



Σχολή Επιστημών Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
Χαρακτηρισμός μικροβιώματος στο μητρικό γάλα

MSc Thesis
Characterization of microbiome in breast milk



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Βιδάλη Δέσποινα
Vidali Despoina

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Χούχουλα Δήμητρα
Houhoula Dimitra

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2022



Faculty of Food Sciences
Department of Food Science and Technology

Master of Science

FOOD INNOVATION, QUALITY AND SAFETY

MSc THESIS

Characterization of microbiome in breast milk

Vidali Despoina

20003

despoina.vidali1996@hotmail.com

SUPERVISOR

Houhoula Dimitra

AIGALEO 2022

Έγινε δεκτή

Ο Διευθυντής του ΠΜΣ:

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (Master thesis) με τίτλο «**Χαρακτηρισμός μικροβιώματος στο μητρικό γάλα**» που παρουσιάστηκε από τον ή την **Βιδάλη Δέσποινα**, υποψηφίου για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Χούχουλα Δήμητρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα

Τσάκνης Ιωάννης, Καθηγητής, Μέλος επιτροπής

Κοντελής Σπυρίδων, Επίκουρος καθηγητής, Μέλος επιτροπής

Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, δηλώνω ενυπογράφως ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την ολοκλήρωση της οποίας κάθε βοήθεια είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται λεπτομερώς στην εργασία αυτή. Έχω αναφέρει πλήρως και με σαφείς αναφορές, όλες τις πηγές χρήσης δεδομένων, απόψεων, θέσεων και προτάσεων, ιδεών και λεκτικών αναφορών, είτε κατά κυριολεξία είτε βάσει επιστημονικής παράφρασης. Αναλαμβάνω την προσωπική και ατομική ευθύνη ότι σε περίπτωση αποτυχίας στην υλοποίηση των ανωτέρω δηλωθέντων στοιχείων, είμαι υπόλογος έναντι λογοκλοπής, γεγονός που σημαίνει αποτυχία στην διπλωματική μου εργασία και κατά συνέπεια αποτυχία απόκτησης Τίτλου Σπουδών, πέραν των λοιπών συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων. Δηλώνω, συνεπώς, ότι αυτή η διπλωματική εργασία προετοιμάστηκε και ολοκληρώθηκε από εμένα προσωπικά και αποκλειστικά και ότι, αναλαμβάνω πλήρως όλες τις συνέπειες του νόμου στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής άλλης πνευματικής ιδιοκτησίας.

Βιδάλη Δέσποινα

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, η οποία πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, της Σχολής Επιστήμης Τροφίμων, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέλαβαν στη διεκπεραίωσή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, Καθηγήτρια κα Δήμητρα Χούχουλα, η οποία μου ανέθεσε τη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, για την υποστήριξη και την καθοδήγησή της σε κάθε βήμα της εργασίας.

Επίσης ευχαριστώ πολύ την συνάδελφό μου κα Δήμητρα Μόσχου, για τις χρήσιμες συμβουλές της, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη των εργαστηρίων για το πνεύμα συναδελφικότητας που επικρατούσε κατά την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την οικογένεια και τον αρραβωνιαστικό μου για την υποστήριξη, την κατανόηση και τη συμπαράστασή τους, καθώς και τον νονό μου κ. Ηλιόπουλο Νικόλαο για τις χρήσιμες συμβουλές.

*Τελικά το μεγαλύτερο στοίχημα,
είναι να παραμείνουμε άνθρωποι.*

-Βίκυ Μπάλλου

Περίληψη

Ο θηλασμός συνδέεται με σημαντικά οφέλη για την υγεία των βρεφών. Εκτός από τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού και τα βιοενεργά συστατικά, το μητρικό γάλα περιέχει επίσης μια ποικιλία μικροβίων, τα οποία είναι σημαντικά για τη διατήρηση της υγείας του μαστού και του βρέφους.

Σπουδαία επίσης, είναι η εμφάνιση των οξυγαλακτικών βακτηρίων, στο μητρικό γάλα, καθώς προσφέρουν αντιμικροβιακή δράση και αναφέρεται ότι έχουν ευεργετική επίδραση στο έντερο του βρέφους.

Η παρούσα μελέτη έχει ως σκοπό τον εντοπισμό του βακτηριακού μικροβιώματος του μητρικού γάλακτος. Συλλέχθηκαν δείγματα μητρικού γάλακτος εννιά (9) υγιών γυναικών μαζί με δεδομένα σχετικά με τους δημογραφικούς παράγοντες και τις διατροφικές συνήθειες των εθελοντών.

Η δοκιμασία έγινε με τη χρήση της φορητής συσκευής χειρός “MinION”, της Oxford Nanopore Technologies, με την οποία ενισχύθηκε η περιοχή του 16S rRNA γονιδίου και διεξήχθη ο προσδιορισμός των βακτηριακών κυττάρων που περιέχονται στο μητρικό γάλα.

Λέξεις κλειδιά: Μικροβίωμα μητρικού γάλακτος, NGS, Ανάλυση 16S με τεχνολογία νανοπόρου.

Abstract

Breastfeeding is associated with significant health benefits for infants. In addition to essential nutrients, immune cells and bioactive ingredients, breast milk also contains a variety of microbes, which are important for maintaining breast and infant health.

Also important is the appearance of lactic acid bacteria in breast milk, as they offer antimicrobial activity and are reported to have a beneficial effect on the infant's gut.

The aim of this study was to detect the bacterial microbiome of breast milk. Nine (9) breast milk samples were collected from women along with data on the demographics and eating habits of the volunteers.

The test was performed using Oxford Nanopore Technologies' portable handheld "MinION" device, which amplified the 16S rRNA gene region and determined the bacterial cells contained in breast milk.

Key words: Microbiome of breast milk, NGS, 16S analysis with Nanopore Technology.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	II
Περίληψη.....	IV
Abstract	V
Πίνακες.....	VII
Εικόνες	VIII
Γραφήματα	IX
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή	1
Κεφάλαιο 2: Θεωρητικό Υπόβαθρο	2
2.1 Μητρικό γάλα	2
2.1.1 Οφέλη μητρικού γάλακτος	3
2.1.2 Σύνθεση μητρικού γάλακτος.....	6
2.1.3 Μικροβίωμα μητρικού γάλακτος	12
2.2 Ταυτοποίηση βακτηρίων με γραμμωτό κώδικα	19
2.2.1 Υπομονάδα 16S του ριβοσωματικού RNA (16S rRNA).....	19
2.2.2 Αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS).....	19
2.2.3 Αλληλούχιση με νανοπόρους (Nanopore Senquencing)	20
2.3 Ανάλυση 16S με τεχνολογία νανοπόρου	23
2.3.1 Προετοιμασία του δείγματος.....	23
2.3.2 Προετοιμασία βιβλιοθήκης.....	25
2.3.3 Αλληλούχιση και ανάλυση	26
Κεφάλαιο 3: Υλικά - Μέθοδοι.....	27
3.1 Δείγματα μητρικού γάλακτος.....	27
3.2 Προετοιμασία δείγματος.....	27
3.2.1 Λύση των κυττάρων	28
3.2.2 Έκπλυση	28
3.2.3 Έκλουση.....	28

3.2.4 Έλεγχος καθαρότητας	28
3.3 Προετοιμασία βιβλιοθήκης 16s	29
3.4 Αλληλούχιση και ανάλυση.....	30
Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα	31
4.1 Βακτηριακά φύλα	31
4.1.1 Φύλο: Firmicutes	32
4.1.2 Φύλο: Proteobacteria	37
4.1.3 Φύλο: Bacteroidetes.....	42
4.1.4 Φύλο: Actinobacteria	44
4.1.5 Λοιπά φύλα	45
4.2 Οξυγαλακτικά βακτήρια.....	46
Κεφάλαιο 5: Συζήτηση - Συμπεράσματα.....	47
Ξένη Βιβλιογραφία.....	50
Ελληνική Βιβλιογραφία	56

Πίνακες

Πίνακας 1. Στάδια απομόνωσης του γενετικού υλικού (71).....	23
Πίνακας 2. Στοιχεία των γυναικών που παραχώρησαν τα δείγματα μητρικού γάλακτος	27
Πίνακας 3. Μίχ της pcr βιβλιοθήκης.....	29
Πίνακας 4. Κύκλοι PCR βιβλιοθήκης	29
Πίνακας 5. Προετοιμασία βιβλιοθήκης πριν την φόρτωση.....	30
Πίνακας 6 Τα είδη των βακτηρίων του φύλου Firmicutes ομαδοποιημένα σε οικογένειες.....	32
Πίνακας 7. Τα είδη των βακτηρίων του φύλου Proteobacteria ομαδοποιημένα σε οικογένειες.....	37
Πίνακας 8. Τα είδη των βακτηρίων του φύλου Bacteroidetes, ομαδοποιημένα σε οικογένειες.....	42

Πίνακας 9. Τα είδη των βακτηρίων του φύλου Actinobacteria, ομαδοποιημένα σε οικογένειες..... 44

Πίνακας 10. Τα είδη των βακτηρίων του φύλου Actinobacteria, ομαδοποιημένα σε οικογένειες..... 45

Εικόνες

Εικόνα 1. Σχέδιο σύνθεσης ολιγοσακχαριτών μητρικού γάλακτος. (9) 10

Εικόνα 2. Παράγοντες που επηρεάζουν το μητρικό γάλα. (29)..... 15

Εικόνα 3. Πάνω απεικονίζονται τα στάδια απομόνωσης ενός συστήματος που χρησιμοποιεί στήλες με μεμβράνες πυριτίου για τις πλύσεις. Κάτω απεικονίζονται τα στάδια απομόνωσης ενός αυτόματου συστήματος που χρησιμοποιεί μαγνητικά σφαιρίδια. (66)..... 24

Εικόνα 4. Τα στάδια της PCR είναι τρία (3) και επαναλαμβάνονται μέχρι το επιθυμητό αποτέλεσμα. i) Αποδιάταξη του δίκλωνου, ii) Υβριδισμός εκκινητών, iii) Σύνθεση αντιγράφων DNA. Στην παρούσα εργασία οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται αντιγράφουν το γονίδιο 16s, οπότε αναπαράγουν μόνο το DNA των βακτηρίων. (69) 25

Γραφήματα

Γράφημα 1. Σύνθεση μητρικού γάλακτος (3).....	6
Γράφημα 2. Τα φύλα των βακτηρίων που εντοπίστηκαν στα δείγματα μητρικού γάλακτος.....	31
Γράφημα 3. Οι οικογένειες του φύλου Firmicutes που εντοπίστηκαν στα δείγματα μητρικού γάλακτος.....	33
Γράφημα 4. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλακτος, και ανήκουν στην οικογένεια Streptococcaceae.	33
Γράφημα 5. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλακτος, και ανήκουν στην οικογένεια Staphylococcaceae.	34
Γράφημα 6. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλακτος, και ανήκουν στην οικογένεια Bacillaceae.....	35
Γράφημα 7. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλακτος, και ανήκουν στην οικογένεια Gamella.....	35
Γράφημα 8. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλακτος, και ανήκουν στις υπόλοιπες οικογένειες του φύλου Firmicutes.	36
Γράφημα 9. Οι οικογένειες του φύλου Proteobacteria εντοπίστηκαν στα δείγματα 1, 2, 3, 4, 5, 6 και 9.....	38
Γράφημα 10. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλακτος, και ανήκουν στην οικογένεια Sphingomonadaceae.	39
Γράφημα 11. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλακτος, και ανήκουν στην οικογένεια Bradyrhizobiaceae.	39
Γράφημα 12. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλακτος, και ανήκουν στην οικογένεια Xanthomonadaceae.....	40
Γράφημα 13. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλακτος, και ανήκουν στις υπόλοιπες οικογένειες του φύλου Proteobacteria.....	41
Γράφημα 14. Οι οικογένειες του φύλου Bacteroidetes εντοπίστηκε στα δείγματα 1, 2,3,5 και 8.....	42

Γράφημα 15. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλατος, και ανήκουν στις οικογένειες του φύλου Bacteroidetes.....	43
Γράφημα 16. Οι οικογένειες του φύλου Actinobacteria εντοπίστηκαν στα δείγματα 1, 2, 3, 4 και 5.....	44
Γράφημα 17. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλατος, και ανήκουν στις υπόλοιπες οικογένειες του φύλου Actinobacteria.	45
Γράφημα 18. Τα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων που εντοπίστηκαν στα δείγματα του μητρικού γάλακτος.....	46
Γράφημα 19. Συνολικό βακτηριακό φορτίο των δειγμάτων.....	48

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

Ο θηλασμός είναι ένας από τους πιο αποτελεσματικούς τρόπους διασφάλισης της υγείας και της επιβίωσης του παιδιού. Ωστόσο, σχεδόν 2 στα 3 βρέφη δεν θηλάζουν αποκλειστικά για τους συνιστώμενους 6 μήνες - ποσοστό που δεν έχει βελτιωθεί εδώ και 2 δεκαετίες.

Το μητρικό γάλα είναι η ιδανική τροφή για βρέφη. Είναι ασφαλές, καθαρό και περιέχει αντισώματα που βοηθούν στην προστασία από πολλές κοινές ασθένειες της παιδικής ηλικίας. Το μητρικό γάλα παρέχει όλη την ενέργεια και τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζεται το βρέφος για τους πρώτους μήνες της ζωής του και συνεχίζει να παρέχει έως και τις μισές ή περισσότερες διατροφικές ανάγκες του παιδιού κατά το δεύτερο εξάμηνο του πρώτου έτους και έως το ένα τρίτο κατά τη διάρκεια το δεύτερο έτος της ζωής.

Τα παιδιά που θηλάζουν έχουν καλύτερες επιδόσεις στα τεστ νοημοσύνης, είναι λιγότερο πιθανό να είναι υπέρβαρα ή παχύσαρκα και λιγότερο επιρρεπή σε διαβήτη αργότερα στη ζωή τους. Οι γυναίκες που θηλάζουν έχουν επίσης μειωμένο κίνδυνο καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών.

Η ακατάλληλη εμπορία υποκατάστατων μητρικού γάλακτος συνεχίζει να υπονομεύει τις προσπάθειες για τη βελτίωση των ποσοστών και της διάρκειας του θηλασμού παγκοσμίως.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) προωθεί ενεργά τον μητρικό θηλασμό ως την καλύτερη πηγή τροφής για βρέφη και μικρά παιδιά και εργάζεται για να αυξήσει το ποσοστό αποκλειστικού θηλασμού για τους πρώτους 6 μήνες έως τουλάχιστον 50% έως το 2025.

Ο ΠΟΥ και η UNICEF δημιούργησαν την Παγκόσμια Συλλογή Θηλασμού για να συγκεντρώσουν πολιτική, νομική, οικονομική και δημόσια υποστήριξη για τον θηλασμό. Αυτό φέρνει κοντά υλοποιητές και δωρητές από κυβερνήσεις, φιλανθρωπίες, διεθνείς οργανισμούς και την κοινωνία των πολιτών.

Επιπλέον, ο ΠΟΥ παρέχει μαθήματα κατάρτισης για εργαζόμενους στον τομέα της υγείας για να παρέχουν εξειδικευμένη υποστήριξη σε μητέρες που θηλάζουν, να τις βοηθούν να ξεπεράσουν προβλήματα και να παρακολουθούν την ανάπτυξη των παιδιών.

Κεφάλαιο 2: Θεωρητικό Υπόβαθρο

2.1 Μητρικό γάλα

Η προγεννητική περίοδος είναι μια περίοδος οργανογένεσης στο βρέφος (στην αρχή της εγκυμοσύνης) και ισχυρής ανάπτυξης του παιδιού κατά τα πρώτα δύο (2) χρόνια της ζωής, αλλά και στην εγκαθίδρυση των φυσιολογικών μηχανισμών που επιμέλουν σε όλη τη ζωή. Από την επιστημοποίηση της έννοιας του DOHaD¹, αναγνωρίζεται ότι υπάρχει σύνδεση μεταξύ των συνθηκών ανάπτυξης κατά την προγεννητική περίοδο και της υγείας και τις ασθένειες των ενηλίκων, και η διατροφή έχει βασικό ρόλο. Είναι πιθανό ότι ο ρυθμός ανάπτυξης (αύξηση βάρους κατά τις πρώτες εβδομάδες) και η σύνθεση της αύξησης βάρους (άπαχο κέρδος σώματος και αύξηση σωματικού λίπους) κατά τη διάρκεια αυτής της βασικής περιόδου έχουν σημαντικές μακροπρόθεσμες επιπτώσεις. (1)

Τα βρέφη που θηλάζουν φιλοξενούν μεγαλύτερη αφθονία *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* στο έντερο από τα βρέφη που τρέφονται με γάλα, συμβάλλοντας σε μια ξεχωριστή ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος, προστασία από λοιμώξεις και επίσης στη μείωση του κινδύνου ασθενειών, όπως αλλεργίες, παχυσαρκία και άλλες διαταραχές αργότερα στη ζωή. (2)

Το μητρικό γάλα παρέχει μια βέλτιστη πηγή θρεπτικών συστατικών και όχι μόνο. Περιέχει βιοδραστικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων ανοσοσφαιρινών, λυσοζύμων, αυξητικών παραγόντων, ολιγοσακχαριτών και ωφέλιμων μικροοργανισμών. (2)

¹ Αναπτυξιακή Προέλευση της Υγείας και Νοσημάτων ενηλίκων

2.1.1 Οφέλη μητρικού γάλακτος

Τα οφέλη του θηλασμού παρέχουν προστασία για την υγεία του βρέφους κατά τις πρώτες εβδομάδες της ζωής του (3).

2.1.1.1 Οφέλη για το παιδί

- Προφύλαξη από αλλεργίες: Ειδικά σε οικογένειες που ο ένας ή και οι δύο γονείς είναι αλλεργικοί υπάρχει κίνδυνος να εμφανιστεί κάποια αλλεργία και στο παιδί. Ήδη, από την εγκυμοσύνη, μπορεί το έμβρυο να ευαισθητοποιηθεί σε κάποιους παράγοντες, που προκαλούν αλλεργίες. Ακόμα και ένα μπουκάλι ξένο γάλα, είναι στους πρώτους έξι μήνες αρκετό για να προκαλέσει μια αλλεργία. Γι' αυτό το λόγο, ειδικά σε οικογένειες με αλλεργικούς γονείς, ο θηλασμός για τους πρώτους έξι μήνες είναι πολύ σημαντικός.

- Προστασία από μολύνσεις: Μέσα στη μήτρα το έμβρυο ζει σε ένα περιβάλλον χωρίς κίνδυνο μόλυνσης. Μετά τον τοκετό έρχεται ξαφνικά σε επαφή με εκατομμύρια μικροοργανισμούς. Το ευαίσθητο και ανώριμο ακόμα ανοσοποιητικό σύστημα του μωρού, χρειάζεται περίπου ένα χρόνο για να μπορεί από μόνο του να παράγει αρκετά αντισώματα και να προστατεύει αποτελεσματικά τον οργανισμό από μολύνσεις. Αρχικά, το μωρό προστατεύεται από τα αντισώματα που έχει πάρει από τη μητέρα του, κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Αυτά όμως, γίνονται με τον καιρό, όλο και λιγότερα. Το μητρικό γάλα και ειδικά το πρωτόγαλα, με τα αντισώματα που περιέχει, είναι το μόνο που γεφυρώνει την ευαίσθητη περίοδο, από τη γέννηση του παιδιού μέχρι τη συμπλήρωση του πρώτου χρόνου. Τα παιδιά που θηλάζουν, πάσχουν πολύ λιγότερο από ασθένειες όπως γαστρεντερίτιδες, μολύνσεις του αναπνευστικού, ωτίτιδες και ουρολοιμώξεις. Δεν είναι τυχαίο, ότι τα παιδιά που θηλάζουν νοσηλεύονται πολύ σπανιότερα στο νοσοκομείο, απ' ότι αυτά που δεν θηλάζουν

- Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι τα παιδιά που έχουν θηλάσει, έχουν πολύ καλύτερη πνευματική ανάπτυξη. Κατά μέσο όρο, παίρνουν γύρω στους 8,3 βαθμούς παραπάνω στα τεστ νοημοσύνης. Αυτό, έχει να κάνει με την ειδική σύσταση των λιπών του μητρικού γάλακτος, που ευνοεί την ανάπτυξη του εγκεφάλου του μωρού.

- Η ψυχική ανάπτυξη του μωρού, επηρεάζεται και αυτή πολύ ουσιαστικά από το θηλασμό. Η σωματική επαφή με τη μητέρα, κάθε άλλο παρά «κακομαθαίνει» το παιδί. Τα παιδιά που έχουν απολαύσει τη σωματική επαφή με τη μητέρα τους κατά

το θηλασμό αλλά και γενικότερα, έχουν πολύ μεγαλύτερη αυτοπεποίθηση και γίνονται πιο γρήγορα ανεξάρτητα.

- Ανάπτυξη των οστών και των μυών του προσώπου, οδοντοφυΐα: Αντίθετα με το μπουκάλι, όπου το γάλα ρέει σχεδόν από μόνο του, ο θηλασμός απαιτεί πιο μεγάλη προσπάθεια από την πλευρά του μωρού. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, να γυμνάζονται καλά οι μύες του προσώπου, πράγμα που έχει μακροχρόνιες επιδράσεις στην ανάπτυξη των οστών, στην οδοντοφυΐα και φυσικά στην ανάπτυξη του λόγου. Επίσης, το γεγονός ότι το μητρικό γάλα δεν περιέχει ζάχαρη, σε αντίθεση με το τροποποιημένο γάλα αγελάδας, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο, για την πρόληψη της τετηρηδότητας.

