cherpes, T. L., Meyn, L. A., Krohn, M. A., Lurie, J. G., Hillier, S. L. (2003). Association between acquisition of herpes simplex virus type 2 in women and bacterial vaginosis. *Clin. Infect. Dis.* 37 (3): 319–325.
- Cherpes, T. L., Hillier, S. L., Meyn, L. A., Busch, J. L., Krohn, M. A. (2008). A delicate balance: risk factors for acquisition of bacterial vaginosis include sexual activity, absence of hydrogen peroxide-producing lactobacilli, black race, and positive herpes simplex virus type 2 serology. *Sex. Transm. Dis.* 35 (1): 78–83.
- Costerton, W., Veeh, R., Shirtliff, M., Pasmore, M., Post, C., Ehrlich, G. (2003). The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest.* 112 (10): 1466-1477.
- Cottell, E., Harrison, R. F., McCaffrey, M., Walsh, T., Mallon, E., Barry–Kinsella, C. (2000). Are seminal fluid microorganisms of significance or merely contaminants? *Fertil. Steril.* 74: 465–470.
- De Jong, Z., Pontonnier, F., Plante, P., Perie, N., Talazac, N., Mansat, A., Chabanon, G. (1990). Comparison of the incidence of *Ureaplasma urealyticum* in infertile men and in donors of semen. *Eur. Urol.* 18 (2): 127-131.
- Donders, G. G., Vereecken, A., Dekeersmaecker, A., Van Bulck, B., Spitz, B. (2000a). Wet mount microscopy reflects functional vaginal lactobacillary flora better than Gram stain. *J. Clin. Pathol.* 53 (4): 308-13.
- Donders, G. G., Bosmans, E., Dekeersmaecker, A., Vereecken, A., Van Bulck, B., Spitz, B. (2000b). Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 182 (4): 872–878.
- Donders, G. G., Van Bulck, B., Caudron, J., Londers, L., Vereecken, A., Spitz, B. (2000c). Relationship of bacterial vaginosis and mycoplasmas to the risk of spontaneous abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183 (2): 431–437.
- Dong, Q., Nelson, D. E., Toh, E., Diao, L., Gao, X., Fortenberry, J. D., Van der Pol, B. (2011). The microbial communities in male first catch urine are highly similar to those in paired urethral swab specimens. *PLoS ONE.* 6 (5): e19709.
- Dover, S. E., Aroutcheva, A. A., Faro, S., Chikindas, M. L. (2008). Natural antimicrobials and their role in vaginal health: a short review. *Int. J. Probiotics. Prebiotics.* 3 (4): 219–230.

- Drell, T., Lillsaar, T., Tummeleht, L., Simm, J., Aaspõllu, A., Väin, E., Saarma, I., Salumets, A., Donders, G. G., Metsis, M. (2013). Characterization of the vaginal micro- and mycobiome in asymptomatic reproductive-age Estonian women. *PLoS ONE* 8 (1): e54379.
- Dunstan, P. K., Johnson, C. R. (2006) Linking richness, community variability, and invasion resistance with patch size. *Ecology*. 87 (11): 2842–2850.
- Döderlein, A. (1892) Das Scheidensekret und Seine Bedeutung für Das Puerperalfieber. *Zbl. Bakteriol.*11: 699.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 308 (5728): 1635–1638.
- Eloe-Fadrosh, E. A., Rasko, D. A. (2013). The human microbiome: from symbiosis to pathogenesis. *Annu. Rev. Med.* 64: 145-163.
- Eren, A. M., Zozaya, M., Taylor, C. M., Dowd, S. E., Martin, D. H., Ferris, M. J. (2011). Exploring the diversity of *Gardnerella vaginalis* in the genitourinary tract microbiota of monogamous couples through subtle nucleotide variation. *PLoS ONE*. 6 (10): e26732.
- Erenpreiss, J., Spano, M., Erenpreisa, J., Bungum, M., Giwercman, A. (2006). Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian. J. Androl.* 8 (1): 11–29.
- Eschenbach, D. A., Davick, P. R., Williams, B. L., Klebanoff, S. J., Young-Smith, K., Critchlow, C. M., Holmes, K. K. (1989). Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women with bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* 27 (2): 251-256.
- Eschenbach, D. A., Thwinn, S. S., Patton, D. L., Hooton, T. M., Stapleton, A. E., *et al.* (2000). Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora. *Clin. Infect. Dis.* 30 (6): 901-907.
- Eschenbach, D. A., Patton, D. L., Hooton, T. M., Meier, A., Stapleton, A. E., Aura, J., Agnew, K. (2001). Effects of vaginal intercourse with and without a condom on vaginal flora and vaginal epithelium. *J. Infect. Dis.* 183 (6): 913-918.
- Falsen, E., Pascual, C., Sjoden, B., Ohlen, M., Collins, M. D. (1999). Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (1): 217–221.

