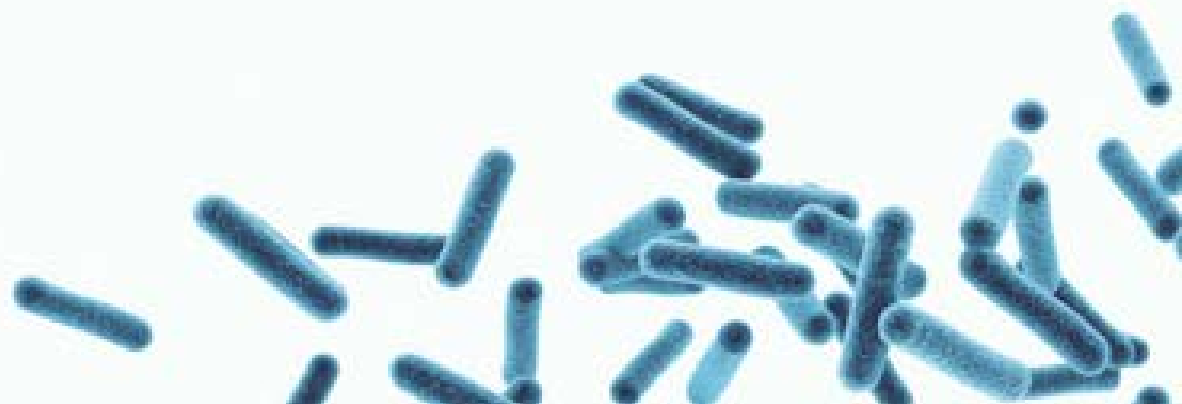




Uma visão completa da saúde endometrial





EMMA Endometrial Microbiome
Metagenomic Analysis



Introdução

O Projeto do Microbioma Humano (HMP) destacou a **importância dos diferentes microrganismos e seus genomas na saúde e doença humana** (Human Microbiome Project Consortium, 2012).

Este conhecimento mostrou a relevância de identificar desequilíbrios ou patógenos no microbioma para melhorar o manejo clínico em diferentes áreas da medicina.

Pesquisas recentes identificaram a **existência de um microbioma endometrial**, demonstrando que a disbiose da cavidade uterina está associada a resultados reprodutivos insatisfatórios em pacientes em Tratamento de Reprodução Assistida. Isto sugere que os desvios patogênicos dos níveis de Lactobacilos endometriais desempenham um importante papel na infertilidade (Moreno et al., 2016).

EMMA (Endometrial Microbiome Metagenomic Analysis), é um teste que pode identificar se o ambiente microbiano uterino é favorável para a implantação embrionária.

O Teste EMMA proporciona uma visão da composição do microbioma endometrial, incluindo os patógenos causadores da Endometrite Crônica, que podem ser analisados especificamente através do teste ALICE.

Indicações para o teste EMMA

Está comprovado o benefício de considerar o microbioma endometrial de pacientes com repetidas falhas de implantação (RIF) (Moreno et al. Am J Obstet Gynecol, 2016), porém o teste **EMMA também pode ser conveniente para todas pacientes com desejo reprodutivo** de forma preventiva, já que proporciona informação sobre o ambiente microbiológico que o embrião encontrará no momento da implantação.

Metodologia

Este teste utiliza a mais recente tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) para proporcionar informações sobre o microbioma do endométrio, analisando o **perfil completo do ambiente microbiano endometrial**. A tecnologia tem como base a extração de DNA seguida de amplificação e sequenciamento do gene RNA ribossômico bacteriano 16S.

Este gene bacteriano, conservado em todas as bactérias, apresenta 9 regiões variáveis com sequências de DNA específicas para cada espécie. Isto permite a atribuição taxonômica e a quantificação relativa de cada bactéria presente em uma amostra.

Uma única amostra endometrial contém células endometriais e bacterianas que podem ser analisadas utilizando sequenciamento para prever a receptividade endometrial e o microbioma endometrial. Portanto, o teste EMMA proporciona uma visão ampla do endométrio que permite melhorar o manejo clínico das pacientes.

Amostra

O teste EMMA pode ser realizado a partir de uma pequena amostra de tecido endometrial biopsiado. Caso a paciente vá realizar o teste ERA, de receptividade endometrial, a mesma amostra coletada pode ser utilizada para ambos os testes **sem a necessidade de uma amostra adicional nem de maior tamanho.**



Dia da biópsia

A coleta de amostra para o teste EMMA pode ser realizada entre os dias 15 e 25 do ciclo natural ou em P+5 em ciclo HRT.