- Το μητρικό γάλα είναι εύπεπτο, η διάσπαση και ο μεταβολισμός του δεν επιβαρύνει τα νεφρά και το συκώτι του μωρού. Τα μωρά που θηλάζονται, έχουν λιγότερους κωλικούς και δερματικούς ερεθισμούς στην περιοχή της πάνας, γιατί το μητρικό γάλα, με την ειδική του σύνθεση, ευνοεί την ανάπτυξη των γαλακτοβάκιλλων στο έντερο του μωρού. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, το PH των κοπράνων του παιδιού, να είναι όξινο, πράγμα που δεν ερεθίζει την επιδερμίδα.

- Συχνός θηλασμός από την πρώτη στιγμή, μειώνει τον κίνδυνο του νεογνικού ίκτερου.

- Είναι αποδεδειγμένο ότι τα μωρά που θηλάζονται κινδυνεύουν πολύ λιγότερο από τον ξαφνικό νεογνικό θάνατο, οι ακριβείς αιτίες του οποίου, δεν έχουν ακόμα διαλευκανθεί.

- Ο θηλασμός έχει και πολλά μακροχρόνια πλεονεκτήματα για την υγεία του παιδιού. Έχει αποδειχθεί με επιστημονικές έρευνες, ότι ο θηλασμός προφυλάσσει από την παχυσαρκία, το σακχαρώδη διαβήτη, μερικές μορφές καρκίνου, καρδιοπάθειες και τη σκλήρυνση κατά πλάκας.

- Το μητρικό γάλα είναι αποστειρωμένο, φρέσκο και βρίσκεται πάντα στη σωστή θερμοκρασία για το μωρό, αφού έχει τη θερμοκρασία του σώματος της μητέρας.

(4)

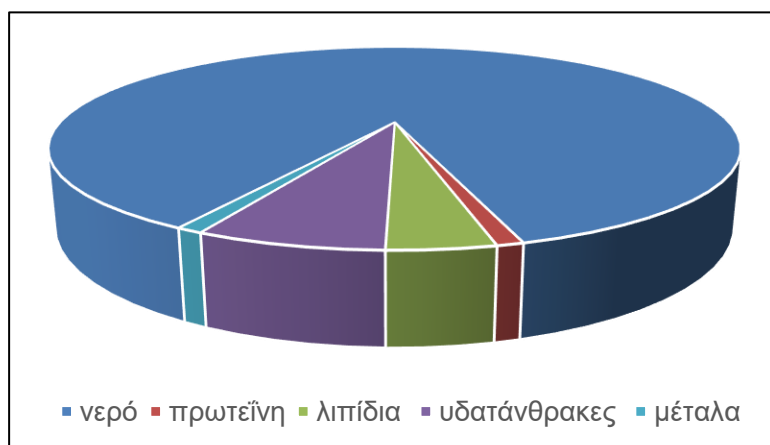
- Προστασία από διάφορες ασθένειες: οξεία και χρόνια μέση ωτίτιδα, διάρροια, μηνιγγίτιδα, νεκρωτική εντεροκολίτιδα, ασθματική βρογχίτιδα, κοιλιοκάκη, φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, παιδικό καρκίνο. (5)

2.1.1.2 Οφέλη για την μητέρα

- Παλινδρόμηση της μήτρας μετά τον τοκετό: Κατά το θηλασμό παράγονται ορμόνες, που βοηθούν τη μήτρα να επανέλθει στην αρχική θέση που είχε πριν την εγκυμοσύνη. Αυτό συμβαίνει με τους λεγόμενους υστερόπρονους, που μοιάζουν με τους πόνους της περιόδου. Μέσω της καλής σύσπασης της μήτρας, η μητέρα χάνει λιγότερο αίμα και το σώμα της επανέρχεται πιο γρήγορα στο κανονικό.
- Προστασία από καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών: Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι οι γυναίκες που έχουν θηλάσει έχουν πολύ μικρότερες πιθανότητες να νοσήσουν από καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών. Επίσης, οι γυναίκες που έχουν θηλάσει παθαίνουν σε μεγαλύτερες ηλικίες πιο σπάνια, οστεοπόρωση.
- Προσφέρει γρηγορότερη ανάκτηση του βάρους που διατηρούσε η γυναίκα πριν την εγκυμοσύνη (5). Το λίπος, που τυχόν συσσωρεύτηκε στο σώμα στην εγκυμοσύνη, καίγεται πιο γρήγορα και χωρίς να χρειάζεται κάποια δίαιτα (4).
- Το μητρικό γάλα μειώνει το κόστος της διατροφής, αφού παρέχεται δωρεάν, είναι παντού και πάντα διαθέσιμο, στην κατάλληλη σύσταση και θερμοκρασία. Αυτό σημαίνει πολύ λιγότερη δουλειά και ειδικά για το βράδυ, όπου δε χρειάζεται να σηκωθεί η μητέρα και να ετοιμάσει το μπουκάλι παρά μόνο να βάλει το μωρό στο στήθος.
- Οι ορμόνες που παράγονται κατά το θηλασμό στο σώμα, κάνουν τη μητέρα πιο ευαίσθητη και διευκολύνουν την ανάπτυξη μιας βαθιάς σχέσης αγάπης και στοργής με το μωρό της. Η σωματική επαφή και η ζεστασιά που απολαμβάνει το μωρό κατά το θηλασμό, δίνουν τις πρώτες γερές βάσεις της ψυχολογικής του ανάπτυξης.
- Ο θηλασμός επηρεάζει και την επανέναρξη της έμμηνου ρύθμισης, η μητέρα κατά τον θηλασμό παραμένει μη γόνιμη, με μικρότερη πιθανότητα να μείνει έγκυος πριν το μωρό κλείσει τον έκτο μήνα. Αναστέλλει την αναπαραγωγική διαδικασία, παρέχοντας μερική αντισυλληπτική προστασία (4).

2.1.2 Σύνθεση μητρικού γάλακτος

Το μητρικό γάλα είναι η καλύτερη τροφή για το βρέφος. Αποτελείται από 87% νερό, 1% πρωτεΐνη, 4% λιπίδια και 7% υδατάνθρακες (συμπεριλαμβανομένων 1 έως 2,4% ολιγοσακχαριτών) (Γράφημα 1). Περιέχει επίσης πολλά μέταλλα (Ασβέστιο, Φώσφορο, Μαγνήσιο, Κάλιο, Νάτριο κ.λπ.) και πολλές βιταμίνες. (3) Το πρωτόγαλα, το οποίο παράγεται γενικά μέχρι την πέμπτη ή έκτη ημέρα μετά τον τοκετό, είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες και μέταλλα και περιέχει πολλές ανοσοενεργές ουσίες, όπως αντισώματα, παράγοντες συμπληρώματος, κυτοκίνες, λυσοζύμη, ολιγοσακχαρίτες και αντιμικροβιακά πεπτίδια (6) (7). Ένα μήνα μετά τον τοκετό, το μητρικό γάλα περιέχει χαμηλότερες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών και μετάλλων και υψηλότερες συγκεντρώσεις λιπιδίων και υδατανθράκων (7).



Γράφημα 1. Σύνθεση μητρικού γάλακτος (3)

2.1.2.1 Βιοδραστικές Πρωτεΐνες

Στις βιοδραστικές πρωτεΐνες (πρωτεΐνες ορού γάλακτος, ένζυμα και καζεΐνες) του μητρικού γάλακτος περιλαμβάνονται: Λακτοφερρίνη, Λυσοζύμη, Ανοσοσφαιρίνες, Απποκορίνη (πρωτεΐνη που δεσμεύει τη βιταμίνη B12), α-Λακταλβουμίνη, Λιπάση διεγερμένη από χολικό άλας (BSSL), κ-καζεΐνη, β-καζεΐνη. (8)

— Η Λακτοφερρίνη είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη. Είναι βακτηριοστατικό, δηλαδή μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη βακτηρίων, ιδιαίτερα δεσμεύοντας τον σίδηρο και καθιστώντας τον απρόσιτο σε παθογόνα που απαιτούν σίδηρο για να αναπτυχθούν. Είναι επίσης βακτηριοκτόνο και το πρωτεϊνικό θραύσμα λακτοφερρίνη έχει αποδειχθεί ότι είναι ιδιαίτερα ισχυρό με αυτόν τον τρόπο. Η λακτοφερρίνη είναι μια σκληρή πρωτεΐνη με δομή που την καθιστά δύσκολη την πέψη. Έχουν βρεθεί σημαντικές ποσότητες άθικτης λακτοφερρίνης στα κόπρανα των βρεφών,

ακόμη και ηλικίας έως 4 μηνών, γεγονός που υποδηλώνει ότι η λακτοφερρίνη επιβιώνει και είναι ενεργή στο λεπτό έντερο. (8)

— Η Λυσοζύμη είναι ένα ενεργό ένζυμο που υπάρχει σε υψηλή συγκέντρωση στο μητρικό γάλα, έως και 3000 φορές υψηλότερη στο ανθρώπινο γάλα από ότι στο βόειο γάλα. Δρα ως αντιβακτηριακό ένζυμο και διασπά στους δεσμούς β,1-4 γλυκοσιδών στο κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων. Η λυσοζύμη έχει ιδιαίτερη σχέση με τη λακτοφερρίνη. Η λακτοφερρίνη αρχικά δεσμεύεται στενά με συστατικά της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης, δηλαδή λιποπολυσακχαρίτες, αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και δημιουργεί οπές στη μεμβράνη, μέσω των οποίων η λυσοζύμη εισέρχεται στη συνέχεια στο γλυκοσωματίδιο των βακτηρίων, αποδομώντας το και σκοτώνει αποτελεσματικά το παθογόνο. (8)

— Το sIgA αντιπροσωπεύει το 90% των συνολικών ανοσοσφαιρινών στο γάλα (ολικό IgA, IgG, IgM). Όποια και αν είναι τα συγκεκριμένα βακτηριακά και ιικά παθογόνα στα οποία εκτέθηκε η μητέρα, τα αντισώματα που έχει αναπτύξει εναντίον τους θα μεταφερθούν στο βρέφος (μέσω του εντερομαστικού ανοσοποιητικού μονοπατιού). Το sIgA, σε αντίθεση με άλλους τύπους IgA, είναι σταθερό έναντι των πρωτεολυτικών ενζύμων στο βρεφικό έντερο και δεσμεύεται σε βακτηριακά και ιικά αντιγόνα, προάγοντας την αναστολή της προσκόλλησης στην επένδυση του βλεννογόνου. Άλλες ανοσοσφαιρίνες όπως IgA, IgM και IgG υπάρχουν, αλλά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, και αφομοιώνονται εύκολα και δεν επιβιώνουν στο λεπτό έντερο με τον τρόπο του sIgA. (8)

— Η Απποκορρίνη (πρωτεΐνη που δεσμεύει τη βιταμίνη B12) είναι σε μεγάλο βαθμό ακόρεστη στο ανθρώπινο γάλα, δηλαδή, υπάρχει πολύ περισσότερη απποκορρίνη από ό,τι η βιταμίνη B12. Ο εγγενής παράγοντας, ο οποίος απαιτείται για την απορρόφηση της βιταμίνης B12, απουσιάζει στο βρέφος και έτσι η απποκορρίνη μπορεί να διευκολύνει την απορρόφηση της βιταμίνης B12. Η Απποκορρίνη έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες. Ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, έχει αποδειχθεί ότι σκοτώνει το *E.coli*. Η Απποκορρίνη είναι επίσης σταθερή έναντι των πρωτεολυτικών πεπτικών ενζύμων. (8)

— Το BSSL περιλαμβάνει μόνο το 1-2% των συνολικών πρωτεϊνών γάλακτος, αλλά αυτό είναι σημαντικό για ένα ενεργό ένζυμο. Υπάρχει στο γάλα ορισμένων ειδών, κυρίως των ανθρώπων, αλλά όχι στο αγελαδινό ή κατσικίσιο γάλα. Στον αυλό του εντέρου υδρολύει το λίπος του γάλακτος (τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια και η υδρόλυση αυτών είναι πολύ σημαντική για πρόωρα και πρόωρα

βρέφη), εστέρες βιταμίνης A, εστέρες χοληστερόλης και λυσο-φωσφολιπίδια. Έτσι, είναι ένα άλογο εργασίας στο ρόλο της πέψης των λιπιδίων. (8)

— Οι καζεΐνες αποτελούν το 20-40% των πρωτεϊνών του μητρικού γάλακτος, το οποίο είναι μικρότερο από το αγελαδινό γάλα, αλλά εξακολουθεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του βρέφους.

- Η β-καζεΐνη είναι μοναδική μεταξύ των καζεϊνών στο ότι έχει πολλαπλά φωσφορυλιωμένα αμινοξέα κατά μήκος της ραχοκοκαλιάς της. Κατά την πέψη, σχηματίζονται μικρότερα φωσφοπεπτιδία καζεΐνης (CPP) και διευκολύνουν την απορρόφηση του ασβεστίου. Επίσης σχηματίζονται μικρές καζεΐνομορφίνες, δηλαδή πεπτιδία οπιοειδών που έχουν συγγένεια με υποδοχείς οπιούχων, οι οποίοι μπορεί να εμπλέκονται στα πρότυπα ύπνου-εγρήγορσης.

- Η κ-καζεΐνη στο μητρικό γάλα είναι σε μεγάλο βαθμό γλυκοζυλιωμένη (~40%) και είναι αναστολέας της βακτηριακής προσκόλλησης. Το ελικοβακτηρίδιο έχει αποδειχθεί ότι είναι πολύ λιγότερο συχνό σε βρέφη που θηλάζουν από τα βρέφη που τρέφονται με γάλα.

— Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες στο μητρικό γάλα θα διασπαστούν πλήρως και θα χρησιμοποιηθούν από το βρέφος ως προμήθεια αμινοξέων. Ωστόσο, ορισμένες πρωτεΐνες υπόκεινται σε μερική πρωτεόλυση, αφήνοντας βιολογικά ενεργά θραύσματα (π.χ. CPPs) και ορισμένες δεν υφίστανται (ή περιορισμένη) πρωτεόλυση (π.χ. λακτοφερρίνη και sIgA) και μπορούν να επιβιώσουν στην πέψη και μπορούν να βρεθούν εντελώς ανέπαφα στα κόπρανα.

— Στην ανώτερη οδό του λεπτού εντέρου, λαμβάνει χώρα μερική πέψη της α-λακταλβουμίνης, σχηματίζοντας διάφορους τύπους πεπτιδίων. Αυτά μπορεί να ασκούν βιοδραστηριότητες για κάποιο χρονικό διάστημα στο λεπτό έντερο, αλλά τελικά η α-λακταλβουμίνη αφομοιώνεται, σχηματίζοντας αμινοξέα.

2.1.2.2 Λιπίδια

Μια άλλη ιδιαιτερότητα του μητρικού γάλακτος είναι η υψηλή αναλογία πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας, ω6 (όπως το αραχιδονικό οξύ) και ω3 (όπως εικοσαπεντανοϊκό και εικοσιδυαεξανοϊκό οξύ), τα οποία προέρχονται από τα απαραίτητα λιπαρά οξέα: λινολεϊκό και α-λινολενικό οξύ. Αυτά τα λιπαρά οξέα είναι σημαντικά για την ανάπτυξη του εγκεφάλου του βρέφους. Σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα, το ανθρώπινο μητρικό γάλα περιέχει επίσης περισσότερη χοληστερόλη, η οποία είναι πρόδρομος των ορμονών και επίσης εμπλέκεται στην ανάπτυξη του εγκεφάλου. (3)

Το λίπος του μητρικού γάλακτος κατέχει μια σημαντική θέση ως πηγή ενέργειας, δομικές και ρυθμιστικές λειτουργίες, στις οποίες τα λιπαρά οξέα είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος αντιπρωτοζωική δραστηριότητα (ελεύθερο λιπαρό οξύ) που παράγεται κατά τη διάρκεια γαστρική και εντερική πέψη του λίπους γάλακτος), αυξημένη ανοσοαπόκριση, αντικαρκινογόνοι παράγοντες και αντιδιαβητικά αποτελέσματα. (9)

Το κύριο κορεσμένο λιπαρό οξύ στο ανθρώπινο γάλα είναι το παλμιτικό οξύ. Απλοποιεί τη δράση της παγκρεατικής λιπάσης και μετατρέποντας το παλμιτικό οξύ σε μονογλυκερίδιο, το οποίο γενικά απορροφάται καλά με αποτέλεσμα βελτίωση της εντερικής δυσφορίας, μείωση των κολικών και του κλάματος του βρέφους. Επιπλέον, η θέση του παλμιτικού οξέος επηρεάζει τα ν-ακυλεντανολαμίδια, συμπεριλαμβανομένων των επιπέδων ανανδαμίδης, η οποία παρουσιάζει αναλγητικά αποτελέσματα συμβάλλοντας στη διαφώτιση της σχέσης μεταξύ της θέσης του παλμιτικού οξέος και της συμπεριφοράς του βρέφους στο κλάμα. (9)

Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι το βουτυρικό που υπάρχει λειτουργεί ως ρύθμιση της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης και μείωση των διεργασιών φλεγμονής στο έντερο. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (καπροϊκό, καπρυλικό), καπρικό και λαυρικό οξέα συνδέονται με αντιμικροβιακές βιολογικές δραστηριότητες. (9)

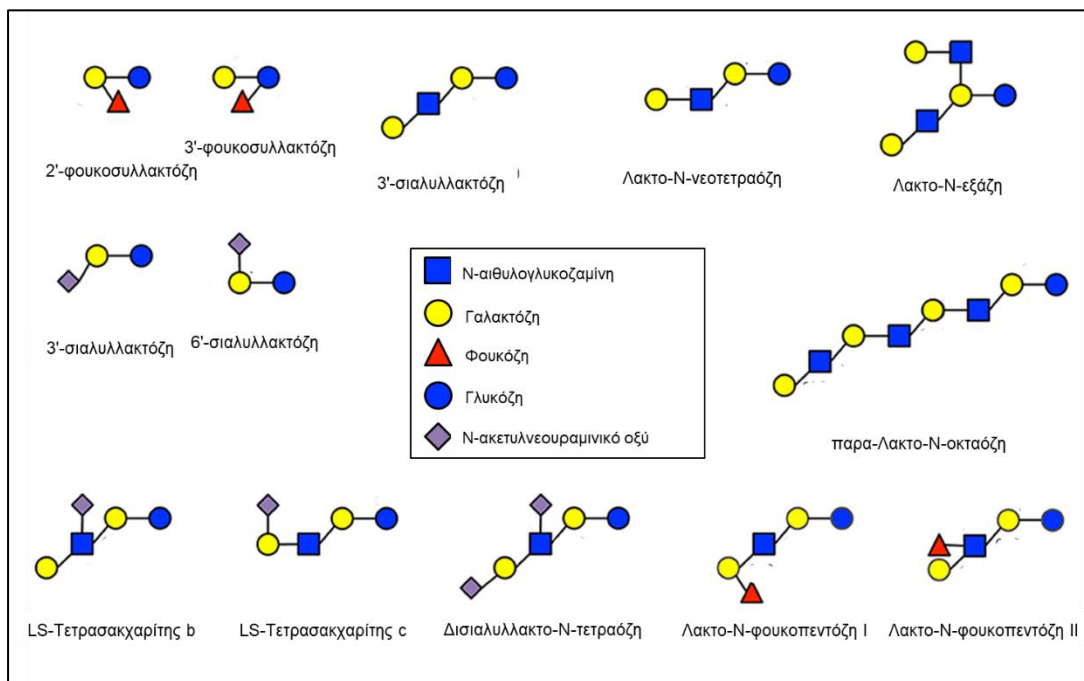
Συγκεκριμένα, το πιο σημαντικά λιπαρά οξέα στο ανθρώπινο γάλα είναι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας. Τα ομόλογα του λινολεϊκού οξέος από τη σειρά ω6 είναι πρόδρομοι του αραχιδονικού οξέος, ενώ τα ομολογαριθμικά του α-λινολενικού οξέος από τη σειρά ω3 είναι πρόδρομες ενώσεις του εικοσα-πεντανοϊκού οξέος και του εικοσιδυοεξανοϊκού οξέος. Ως εκ τούτου, το μητρικό γάλα περιέχει τα απαραίτητα πρόδρομα λιπαρά οξέα (λινολεϊκό και α-λινολεϊκό) για την

παραγωγή αρακτονικού και κερβονικού, τα οποία παρουσιάζουν κρίσιμη λειτουργία στην οπτική, ανοσοποιητική, γνωστική και κινητική ανάπτυξη στα νεογνά. Επιπλέον, παρουσιάζει σημαντική λειτουργία στην προστασία από αλλεργίες, το άσθμα, τη βελτίωση της πνευμονικής λειτουργίας και τη μείωση των ποσοστών παιδικής φλεγμονής και παχυσαρκίας, καθώς και ένα επιπλέον πλεονέκτημα είναι η αύξηση κατά 4,5 πόντους IQ σε βρέφη που θηλάζουν σε σύγκριση με βρέφη που δεν θηλάζουν. το έλαβε. (9)