- Ferris, M. J., Maszta, A., Aldridge, K. E., Fortenberry, J. D., Fidel, P. L. Jr., Martin, D. H. (2004a). Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis. *BMC Infect. Dis.* 4: 5.
- Ferris, M. J., Maszta, A., Martin, D. H. (2004b). Use of species-directed 16S rRNA gene PCR primers for detection of *Atopobium vaginae* in patients with bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* 42 (12): 5892–5894.
- Ferris, M. J., Norori, J., Zozaya-Hinchliffe, M., Martin, D. H. (2007). Cultivation-independent analysis of changes in bacterial vaginosis flora following metronidazole treatment. *J. Clin. Microbiol.* 45 (3): 1016–1018.
- Fethers, K., Twin, J., Fairley, C. K., Fowkes, F. J. I., Garland, S. M., *et al.* (2012). Bacterial vaginosis (BV) candidate bacteria: Associations with BV and behavioural practices in sexually-experienced and inexperienced women. *PLoS ONE.* 7 (2): e30633.
- Forney, L. J., Zhou, X., Brown, C. J. (2004). Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Curr. Opin. Microbiol.* 7 (3): 210–220.
- Forney, L. J., Foster, J. A., Ledger, W. (2006). The vaginal flora of healthy women is not always dominated by *Lactobacillus* species. *J. Infect. Dis.* 194 (10): 1468–1469.
- Fowler, J. E. (1981). Infections of the male reproductive tract and infertility: a selected review. *J. Androl.* 2 (3): 121–131.
- Fredricks, D. N., Fiedler, T. L., Marrazzo, J. M. (2005). Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N. Engl. J. Med.* 353: 1899-1911.
- Fredricks, D. N., Fiedler, T. L., Thomas, K. K., Mitchell, C. M., Marrazzo, J. M. (2009). Changes in vaginal bacterial concentrations with intravaginal metronidazole therapy for bacterial vaginosis as assessed by quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* 47 (3): 721–726.
- Gajer, P., Brotman, R. M., Bai, G., Sakamoto, J., Schütte, U. M. E., Zhong, X., *et al.* (2012). Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci. Transl. Med.* 4 (132):132ra52.
- Gardner, H. L., Dukes, C. D. (1955). *Haemophilus vaginalis* vaginitis. A newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 69 (5): 962-976.
- Gdoura, R., Kchaou, W., Chaari, C., Znazen, A., Keskes, L., Rebai, T., Hammami, A. (2007). *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* infections and semen quality of infertile men. *BMC Infect. Dis.* 7: 129.

- Gdoura, R., Kchaou, W., Ammar-Keskes, L., Chakroun, N., Sellemi, A., Znazen, A., Rebai, T., Hammami, A. (2008). Assessment of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, and *Mycoplasma genitalium* in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. *J. Androl.* 29 (2): 198–206.
- Gibbs, R. S. (1993). Chorioamnionitis and bacterial vaginosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 169 (2): 460–462.
- Graver, M. A., Wade, J. J. (2011). The role of acidification in the inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by vaginal lactobacilli during anaerobic growth. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 10: 8.
- Grice, E. A., Kong, H. H., Conlan, S., Deming, C. B., Davis, J., Young, A. C., *et al.* (2009). Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science.* 324 (5931): 1190–1192.
- Gupta, K., Stapleton, A. E., Hooton, T. M., Roberts, P. L., Fennell, C. L., Stamm, W. E. (1998). Inverse association of H₂O₂-producing lactobacilli and vaginal *Escherichia coli* colonization in women with recurrent urinary tract infections. *J. Infect. Dis.* 178 (2): 446–450.
- Gupta, A., Gupta, A., Gupta, S., Mittal, A., Chandra, P., Gill, A. K. (2009). Correlation of mycoplasma with unexplained infertility. *Arch. Gynecol. Obstet.* 280 (6): 981-985.
- Haggerty, C. L., Hillier, S. L., Bass, D. C., Ness, R. B., PID Evaluation and Clinical Health study investigators. (2004). Bacterial vaginosis and anaerobic bacteria are associated with endometritis. *Clin. Infect. Dis.* 39 (7): 990–995.
- Haggerty, C. L., Totten, P. A., Astete, S. G., Ness, R. B. (2006). *Mycoplasma genitalium* among women with nonconococcal, nonchlamydial pelvic inflammatory disease. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2006: 30184.
- Haggerty, C. L., Taylor, B. D. (2011). *Mycoplasma genitalium*: an emerging cause of pelvic inflammatory disease. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2011: 959816.
- Hao, X., Jiang, R., Chen, T. (2011). Clustering 16S rRNA for OTU prediction: a method of unsupervised Bayesian clustering. *Bioinformatics.* 27: 611-618.
- Hawes, S. E., Hillier, S. L., Benedetti, J., Stevens, C. E., Koutsky, L. A., Wolner-Hanssen, P., Holmes, K. K. (1996). Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections. *J. Infect. Dis.* 174 (5): 1058–1063.

- Hay, P. E., Lamont, R. F., Taylor-Robinson, D., Morgan, D. J., Ison, C., Pearson, J. (1994). Abnormal bacterial colonisation of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage. *BMJ*. 308 (6924): 295–298.
- Hay, P. E., Ugwumadu, A., Chowns, J. (1997). Sex, thrush and bacterial vaginosis. *Int. J. STD. AIDS*. 8 (10): 603–608.
- Hay, P. E. (2000). Recurrent bacterial vaginosis. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2: 506-12.
- Hay, P. E. (2004). Bacterial vaginosis and miscarriage. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17 (1): 41–44.
- Hellberg, D., Nilsson, S., Mardh, P. A. (2000). Bacterial vaginosis and smoking. *Int. J. STD. AIDS*. 11 (9): 603–606.
- Hernandez-Rodriguez, C., Romero-Gonzalez, R., Albani-Campanario, M., Figueroa-Damian, R., Meraz-Cruz, N., Hernandez-Guerrero, C. (2011). Vaginal microbiota of healthy pregnant Mexican women is constituted by four *Lactobacillus* species and several vaginosis-associated bacteria. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2011: 851485.
- Hess, M., Sczyrba, A., Egan, R., Kim, T. W., Chokhawala, H., Schroth, G., *et al.* (2011). Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. *Science*. 331 (6016): 463–467.
- Hickey, R. J., Zhou, X., Pierson, J. D., Ravel, J., Forney, L. J. (2012). Understanding vaginal microbiome complexity from an ecological perspective. *Transl. Res.* 160 (4): 267-282.
- Hillier, S. L., Krohn, M. A., Rabe, L. K., Klebanoff, S. J., Eschenbach, D. A. (1993). The normal vaginal flora, H₂O₂-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clin. Infect. Dis.* 16 (4): S273-S281.
- Hillier, S. L., Nugent, R. P., Eschenbach, D. A., Krohn, M. A., Gibbs, R. S., *et al.* (1995). Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *N. Engl. J. Med.* 333 (26): 1737-1742.
- Howe, L., Wiggins, R., Soothill, P. W., Millar, M. R., Horner, P. J., Corfield, A. P. (1999). Mucinas and sialidase activity of the vaginal microflora: implications for the pathogenesis of preterm labour. *Int. J. STD. AIDS*. 10 (7): 442–447.
- Hugenholtz, P., Pace, N. R. (1996). Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends. Biotechnol.* 14(6): 190–197.