Se a biópsia endometrial é realizada para a análise conjunta dos testes ERA e EMMA, é necessário seguir as instruções de coleta de acordo com o protocolo do teste ERA.



Resultados

O laudo do teste EMMA proporciona informações sobre a saúde microbiana geral da cavidade uterina.

Incluindo:

- Porcentagem de lactobacilos na amostra endometrial.
- Porcentagens das 10 bactérias mais abundantes detectadas na amostra endometrial
- Diagnóstico do Microbioma Endometrial: normal (alta porcentagem de lactobacilos), ou anormal (baixa porcentagem de lactobacilos e / ou presença de patógenos bacterianos).
- Recomendação de terapia probiótica / antibiótica, quando necessário.

ENDOMETRIAL MICROBIOME METAGENOMIC ANALYSIS (EMMA)

Patient information	Sample information	Clinic information
Unique pat id.: XXX	Date received: XX/XX/XXXX	Clinic: XXX
Sample type: Endometrial biopsy	Report Date: XX/XX/XXXX	Clinician: Dr. XXX
Patient name: XXX	Cycle type: Natural	No. biopsy: XXX
Patient DOB: XX/XX/XXXX	Day of cycle: XX/XX/XXXX	
	Date of biopsy: XX/XX/XXXX	

TEST RESULT: NORMAL MICROBIOME PROFILE

Percentage of *Lactobacilli*: 92%

Ten most abundant bacteria:

Bacteria	%
<i>Lactobacillus</i>	92%
<i>Bifidobacterium</i>	3%
<i>Propionibacterium</i>	2%
Others	3%

Chronic endometritis causing bacteria:

ALICE pathogens	%
Enterobacteria	ND
<i>Escherichia spp.</i>	ND
<i>Klebsiella spp.</i>	ND
<i>Enterococcus spp.</i>	ND
<i>Staphylococcus spp.</i>	ND
<i>Streptococcus spp.</i>	ND
<i>Mycoplasma spp.</i>	ND
<i>Ureaplasma spp.</i>	ND
<i>Chlamydia spp.</i>	ND
<i>Neisseria spp.</i>	ND

INTERPRETATION OF YOUR RESULT AND RECOMMENDATION:

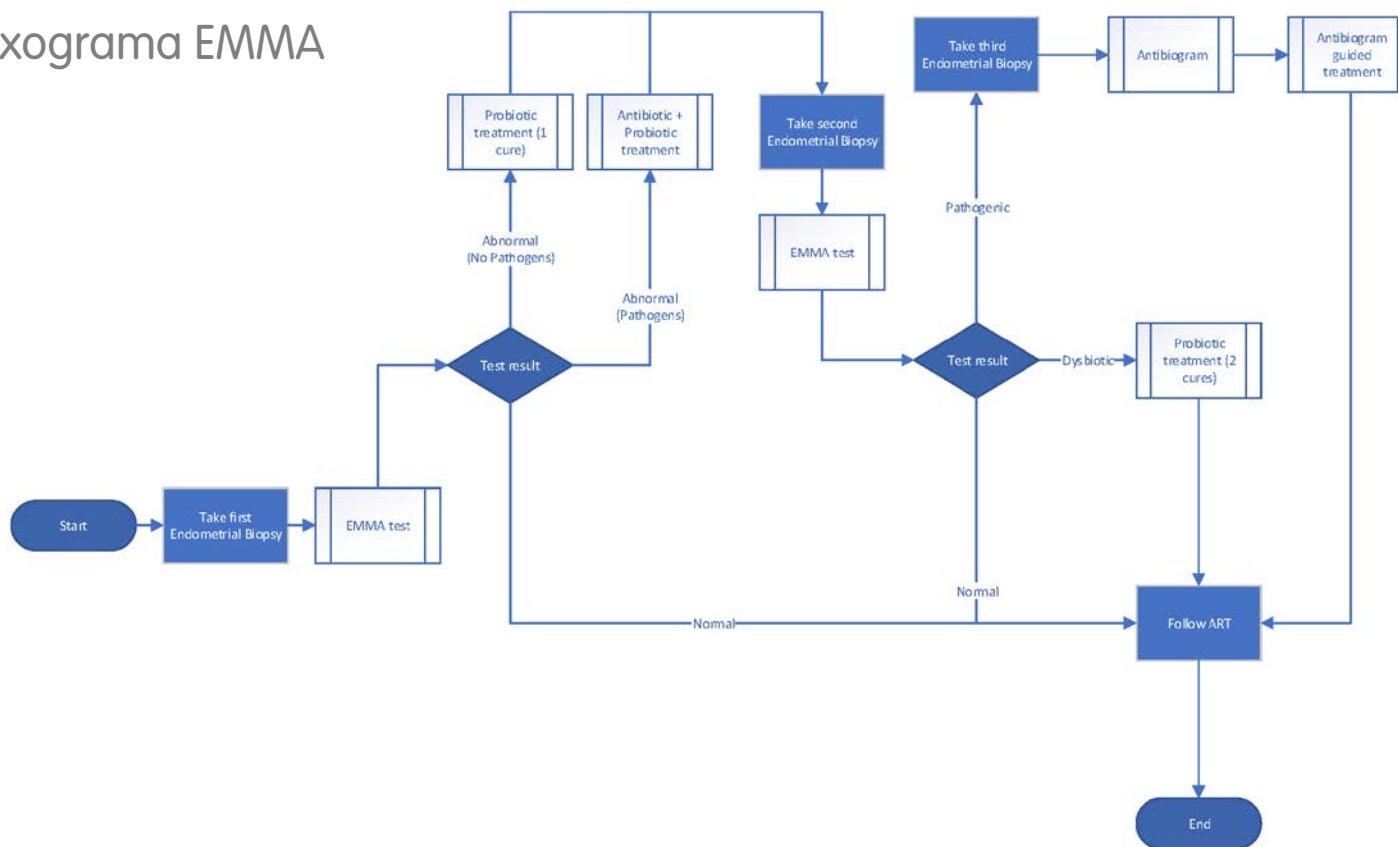
The most abundant bacteria in the sample is *Lactobacillus*, which is considered a favourable endometrial microbiota for implantation. The amount of dysbiotic or pathogenic bacteria detected is not significant.