2.1.2.3 Ολιγασακχαρίτες

Οι ολιγασακχαρίτες υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες, από 10 έως 20 g/L και με πολύ ποικίλες βιοχημικές συνθέσεις (πάνω από 100 διαφορετικές ενώσεις). (3) Είναι πολυλειτουργικές γλυκάνες, που υπάρχουν φυσικά στο ανθρώπινο γάλα, περίπου 15 δομές ολιγασακχαρίτες έχουν εντοπιστεί στο μητρικό γάλα. (10)

Οι ολιγασακχαρίτες του μητρικού γάλακτος αποτελούνται από πέντε βασικούς μονοσακχαρίτες (Εικόνα 1): Γλυκόζη, Γαλακτόζη, N-αιθυλογλυκοζαμίνη, Φουκόζη και N-ακετυλνεουραμινικό οξύ. (10) (11)



Εικόνα 1. Σχέδιο σύνθεσης ολιγασακχαριτών μητρικού γάλακτος. (9)

2.1.2.4 Βιταμίνες

Μεταξύ των λιποδιαλυτών βιταμινών, έχουν εντοπιστεί εμφανείς ανεπάρκειες σε βρέφη και μικρά παιδιά. αυτές οι ανεπάρκειες συνδέονται με ανεπαρκή αποθέματα βιταμινών A, D ή K. Προφανώς, η βιταμίνη E δεν ευθύνεται για οποιαδήποτε χαρακτηριστική ασθένεια ανεπάρκειας σε «φυσιολογικά» άτομα, αλλά ο προστατευτικός της ρόλος είναι, ωστόσο, ιδιαίτερης σημασίας για τα ευάλωτα άτομα, ιδιαίτερα τα πρόωρα βρέφη. Οι βιταμίνες A και D σχετίζονται επίσης με σύνδρομα τοξικότητας σε υπερβολικές λήψεις και η βιταμίνη D είναι η μόνη βιταμίνη για την οποία η μητρική υπερδοσολογία έχει αναφερθεί ότι προκαλεί τοξικότητα στο βρέφος που θηλάζει. Οι βιταμίνες A και E παρουσιάζουν μια χαρακτηριστική μείωση των επιπέδων με την πρόοδο της γαλουχίας, και για τις τέσσερις λιποδιαλυτές βιταμίνες, υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ανταπόκρισης στις αλλαγές στη μητρική πρόσληψη. Ωστόσο, η ποσοτικοποίηση αυτού λείπει. (12)

Για τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες, υπάρχουν λίγα στοιχεία για εμφανείς ανεπάρκειες, επειδή το μητρικό γάλα υπερέχει έναντι των μητρικών ιστών για την πρόσβαση στα διαθέσιμα αποθέματα βιταμινών. Ωστόσο, υπάρχουν σημαντικές διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις του μητρικού γάλακτος που σχετίζονται με διακυμάνσεις στη μητρική πρόσληψη, ειδικά για τη ριβοφλαβίνη, τη βιταμίνη B6, τη βιταμίνη B2 και τη βιταμίνη C. Για τις άλλες πέντε υδατοδιαλυτές βιταμίνες, τα στοιχεία είναι λιγότερο πειστικά. Οι αλλαγές κατά τη διάρκεια της γαλουχίας ποικίλλουν αλλά, σε αντίθεση με τις λιποδιαλυτές βιταμίνες, η συνολική τάση είναι ανοδική. (12)

Η τοξικότητα δεν αποτελεί πρόβλημα για τα βρέφη που θηλάζουν και προβλήματα ανεπάρκειας έχουν παρουσιαστεί μόνο σε βρέφη που τρέφονται με γάλα, π.χ. όπου η φόρμουλα ήταν ακατάλληλη ή κατεστραμμένη κατά την προεπεξεργασία. (12)

2.1.3 Μικροβίωμα μητρικού γάλακτος

Οι Su Yeong Kim και Dae Yong Yi ανίχνευσαν εικοσι-τρία (23) φύλα αναλύοντας τη μικροχλωρίδα που προέρχεται από το μητρικό γάλα. Μεταξύ των μικροβίων, τα *Firmicutes* αντιπροσώπευαν το μεγαλύτερο ποσοστό, με 56,4% μεταξύ των φυτών, ακολουθούμενα από τα *Proteobacteria* (19,6%), τα *Bacteroidetes* (9,8%) και τα *Actinobacteria* (9,0%). Η *Verrucomicrobia* έδειξε μια μέση αναλογία κάτω από 5%, ενώ άλλα φύλα αντιπροσώπευαν <1% της βακτηριακής σύνθεσης του μητρικού γάλακτος. Τριακόσια ενενήντα δύο (392) γένη ανιχνεύθηκαν συνολικά σε επίπεδο γένους, με το *Streptococcus* να έχει το υψηλότερο ποσοστό με 25,1%, ακολουθούμενο από το *Staphylococcus* με 10,7% με τα *Bacteroides*, *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae*, *Ruminococcaceae*, *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Clostridiales*, *Corynebacterium*, *Akkermansia*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Dialister*, *Stenotrophomonas*, *Blautias*, *Neetrophomonas*, *Blautias*, *Spheosophingom* να ακολουθούν. Τα *Rothia* και το *Faecalibacterium* έδειξαν μέσες αναλογίες κάτω από 5%, ενώ άλλα γένη αντιπροσώπευαν <1% της βακτηριακής σύνθεσης κατά μέσο όρο (13).

Οι Ted Jost, et al ανίχνευσαν τέσσερα (4) φύλα αναλύοντας τη μικροχλωρίδα που προέρχεται από το μητρικό γάλα. Μεταξύ των μικροβίων, τα *Firmicutes* αντιπροσώπευαν το μεγαλύτερο ποσοστό, με 82,1% μεταξύ των φυτών, ακολουθούμενα από τα *Actinobacteria* (17,0%). Το *Proteobacteria* έδειξε μια μέση αναλογία κάτω από 1%. Δέκα (10) γένη ανιχνεύθηκαν συνολικά σε επίπεδο γένους, με το *Staphylococcus* να έχει το υψηλότερο ποσοστό με 61,1%, ακολουθούμενο από το *Streptococcus*, με 17,9% και το *Propionibacterium*, με 14,0%. Τα *Bifidobacterium*, *Veillonella*, και *Rothia* έδειξαν μέσες αναλογίες κάτω από 5%, ενώ άλλα γένη αντιπροσώπευαν <1% της βακτηριακής σύνθεσης κατά μέσο όρο (14).

Η ανασκόπηση των Petra Zimmermann και Nigel Curtis, συμφωνεί με τις παραπάνω μελέτες. Χαρακτηριστικά αναφέρουν ότι οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν ότι τα *Firmicutes* και τα *Proteobacteria* είναι τα πιο κυρίαρχα φύλα στο μητρικό γάλα, ενώ τα *Actinobacteria* και *Bacteroidetes* (15), (16), (17), (18) (19) (20), (21), (22), (23), (24) (25) είναι παρόντα σε χαμηλότερη σχετική αφθονία με τα *Actinobacteria* και *Proteobacteria* να βρίσκονται στην δεύτερη ή στην τρίτη θέση (26) (27) Περαιτέρω φύλα που έχουν ανιχνευθεί στο μητρικό γάλα είναι τα *Acidobacteria* (17) (28), *Armatimonadetes* (17), *Chlamydiae* (17), *Chlorobi* (28), *Chloroflexi* (28),

Cyanobacteria (27) (28), *Deinococcus-Thermus* (28), *Elusimicrobioa*, *Fibrobacteres* (28), *Fusobacteria* (17), *Planctomycetes*, *Spirochaetes* (17) (22), *Synergistetes* (22), *Tenericutes* (22) (28), *Thermi* (17), *Sacharibacteria*, *Verrucomicrobia* (17) (24) (28).

Αν και έχουν απομονωθεί έως και πεντακόσια-ενενήντα (590) διαφορετικά γένη από το μητρικό γάλα (29) τριάντα-ένα (31) από αυτά να έχουν ανιχνευτεί πιο συχνά, τα πιο συχνά είναι τα *Staphylococcus* με 97% (16) (25) (27) (28) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36) (37) (38) (39) (40) (41) εμφάνιση σε μελέτες, ακολουθούμενο από τα *Streptococcus* (95%) (22) (25) (34) (27) (28) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36) (37) (38) (40) (42) (43), *Bifidobacterium* (63%) (28) (30) (31) (33) (36) (37) (39) (41) (42) (44) (45), *Lactobacillus* (63%) (28) (30) (31) (33) (36) (38) (39) (42) (43) (44) (46), *Enterococcus* (42%) (28) (31) (36) (37) (38) (41) (43) (44) (46), *Pseudomonas* (50%) (16) (22) (25) (28) (32) (33) (35) (40), *Corynebacterium* (42%) (27) (30) (32) (33) (34) (35), *Actinetobacter* (42%) (22) (27) (31) (32) (33) (34), *Rothia* (34%) (27) (32) (33). Τα υπόλοιπα γένη βρέθηκαν σε λιγότερο από το 30% των μελετών που έχουν διεξαχθεί *Cutibacterium* (28) (28) (31) (33), *Veillonella* (27) (33), *Gemella* (27) (31), *Prevotella* (29), *Klebsiella* (22), *Clostridium* (29), *Stenotrophomonas* (32) (33), *Enterobacter* (15) (47), *Escherichia* (29), *Actinomyces* (30), *Neisseria* (28), *Delftia* (20) (33) (48) (49), *Micrococcus* (27) (33), *Spingomonas* (28) (35), *Haemophilus* (19) (50), *Halomonas* (33), *Lactococcus* (31) (34), *Pantoea* (31), *Ruminococcus* (28) (30), *Novosphingobium* (28), *Ralstonia* (35) (40) (25), *Weisella* (34) (35) (38), *Brad-yrhizobium* (35), *Corynebacteria* (35), *Leuconostoc* (34), *Pediococcus* (38), *Propi-onibacterium* (35), *Serratia* (35), *Sphingomonas* (35).

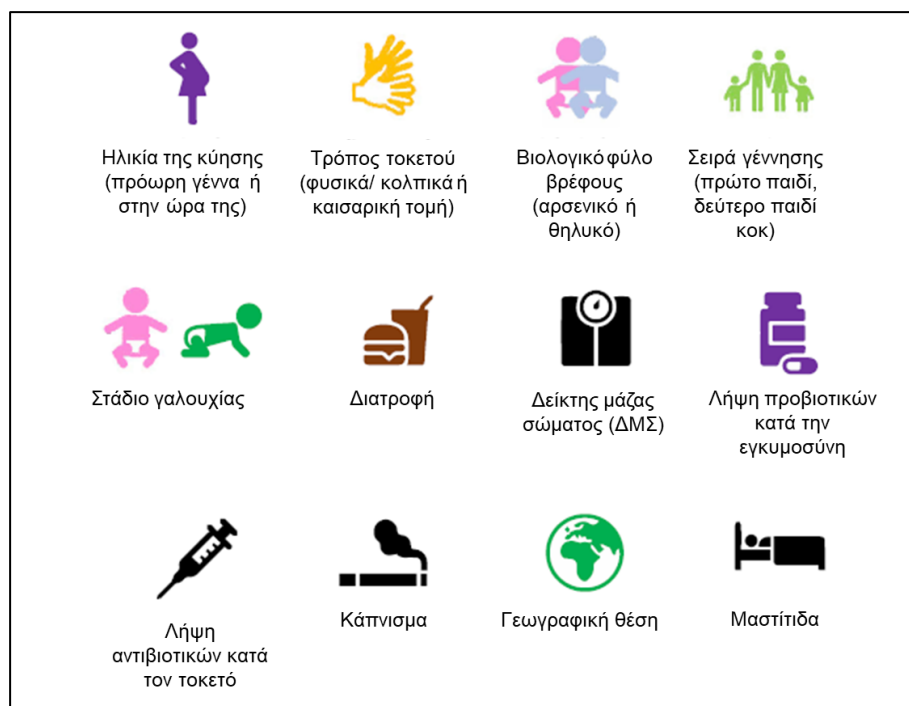
2.1.3.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια στο μητρικό γάλα

Το μητρικό γάλα περιέχει πρεβιοτικές ουσίες, που μπορεί να διεγείρει επιλεκτικά την ανάπτυξη ενός περιορισμένου αριθμού ωφέλιμων βακτηρίων στο έντερο του βρέφους (51). Επίσης θεωρείται φυσική πηγή αυτών των βακτηρίων (γαλακτικού οξέος / προβιοτικά) (52) τα οποία έχουν δείξει την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη ενός ευρέος φάσματος παθογόνων βακτηρίων με ανταγωνιστικό αποκλεισμό ή μέσω της παραγωγής αντιμικροβιακών συστατικών (53) . Έτσι το μητρικό γάλα μπορεί να θεωρηθεί συμβιωτική τροφή (52).

Το μητρικό γάλα έχει μελετηθεί αρκετά, και μπορεί να σχηματιστεί μια άποψη σχετικά με τα προβιοτικά που περιέχονται περισσότερο στο μικροβίωμά του. Το 66,7% των μελετών έχουν ανιχνεύσει βακτήρια του γένους *Streptococcus* με 60,0% ποσοστό εμφάνισης (25) (34) (35) (36) (37) (38) (40) (42) (43) ακολουθούμενο από το *Bifidobacterium* (53,3%) (28) (30) (31) (33) (36) (37) (39) (41) (42) (44) (45), *Lactobacillus* (53,3%) (28) (30) (31) (33) (36) (38) (39) (42) (43) (44) (46) , *Enterococcus* (40,0%) (28) (31) (36) (37) (38) (41) (43) (44) (46), *Weisella* (34) (35) (38), *Lactococcus* (31) (34), *Pediococcus* (38), *Leuconostoc* (34). Σε επίπεδο είδους, σε μεγάλο ποσοστό, έχουν ανιχνευτεί τα *S.aureus* (36), *S.epidermidis* (41), *S.salivarius* (42), *B.longum* (37), *B.bifidum* (45), *B.breve* (45) (41), *L.gasseri* (46), *E. Faecium* (41) (46) (54).

2.1.3.2 Παράγοντες που επηρεάζουν το μικροβίωμα

Το μικροβίωμα του μητρικού γάλακτος επηρεάζεται από τον τρόπο ζωής της μητέρας και τα βιολογικά χαρακτηριστικά του βρέφους (Εικόνα 2) (29).



Εικόνα 2. Παράγοντες που επηρεάζουν το μητρικό γάλα. (29)

- Ηλικία της κύησης (πρώωρη γέννα ή στην ώρα της): Σύμφωνα με τον Khodayar-Pardo P., στις γυναίκες που γέννησαν στην ώρα τους το μητρικό τους γάλα έχει σε αφθονία *Bifidobacterium* (43), ενώ ο Urbaniak C καταγράφει ότι η ηλικία της κύησης δεν έχει καμιά επίδραση στο μικροβίωμα του μητρικού γάλακτος.

- Τρόπος τοκετού (φυσικά/ κολπικά ή καισαρική τομή): Έχουν αναφερθεί ότι στο μητρικό γάλα γυναικών που είχαν γεννήσει με καισαρική τομή τα συνολικά βακτηριακά φορτία (43) και περιβαλλοντικά βακτήρια (50) είναι υψηλότερα. Οι γυναίκες που γέννησαν με καισαρική τομή έχει αναφερθεί ότι είχαν υψηλότερη σχετική αφθονία σε *Proteobacteria* (32), *Carnobacteriaceae* (34) *Lactobacillus* (33) αλλά χαμηλότερη σχετική αφθονία των *Leuconostocaceae* (34) σε σύγκριση με γυναίκες που είχαν γεννήσει κολπικά. Ο κολπικός τοκετός, από την άλλη πλευρά, έχει συσχετιστεί με υψηλότερη σχετική αφθονία σε *Bifidobacterium* (43) (24), *Haemophilus* (50), *Streptococcus* (50) (24) (31), *Lactobacillus* και χαμηλότερη σχετική αφθονία *Fingoldia* (50), *Halomonas* (50), *Staphylococcus* (50) (24) (31), *Prevotona* (50).

- Το βιολογικό φύλο του βρέφους (αρσενικό ή θηλυκό): Στο μικροβίωμα του μητρικού γάλακτος των μητέρων αρσενικών βρεφών καταγράφεται χαμηλότερη

ποικιλομορφία και πλούτος (18) παράλληλα όμως οι Williams JE. et al. αναφέρουν ότι είχαν υψηλότερη σχετική αφθονία σε *Streptococcus* και χαμηλότερο συγγενή αφθονία σε *Staphylococcus* (26).

- Σειρά γέννησης (πρώτο παιδί, δεύτερο παιδί κοκ): Οι Moossavi S et al. καταγράφουν χαμηλότερη ποικιλομορφία στη μικροχλωρίδα του μητρικού γάλακτος γυναικών που γέννησαν για πρώτη φορά, σε σύγκριση με εκείνες που είχαν ένα ή περισσότερα παιδιά (18).

- Λήψη αντιβιοτικών κατά τον τοκετό: Στις γυναίκες που έλαβαν αντιβιοτικά κατά την διάρκεια του τοκετού έχει αναφερθεί ότι έχουν χαμηλότερο συνολικό βακτηριακό φορτίο (42) επίσης δεν μπορούσε να βρεθεί *Bifidobacterium* (17).

- Αντίσταση στα αντιβιοτικά: Οι Parnanen K. et al. καταγράφουν ότι η αντίσταση στα αντιβιοτικά μεταφέρεται μέσω του μητρικού γάλακτος στο βρέφος (55).

- Οροθετική μητέρα: Οι Gonzalez R. et al. καταγράφουν ότι το μητρικό γάλα των οροθετικών γυναικών περιέχεται υψηλότερο ποσοστό σε *Lactobacillus* (40).

- Στάδιο γαλουχίας: Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει τη σύνθεση του μικροβιώματος του μητρικού γάλακτος με την πάροδο του χρόνου. Οι Murphy K. et al. ανέφεραν αύξηση του πλούτου των βακτηρίων από 3 σε 6 εβδομάδες και μείωση του πλούτου και της ποικιλομορφίας από 6 σε 12 εβδομάδες (15). Επιπλέον, έχει ανιχνευτεί υψηλότερη σχετική αφθονία σε *Enterococcus* (56), *Lactococcus* (34), *Leuconostoc* (34), *Staphylococcus* (19) (34) (56) και *Weissella* (34) κατά τις πρώτες 10 ημέρες, ενώ τα *Bifidobacterium* (43), *Granulicatella* (19) (26), *Lactobacillus* (43) (56), *Leptotrichia* (19) (34), *Prevotella* (34), *Rothia* (19), και *Veillonella* (34) είναι πιο άφθονα στη συνέχεια.

- Διατροφή: Στη Συρία, το *L.plantarum* βρέθηκε ως κύριο συστατικό του μικροβιώματος του μητρικού γάλακτος. Προτάθηκε ότι αυτό προέρχεται από τρόφιμα, καθώς ανιχνεύεται συνήθως σε λαχανικά που έχουν υποστεί ζύμωση που καταναλώνονται συχνά στη Συρία. (38). Ομοίως, στο Μπουρουντί βρέθηκε σε αφθονία το *Rhizobium*. Περιέχεται στα όσπρια, τα οποία αποτελούν το κύριο συστατικό της διατροφής των γυναικών στο Μπουρουντί. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι η πρόσληψη θερμίδων συσχετίστηκε με την αύξηση σε *Granulicatella* και ότι η πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων με την μείωση σε *Corynebacterium* (26).

- Δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ): Σε γυναίκες με υψηλούς δείκτες μάζας σώματος έχουν αναφερθεί ότι έχουν μια λιγότερο ποικιλόμορφη βακτηριακή κοινότητα στη μικροχλωρίδα του μητρικού γάλακτος αλλά με υψηλότερα συνολικά βακτηριακά φορτία γαλακτοβάκιλλων στο πρωτόγαλα (34). Επιπλέον, οι γυναίκες με υψηλό ΔΜΣ έχει παρατηρηθεί ότι έχουν υψηλότερη σχετική αφθονία σε *Akkermansia* (34) (39), *Granulicatella* (26) και *Staphylococcus* (31) και χαμηλότερη σχετική αφθονία σε *Bacteroides* (26), *Bifidobacterium* (34), *Lactobacillus* (31) και *Streptococcus* (31) στο ώριμο γάλα.

- Λήψη προβιοτικών κατά την εγκυμοσύνη: μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση προβιοτικών κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης δεν επηρεάζει την μικροχλωρίδα του μητρικού γάλακτος (17) (19) (57).

- Κάπνισμα: Το κάπνισμα έχει αναφερθεί ότι επηρεάζει τα ανοσολογικά συστατικά του μητρικού γάλακτος (58), αντιθέτως οι Moossavi S. Et al. διερεύνησαν την επίδραση του καπνίσματος στη μικροχλωρίδα του μητρικού γάλακτος και δεν παρατήρησαν καμία επίδραση στην ποικιλομορφία ή τη σύνθεση (18).