- Hugenholtz, P., Goebel, B. M., Pace, N. R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180 (18): 4765–4774.
- Hummelen, R., Fernandes, A. D., Macklaim, J. M., Dickson, R. J., Chagalucha, J., Gloor, G. B., Reid, G. (2010). Deep sequencing of the vaginal microbiota of women with HIV. *PLoS ONE.* 5 (8): e12078.
- Hutchinson, K. B., Kip, K. E., Ness, R. B. (2007). Condom use and its association with bacterial vaginosis and bacterial vaginosis-associated vaginal microflora. *Epidemiology.* 18 (6): 702–708.
- Hyman, R. W., Fukushima, M., Diamond, L., Kumm, J., Giudice, L. C., Davis, R. W. (2005). Microbes on the human vaginal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102 (22): 7952–7957.
- Ivanov, I. B., Kuzmin, M. D., Gritsenko, V. A. (2009). Microflora of the seminal fluid of healthy men and men suffering from chronic prostatitis syndrome. *Int. J. Androl.* 32 (5): 462-467.
- Janeway, C. A. Jr., Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 197-216.
- Jarvi, K., Lacroix, J. M., Jain, A., Dumitru, I., Heritz, D., Mittelman, M. W. (1996). Polymerase chain reaction-based detection of bacteria in semen. *Fertil. Steril.* 66: 463–467.
- Jaspers, V., Menten, J., Smet, H., Poradosú, S., Abdellati, S., Verhelst, R., Hardy, L., Buvé, A., Crucitti, T. (2012). Quantification of bacterial species of the vaginal microbiome in different groups of women, using nucleic acid amplification tests. *BMC Microbiol.* 12: 83.
- Kashket, E. R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Lett.* 46 (3): 233–244.
- Kataoka, S., Yamada, T., Chou, K., Nishida, R., Morikawa, M., Minami, M., Yamada, H., Sakuragi, N., Minakami, H. (2006). Association between preterm birth and vaginal colonization by mycoplasmas in early pregnancy. *J. Clin. Microbiol.* 44 (1): 51-55.
- Kermes, K., Punab, M., Lõivukene, K., Mändar, R. (2003). Anaerobic seminal fluid microflora in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome patients. *Anaerobe.* 9 (3): 117–123.

- Kiessling, A. A., Desmarais, B. M., Yin, H. Z., Loverde, J., Eyre, R. C. (2008). Detection and identification of bacterial DNA in semen. *Fertil. Steril.* 90 (5): 1744–1756.
- Kjaergaard, N., Hansen, D., Hansen, E. S., Schoenheyder, H. C., Ulbjerg, N., Madsen, H. (1997). Pyospermia and preterm, prelabor, rupture of membranes. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 76 (6): 528–531.
- Knox, C. L., Allan, J. A., Allan, J. M., Edirisinghe, W. R., Stenze, D. L., Lawrence, F. L., Purdie, D. M., Timm, P. S. (2003). *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* are detected in semen after washing before assisted reproductive technology procedures. *Fertil. Steril.* 80 (4): 921-929.
- Knox CL, Dando SJ, Nitsos I, Kallapur SG, Jobe AH, Payton, D., Moss, T. J., Newnham, J. P. (2010). The severity of chorioamnionitis in pregnant sheep is associated with in vivo variation of the surface exposed multiple banded antigen of *Ureaplasma parvum*. *Biol. Reprod.* 83 (3): 415–426.
- Kong, F., James, G., Ma, Z., Gordon, S., Bin, W., Gilbert, G. L. (1999). Phylogenetic analysis of *Ureaplasma urealyticum*-support for the establishment of a new species, *Ureaplasma parvum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (4): 1879–1889.
- Korrovits, P., Punab, M., Türk, S., Mändar, R. (2006). Seminal microflora in asymptomatic inflammatory (NIH IV category) prostatitis. *Eur. Urol.* 50 (6): 1338–1344.
- Kurki, T., Sivonen, A., Renkonen, O., Savia, E., Ylikorkala, O. (1992). Bacterial vaginosis in early pregnancy and pregnancy outcome. *Obstet. Gynecol.* 80 (2): 173–177.
- Lai, S. K., Hida, K., Shukair, S., Wang, Y. Y., Figueiredo, A., Cone, R., Hope, T. J., Hanes, J. (2009). Human immunodeficiency virus type 1 is trapped by acidic but not by neutralized human cervicovaginal mucus. *J. Virol.* 83 (21): 11196–11200.
- Larsen, B., Monif, G. R. G. (2001). Understanding the bacterial flora of the female genital tract. *Clin. Infect. Dis.* 32: e69-77.
- Lapp, E., Borovkova, N., Oopkaup, H., Štšepetova, J., Ahelik, A., Oolep, S., Mändar, R. (2012). Hydrogen peroxide production by vaginal lactobacilli depends on species and study group. 35th International Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease (SOMED). Valencia, Spain. 15-17.05.2012.
- Lapp, E., Ahelik, A., Hütt, P., Smidt, I., Oopkaup, H., Štšepetova, J., Mändar, R. (2013). Functional properties of vaginal lactobacilli strains are highly variable. *ECCMID* –

European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Berlin, Germany. 27-30.04.2013.