- Γεωγραφική θέση: Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει διαφορές στη μικροχλωρίδα του μητρικού γάλακτος από περιοχή σε περιοχή (35) (32) (33) (48). Μια μελέτη έδειξε ότι οι γυναίκες στις ΗΠΑ μπορεί να έχουν λιγότερο *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* στο μητρικό γάλα τους σε σύγκριση με τις γυναίκες στην Ευρώπη (35). Μια άλλη μελέτη αναφέρει διαφορές στη σύνθεση του μητρικού γάλακτος μεταξύ των γυναικών στην Ιταλία και το Μπουρούντι (Ιταλία: κυριαρχία *Abiotrophia* και *Alloiococcus* στο πρωτόγαλα και *Parabacteroides* στο ώριμο γάλα. Μπουρουντί: *Aquabacterium*, *Peptrostreptococcus* και *Serratiales* στο πρωτόγαλα και , *Rhizobium* και *Weissella* σε ώριμο γάλα) (48). Επίσης έχει πραγματοποιηθεί σύγκριση μεταξύ Νότιας Αφρικής, Φινλανδίας, Κίνας, και Ισπανίας. Βρέθηκε υψηλότερη σχετική αφθονία των *Enterobacteriaceae* και *Pseudomonadaceae* στη Νότια Αφρική, *Firmicutes* στη Φινλανδία, *Streptococcus* στην Κίνα και *Cutibacterium* και *Pseudomonas* στην Ισπανία (32). *Lactobacillaceae* βρέθηκαν μοναδικά σε δείγματα από τη Φινλανδία, *Bifidobacteriaceae* μόνο σε δείγματα από τη Νότια Αφρική και *Enterococcaceae* σε δείγματα από όλες τις χώρες εκτός από την Κίνα (32). Ωστόσο, δεδομένου ότι η εξαγωγή DNA έγινε σε διαφορετικά εργαστήρια, επομένως αυτά τα ευρήματα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή. Η βακτηριακή σύνθεση σε επίπεδο οικογένειας έχει επίσης αναφερθεί ότι διαφέρει μεταξύ δειγμάτων από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές στην Κίνα και την Ταϊβάν (33) (31).

- Μαστίτιδα: Έχει παρατηρηθεί ότι η βακτηριακή ποικιλομορφία ήταν χαμηλότερη στο μητρικό γάλα των γυναικών με μαστίτιδα σε σύγκριση με των υγιών γυναικών (28) (22). Στις γυναίκες με οξεία μαστίτιδα, ο *S.aureus* κυριαρχεί στη μικροχλωρίδα του μητρικού γάλατος, ενώ κατά τη διάρκεια της υποξείας μαστίτιδας κυριαρχεί ο *S. epidermidis* (28). Επιπλέον, αναφέρεται χαμηλότερη αφθονία αναερόβιων βακτηρίων, *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium* και *Ruminococcus* και υψηλότερη σχετική αφθονία *Aeromonas*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Masphyloctitis* και *Staphyloctitis* (22). Τέλος έχει καταγραφεί ότι το αρχαϊκό DNA απουσιάζει από το μητρικό γάλα των γυναικών με μαστίτιδα, ενώ βρέθηκε σε όλες τις υγιείς γυναίκες (28).

2.2 Ταυτοποίηση βακτηρίων με γραμμωτό κώδικα

Οι μικροβιακοί πληθυσμοί οι οποίοι αποικίζουν όλες σχεδόν τις σωματικές επιφάνειες και τους βλεννογόνους του ανθρώπινου οργανισμού, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και έχουν συσχετιστεί με ευεργετικές συνέπειες για τον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά και άμεσα ή έμμεσα με ένα ευρύ φάσμα νοσολογικών οντοτήτων. Η δομή και οι δυναμικές σχέσεις των μικροχλωρίδων μελετώνται εντατικά τα τελευταία χρόνια. Μέχρι τη δεκαετία του 1990, η καλλιέργεια ήταν η μόνη διαθέσιμη μέθοδος για τη διερεύνηση της σύνθεσης των μικροχλωρίδων, αλλά έκτοτε έχουν γίνει διαθέσιμες και μέθοδοι χωρίς καλλιέργεια. Η πρόσφατη εισαγωγή τεχνικών αλληλούχισης επόμενης γενιάς και οι δυνατότητές της για μαζική αλληλούχιση 16S rRNA αμπλικονίων ή η μαζική παράλληλη αλληλούχιση του συνόλου των μικροβιακών γονιδίων μίας μικροχλωρίδας, έχει μεγαλώσει εκθετικά τη δυνατότητα μελέτης των πολύπλοκων οικοσυστημάτων του ανθρώπινου γονιδιώματος. (59)

2.2.1 Υπομονάδα 16S του ριβοσωματικού RNA (16S rRNA)

Η υπομονάδα 16S του ριβοσωματικού RNA (16S rRNA) των βακτηρίων έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στο παρελθόν και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση των βακτηρίων. Το 16S rRNA που αποτελείται από 1500 περίπου βάσεις νουκλεοτιδίων, βρίσκεται σε όλα τα βακτήρια. Η βασική του λειτουργία είναι η έναρξη και η επιμήκυνση της πρωτεϊνοσύνθεσης, η οποία δεν έχει αλλάξει και έτσι, τυχαίες αλλαγές αποτελούν δείκτη του χρόνου εξελίξεως των βακτηρίων. Παρ' όλη την εν γένει υψηλή ομολογία του 16S rRNA μεταξύ των βακτηριακών ειδών ("συντηρημένες περιοχές"), το 16S rRNA περιλαμβάνει στην αλληλουχία του εννέα μεταβλητές περιοχές που είναι διακριτές μεταξύ των διαφόρων μικροβίων και οι οποίες ως εκ τούτου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αναγνώριση και διάκριση μεταξύ των βακτηρίων. (60)

2.2.2 Αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS)

Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing) είναι μία πρόσφατη τεχνολογία με την οποία πραγματοποιείται προσδιορισμός αλληλουχιών DNA με υψηλή απόδοση αλλά και με χαμηλό κόστος. Με τη χρήση των συσκευών αλληλούχισης επόμενης γενιάς μεγάλος αριθμός τμημάτων DNA μπορούν να αλληλουχηθούν παράλληλα, δηλαδή ταυτόχρονα και στην ίδια αντίδραση. Η αντίδραση αυτή καλείται μαζική παράλληλη αλληλούχιση. (61)

Παρατηρούνται διαφορετικές μέθοδοι NGS ανάλογα με τις ανάγκες που πρέπει να αντιμετωπιστούν. Το αρχικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείτε μπορεί να είναι γονιδιωματικό DNA, αγγελιοφόρο ή μη κωδικό RNA (non coding RNA) ή οποιοδήποτε νουκλεϊκό και ριβονουκλεϊκό μόριο που λαμβάνεται μετά από ειδικές διαδικασίες (62). Η διαδικασία ξεκινάει με τον κατακερματισμό του στοχευμένου DNA και ακολουθεί η δημιουργία της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης. Κατά την δημιουργία της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης ενισχύεται το επιθυμητό τμήμα του DNA. Έπειτα, φορτώνεται σε ένα υπολογιστικό πρόγραμμα αλληλούχισης (sequencer) και οι πληροφορίες από κάθε τμήμα αλληλούχισης συγκεντρώνονται από ένα σύστημα βιοπληροφορικής. Οι πληροφορίες αλληλούχισης συγκρίνονται με μια αλληλουχία αναφοράς και το σύστημα εκφράζει τα τελικά αποτελέσματα. (63)

2.2.3 Αλληλούχιση με νανοπόρους (Nanopore Sequencing)

Η μέθοδος με νανοπόρους βασίζεται στο ότι η αγωγιμότητα του πόρου, για τα ρεύματα ιόντων, μεταβάλλεται όταν ο πόρος έχει αποκλειστεί από τον κλώνο του νουκλεϊκού οξέος που διέρχεται μέσα από αυτόν. Η ροή του ρεύματος ιόντος βασίζεται στην μετατόπιση του μορίου μέσα στον πόρο. (64) Τα ιόντα ηλεκτρολύτη στο διάλυμα μετακινούνται διαμέσου του πόρου ηλεκτροφορητικά κάτω από μια προκαθορισμένη τάση, δημιουργώντας έτσι ένα σήμα ιοντικού ρεύματος. Όταν στο διάλυμα θα προστεθεί ένα μόριο, όπως ένα αρνητικά φορτισμένο μόριο DNA, το ρεύμα που ρέει διαμέσου του νανοπόρου θα αποκλειστεί, διακόπτοντας το μεταδιδόμενο σήμα. Οι φυσικές και χημικές ιδιότητες των μορίων στόχων μπορούν να υπολογιστούν με την στατιστική ανάλυση του εύρους και της διάρκειας των ρευμάτων. (65) Κάθε νουκλεοτίδιο παρέχει μία μοναδική ηλεκτρική υπογραφή που καθορίζεται από τις ιδιότητες προσανατολισμού και φορτίου (66)

Η αλληλούχιση με νανοπόρους έγινε εμπορικό προϊόν της εταιρείας Oxford Nanopore Technologies (ONT) η οποία δημιούργησε μια συσκευή προσδιορισμού ακολουθίας DNA μιας χρήσης, σε μέγεθος μιας ράβδου μνήμης USB, το οποίο έχει σχεδιαστεί για γενικές εφαρμογές της αλληλουχίας του DNA. Το μέσο μήκος ανάγνωσης του MinION είναι περίπου 5,4kb έως 10kb το οποίο είναι πολύ μεγαλύτερο από τα μέσα μήκη ανάγνωσης άλλων τεχνολογιών προσδιορισμού ακολουθίας DNA. (67)

Το βασικό πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι ότι η προετοιμασία του δείγματος είναι ελάχιστη σε σύγκριση με τις μεθόδους προσδιορισμού αλληλουχίας

δεύτερης γενιάς και μπορούν να ληφθούν μεγάλα μήκη ανάγνωσης στην περιοχή. Επιπλέον, δεν απαιτούνται βήματα ενίσχυσης ή απολίνωσης πριν από τον προσδιορισμό της αλληλουχίας. Το κύριο πρόβλημα με αυτήν την τεχνολογία είναι η απαίτηση βελτιστοποίησης της ταχύτητας μετατόπισης του DNA μέσω του νανοπόρου για να εξασφαλιστεί αξιόπιστη μέτρηση των αλλαγών του ιοντικού ρεύματος και να μειωθούν τα υψηλά ποσοστά σφάλματος της κλήσης βάσης. (62)

2.2.3.1 Σύγκριση Nanopore και Illumina

Η κυρίαρχη μέθοδος στον χώρο της NGS είναι η Illumina. Η αλληλουχία Illumina είναι κυρίως μια πλατφόρμα σύντομης ανάγνωσης, αλληλουχίας-σύνθεσης και έχει γίνει απίστευτα δημοφιλής. Η αλληλουχία νανοπόρων είναι μακροχρόνια, άμεση αλληλούχιση, που βασίζεται σε εντελώς διαφορετικές αρχές από τις παραδοσιακές τεχνολογίες αλληλούχισης (68).

Η αλληλουχία Illumina χρησιμοποιεί τεχνολογία αναστρέψιμων τερματιστών βαφής για την ανίχνευση της αλληλουχίας των μορίων DNA. Το δείγμα αρχικά διασπάται σε μικρές τομές. Επομένως, στην αλληλουχία illumina δημιουργούνται στην αρχή σύντομες αναγνώσεις ή θραύσματα 100-150bp. Αυτά τα θραύσματα στη συνέχεια συνδέονται με γενικούς προσαρμογείς και ανόπτονται σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα. Γίνεται PCR για την ενίσχυση κάθε θραύσματος. Αυτό δημιουργεί ένα σημείο με πολλά αντίγραφα του ίδιου τμήματος. Αργότερα, διαχωρίζονται σε μονόκλωνα και υποβάλλονται σε αλληλούχιση. Η αντικειμενοφόρος πλάκα προσδιορισμού αλληλουχίας περιέχει επισημασμένα με φθορισμό νουκλεοτίδια, πολυμεράση DNA και έναν τερματιστή. Λόγω του τερματιστή, προστίθεται μόνο μία βάση κάθε φορά. Κάθε τερματιστής κύκλου αφαιρείται και επιτρέπει την προσθήκη της επόμενης βάσης στην τοποθεσία. Επιπλέον, με βάση τα σήματα φθορισμού, ο υπολογιστής ανιχνεύει τη βάση που προστίθεται σε κάθε κύκλο. Η τεχνολογία αλληλουχίας Illumina κατασκευάζει την ακολουθία μέσα σε 4 έως 56 ώρες. (69)

Η βασική διαφορά μεταξύ της αλληλουχίας nanopore και illumina είναι ότι η nanopore είναι μια τεχνική προσδιορισμού αλληλουχίας που χρησιμοποιεί νανοπόρους για να ανιχνεύσει την αλληλουχία ενός μορίου DNA, ενώ η αλληλουχία illumina είναι μια τεχνική αλληλούχισης που χρησιμοποιεί αναστρέψιμη χρωστική τεχνολογία τερματιστών για την ανίχνευση της αλληλουχίας ενός μορίου DNA. (69)

Το κόστος είναι επίσης σημαντικό στοιχείο στην επιλογή της πλατφόρμας αλληλουχίας και η τιμολόγηση εξαρτάται από το συγκεκριμένο sequencer που

χρησιμοποιείται. Η πλατφόρμα Illumina κυμαίνεται από 5-150\$ ενώ η Nanopore από 7-100\$. (69)

Αν και οι τεχνικές και το κόστος της αλληλουχίας ποικίλλουν μεταξύ αυτών των δύο προσεγγίσεων αλληλουχίας, η κύρια διαφορά μεταξύ του Illumina και του Oxford Nanopore έγκειται στα δεδομένα ακατέργαστης αλληλουχίας που παράγονται από αυτές τις διαδικασίες. (68)

Η αλληλουχία Illumina αλληλουχεί κυρίως μικρά θραύσματα DNA, παράγοντας μήκη ανάγνωσης 50-300 ζευγών βάσεων (bp) τα οποία στη συνέχεια συναρμολογούνται σε μια ολόκληρη αλληλουχία γονιδιώματος χρησιμοποιώντας αγωγούς βιοπληροφορικής και γονιδιώματα αναφοράς. Αυτό ονομάζεται τεχνολογία σύντομης ανάγνωσης και ήταν απίστευτα χρήσιμο μέχρι στιγμής στη γονιδιωματική. Ωστόσο, είναι πολύ δύσκολο να συναρμολογηθούν σωστά αυτές οι σύντομες αναγνώσεις και εάν το γονιδίωμα προέρχεται από έναν οργανισμό που δεν διαθέτει γονιδίωμα αναφοράς υψηλής ποιότητας ή έχει πολλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ή σπάνιες παραλλαγές, καθιστά τη συναρμολόγηση ακόμη πιο δύσκολη και λιγότερο ακριβής (68).

Η αλληλουχία νανοπόρων είναι μια τεχνολογία μακράς ανάγνωσης, η οποία συχνά παράγει αναγνώσεις μήκους 10.000-30.000 ζευγών βάσεων και το ρεκόρ μήκους απλής ανάγνωσης 2.300.000 ζευγών βάσεων. Το πλεονέκτημα των μεγαλύτερων αναγνώσεων είναι η ευκολότερη συναρμολόγηση του γονιδιώματος και η υψηλότερη ακρίβεια στον εντοπισμό σπάνιων παραλλαγών και στη σαφέστερη διάκριση των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (68).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η Illumina εισβάλλει στον πολυδιαβασμένο χώρο με τη νέα της ανάλυση Infinity. Το Infinity χρησιμοποιεί την υπάρχουσα αλληλουχία Illumina με διαφορετικά βήματα προετοιμασίας δειγμάτων για να παράγει αναγνώσεις μήκους έως και 10.000 ζευγών βάσεων (68).

Και οι δύο τεχνικές είναι γρήγορες αλλά η Nanopore λειτουργεί σε πραγματικό χρόνο (real time) ενώ η Illumina θέλει τέσσερις (4) με πενήντα-έξι (56) ώρες για να παραδώσει αποτελέσματα. (69)

2.3 Ανάλυση 16S με τεχνολογία νανοπόρου

Περιορίζοντας σε μια συγκεκριμένη περιοχή ενδιαφέροντος, ο χρήστης μπορεί να δει όλους τους οργανισμούς στο δείγμα χωρίς να προσδιορίσει την αλληλουχία περιπτώσεων περιοχών του γονιδιώματος, καθιστώντας τη δοκιμή ταχύτερη και πιο οικονομική. Υπάρχουν δώδεκα (12) μοναδικοί γραμμικοί κώδικες, οι οποίοι επιτρέπουν στον χρήστη να συγκεντρώσει έως και δώδεκα (12) διαφορετικά δείγματα σε ένα πείραμα αλληλουχίας. Η ανάλυση χωρίζεται σε τρία (3) στάδια: προετοιμασία του δείγματος, προετοιμασία βιβλιοθήκης, αλληλούχιση και ανάλυση. (70)

2.3.1 Προετοιμασία του δείγματος

Η προετοιμασία του δείγματος περιλαμβάνει την σωστή απομόνωση του DNA από τα δείγματα καθώς και τον έλεγχο ποιότητας του γενετικού υλικού (μήκος, ποσότητα, καθαρότητα).

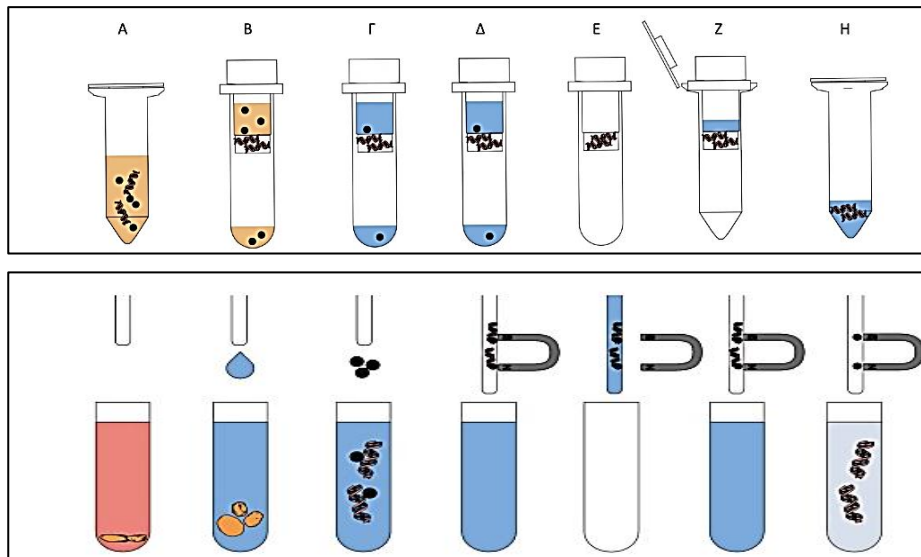
2.3.1.1 Απομόνωση

Η απομόνωση ακολουθεί μια απλή ροή διεργασίας που αποτελείται από τρία (3) στάδια (Πίνακας 1):

Πίνακας 1. Στάδια απομόνωσης του γενετικού υλικού (71)

Λύση	<ul style="list-style-type: none">• απελευθέρωση DNA• μετουσίωση των πρωτεϊνών• απενεργοποίηση νουκλεασών
Έκπλυση	<ul style="list-style-type: none">• απομάκρυνση πρωτεϊνών, αλάτων και άλλων ρύπων• καλύτερη δέσμευση του νουκλεϊκού οξέος
Έκλουση	<ul style="list-style-type: none">• το DNA απελευθερώνεται με τη χρήση αλκαλικού διαλύματος και το έκλουσμα συλλέγεται

Υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα συστήματα αντιδραστηρίων (κιτ) που έχουν απλοποιήσει κατά πολύ την απομόνωση του γενετικού υλικού (Εικόνα 3). Με την εξέλιξη των συστημάτων ήδη υπάρχουν εμφανείς διαφορές μεταξύ τους, ως προς την ευκολία χειρισμού και τις αναλυτικές οδηγίες εκτέλεσης της διαδικασίας, τον ταυτόχρονο χειρισμό πολλών δειγμάτων, την ταχύτητα, την αποφυγή χρήσης επικίνδυνων χημικών, την υψηλή ποιότητα απομονωμένου DNA, την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. (71)



Εικόνα 3. Πάνω απεικονίζονται τα στάδια απομόνωσης ενός συστήματος που χρησιμοποιεί στήλες με μεμβράνες πυριτίου για τις πλύσεις. Κάτω απεικονίζονται τα στάδια απομόνωσης ενός αυτόματου συστήματος που χρησιμοποιεί μαγνητικά σφαιρίδια. (66)

Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν πλήρως αυτοματοποιημένα ρομποτικά συστήματα απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων με βάση την τεχνολογία των μαγνητικών σφαιριδίων. Το σύστημα εκτελεί αυτόματα όλα τα απαραίτητα βήματα, από την προετοιμασία του δείγματος μέχρι την έκλυση του καθαρού γενετικού υλικού (DNA ή RNA). Τα πλεονεκτήματα ενός τέτοιου συστήματος είναι η εκμηδένιση του κινδύνου επιμόλυνσης από δείγμα σε δείγμα, ο σύντομος χρόνος απομόνωσης (τυπικά 30-45 λεπτά για 6 έως 16 δείγματα) και η ελάχιστη ενασχόληση του χειριστή. (71)

2.3.1.2 Έλεγχος ποιότητας

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας απομόνωσης των νουκλεϊκών οξέων το επόμενο κρίσιμο βήμα, είναι η εκτίμηση της ποιότητας και της καθαρότητας του απομονωμένου υλικού και ο υπολογισμός της συγκέντρωσης αυτού. Η εκτίμηση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με φασματοφωτομετρία. (71)