- Leitch, H., Kiss, H. (2006). Asymptomatic bacterial vaginosis and intermediate flora as risk factors for adverse pregnancy outcome. *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 21 (3): 375–390.
- Leopold, S. (1953). Heretofore undescribed organism isolated from genitourinary system. *U. S. Armed. Forces. Med. J.* 4 (2): 263-266.
- Ling, Z., Kong, J., Liu, F., Zhu, H., Chen, X., Wang, Y., Li, L., Nelson, K. E., Xia, Y., Xiang, C. (2010). Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. *BMC Genomics.* 11: 488.
- Linhares, I. M., Summers, P. R., Larsen, B., Giraldo, P. C., Witkin, S. S. (2010). Contemporary perspectives on vaginal pH and lactobacilli. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 203: 1.e1–5.
- Llahf-Camp, J. M., Rai, R., Ison, C., Regan, L., Taylor-Robinson, D. (1996). Association of bacterial vaginosis with a history of second trimester miscarriage. *Hum. Reprod.* 11 (7): 1575–1578.
- Lopes dos Santos Santiago, G., Tency, I., Verstraelen, H., Verhelst, R., Trog, M., Temmerman, M., Vancoillie, L., Decat, E., Cools, P., Vaneechoutte, M. (2012). Longitudinal qPCR Study of the Dynamics of *L. crispatus*, *L. iners*, *A. vaginae*, (Sialidase Positive) *G. vaginalis*, and *P. bivia* in the Vagina. *PLoS ONE.* 7 (9): e45281.
- Ma, B., Forney, L. J., Ravel, J. (2012). Vaginal microbiome: rethinking health an disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 66: 371-389.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. P. (1997). *Brock Biology of Microorganisms.* Simon & Schuster: Upper Saddle River, NJ, USA.
- Maeda, S. I., Tamaki, M., Kojima, K., Yoshida, T., Ishiko, H., Yasuda, M., Deguchi, T. (2001). Association of *Mycoplasma genitalium* persistence in the urethra with recurrence of non-gonococcal urethritis. *Sex. Transm. Dis.* 28 (8): 472–476.
- Magnanelli, S., Wilks, M., Boake, S., Tabaqchalli, S., Wass, A. H. (1990). Quantitative bacteriology of seminal fluid in health and disease. *Microb. Ecol. Health. Dis.* 3: 129–137.
- Manhart, L. E., Critchlow, C. W., Holmes, K. K., Dutro, S. M., Eschenbach, D. A., Stevens, C. E., Totten, P. A. (2003). Mucopurulent cervicitis and *Mycoplasma genitalium*. *J. Infect. Dis.* 187 (4): 650–657.

- Martin, H. L., Richardson, B. A., Nyange, P. M., Lavreys, L., Hillier, S. L., *et al.* (1999). Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J. Infect. Dis.* 180 (6): 1863-1868.
- Mcdonald, D., Price, M.N., Goodrich, J., Nawrocki, E.P., DeSantis, T.Z., Probst, A., Andersen, G.L., Knight, R., Hugenholtz, P. (2011). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* 6 (3): 610–618.
- Menard, J. P., Fenollar, F., Henry, M., Bretelle, F., Raoult, D. (2008). Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis. *Clin. Infect. Dis.* 47 (1): 33-43.
- Montagnini Spaine, D., Mamizuka, E. M., Pereira Cedenho, A., Srougi, M. (2000). Microbiologic aerobic studies on normal male urethra. *Urology.* 56 (2): 207–210.
- Moretti, E., Capitani, S., Figura, N., *et al.* (2009) The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *J. Assist. Reprod. Genet.* 26: 47–56.
- Morison, L., Ekpo, G., West, B., Demba, E., Mayaud, P., Coleman, R., Bailey, R., Walraven, G. (2005). Bacterial vaginosis in relation to menstrual cycle, menstrual protection method, and sexual intercourse in rural Gambian women. *Sex. Transm. Infect.* 81 (3): 242–247.
- Mändar, R., Raukas, E., Türk, S., Korrovits, P., Punab, M. (2005). Mycoplasmas in semen of chronic prostatitis patients. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 39 (6): 479-482.
- Mändar, R., Truu, J., Borovkova, N., Punab, M. (2012). Effect of sexual intercourse on vaginal microbiome of infertile couples' women (data of Illumina sequencing). 52nd ICAAC: Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. USA, San Francisco. 9.-12.09.2012.
- Mändar, R. (2013). Microbiota of male genital tract: Impact on the health of man and his partner. *Pharmacol. Res.* 69 (1): 32-41.
- Mändar, R., Borovkova, N., Lapp, E., Korrovits, P., Punab, M., Metspalu, A., Krjutškov, K., Nõlvak, H., Preem, J., Oopkaup, K., Salumets, A., Truu, J. (2013). Seminal microbiome in male partners of infertile couples. *Microbiome and Host Health.* Lisbon, Portugal. 12-14.05.2013.
- Naber, K. G., Weidner, W. (2000). Chronic prostatitis – an infectious disease? *J. Antimicrob. Chemother.* 46 (2): 157–161.

- Nelson, D. E., Dong, Q., Van der Pol, B., Toh, E., Fan, B., Katz, B. P., Mi, D., Rong, R., Weinstock, G. M., Sodergren, E., Fortenberry, J. D. (2012). Bacterial communities of the coronal sulcus and distal urethra of adolescent males. *PLoS ONE*. 7 (5): e36298.
- Ness, R. B., Kip, K. E., Hillier, S. L., Soper, E. D., Stamm, C. A., Sweet, R. L., Rice, P., Richte, H. E. (2005). A cluster analysis of bacterial vaginosis-associated microflora and pelvic inflammatory disease. *Am. J. Epidemiol.* 162 (6): 585-590.
- Nugent, R. P., Krohn, M. A., Hillier, S. L. (1991). Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J. Clin. Microbiol.* 29 (2): 297-301.
- Oakeshott, P., Hay, P., Hay, S., Steinke, F., Rink, E., Kerry, S. (2002). Association between bacterial vaginosis or chlamydial infection and miscarriage before 16 weeks' gestation: prospective community based cohort study. *BMJ*. 325 (7376): 1334.
- Oakley, B. B., Fiedler, T. L., Marrazzo, J. M., Fredricks, D. N. (2008). Diversity of human vaginal bacterial communities and associations with clinically defined bacterial vaginosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (15): 4898-4909.
- Ochman, H., Jones, I. B. (2000). Evolutionary dynamics of full genome content in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 19 (24): 6637-6643.
- O'Hanlon, D. E., Moench, T. R., Cone, R. A. (2011). In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. *BMC Infect. Dis.* 11: 200.
- Oscariz, J. C., Pisabarro, A. G. (2001). Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int. Microbiol.* 4 (1): 13-19.
- Parameswaran, P., Jalili, R., Tao, L., Shokralla, S., Gharizadeh, B., Ronaghi, M., Fire, A. Z. (2007). A pyrosequencing-tailored nucleotide barcode design unveils opportunities for large-scale sample multiplexing. *Nucleic. Acids. Res.* 35 (19): e130.
- Pavlova, S. I., Kilic, S. S., So, J. S., Nader-Macias, M. E., Simoes, J. A., Tao, L. (2002). Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *J. Appl. Microbiol.* 92 (3): 451-459.
- Pellati, D., Mylonakis, I., Bertoloni, G., *et al.* (2008). Genital tract infections and infertility. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 140: 3-11.
- Peters, S. E., Beck-Sague, C. M., Farshy, C. E., Gibson, I., Kubota, K. A., Solomon, F., Morse, S. A., Sievert, A. J., Black, C. M. (2000). Behaviors associated with *Neisseria*

- gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis*: cervical infection among young women attending adolescent clinics. *Clin. Pediatr.* 39 (3): 173–177.
- Priestley, C. F. J., Jones, B. M., Dhar, J., Goodwin, L. (1997). What is normal vaginal flora? *Genitourin. Med.* 73 (1): 23-28.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., Glöckner, F.O. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic. Acids. Res.* 35 (21): 7188–7196.
- Punab, M., Lõivukene, K., Kermes, K., Mändar, R. (2003). The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologia.* 35: 271-278.
- Pybus, V., Onderdonk, A. B. (1997). Evidence for a commensal, symbiotic relationship between *Gardnerella vaginalis* and *Prevotella bivia* involving ammonia: Potential significance for bacterial vaginosis. *J. Infect. Dis.* 175 (2): 406–413.
- Pybus, V., Onderdonk, A. B. (1998). A commensal symbiosis between *Prevotella bivia* and *Peptostreptococcus anaerobius* involves amino acids: Potential significance to the pathogenesis of bacterial vaginosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 22 (4): 317–327.
- Ralph, S. G., Rutherford, A. J., Wilson, J. D. (1999). Influence of bacterial vaginosis on conception and miscarriage in the first trimester: cohort study. *BMJ.* 319 (7204): 220–223.
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S., *et al.* (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108 (1): 4680–4687.
- Redondo-Lopez, V., Cook, R. L., Sobel, J. D. (1990). Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev. Infect. Dis.* 12 (5): 856–872.
- Rehewy, M. S., Hafez, E. S., Thomas, A., Brown, W. J. (1979). Aerobic and anaerobic bacterial flora in semen from fertile and infertile groups of men. *Arch. Androl.* 2 (3): 263–268.
- Robinson, J. W., Dando, S. J., Nitsos, I., Newnham, J., Polglase, G. R., *et al.* (2013). *Ureaplasma parvum* serovar 3 multiple banded antigen size variation after chronic intra-amniotic infection/colonization. *PLoS ONE.* 8 (4): e62746.