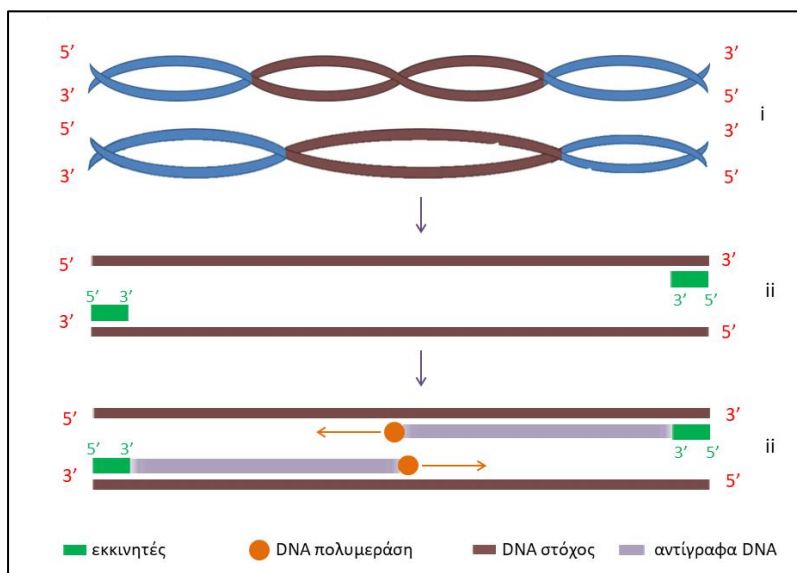
Για την εκτίμηση της καθαρότητας ενός διαλύματος νουκλεϊκών οξέων είναι απαραίτητο να μετρηθεί η απορρόφηση σε δύο μήκη κύματος:

- στα 260nm, που εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση τα νουκλεϊκά οξέα
- στα 280nm, που εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση οι πεπτιδικοί δεσμοί των πρωτεϊνών

Μετρίεται λοιπόν η απορρόφηση του απομονωμένου δείγματος στα 260nm και στα 280nm, και στη συνέχεια να υπολογίζεται ο λόγος τους (A_{260nm}/A_{280nm}). Συμπερασματικά, ένας λόγος A_{260nm}/A_{280nm} μεταξύ 1,8 και 2 είναι ικανοποιητικός. (71)

2.3.2 Προετοιμασία βιβλιοθήκης

Η προετοιμασία της βιβλιοθήκης περιλαμβάνει την ενίσχυση του γονιδίου 16s χρησιμοποιώντας γραμμικούς κώδικες με χρήση PCR (Εικόνα 4) και την σύνδεση των προσαρμογών της αλληλούχισης στα άκρα του DNA με την χρήση των κατάλληλων αντιδραστηρίων. Ενδιάμεσα πραγματοποιούνται πλύσεις, για την καλύτερη σύνδεση των αλληλουχιών με το DNA. (70)



Εικόνα 4. Τα στάδια της PCR είναι τρία (3) και επαναλαμβάνονται μέχρι το επιθυμητό αποτέλεσμα. i) Αποδιάταξη του δίκλωνου, ii) Υβριδισμός εκκινητών, iii) Σύνθεση αντιγράφων DNA. Στην παρούσα εργασία οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται αντιγράφουν το γονίδιο 16s, οπότε αναπαράγουν μόνο το DNA των βακτηρίων. (69)

2.3.3 Αλληλούχιση και ανάλυση

Αφού φορτωθούν οι βιβλιοθήκες στο MiniION, πραγματοποιείται εκκίνηση του λογισμικού, το οποίο συλλέγει ακατέργαστα δεδομένα από τη συσκευή και τα μετατρέπει σε βασικές αναγνώσεις. (70)

Κεφάλαιο 3: Υλικά - Μέθοδοι

3.1 Δείγματα μητρικού γάλακτος

Κατά την εκτέλεση της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μητρικού γάλακτος από Ελληνίδες γυναίκες που γέννησαν τους τρεις μήνες του καλοκαιριού του 2021. Τα δείγματα παραχωρήθηκαν από τις γυναίκες κατά τις πρώτες μέρες θηλασμού (πρώιμο μητρικό γάλα).

Πίνακας 2. Στοιχεία των γυναικών που παραχώρησαν τα δείγματα μητρικού γάλακτος

	Ημ. Γέννησης	Λήψη ΜΓ (24ωρο)	Ηλικία	Υποκείμενα νοσήματα	Αντιβιοτικά κατά τον τοκετό	Επιπλοκές κύησης	Φύλο	Εμβόλιο κατά του covid
1	15/6/2021	3ο	32	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	Α	ΝΑΙ
2	17/6/2021	3ο	31	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Α	ΟΧΙ
3	27/6/2021	3ο-4ο	30	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	Α	ΟΧΙ
4	10/7/2021	3ο	41	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Θ	ΟΧΙ
5	22/7/2021	4ο	37	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Θ	ΝΑΙ
6	31/7/2021	7ο	36	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Α	ΝΑΙ
7	30/7/2021	3ο	34	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	Α	ΝΑΙ
8	7/8/2021	3ο-4ο	34	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	Α	ΝΑΙ
9	10/8/2021	3ο	29	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Α	ΟΧΙ

3.2 Προετοιμασία δείγματος

Για την προετοιμασία των δειγμάτων πραγματοποιείται απομόνωση του γενετικού υλικού, με την χρήση του «Monarch® Genomic DNA Purification Kit» της BioLab.

Το σύστημα αυτό χρησιμοποιεί στήλες με μεμβράνες πυριτίου για τις πλύσεις του γενετικού υλικού (Εικόνα 3). Το πακέτο περιέχει: Cell Lysis Buffer, Binding Buffer, Wash Buffer, Elute Buffer, RNA-αση Α και στήλες πλύσεων. Πριν την έναρξη της απομόνωσης πρέπει να έχει προηγηθεί:

- Αποθήκευση τη RNA-ασης Α και της Πρωτεΐνάσης Κ στους -20°C .
- Προσθέστε αιθανόλη ($\geq 95\%$) στο σ Wash Buffer όπως υποδεικνύεται στην ετικέτα της φιάλης.
- Προθέρμανση του Elute Buffer στους 60°C .

3.2.1 Λύση των κυττάρων

Για την λύση των κυττάρων προστίθενται στα δείγματα 1μl πρωτεϊνάση K, 3μl RNA-αση A, πραγματοποιείται ανακίνηση με την χρήση vortex, και στην συνέχεια συμπληρώνονται 100μl Cell Lysis Buffer της εταιρίας.

Έπειτα, τα δείγματα, τοποθετούνται σε θερμικό αναδευτήρα με ανάδευση σε πλήρη ταχύτητα (~1400rpm), στους 56°C, για 5min. Μετά την επώαση προστίθενται 400μl από το Binding Buffer της εταιρίας, πραγματοποιείται ανακίνηση με την χρήση vortex και ακολουθεί η μετάγγιση των δειγμάτων σε στήλη.

3.2.2 Έκπλυση

Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση αρχικά για 3min, στα 1000rpm και στη συνέχεια για 1min στα 12000rpm. Αφού μεταφερθεί η στήλη σε άλλον περιέκτη πραγματοποιούνται πλύσεις με τη χρήση 500μl Wash Buffer της εταιρίας. Αμέσως μετά φυγοκεντρείται η στήλη για 1min στα 12000rpm.

3.2.3 Έκλουση

Προστίθενται στην στήλη 100μl Elute Buffer (60°C) της εταιρίας. Σύμφωνα με την εταιρία το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης προσφέρει ισχυρή προστασία κατά της ενζυμικής αποικοδόμησης και είναι βέλτιστο για μακροχρόνια αποθήκευση του DNA. Φυγοκεντρείται η στήλη για 1min στη μέγιστη ταχύτητα (12000rpm) για την έκλουση του gDNA. Ακολουθεί απομόνωση του διηθήματος και έλεγχος της καθαρότητας.

3.2.4 Έλεγχος καθαρότητας

Στην συνέχεια μετρίεται η απορρόφηση σε δύο μήκη κύματος, στα 260nm και στα 280nm, για την εκτίμηση της καθαρότητας, όπως περιγράφεται και στο Κεφάλαιο 3.2.4.

3.3 Προετοιμασία βιβλιοθήκης 16s

Για την προετοιμασία της βιβλιοθήκης ακολουθήθηκαν οι παρακάτω οδηγίες του πρωτόκολλου του «16S Barcoding Kit» της Oxford Nanopore Technologies.

1. Ξεπάγωμα των γραμμωτών κωδικών 16s σε θερμοκρασία δωματίου, και ανακίνηση με χρήση μικροφυγόκεντρου. Κατά την διάρκεια της χρήσεως του διατηρούνται σε πάγο.
2. Προετοιμασία του DNA σε νερό nuclease-free.
3. Στο mix της pcr, για ένα δείγμα, αναμιγνύονται τα παρακάτω:

Πίνακας 3. Mix της pcr βιβλιοθήκης

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Νερό nuclease-free	14μl
DNA (δείγμα) (10ng)	10μl
16S Barcode (10μM)	1μl
LongAmp Taq 2X master mix	25μl
Σύνολο	50μl

4. Απαλό ανακάτεμα και ανακίνηση με χρήση μικροφυγόκεντρου.
5. Με την μέθοδο της Αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), πολλαπλασιάζεται το επιθυμητό DNA στόχος με τους παρακάτω κύκλους:

Πίνακας 4. Κύκλοι PCR βιβλιοθήκης

Βήμα κύκλου	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	95°C	1min	1
Αποδιάταξη κλώνων	95°C	20secs	25
Υβριδισμός εκκινήτων	55°C	30secs	25
Σύνθεση DNA	65°C	2mins	25
Τελική σύνθεση	65°C	5mins	1
	4°C	∞	

6. Μεταφορά του δείγματος σε καθαρό Eppendorf των 1,5ml.
7. Ανακίνηση των σφαιριδίων AMPure XP με την χρήση vortex, και ανάμειξη 30μl αυτών στο δείγμα. Ακολουθεί ανάδευση με περιστροφικό μίξερ, για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.

8. Φυγοκεντρείται το δείγμα με τα σφαιρίδια, τοποθετείται πάνω σε έναν μαγνήτη και αφαιρείται το διήθημα. Καθαρίζεται το δείγμα με 200μl φρεσκοπαρασκευασμένης αιθανόλης 70% χωρίς να διαταραχθούν τα σφαιρίδια και μετρά αφαιρείται η αιθανόλη. Αυτό το βήμα επαναλαμβάνεται.
9. Φυγοκεντρείται το δείγμα με τα σφαιρίδια και τοποθετούνται ξανά στον μαγνήτη. Αφαιρείται τυχόν υπολειμματική αιθανόλη και αφήνεται να στεγνώσει για ~30 δευτερόλεπτα. Αφαιρούνται τα δείγματα από τον μαγνήτη.
10. Πραγματοποιείται αραίωση του δείγματος με διάλυμα 10μl (10mM Tris-HCl pH 8,0 και 50 mM NaCl).
11. Όταν το δείγμα γίνει διαφανές, πραγματοποιείται μετάγγιση 10μl εκλούσματος σε καθαρό περιέκτη (Eppendorf των 1,5ml). Τα σφαιρίδια απορρίπτονται.
12. Συγκεντρώνονται όλες οι βιβλιοθήκες (δείγματα) με γραμμωτό κώδικα στις επιθυμητές αναλογίες. Προστίθεται 1μL RAP της εταιρίας, σε κάθε μία βιβλιοθήκη και πραγματοποιείται απαλή ανάδευση. Μετά αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5min, για επώαση.

3.4 Αλληλούχιση και ανάλυση

Οι προετοιμασμένες βιβλιοθήκες φορτώνονται στο κελί ροής MinION. Μέχρι να έρθει η ώρα για την φόρτωση οι βιβλιοθήκες αποθηκεύονται σε πάγο.

Πίνακας 5. Προετοιμασία βιβλιοθήκης πριν την φόρτωση.

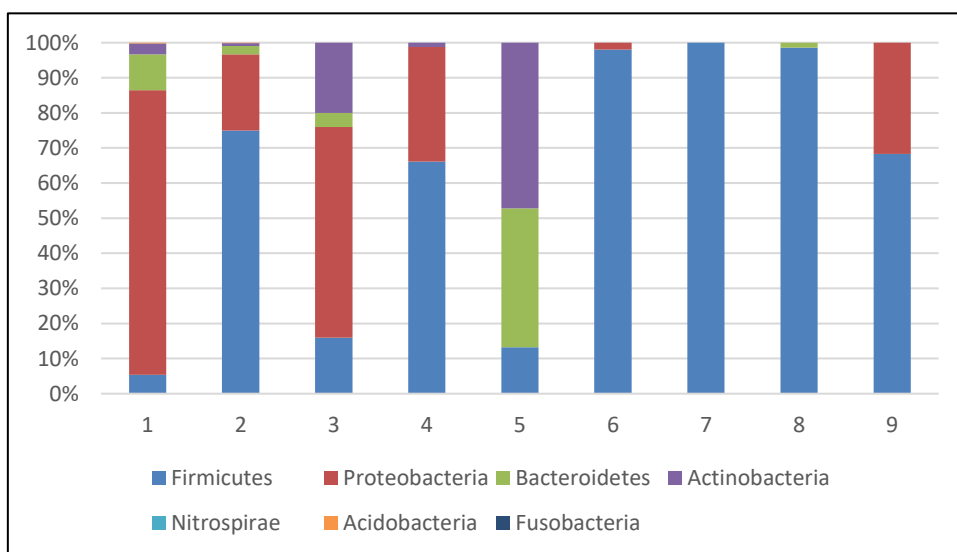
Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Sequencing Buffer (SQB)	34μl
Loading Beads (LB)	25,5μl
Νερό nuclease-free	4,5μl
DNA βιβλιοθήκη (δείγμα)	11μl
Σύνολο	75μl

Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα

Από την ανάλυση 16S με τεχνολογία νανοπόρου της Oxford Nanopore Technologies, το 87,4% των αποτελεσμάτων ήταν επιτυχή. Λήφθηκαν λοιπόν, ικανοποιητικά αποτελέσματα για το μικροβίωμα του μητρικού γάλακτος, περιλαμβανομένου του φύλου, της οικογένειας, του γένους και του είδους των βακτηρίων που το αποτελούν. Εντοπίστηκαν συνολικά εκατόν-εβδομήντα-πέντε (175) είδη βακτηρίων.

4.1 Βακτηριακά φύλα

Εντοπίστηκαν εννιά (9) είδη βακτηριακών φύλων στο μικροβίωμα του μητρικού γάλακτος (Γράφημα 2). Τα φύλα που βρέθηκαν σε μεγαλύτερη συχνότητα μέσα στα δείγματα, από το συχνότερο στο λιγότερο συχνό, είναι: *Firmicutes* (62,09%), *Proteobacteria* (33,76%), *Bacteroidetes* (3,21%), *Actinobacteria* (0,47%). Επιπλέον φύλα που βρέθηκαν σε μικρό ποσοστό στα δείγματα: *Nitrospirae*, *Acidobacteria*, *Fusobacteria*.



Γράφημα 2. Τα φύλα των βακτηρίων που εντοπίστηκαν στα δείγματα μητρικού γάλακτος.

4.1.1 Φύλο: Firmicutes

Το πιο συχνό φύλο που εμφανίστηκε στο μητρικό γάλα, είναι το φύλο *Firmicutes*. Είναι μια ομάδα βακτηρίων, τα περισσότερα από τα οποία έχουν θετική κατά Gram δομή κυτταρικού τοιχώματος. Λίγα, ωστόσο, έχουν μια πορώδη ψευδο-εξωτερική μεμβράνη που τους κάνει να βάφονται αρνητικά κατά Gram (72).

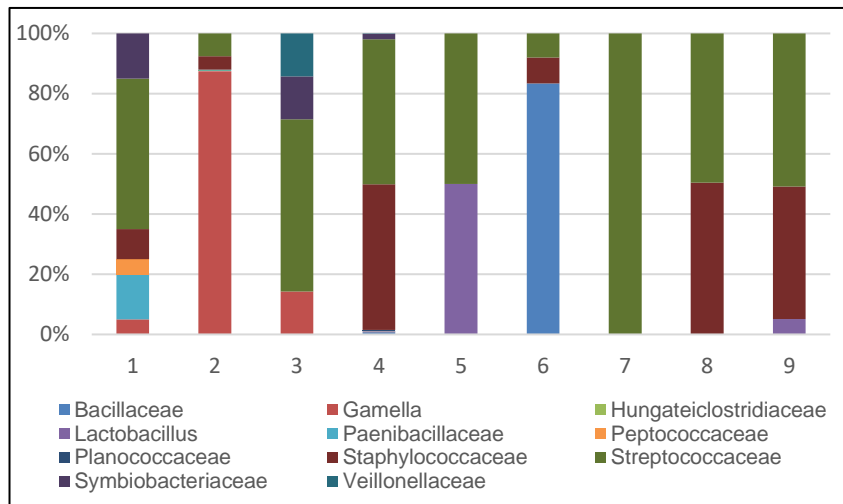
Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6), παρουσιάζονται οι οικογένειες και τα είδη των βακτηρίων του φύλου *Firmicutes* που βρέθηκαν στο μητρικό γάλα.

Πίνακας 6 Τα είδη των βακτηρίων του φύλου *Firmicutes* ομαδοποιημένα σε οικογένειες

Firmicutes		
Bacillaceae	Staphylococcaceae	Streptococcaceae
Bacillus aerophilus	Staphylococcus aureus	Streptococcus acidominimus
Bacillus akibai	Staphylococcus auricularis	Streptococcus anginosus
Bacillus cereus	Staphylococcus capitis	Streptococcus australis
Bacillus halmapalus	Staphylococcus caprae	Streptococcus azizii
Bacillus mycoides	Staphylococcus carnosus	Streptococcus constellatus
Bacillus nakamurai	Staphylococcus cohnii	Streptococcus cristatus
Bacillus pacificus	Staphylococcus devriesei	Streptococcus dentiloxodontae
Bacillus paramycooides	Staphylococcus edaphicus	Streptococcus downei
Bacillus paranthracis	Staphylococcus equorum	Streptococcus gordonii
Bacillus proteolyticus	Staphylococcus haemolyticus	Streptococcus himalayensis
Bacillus solisilvae	Staphylococcus hominis	Streptococcus infantis
Bacillus tropicus	Staphylococcus lugdunensis	Streptococcus intermedius
Bacillus wiedmannii	Staphylococcus microti	Streptococcus marmotae
Bacillus xiamenensis	Staphylococcus muscae	Streptococcus mitis
Gamella	Staphylococcus petrasii	Streptococcus oralis
Gemella haemolysans	Staphylococcus piscifermentans	Streptococcus panodentis
Gemella taiwanensis	Staphylococcus pseudintermedius	Streptococcus parasanguinis
Hungateiclostridiaceae	Staphylococcus saccharolyticus	Streptococcus peroris
Thermoclostridium stercorarium	Staphylococcus saprophyticus	Streptococcus pneumoniae
Lactobacillus	Staphylococcus schleiferi	Streptococcus pseudopneumoniae
Lactobacillus crispatus	Staphylococcus stepanovicii	Streptococcus rubneri
Lactobacillus graminis	Staphylococcus warneri	Streptococcus salivarius
Lactobacillus paracasei	Symbiobacteriaceae	Streptococcus thermophilus
Paenibacillaceae	Symbiobacterium ostreiconchae	Veillonellaceae
Paenibacillus hordei	Symbiobacterium terraclitae	Veillonella atypica
Paenibacillus nicotianae	Symbiobacterium thermophilum	Veillonella parvula
Paenibacillus profundus	Peptococcaceae	Planococcaceae
Saccharibacillus sacchari	Desulfotomaculum profundi	Planomicrobium psychrophilum

Προσωπικό αρχείο, πηγή πληροφορίας: NCBI (72)

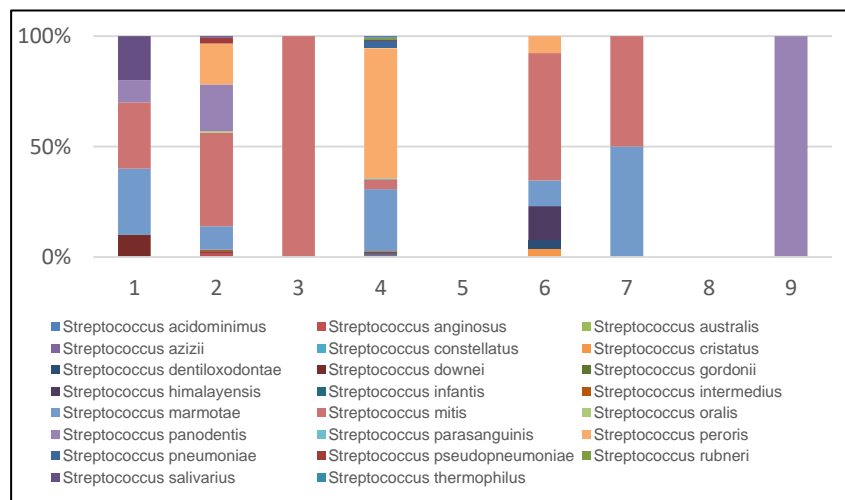
Εντοπίστηκαν, έντεκα (11) οικογένειες αυτού του φύλου (Γράφημα 3). Οι οικογένειες των βακτηρίων που βρέθηκαν μέσα στα δείγματα, από το συχνότερο στο λιγότερο συχνό, είναι: *Streptococcaceae* (39,59%), *Staphylococcaceae* (24,68%), *Bacillaceae* (18,82%), *Gamella* (16,97%). Οι οικογένειες με ποσοστό εμφάνισης κάτω του 15% είναι *Symbiobacteriaceae*, *Lactobacillus*, *Paenibacillaceae*, *Veillonellaceae*, *Hungateiclostridiaceae*, *Peptococcaceae*, *Planococcaceae*.