- Rodriguez, J. M., Collins, M. D., Sjoden, B., Falsen, E. (1999). Characterization of a novel *Atopobium* isolate from the human vagina: description of *Atopobium vaginae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (4): 1573-1576.
- Rogosa, M., Sharpe, M. E. (1960). Species differentiation of human vaginal lactobacilli. *J. Gen. Microbiol.* 23: 197–201.
- Romero, R., Erez, O., Espinoza, J. (2005). Intrauterine infection, preterm labor, and cytokines. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 12 (7): 463-465.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. B., Moorman, A. F. M. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic. Acids. Res.* 37 (6): e45.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., *et al.* (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-45 independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (23): 7537-7541.
- Schwebke, J. R., Richey, C. M., Weiss, H. L. (1999). Correlation of behaviors with microbiologic changes in vaginal flora. *J. Infect. Dis.* 180 (5): 1632-1636.
- Scott, T. G., Curran, B., Smyth, C. J. (1989). Electron microscopy of adhesive interactions between *Gardnerella vaginalis* and vaginal epithelial cells, McCoy cells and human red blood cells. *J. Gen. Microbiol.* 135 (3): 475-80.
- Sewankambo, N., Gray, R. H., Wawer, M. J., Paxton, L., McNaim, D., *et al.* (1997). HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet.* 350 (9077): 546-550.
- Sharma, R. K., Pasqualotto, A. E., Nelson, D. R., Thomas, A. J., Agarwal, A. (2001). Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J. Androl.* 22 (4): 575–583.
- Shi, Y., Chen, L., Tong, J., Xu, C. (2009). Preliminary characterization of vaginal microbiota in healthy Chinese women using cultivation-independent methods. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 35 (3): 525–532.
- Shipitsyna, E., Roos, A., Datcu, R., Hallen, A., Fredlund, H., Jensen, J. S., Engstrand, L., Unemo, M. (2013). Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age—sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible? *PLoS ONE.* 8 (4): e60670.

- Simms, I., Eastick, K., Mallinson, H., Thomas, K., Gokhale, R., Hay, R., Herring, A., Rogers, P. A. (2003). Associations between *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis* and pelvic inflammatory disease. *J. Clin. Pathol.* 56 (8): 616-618.
- Sobel, J. D. (2000). Bacterial vaginosis. *Annu. Rev. Med.* 51: 349-56.
- Spear, G. T., Sikaroodi, M., Zariffard, M. R., Landay, A. L., French, A. L., Gillevet, P. M. (2008). Comparison of the diversity of the vaginal microbiota in HIV-infected and HIV-uninfected women with or without bacterial vaginosis. *J. Infect. Dis.* 198 (8): 1131-1140.
- Srinivasan, S., Liu, C., Mitchell, C. M., Fiedler, T. L., Thomas, K. K., Agnew, K. J., Marrazzo, J. M., Fredricks, D. N. (2010). Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. *PLoS ONE.* 5 (4): e10197.
- Srinivasan, S., Hoffman, N. G., Morgan, M. T., Matsen, F. A., Fiedler, T. L., *et al.* (2012). Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analysis reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PLoS ONE.* 7 (6): e37818.
- Svare, J. A., Schmidt, H., Hansen, B. B., Lose, G. (2006). Bacterial vaginosis in a cohort of Danish pregnant women: prevalence and relationship with preterm delivery, low birthweight and perinatal infections. *BJOG.* 113 (12): 1419-1425.
- Swidsinki, A., Mendling, W., Loening-Baucke, V., Ladhoff, A., Swidsinki, S., Hale, L. P., Lochs, H. (2005). Adherent biofilms in bacterial vaginosis. *Obstet. Gynecol.* 106 (5): 1013-23.
- Swidsinki, A., Mendling, W., Loening-Baucke, V., Swidsinski, S., Dörffel, Y., Scholze, J., Lochs, H., Verstraelen, H. (2008). An adherent *Gardnerella vaginalis* biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with metronidazole. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 198 (1): 97.e1-6.
- Takahashi, S., Takeyama, K., Miyamoto, S., Ichihara, K., Maeda, T., Kunishima, Y., Matsukawa, M., Tsukamoto, T. (2006). Detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Ureaplasma parvum* DNAs in urine from asymptomatic healthy young Japanese men. *J. Infect. Chemother.* 12 (5): 269-271.
- Tamrakar, R., Yamada, T., Furuta, I., Cho, K., Morikawa, M., Yamada, H., Sakuragi, N., Minakami, H. (2007). Association between *Lactobacillus* species and bacterial

- vaginosis-related bacteria, and bacterial vaginosis scores in pregnant Japanese women. *BMC Infect. Dis.* 7: 128.
- Tappenden, K. A., Deutsch, A. S. (2007). The physiological relevance of the intestinal microbiota - contributions to human health. *J. Am. Coll. Nutr.* 26 (6): 697S-83S.
- Taylor-Robinson, D. (2007). The role of mycoplasmas in pregnancy outcome. *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 21 (3): 425–438.
- Takeuchi, O., Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 140: 805-820.
- Thomas, S. (1928). Doderlein's bacillus: *Lactobacillus acidophilus*. *J. Infect, Dis.* 43 (3): 219–227.
- Torsvik, V., Ovreas, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5 (3): 240–245.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., Gordon, J. I. (2007). The Human Microbiome Project. *Nature.* 449 (7164): 804–810.
- Türk, S., Korrovits, P., Punab, M., Mändar, R. (2007). Coryneform bacteria in semen of chronic prostatitis patients. *Int. J. Androl.* 30 (2): 123-128.
- Türk, S., Kermes, K., Lõivukene, K., Raukas, E., Korrovits, P., Punab, M., Mändar, R. (2010). Sperma mikrofloora kroonilise prostatiidi korral. *Eesti Arst.* 89 (2): 83-94.
- Upadhyaya, M., Hibbard, B. M., Walker, S. M. (1984). The effect of *Ureaplasma urealyticum* on semen characteristics. *Fertil. Steril.* 41 (2): 304-308.
- Usui, R., Ohkuchi, A., Matsubara, S., Izumi, A., Watanabe, T., Suzuki, M., Minakami, H. (2002). Vaginal lactobacilli and preterm birth. *J. Perinat. Med.* 30 (6): 458–466.
- Verhelst, R., Verstraelen, H., Claeys, G., Verschraegen, G., Delanghe, J., Van Simaey, L., *et al.* (2004) Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC Microbiol.* 4: 16.
- Verstraelen, H., Verhelst, R., Claeys, G., De Backer, E., Temmerman, M., Vaneechoutte, M. (2009). Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora. *BMC Microbiol.* 9: 116.