Γράφημα 3. Οι οικογένειες του φύλου *Firmicutes* που εντοπίστηκαν στα δείγματα μητρικού γάλακτος.

4.1.1.1 Οικογένεια: *Streptococcaceae*

Από την οικογένεια *Streptococcaceae* εντοπίστηκαν είκοσι-τρία (23) είδη βακτηρίων (Γράφημα 4).



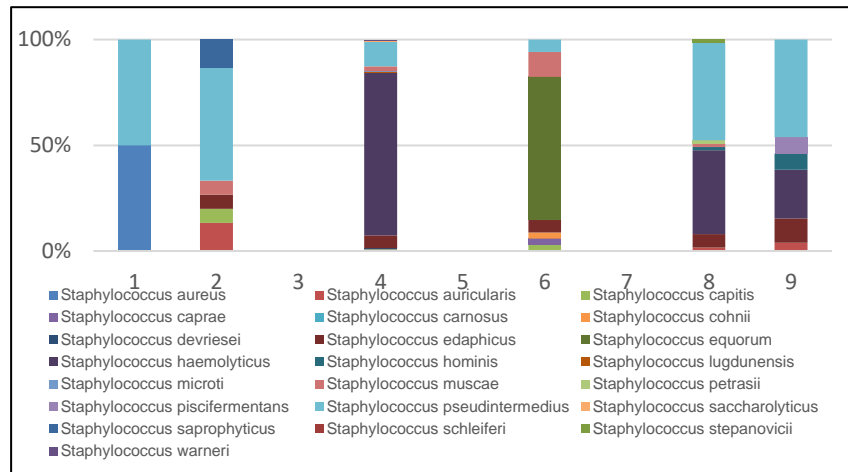
Γράφημα 4. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλακτος, και ανήκουν στην οικογένεια *Streptococcaceae*.

Τα είδη που βρέθηκαν, είναι: *Streptococcus acidominimus*, *S. anginosus*, *S. australis*, *S. azizii*, *S. constellatus*, *S. cristatus*, *S. dentiloxodontae*, *S. downei*, *S.*

gordonii, *S. himalayensis*, *S. infantis*, *S. intermedius*, *S. marmotae*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. panodentis*, *S. parasanguinis*, *S. peroris*, *S. pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae*, *S. rubneri*, *S. salivarius*, *S. thermophilus*.

4.1.1.2 Οικογένεια: *Staphylococcaceae*

Από την οικογένεια *Staphylococcaceae* εντοπίστηκαν είκοσι-δύο (22) είδη βακτηρίων στο μικροβίωμα του μητρικού γάλακτος (Γράφημα 5).

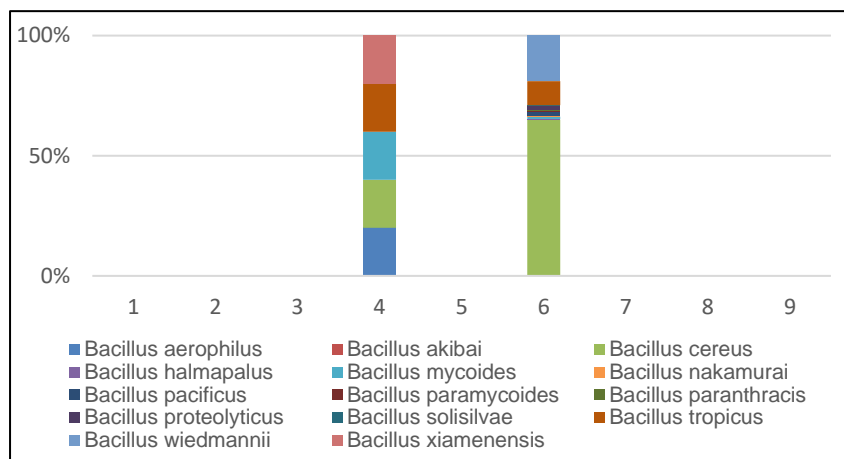


Γράφημα 5. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλακτος, και ανήκουν στην οικογένεια *Staphylococcaceae*.

Τα είδη που βρέθηκαν, είναι: *Staphylococcus aureus*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. carnosus*, *S. cohnii*, *S. devriesei*, *S. edaphicus*, *S. equorum*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. microti*, *S. muscae*, *S. petrasii*, *S. piscifermentans*, *S. pseudintermedius*, *S. saccharolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. stepanovicii*, *S. warneri*.

4.1.1.3 Οικογένεια: *Bacillaceae*

Από την οικογένεια *Bacillaceae* εντοπίστηκαν δεκατέσσερα (14) είδη βακτηρίων στο μικροβίωμα του μητρικού γάλακτος (Γράφημα 6).

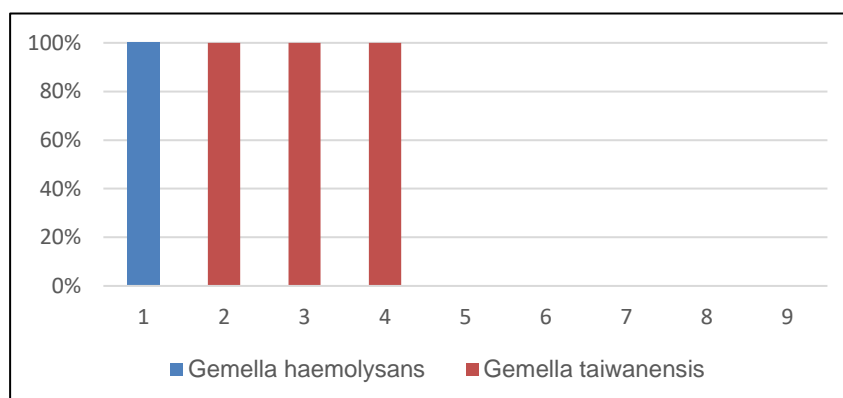


Γράφημα 6. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλακτος, και ανήκουν στην οικογένεια *Bacillaceae*.

Τα είδη που βρέθηκαν, είναι: *Bacillus aerophilus*, *B. akibai*, *B. cereus*, *B. halmopalus*, *B. mycoides*, *B. nakamurai*, *B. pacificus*, *B. paramycoides*, *B. paranthracis*, *B. proteolyticus*, *B. solisilvae*, *B. tropicus*, *B. wiedmannii*, *B. Xiamenensis*.

4.1.1.4 Οικογένεια: *Gamella*

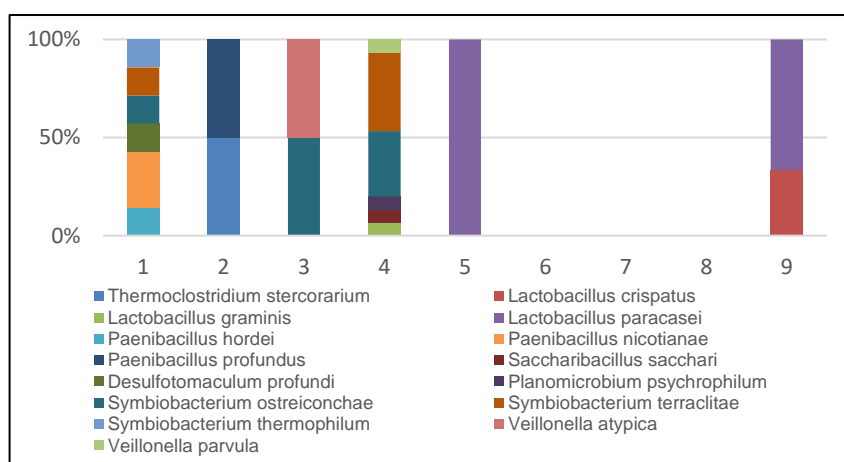
Από την οικογένεια *Gamella* εντοπίστηκαν δύο (2) είδη βακτηρίων στο μικροβίωμα του μητρικού γάλακτος (Γράφημα 7). Τα είδη που βρέθηκαν, είναι: *Gemella haemolysans*, *G. Taiwanensis*.



Γράφημα 7. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλακτος, και ανήκουν στην οικογένεια *Gamella*.

4.1.1.5 Λοιπές οικογένειες, φύλου Firmicutes

Από τις οικογένειες *Symbiobacteriaceae*, *Lactobacillus*, *Paenibacillaceae*, *Veillonellaceae*, *Hungateiclostridiaceae*, *Peptococcaceae*, *Planococcaceae* εντοπίστηκαν δεκα-πέντε (15) είδη βακτηρίων στο μικροβίωμα του μητρικού γάλακτος (Γράφημα 8). Τα είδη που βρέθηκαν, είναι: *Thermoclostridium stercorarium*, *Lactobacillus crispatus*, *L. graminis*, *L. paracasei*, *Paenibacillus hordei*, *P. nicotianae*, *P. profundus*, *Saccharibacillus sacchari*, *Desulfotomaculum profundi*, *Planomicrobium psychrophilum*, *Symbiobacterium ostreiconchae*, *S. terraclitae*, *S. thermophilum*, *Veillonella atypica*, *V. Parvula*.



Γράφημα 8. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλακτος, και ανήκουν στις υπόλοιπες οικογένειες του φύλου Firmicutes.

4.1.2 Φύλο: Proteobacteria

Το φύλο *Proteobacteria* αποτελείται από Gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι έχουν μια εξωτερική μεμβράνη που αποτελείται κυρίως από λιπτοπολυσακχαρίτες. Τα μέλη αυτού του φύλου έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά μορφολογικά, φυσιολογικά, οικολογικά και παθογόνα. (73)

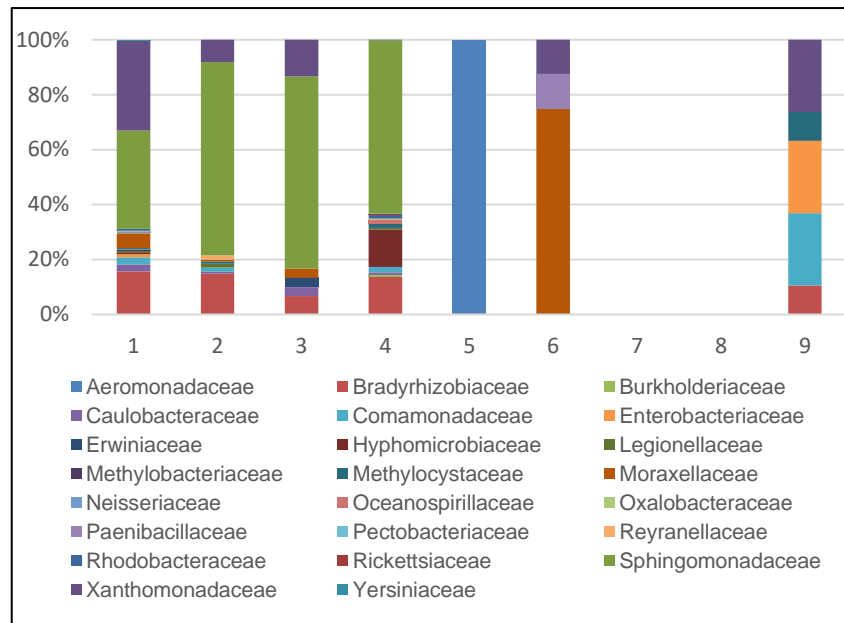
Πίνακας 7. Τα είδη των βακτηρίων του φύλου Proteobacteria ομαδοποιημένα σε οικογένειες

Proteobacteria			
Aeromonadaceae Aeromonas hydrophila	Moraxellaceae Acinetobacter johnsonii	Xanthomonadaceae Ancylobacter oerskovii	
Bradyrhizobiaceae Bradyrhizobium americanum Bradyrhizobium denitrificans Bradyrhizobium diazoefficiens Bradyrhizobium japonicum Bradyrhizobium jicamae Bradyrhizobium lupini Bradyrhizobium mercantei Bradyrhizobium oligotrophicum Bradyrhizobium pachyrhizi Bradyrhizobium rifense Bradyrhizobium valentinum Pseudomonas alcaligenes Pseudomonas carboxydohydrogena Pseudomonas extremaustralis Pseudomonas plecoglossicida Pseudomonas reidholzensis	Acinetobacter septicus Moraxella osloensis	Stenotrophomonas acidaminiphila Stenotrophomonas humi	
	Neisseriaceae Neisseria bacilliformis	Stenotrophomonas maltophilia Stenotrophomonas tumulicola	
	Oceanospirillaceae Neptunomonas antarctica	Erwiniaceae Erwinia aphidicola	
	Oxalobacteraceae Undibacterium parvum	Hyphomicrobiaceae Hyphomicrobium denitrificans Hyphomicrobium vulgare Pedomicrobium australicum	
	Paenibacillaceae Brevibacillus parabrevis		
	Pectobacteriaceae Pectobacterium aroidearum	Legionellaceae Legionella lansingensis Legionella massiliensis Legionella saoudiensis	
	Rhodobacteraceae Aestuariispira insulae Azospirillum lipoferum Magnetospirillum moscoviense Paracoccus carotinifaciens		Methylobacteriaceae Methylorubrum populi
	Rickettsiaceae Rickettsia heilongjiangensis		Yersiniaceae Yersinia ruckeri
	Caulobacteraceae Brevundimonas nasdae Caulobacter henricii Caulobacter rhizosphaerae Caulobacter segnis Phenylobacterium muchangponense	Sphingomonadaceae Novosphingobium aromaticivorans Novosphingobium bradum Novosphingobium capsulatum Novosphingobium flavum Novosphingobium ginsenosidimutans Novosphingobium guangzhouense Novosphingobium hassiacum Novosphingobium nitrogenifigens Novosphingobium pokkalii Novosphingobium rosa Novosphingobium subterraneum Sphingobium xanthum Sphingomonas wittichii	Enterobacteriaceae Klebsiella grimontii Klebsiella oxytoca Klebsiella pneumoniae Salmonella enterica
			Burkholderiaceae Burkholderia humptydoensis Caballeronia zhejiangensis
Reyranellaceae Reyranella massiliensis Reyranella soli			
Comamonadaceae Acidovorax cattleyae Aquabacterium commune Aquabacterium parvum Comamonas testosteroni Pelomonas saccharophila			
Methylocystaceae Methylobacterium radiotolerans Methylocystis heyeri Methylocystis hirsuta			

Προσωπικό αρχείο, πηγή πληροφορίας: NCBI (72)

Στον πίνακα που προηγήθηκε (Πίνακας 7), παρουσιάζονται οι οικογένειες και τα είδη των βακτηρίων του φύλου *Proteobacteria* που βρέθηκαν στο μητρικό γάλα.

Εντοπίστηκαν, λοιπόν, είκοσι-τρεις (23) οικογένειες αυτού του φύλου (Γράφημα 9), σε κάποια από τα δείγματα. Οι οικογένειες που βρέθηκαν σε μεγαλύτερη συχνότητα, από το συχνότερο στο λιγότερο συχνό, είναι: *Sphingomonadaceae* (54,96%), *Bradyrhizobiaceae* (15,90%), *Xanthomonadaceae* (26,08%).



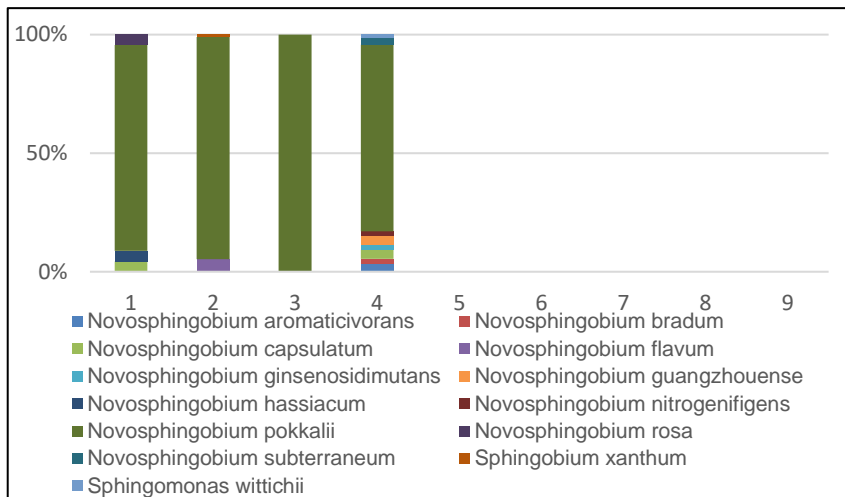
Γράφημα 9. Οι οικογένειες του φύλου *Proteobacteria* εντοπίστηκαν στα δείγματα 1, 2, 3, 4, 5, 6 και 9.

Οι οικογένειες με ποσοστό εμφάνισης κάτω του 15% είναι, *Aeromonadaceae*, *Burkholderiaceae*, *Caulobacteraceae*, *Comamonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Legionellaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Methylocystaceae*, *Moraxellaceae*, *Neisseriaceae*, *Oceanospirillaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Paenibacillaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Reyraneliaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Rickettsiaceae*, *Yersiniaceae*.

4.1.2.1 Οικογένεια: *Sphingomonadaceae*

Από την οικογένεια *Sphingomonadaceae* εντοπίστηκαν δεκατέσσερα (14) είδη βακτηρίων στο μικροβίωμα του μητρικού γάλακτος (Γράφημα 10).

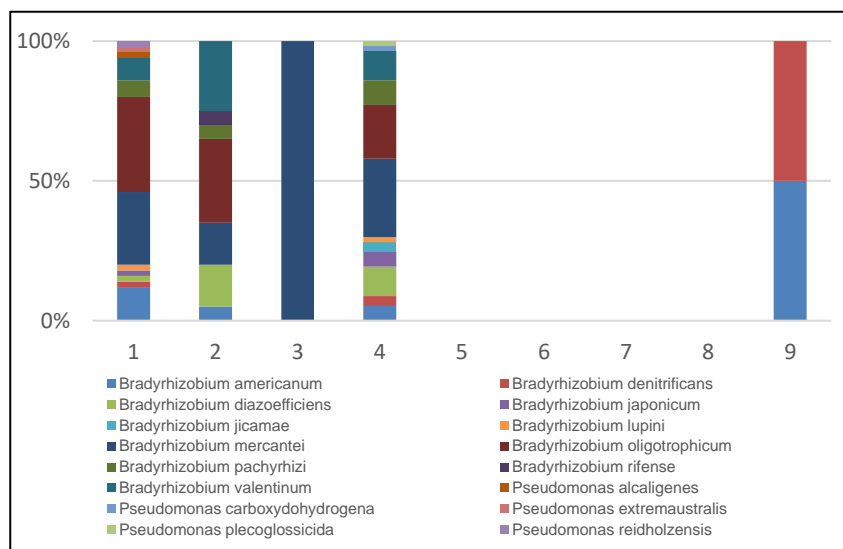
Τα είδη που βρέθηκαν, είναι: *Novosphingobium aromaticivorans*, *N. bradum*, *N. capsulatum*, *N. flavum*, *N. ginsenosidimutans*, *N. guangzhouense*, *N. hassiacum*, *N. nitrogenifigens*, *N. pokkali*, *N. rosa*, *N. Subterraneum*, *Sphingobium xanthum*, *S. wittichii*.



Γράφημα 10. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλατος, και ανήκουν στην οικογένεια Sphingomonadaceae.

4.1.2.2 Οικογένεια: Bradyrhizobiaceae

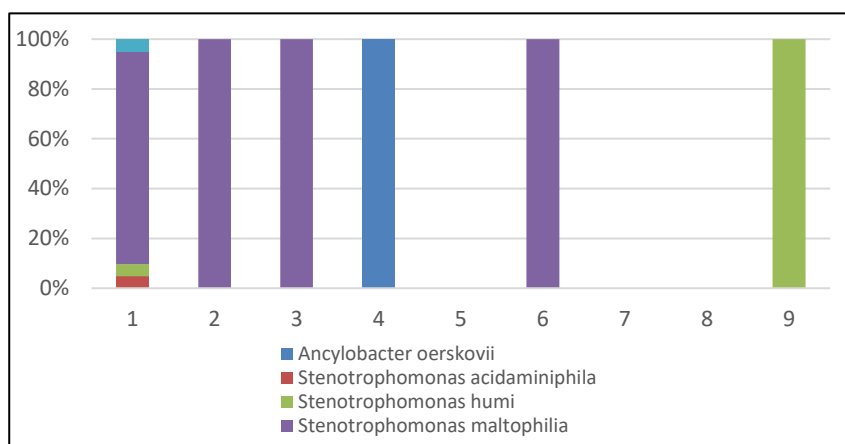
Από την οικογένεια *Bradyrhizobiaceae* εντοπίστηκαν δεκαέξι (16) είδη βακτηρίων στο μικροβίωμα του μητρικού γάλακτος (Γράφημα 11). Τα είδη που βρέθηκαν, είναι: *Bradyrhizobium Americanum*, *B. denitrificans*, *B. diazoefficiens*, *B. embrapense*, *B. iriomotense*, *B. japonicum*, *B. jicamae*, *B. lupini*, *B. mercantei*, *B. oligotrophicum*, *B. pachyrhizi*, *B. rifense*, *B. valentinum*, *Pseudomonas alcaligenes*, *P. carboxydohydrogena*, *P. extremaustralis*, *P. plecoglossicida*, *P. Reidholzensis*.



Γράφημα 11. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλατος, και ανήκουν στην οικογένεια Bradyrhizobiaceae.

4.1.2.3 Οικογένεια: *Xanthomonadaceae*

Από την οικογένεια *Xanthomonadaceae* εντοπίστηκαν πέντε (5) είδη βακτηρίων στο μικροβίωμα του μητρικού γάλακτος (Γράφημα 12). Τα είδη που βρέθηκαν, είναι: *Ancylobacter oerskovii*, *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *S. humi*, *S. maltophilia*, *S. tumulicola*.