- Verstraelen, H., Verhelst, R., Vanechoutte, M., Temmerman, M. (2010). The epidemiology of bacterial vaginosis in relation to sexual behaviour. *BMC Infect. Dis.* 10: 81.
- Virecoulon, F., Wallet, F., Fruchart-Flamenbaum, A., Rigot, J., Peers, M., Mitchell, V., Courcol, R. (2005). Bacterial flora of the low male genital tract in patients consulting for infertility. *Andrologia.* 37 (5): 160–165.
- Wang, Y., Liang, C. L., Wu, J. Q., Xu, C., Qin, S. X., Gao, E. S. (2006). Do *Ureaplasma urealyticum* infections in the genital tract affect semen quality? *Asian. J. Androl.* 8 (5): 562-568.
- Weidner, W., Wagenlehner, F. M., Marconi, M., *et al.* (2008). Acute bacterial prostatitis and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: andrological implications. *Andrologia.* 40: 105–112.
- Weissenbacher, T., Walter, C., Mylonas, I., *et al.* (2010). Interleukin-6, interleukin-10 and interleukin-12 in vaginal fluid from women with bacterial vaginosis. *Arch. Gynecol. Obstet.* 281: 77–80.
- Wiesenfeld, H. C., Hillier, S. L., Krohn, M. A., Landers, D. V., Sweet, R. L. (2003). Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin. Infect. Dis.* 36 (5): 663–668.
- Willén, M., Holst, E., Myhre, E. B., Olsson, A. M. (1996). The bacterial flora of the genitourinary tract in healthy fertile men. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 30 (5): 387–393.
- Wilson, J. D., Lee, R. A., Balen, A. H., Rutherford, A. J. (2007). Bacterial vaginal flora in relation to changing oestrogen levels. *Int. J. STD AIDS.* 18 (5): 308–311.
- Wira, C. R., Fahey, J. V., Sentman, C. L., Pioli, P. A., Shen, L. (2005). Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol. Rev.* 206: 306–335.
- 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 (3): 347-354.
- Wittemer, C., Bettahar-Lebugle, K., Ohl, J., Rongièrès, C., Viville, S., Nisand, I. (2004). Abnormal bacterial colonisation of the vagina and implantation during assisted reproduction. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 32 (2): 135–139.
- World Health Organization. (1999). Laboratory manual for examination of human semen and sperm–cervical mucus interaction, 4th edition. New York: Cambridge University Press.

- Zhou, X., Bent, S. J., Schneider, M. G., Davis, C. C., Islam, M. R., Forney, L. J. (2004). Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiol.* 150: 2565-2573.
- Zhou, X., Brown, C. J., Abdo, Z., Davis, C. C., Hansmann, M. A., Joyce, P., Foster, J. A., Forney, L. J. (2007). Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *ISME J.* 1 (2): 121–133.
- Zhou, X., Hansmann, M. A., Davis, C. C., Suzuki, H., Brown, C. J., Schütte, U., Pierson, J. D., Forney, L. J. (2010). The vaginal bacterial communities of Japanese women resemble those of women in other racial groups. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 58 (2): 169–181.
- Zozaya-Hinchliffe, M., Lillis, R., Martin, D. H., Ferris, M. J. (2010). Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* 48 (5): 1812–1819.
- Yen, S., Shafer, M. A., Moncada, J., Campbell, C. J., Flinn, S. D., Boyer, C. B. (2003). Bacterial vaginosis in sexually experienced and nonsexually experienced young women entering the military. *Obstet. Gynecol.* 102 (5): 927–933.
- Yoon, B. H., Romero, R., Lim, J. H., Shim, S. S., Hong, J. S., Shim, J. Y., Jun, J. K. (2003). The clinical significance of detecting *Ureaplasma urealyticum* by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with preterm labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 189 (4): 919-924.
- Yoshimura, K., Yoshimura, M., Kobayashi, T., Kubo, T., Hachisuga, T., Kashimura, M. (2009). Can bacterial vaginosis help to find sexually transmitted diseases, especially chlamydial cervicitis? *Int. J. STD AIDS.* 20 (2): 108-111.
- Yoshimura, K., Morotomi, N., Fukuda, K., Nakano, M., Kashimura, M., Hachisuga, T., Taniguchi, H. (2011). Intravaginal microbial flora by the 16S rRNA gene sequencing. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 205 (3): 235. e1-9.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://euro.perearstikeskus.ee/gyn/37.pdf>

<http://greengenes.lbl.gov/>

<http://rdp.cme.msu.edu/>

<http://www.arb-home.de/>

<http://www.arb-silva.de/>

LISA 1

NIH – Kroonilise prostatiidi sümptomindeks

(NIH-CPSI – National Institute of Health Chronic Prostatitis Symptom Index)

Valu või ebamugavustunne

1. Kas Teil on viimase nädala jooksul esinenud valusid või ebamugavustunnet järgmistes kehapiirkondades?

	jah	ei
a. Pärasoole ja munandite vaheline piirkond (lahkliha)	1	0
b. Munandid	1	0
c. Peenise otsas (mitte seotult kusemisega)	1	0
d. Alakõhus, alaseljas, häbeme- või põiepiirkonnas	1	0

2. Kas Teil on viimase nädala jooksul esinenud

	jah	ei
a. Valu või põletustunnet kusemisel?	1	0
b. Valu või ebamugavustunnet orgasmi (seemnepurske) ajal või selle järgselt?	1	0

3. Kui sageli on viimase nädala jooksul esinenud valusid või ebamugavustunnet mistahes

nimetatud piirkonnas?

- 0 Üldse mitte
- 1 Harva
- 2 Mõnikord
- 3 Sageli
- 4 Tavaliselt
- 5 Alati

4. Milline number kirjeldab kõige paremini Teil viimase nädala jooksul esinenud KESKMIST valu või ebamugavustunnet?

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

VALU

TUGEVAIM

PUUDUB

VÕIMALIK

VALU

Kusemine

5. Kui tihti viimase nädala jooksul olete tundnud peale kusemise lõpetamist, et põis ei tühjenenud täielikult?

- 0 Üldse mitte
- 1 Vähem kui ühel korral viiest
- 2 Vähem kui pooltel kordadest
- 3 Ligikaudu pooltel kordadel
- 4 Enam kui pooltel kordadest
- 5 Peaaegu alati

6. Kui tihti viimase nädala jooksul olete pidanud kusel käima sagedamini kui 2 tunni tagant?

- 0 Üldse mitte
- 1 Vähem kui ühel korral viiest
- 2 Vähem kui pooltel kordadest
- 3 Ligikaudu pooltel kordadel
- 4 Enam kui pooltel kordadest
- 5 Peaaegu alati

Sümptomite (vaevuste) mõju

7. Mil määral on viimase nädala jooksul esinenud vaevused takistanud Teie igapäevaseid tegevusi?

- 0 Üldse mitte
- 1 Väga vähe
- 2 Mõnevõrra
- 3 Oluliselt

8. Kui palju olete viimase nädala jooksul mõelnud oma vaevustele?

- 0 Üldse mitte
- 1 Väga vähe
- 2 Mõnevõrra
- 3 Palju

Elukvaliteet

9. Kuidas suhtuksite sellesse, kui Teil tuleks elu lõpuni elada oma vaevustega just sellisel

kujul, nagu need esinesid viimase nädala jooksul?

- 0 Rõõmsalt
- 1 Rahulolevalt
- 2 Enam-vähem rahulolevalt
- 3 Nii ja teisiti (peaaegu võrdselt rahulolevalt ja rahulolematult)
- 4 Pigem rahulolematult
- 5 Õnnetult
- 6 Kohutav!

LISA 2

Prostatiidi küsimustik

Märkige palun hinnanguliselt, kui võrd on Teid VIIMASE NÄDALA jooksul häirinud järgmised haigusnähud (üks valik igast reast).

	Haigusnähtu ei esinenud	Haigusnäht esines				
		ei häiri elu	häirib mõnevõrra	üsna häiriv	väga häiriv	kohutav
punetus kusiti otsal	1	2	3	4	5	6
eritus kusetorust	1	2	3	4	5	6
valu, ebamugavus alaseljas	1	2	3	4	5	6
valu, ebamugavus lahklihas	1	2	3	4	5	6
valu, ebamugavus alakõhus	1	2	3	4	5	6
valu, ebamugavus pärasoole piirkonnas	1	2	3	4	5	6
valu, ebamugavus munandites	1	2	3	4	5	6
valu, ebamugavus peenises	1	2	3	4	5	6
valu, ebamugavus kusemisel	1	2	3	4	5	6
põis ei tühjene kusemisel	1	2	3	4	5	6

täielikult						
sagenenud kusemine (<2 t vahega)	1	2	3	4	5	6
kusejuga katkeb korduvalt	1	2	3	4	5	6
kusetungi ei saa edasi lükata	1	2	3	4	5	6
kusejuga on nõrk	1	2	3	4	5	6
peab punnitama kusemise alguses	1	2	3	4	5	6
järetilkumine pärast kusemist	1	2	3	4	5	6
öösel peab kusel käima	1	2	3	4	5	6
erektsioon vajub enneaegselt ära	1	2	3	4	5	6
valu seemnepurske ajal või järel	1	2	3	4	5	6
erektsiooni teke on raskenenud	1	2	3	4	5	6
spermas on verd	1	2	3	4	5	6
huvi seksi vastu on vähenenud	1	2	3	4	5	6
liigvarane seemnepurse	1	2	3	4	5	6
raske jõuda seemnepurskeni	1	2	3	4	5	6
valulikud erektsioonid	1	2	3	4	5	6
üldine nõrkustunne	1	2	3	4	5	6
kiire väsimine	1	2	3	4	5	6
töövõime langus	1	2	3	4	5	6
valu liigestes	1	2	3	4	5	6
seljavalu	1	2	3	4	5	6
peavalu	1	2	3	4	5	6
ülemäärane higistamine	1	2	3	4	5	6
unehäired	1	2	3	4	5	6
närvilisus, ärrituvus	1	2	3	4	5	6
jalgade ja käte külmetamine	1	2	3	4	5	6
valu, raskustunne jalgades	1	2	3	4	5	6

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina **Riinu Kiiker**

(sünnikuupäev: 15.06.1988)

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
„Ureaplasmad ja laktobatsillid viljatute paaride suguteede mikrobiotas ning seksuaalvahekorra mõju tupe mikroobikooslusele“,

mille juhendajad on **Reet Mändar ja Jaanis Juhanson**

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2013