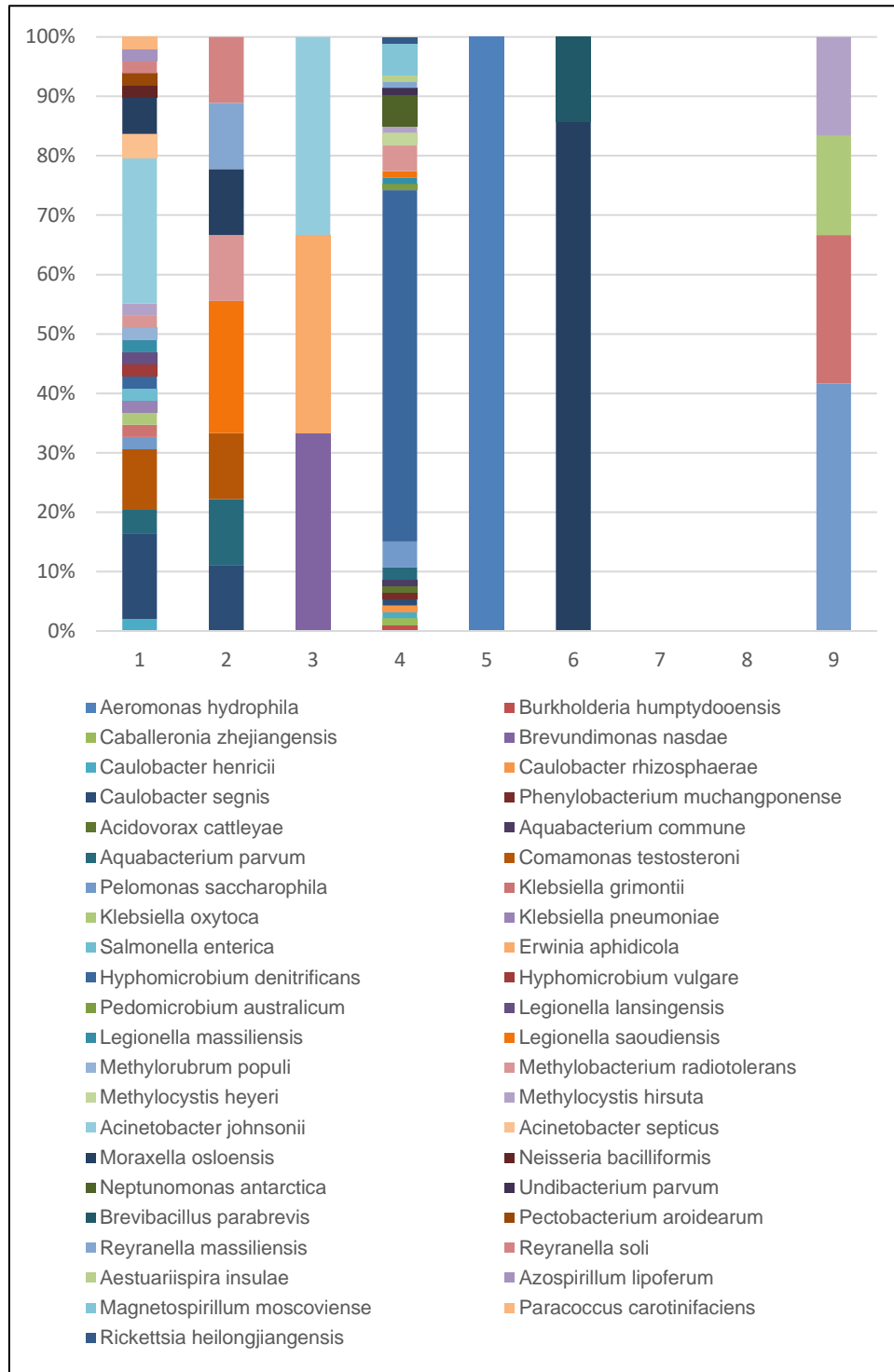


Γράφημα 12. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλακτος, και ανήκουν στην οικογένεια *Xanthomonadaceae*.

4.1.2.4 Λοιπές οικογένειες, φύλου *Proteobacteria*

Από τις οικογένειες *Aeromonadaceae*, *Burkholderiaceae*, *Caulobacteraceae*, *Comamonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Legionellaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Methylocystaceae*, *Moraxellaceae*, *Neisseriaceae*, *Oceanospirillaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Paenibacillaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Reyranellaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Rickettsiaceae*, *Yersiniaceae* εντοπίστηκαν σαράντα-τέσσερα (44) είδη βακτηρίων στο μικροβίωμα του μητρικού γάλακτος (Γράφημα 13). Τα είδη που βρέθηκαν, είναι: *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia hump-tydoensis*, *Caballeronia zhejiangensis*, *Brevundimonas nasdae*, *Caulobacter henricii*, *C. rhizosphaerae*, *C. segnis*, *Phenylobacterium muchangponense*, *Acidovorax cattleyae*, *Aquabacterium commune*, *A. parvum*, *Comamonas testosteroni*, *Pelomonas saccharophila*, *Klebsiella grimontii*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Erwinia aphidicola*, *Hyphomicrobium denitrificans*, *H. vulgare*, *Pedomicrobium australicum*, *Legionella lansingensis*, *L. massiliensis*, *L. saudiensis*, *Methylobacterium radiotolerans*, *Methylocystis heyeri*, *Methylocystis hirsuta*, *Acinetobacter johnsonii*, *A. septicus*, *Moraxella osloensis*, *Neisseria bacilliformis*, *Neptunomonas antarctica*, *Undibacterium parvum*, *Brevibacillus parabrevis*, *Pectobacterium aroidearum*, *Reyranella massiliensis*, *R. soli*, *Aestuariispira insulae*,

Azospirillum lipoferum, *Magnetospirillum moscoviense*, *Paracoccus carotinifaciens*,
Rickettsia heilongjiangensis, *Yersinia ruckeri*



Γράφημα 13. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλατος, και ανήκουν στις υπόλοιπες οικογένειες του φύλου *Proteobacteria*.

4.1.3 Φύλο: Bacteroidetes

Τα βακτήρια αυτού του φύλου είναι αρνητικά κατά Gram, έχουν ραβδοειδές σχήμα και είναι μη σποριοποιητικά. Οι συνθήκες που ζούνε είναι αναερόβιες ή αερόβιες. Είναι ευρέως καταμελημένα στο περιβάλλον, συμπεριλαμβανομένου του εδάφους, των ιζημάτων και του θαλασσινού νερού, καθώς και στα έντερα και στο δέρμα των ζώων.

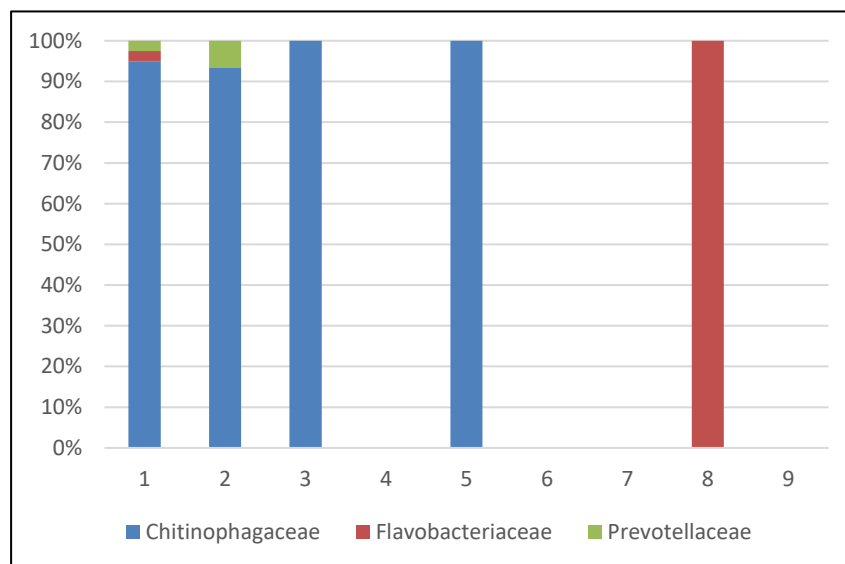
Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8), παρουσιάζονται οι οικογένειες και τα είδη των βακτηρίων του φύλου *Bacteroidetes* που βρέθηκαν στο μητρικό γάλα.

Πίνακας 8. Τα είδη των βακτηρίων του φύλου *Bacteroidetes*, ομαδοποιημένα σε οικογένειες

Bacteroidetes	
Chitinophagaceae	Flavobacteriaceae
Asinibacterium lactis	Flavobacterium succinicans
Sediminibacterium aquarii	Prevotellaceae
Sediminibacterium goheungense	Prevotella veroralis
Sediminibacterium roseum	
Sediminibacterium salmoneum	
Terrimonas pekingensis	
Terrimonas terrae	

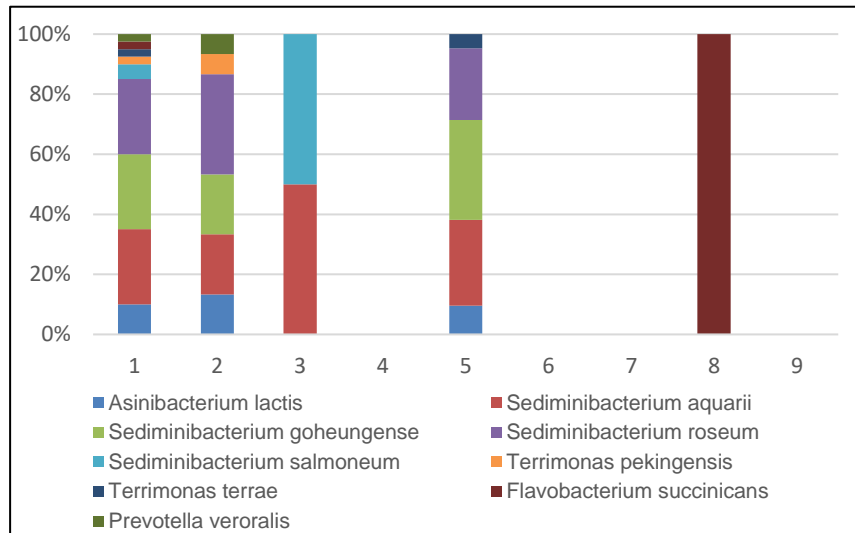
Προσωπικό αρχείο, πηγή πληροφορίας: NCBI (72)

Εντοπίστηκαν, λοιπόν, τρεις (3) οικογένειες αυτού του φύλου (Γράφημα 14), σε κάποια από τα δείγματα. *Chitinophagaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Prevotellaceae*.



Γράφημα 14. Οι οικογένειες του φύλου *Bacteroidetes* εντοπίστηκαν στα δείγματα 1, 2, 3, 5 και 8.

Τέλος, εντοπίστηκαν εννιά (9) είδη βακτηρίων στο μικροβίωμα του μητρικού γάλακτος (Γράφημα 15). Τα είδη που βρέθηκαν, είναι: *Asinibacterium lactis*, *Sediminibacterium aquarii*, *Sediminibacterium goheungense*, *Sediminibacterium roseum*, *Sediminibacterium salmoneum*, *Terrimonas pekingensis*, *Terrimonas terrae*, *Flavobacterium succinicans*, *Prevotella veroralis*



Γράφημα 15. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλακτος, και ανήκουν στις οικογένειες του φύλου *Bacteroidetes*.

4.1.4 Φύλο: Actinobacteria

Τα βακτήρια αυτού του φύλου είναι θετικά κατά Gram, είναι μια ομάδα διακλαδιζόμενων μονοκύτταρων μικροοργανισμών, οι περισσότεροι από τους οποίους σχηματίζουν μυκήλια. Αναπαράγονται με δυαδική σχάση ή με παραγωγή σπορίων ή κονιδίων και η σπορίωση των Actinobacteria γίνεται μέσω κατακερματισμού και κατάτμησης ή σχηματισμού κονιδίων. (72)

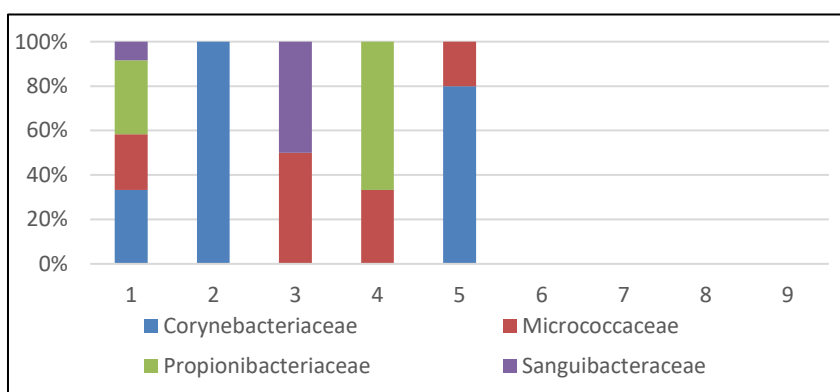
Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 9), παρουσιάζονται οι οικογένειες και τα είδη των βακτηρίων του φύλου *Actinobacteria* που βρέθηκαν στο μητρικό γάλα.

Πίνακας 9. Τα είδη των βακτηρίων του φύλου *Actinobacteria*, ομαδοποιημένα σε οικογένειες

Actinobacteria	
Corynebacteriaceae <i>Corynebacterium aurimucosum</i> <i>Corynebacterium coyleae</i> <i>Corynebacterium ihumii</i> <i>Corynebacterium pilbarensis</i>	Propionibacteriaceae <i>Cutibacterium acnes</i> <i>Cutibacterium granulosum</i>
	Sanguibacteraceae <i>Sanguibacter inulinus</i>
Micrococcaceae <i>Rothia mucilaginosa</i>	

Προσωπικό αρχείο, πηγή πληροφορίας: NCBI (72)

Εντοπίστηκαν, λοιπόν, τέσσερις (4) οικογένειες αυτού του φύλου. Οι οικογένειες που βρέθηκαν σε μεγαλύτερη συχνότητα μέσα στα δείγματα, από το συχνότερο στο λιγότερο συχνό, είναι: *Corynebacteriaceae* (50%), *Micrococcaceae* (18,75%), *Propionibacteriaceae* (18,75%), *Sanguibacteraceae* (12,50%).



Γράφημα 16. Οι οικογένειες του φύλου *Actinobacteria* εντοπίστηκαν στα δείγματα 1, 2, 3, 4 και 5.

Εντοπίστηκαν οκτώ (8) είδη βακτηρίων στο μικροβίωμα του μητρικού γάλακτος (Γράφημα 15). Τα είδη που βρέθηκαν, είναι: *Corynebacterium aurimucosum*, *C. coyleae*, *C. ihumii*, *C. pilbarensis*, *Rothia mucilaginosa*, *Cutibacterium acnes*, *C. granulosum*, *Sanguibacter inulinus*.

4.1.5 Λοιπά φύλα

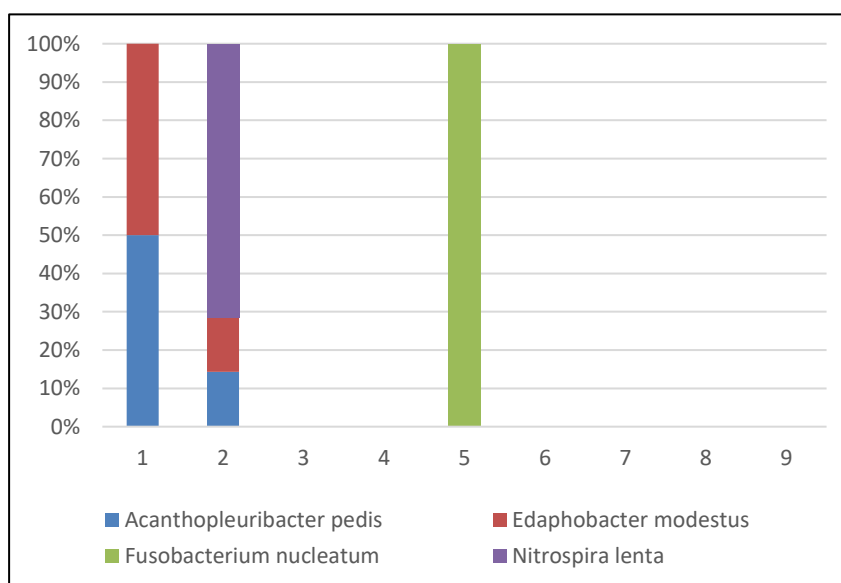
Επιπλέον φύλα που βρέθηκαν σε μικρό ποσοστό στα δείγματα: *Acidobacteria* (0,16%), *Fusobacteria* (0,06%), *Verrucomicrobia* (0,06%), *Nitrospirae* (0,03%). Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 9), παρουσιάζονται οι οικογένειες και τα είδη των βακτηρίων των φύλων *Acidobacteria* (0,16%), *Fusobacteria*, *Nitrospirae*, που βρέθηκαν στο μητρικό γάλα.

Πίνακας 10. Τα είδη των βακτηρίων του φύλου *Actinobacteria*, ομαδοποιημένα σε οικογένειες

Acidobacteria	Fusobacteria	Nitrospirae
Acidobacteriaceae Edaphobacter modestus	Fusobacteriaceae Fusobacterium nucleatum	Nitrospiraceae Nitrospira lenta
Acanthopleuribacteraceae Acanthopleuribacter pedis		

Προσωπικό αρχείο, πηγή πληροφορίας: NCBI (72)

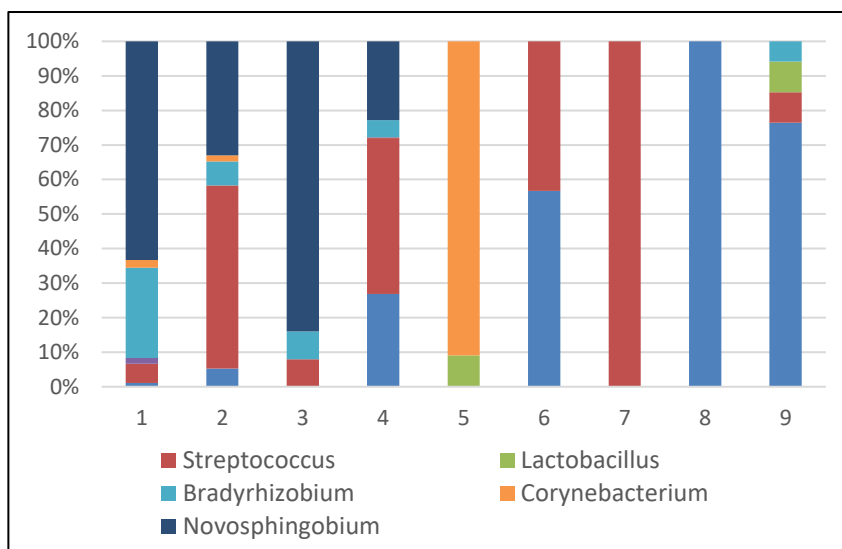
Τέλος, εντοπίστηκαν τέσσερα (4) είδη βακτηρίων στο μικροβίωμα του μητρικού γάλακτος (Γράφημα 17). Τα είδη που βρέθηκαν, είναι: *Acanthopleuribacter pedis*, *Edaphobacter modestus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Nitrospira lenta*.



Γράφημα 17. Τα είδη των βακτηρίων, που εντοπίστηκαν ανά δείγμα μητρικού γάλακτος, και ανήκουν στις υπόλοιπες οικογένειες του φύλου *Actinobacteria*.

4.2 Οξυγαλακτικά βακτήρια

Εντοπίστηκαν επτά (7) γένη οξυγαλακτικών βακτηρίων στο μικροβίωμα του μητρικού γάλακτος (Γράφημα 18). Τα γένη των οξυγαλακτικών βακτηρίων που βρέθηκαν, από το συχνότερο στο λιγότερο συχνό, είναι: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bradyrhizobium*, *Corynebacterium*, *Novosphingobium*.



Γράφημα 18. Τα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων που εντοπίστηκαν στα δείγματα του μητρικού γάλακτος.

Κεφάλαιο 5: Συζήτηση - Συμπεράσματα

Η ανάλυση 16S με τεχνολογία νανοπόρου έχει σημαντικές δυνατότητες για τη μικροβιολογική ανάλυση του μητρικού γάλακτος. Βοήθησε στον εντοπισμό ενός μεγάλου μέρους του μικροβιώματος του μητρικού γάλακτος σε μικρό χρονικό διάστημα.

Τριανταπέντε (35) οικογένειες ανιχνεύθηκαν συνολικά, με την *Sphingomonadaceae* να προηγείται και ακολουθούν *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Bacillaceae*, *Gamella*. Σε επίπεδο είδους, εκατόν-εβδομήντα-πέντε (175) είδη βακτηρίων ανιχνεύθηκαν με τους *Staphylococcus pseudintermedius*, *Streptococcus mitis* να προηγούνται και ακολουθούν *Staphylococcus edaphicus*, *Streptococcus marmotae*, *Bradyrhizobium americanum*, *Bradyrhizobium mercantei*, *Novosphingobium pokkali*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus muscae*, *Sediminibacterium aquarii*, *Rothia mucilaginosa*.

Οι διαφορές που εντοπίζονται μεταξύ των δειγμάτων που μελετήθηκαν (Γράφημα 19), σύμφωνα με έρευνες (Κεφάλαιο 2.1.3.2), πιθανόν να οφείλονται στα χαρακτηριστικά υγείας και διατροφής της μητέρας και του μωρού. Σύμφωνα με αυτά τα χαρακτηριστικά (**Πίνακας 2**, σελ. 27) μπορεί να γίνει ένας διαχωρισμός μεταξύ των δειγμάτων.

— Έξι (6) στις εννιά (9) γυναίκες (66,7% των δειγμάτων) έκανε χρήση αντιβιοτικών κατά τη διάρκεια του τοκετού. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι γυναίκες που είχαν προχωρήσει σε χρήση αντιβιοτικών κατά τον τοκετό, είχαν χαμηλότερο συνολικό βακτηριακό φορτίο (κατά μέσο όρο 26,2 βακτηριακά είδη), σχεδόν κατά το μισό, από τις γυναίκες που δεν είχαν κάνει χρήση (κατά μέσο όρο 50,3 βακτηριακά είδη).

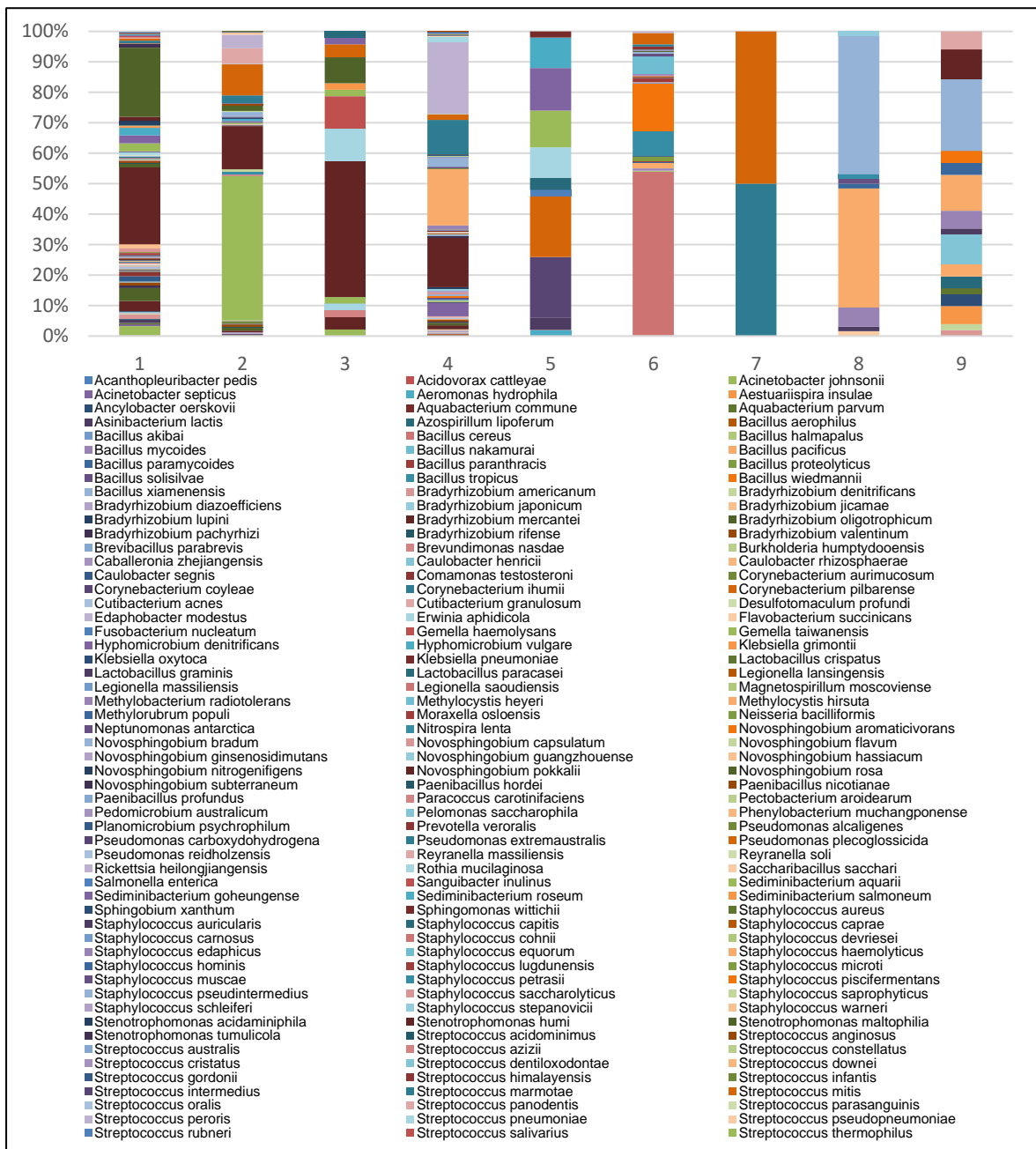
— Τρεις (3) στις εννιά (9) γυναίκες (33,3% των δειγμάτων) πάσχουν από υποκείμενα νοσήματα. Στις γυναίκες αυτές δεν παρατηρείται κάποια διαφορά στο συνολικό βακτηριακό φορτίο σε σχέση με τις υπόλοιπες.

— Τέσσερις (4) στις εννιά (9) γυναίκες (44,4% των δειγμάτων) είχαν επιπλοκές κατά την κύηση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, στις γυναίκες που δεν είχαν επιπλοκές κατά την διάρκεια της κύησης, βρέθηκε υψηλότερο συνολικό βακτηριακό φορτίο στο μητρικό τους γάλα.

— Δύο (7) στις εννιά (9) γυναίκες (77,7% των δειγμάτων) γέννησαν αρσενικό. Παρατηρήθηκε ότι, οι γυναίκες που γέννησαν θηλυκό, είχαν χαμηλότερο συνολικό βακτηριακό φορτίο (κατά μέσο όρο 17,1 βακτηριακά είδη), σχεδόν κατά έντεκα (11)

είδη, από τις γυναίκες που γέννησαν αρσενικό (κατά μέσο όρο 28,0 βακτηριακά είδη). Βέβαια παρατηρήθηκε ότι, οι γυναίκες που είχαν γεννήσει θηλυκά είχαν ψηλότερο φορτίο σε μερικά είδη όπως *Streptococcus* και *Staphylococcus*.

— Πέντε (5) στις εννιά (9) γυναίκες (55,5% των δειγμάτων) έχουν κάνει το εμβόλιο κατά του COVID. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, στις γυναίκες που δεν είχαν κάνει το εμβόλιο κατά του COVID, βρέθηκε υψηλότερο συνολικό βακτηριακό φορτίο στο μητρικό τους γάλα (κατά μέσο όρο 5,7 βακτηριακά είδη), σχεδόν κατά πέντε (5) είδη.



Γράφημα 19. Συνολικό βακτηριακό φορτίο των δειγμάτων

Περαιτέρω και πιο ενδελεχής μελέτη απαιτείται προκειμένου να επαληθευθούν αυτές οι παρατηρήσεις καθώς και να εντοπιστούν και επιπλέον μικροβιακά στελέχη που πιθανόν να εμπλέκονται.

Ξένη Βιβλιογραφία

1. **C.M.Roth.** ELECTROPHORESIS | Nucleic Acids. *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*. s.l. : Rutgers University, Piscataway, NJ, USA, 2005.
2. **Erika Cortes-Macías, Marta Selma-Royo, Izaskun García-Mantrana, Marta Calatayud, Sonia González, Cecilia Martínez-Costa, Maria Carmen Collado.** Maternal Diet Shapes the Breast Milk Microbiota Composition and Diversity: Impact of Mode of Delivery and Antibiotic Exposure. *The Journal of Nutrition*. 2021.
3. **Boquien, Clair-Yves.** Human Milk: An Ideal Food for Nutrition of Preterm Newborn. 2018.
6. **Bocci V, von Bremen K , Corradeschi F , Luzzi E , Paulesu L .** What is the role of cytokines in human colostrum? . *J Biol Regul Homeost Agents* . 1991.
7. **Ballard O, Morrow AL .** Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am* . 2013.
8. **Lönnerdal, Bo.** Bioactive proteins in breast milk. *Journal of Padiatrics and Child Health*. 2013.
9. **Jesui Vergilio Visentainer, Oscar Oliveira Santos, Liane Maldaner, Caroline Zappielo, Vanessa Neia, Lorena Visentainer, Luciana Pelissari, Jessica Pizzo, Adriela Rydlewski, Roberta Silveira, Marilia Galuch , Jeane Laguila Visentainer.** Lipids and Fatty Acids in Human Milk: Benefits and Analysis. *Biochemistry and Health Benefits of Fatty Acids*. 2018.
10. **Michał Wiciński, Ewelina Sawicka, Jakub Gębalski, Karol Kubiak, and Bartosz Malinowski.** Human Milk Oligosaccharides: Health Benefits, Potential Applications in Infant Formulas, and Pharmacology. *National Library of Medicine*. 2020.
11. **Vassilis Triantis, Lars Bode, R. J. Joost van Neerven.** Immunological Effects of Human Milk Oligosaccharides. 2018.
12. **CHRISTOPHER J. BATES, ANN PRENTICE.** BREAST MILK AS A SOURCE OF VITAMINS, ESSENTIAL MINERALS AND TRACE ELEMENTS. Pergamon, 1994.

13. **Su Yeong Kim, Dae Yong Yi.** Analysis of the human breast milk microbiome and bacterial extracellular vesicles in healthy mothers. *Experiment and Molecular Medicine*. 2020.
14. **Ted Jost, Christophe Lacroix, Christian P. Braegger, Florence Rochat, Christophe Chassard.** Vertical mother–neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. 2013, Vol. 16, 9.
15. **Murphy K, Curley D , O’CallaghanTF , O’SheaCA , Dempsey EM , O’ToolePW , et al.** The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: a pilot study. . *Sci Rep* . 2017.
16. **Ward TL, Hosid S, Ioshikhes I, Altosaar I.** Human milk metagenome: a functional capacity analysis. . *BMC Microbiol* . 2013.
17. **Hermansson H, Kumar H , Collado MC , Salminen S , Isolauri E , Rautava S .** Breast milk microbiota is shaped by mode of delivery and intrapartum antibiotic exposure. *Front Nutr* . 2019, p. 6 :4.
18. **Moossavi S, Sepehri S , Robertson B , Bode L , Goruk S , Field CJ , et al.** Composition and variation of the human milk microbiota are influenced by maternal and early-life factors. *Cell Host Microbe* . 2019.
19. **Simpson MR, Avershina E , Storro O , Johnsen R , Rudi K , Oien T .** Breastfeeding-associated microbiota in human milk following supplementation with lactobacillus rhamnosus GG, Lactobacillus acidophilus La-5, and Bifidobacterium animalis ssp. lactis Bb-12. *J Dairy Sci*. 2018.
20. **Tuominen H, Rautava S , Collado MC , Syrjanen S , Rautava J .** HPV infection and bacterial microbiota in breast milk and infant oral mucosa. *PLoS ONE* . 2018.
21. **Pannaraj PS, Li F , Cerini C , Bender JM , Yang S , Rollie A , et al.** Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome. . *JAMA Pediatr* . 2017.
22. **Patel SH, Vaidya YH , Patel RJ , Pandit RJ , Joshi CG , Kunjadiya AP .** Culture independent assessment of human milk microbial community in lactational mastitis. . *Sci Rep*. 2017.
23. **Urbaniak C, Angelini M , Gloor GB , Reid G .** Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. . *Microbiome* . 2016.

24. **Cabrera-Rubio R, Mira-Pascual L, Mira A, Collado MC** . Impact of mode of delivery on the milk microbiota composition of healthy women. *J Dev Orig Health Dis*. 2016.
25. **Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C**. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *Br J Nutr*. 2013.
26. **Williams JE, Carrothers JM, Lackey KA, Beatty NF, York MA, Brooker SL, et al**. Human milk microbial community structure is relatively stable and re-lated to variations in macronutrient and micronutrient intakes in healthy lactating women. *J Nutr*. 2017.
27. **Ojo-Okunola A, Nicol M, du Toit E** . Human breast milk bacteriome in health and disease. . *Nutrients* 2018.
28. **Jimenez E, de Andres J, Manrique M, Pareja-Tobes P, Tobes R, Martinez-Blanch JF, et al**. Metagenomic analysis of milk of healthy and mastitis-suffering women. ; 31 :406–15 . *J Hum Lactation*. 2015.
29. **Petra Zimmermann, Nigel Curtis**. Breast milk microbiota: A review of the factors that influence composition. *Journal of Infection*. 2020.
30. **Damaceno QS, Souza JP, Nicoli JR, Paula RL, Assis GB, Figueiredo HC, et al**. Evaluation of potential probiotics isolated from human milk and colostrum. . *Probiot Antimicrob Prot* . 2017.
31. **Ding M, Qi C, Yang Z, Jiang S, Bi Y, Lai J, et al**. Geographical location specific composition of cultured microbiota and Lactobacillus occurrence in human breast milk in China. *Food Funct*. 2019, pp. 10 :554–64 .
32. **Kumar H, du Toit E, Kulkarni A, Aakko J, Linderborg KM, Zhang Y, et al**. Kumar H, du Toit E, Kulkarni A, Aakko J, Linderborg KM, Zhang Y, et al. Distinct patterns in human milk microbiota and fatty acid profiles across specific geographic locations. . *Front Microbiol* . 2016.
33. **Li SW, Watanabe K, Hsu CC, Chao SH, Yang ZH, Lin YJ, et al**. Bacterial composition and diversity in breast milk samples from mothers living in Taiwan and Mainland China. *Front Microbiol* . 2017.
34. **Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A** . The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr*. 2012.

35. **Hunt KM, Foster JA , Forney LJ , Schutte UM , Beck DL , Abdo Z , et al.** Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. . *PLoS ONE*. 2011.
36. **Collado MC, Delgado S, Maldonado A, Rodríguez JM.** Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Lett Appl Microbiol*. 2009.
37. **Grönlund MM, Gueimonde M, Laitinen K, Kociubinski G, Grönroos T, Salminen S, Isolauri E.** Maternal breastmilk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the Bifidobacterium microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clin Exp Allergy*. 2007.
38. **Albesharat R, Ehrmann MA , Korakli M , Yazaji S , Vogel RF.** Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. . *Syst Appl Microbiol* . 2011, pp. 34 :148–55.
39. **Collado MC, Laitinen K , Salminen S , Isolauri E .** Maternal weight and excessive weight gain during pregnancy modify the immunomodulatory potential of breast milk.; . *Pediatr Res* . 2012, Vol. 72, 77–85.
40. **Gonzalez R, Maldonado A , Martin V , Mandomando I , Fumado V , Metzner KJ , et al.** Breast milk and gut microbiota in African mothers and infants from an area of high HIV prevalence. *PLoS ONE* . 2013.
41. **Tusar T, Zerdoner K, Bogovic Matijasic B, Paveljsek D, Benedik E, Brantanic B, Fidler N, Rogelj I.** Cultivable bacteria from milk from Slovenian breastfeeding mothers. *Food Technol Biotechnol* . 2014.
42. **Solis G, de Los Reyes-Gavilan CG , Fernandez N , Margolles A , Gueimonde M .** Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe*. 2010.
43. **Khodayar-Pardo P, Mira-Pascual L , Collado MC , Martinez-Costa C .** Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *Perinatol* . 2014, Vol. 34, 599–605.
44. **Soto A, Martín V, Jiménez E, Mader I, Rodríguez JM, Fernández. L.** Lactobacilli and Bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* . 2014.

45. **Olivares M, Albrecht S, De Palma G, Ferrer MD, Castillejo G, Schols HA, Sanz Y.** Human milk composition differs in healthy mothers and mothers with celiac disease. *Eur J Nutr* . 2014.
46. **Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM.** Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr*. 2003.
47. **Boix-Amoros A, Collado MC , Mira A .** Relationship between milk microbiota, bacterial load, macronutrients, and human cells during lactation. . *Front Micro-biol* . 2016.
48. **Drago L, Toscano M , De Grandi R , Grossi E , Padovani EM , Peroni DG .** Microbiota network and mathematic microbe mutualism in colostrum and mature milk collected in two different geographic areas: Italy versus Burundi. *ISME J*. 2017.
49. **Sakwinska O, Moine D , Delley M , Combremont S , Rezzonico E , Descombes P , et al.** Microbiota in breast milk of Chinese lactating mothers. *PLoS ONE* . 2016.
50. **Toscano M, De Grandi R , Peroni DG , Grossi E , Facchin V , Comberiat P , et al.** Impact of delivery mode on the colostrum microbiota composition. *BMC Microbiol*. 2017, Vol. 17, 205.
51. **Dai D, Walker WA.** Protective nutrients and bacterial colonization in the immature human gut. *Adv Pediatr* . 1999.
52. **Rocío Martín, Susana Langa, Carlota Reviriego, Esther Jiménez, María LMarín, Jordi Xaus, Leonides Fernández, Juan MRodríguez.** Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics*. 2003, Vol. 143, 6.
53. **Georgia Nikolopoulou, Theofania Tsironi, Panagiotis Halvatsiotis, Ekaterini Petropoulou, Nikolaos Genaris 4, Despina Vougiouklaki, Dionyssios Antonopoulos, Apollon Thomas, Anastasia Tsilia, Anthimia Batrinou, Efstathia Tsakali, DimitraHouhoula.** Analysis of the Major Probiotics in HealthyWomen’s Breast Milk by Realtime PCR. Factors Affecting the Presence of Those Bacteria. *appied scienses*. 2021.
54. **Michelle K McGuire, Mark A McGuire.** Human Milk: Mother Nature’s Prototypical Probiotic Food? 2014.

55. **Parnanen K, Karkman A , Hultman J , Lyra C , Bengtsson-Palme J , Larsson DGJ , et al.** Maternal gut and breast milk microbiota affect infant gut antibiotic resistance and mobile genetic elements. *Nat Commun.* 2018.
56. **Moles L, Escribano E , de Andres J , Montes MT , Rodriguez JM , Jimenez E , et al.** Administration of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, two strains isolated from human milk, to very low and extremely low birth weight preterm infants: a pilot study. *J Immunol Res.* 2015.
57. **Gueimonde M, Laitinen K , Salminen S , Isolauri E .** Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology.* 2007.
58. **Napierala M, Mazela J , Merritt TA , Florek E .** Tobacco smoking and breastfeeding: effect on the lactation process, breast milk composition and infant development. A critical review. *Environ Res.* 2016.
60. **J.Rajendhran and P.Gunasekaran.** Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. 2011, Vol. 166, 2.
61. **Weinstock, George M.** Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature.* 2012.
62. **Kulski, Jerzy K.** Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. 2016.
64. **PregledniLanak.** The History of DNA Sequencing. *J Med Biochem.* 2013
65. **Venkatesan B.M., Dorvel B., Yemenicioglu S., Watkins N., Petrov I., Bashir R.** Highly sensitive, mechanically stable nanopore sensors for DNA analysis. *Adv Mater.* 2009, Vol. 21, 2771.
66. **Yanxiao Feng, Yuechuan Zhang, Cuifeng Ying, Deqiang Wang, Chunlei.** Nanopore-based Fourth-generation DNA Sequencing Technology. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2015, Vol. 13, 4-16.
67. **E.C., Hayden.** Data from pocket-sized genome sequencer unveiled. *Nature.* 2014.
68. **Cook, Jane.** Battle of the Sequencers: Illumina vs Nanopore Sequencing. [Online] Bridge Informatics, 2022.
69. **Dr.Samanthi.** Difference Between Nanopore and Illumina Sequencing. *Difference Between.com.* 2021.

70. **Technologies, Oxford Nanopore.** Rapid sequencing amplicons - 16S barcoding. *Protocol*.

72. **NCBI - Taxonomy.** s.l. : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>.

73. **Seong, Chi Nam, et al.** Taxonomic hierarchy of the phylum Proteobacteria and Korean indigenous novel Proteobacteria species. *Korea Science*. 2019.

Ελληνική Βιβλιογραφία

4. **Ζαμπέλας, Α.** Η διατροφή στα στάδια της ζωής. *Π.Χ. Πασχαλίδης*. 2003.

5. **Μαλλιάρου, Μαρία – Αδαμαντία.** Οδηγίες για την προώθηση του μητρικού θηλασμού. *Π. Καϊκονίδης Ε.Π.Ε.* 2015.

59. **Φ. Γύπας και Φ. Α. Μεντής.** Τεχνικές μελέτης των φυσιολογικών μικροχλωρίδων του ανθρώπου - μεταγονιδιωματική (Ανασκόπηση). 2014, Τόμ. 59, 2.

63. **ΚΑΛΤΣΟΥΛΑ, ΑΝΤΙΓΟΝΗ.** Αλληλούχιση νέας γενιάς NGS (next generation sequencing): Εφαρμογές στην ογκολογία και στην εξατομικευμένη θεραπεία ασθενών με καρκίνο. *ΕΑΠ*. 2021.

71. **Γεώργιος Παπανικολάου, Δανάη Παλαιολόγου, Ευθυμία Κατσαρέλη, Θεοδώρα Κατσίλα, Χαραλαμπία Τσαρουχά, Μαρία Τζέτη, Κωνσταντίνος Λιλάκος, Λεωνίδα Δούκισσας.** *Εργαστηριακές ασκήσεις Γενετικής του ανθρώπου*. 2015.

74. **Αικ. Χαρβάλου, Δημ. Χούχουλα.** *Εισαγωγή στις αρχές της μοριακής & διαγνωστική πρακτική*. Αθήνα : Εκδόσεις Τσότρας, 2020.