Recommendation: No microbiological intervention is required.

Laudo

As recomendações para terapia antimicrobiana serão sempre **guiadas por um microbiologista clínico especializado**, que irá aconselhar de forma individualizada a paciente ou o(a) médico(a).

Fluxograma EMMA



Benefícios do Mibrobioma por NGS vs Cultura de Microbioma

A cultura microbiana é o método tradicional para avaliação de populações bacterianas e infecção. No entanto, foi demonstrado que, dependendo da localização, entre 20% e 60% das bactérias não podem ser cultivadas. A avaliação molecular do microbioma usando NGS permite a detecção de bactérias cultiváveis e não cultiváveis, otimizando dessa forma o resultado final.

Referências

Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012; 486:207-14.

Moreno I, Codoñer FM, Vilella F, Valbuena D, Martinez-Blanch JF, Jimenez-Almazan J, Alonso R, Alama P, Remohi J, Pellicer A, Ramon D, Simon C. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *Am J Obstet Gynecol.* 2016; 215:684-703.



ALICE Analysis of Infectious
Chronic Endometritis



Introdução

O melhor exemplo de patologia causada por uma microbiota endometrial alterada é a **Endometrite Crônica (EC)**. EC é uma inflamação persistente do tecido endometrial, causada por infecção da cavidade uterina, principalmente por patógenos bacterianos. Por geralmente ser assintomática e os métodos atuais de diagnóstico clássico (histologia, histeroscopia e cultura microbiana) serem insatisfatórios, a EC é pouco investigada, apesar de afetar **aproximadamente 30% das mulheres inférteis, enquanto a prevalência em pacientes com Repetidas Falhas de Implantação (RIF) e Perda Gestacional Recorrente (RPL) poderiam superar os 60%**.

Um estudo recente realizado pela Igenomix demonstrou que a avaliação molecular da EC é um método viável, mais rápido e mais econômico para o diagnóstico da EC em comparação com o método clássico (Moreno et al., Am J Obstet Gynecol, 2018), e deve ser considerado como uma forma de melhorar a detecção desta patologia endometrial frequentemente não diagnosticada.

O teste ALICE (Analysis of Infectious Chronic Endometritis), identifica as bactérias mais frequentes associadas à Endometrite Crônica. Isso amplia o serviço oferecido pela Igenomix, para avaliar o fator endometrial a nível microbiológico, com o objetivo de melhorar o manejo clínico das pacientes com essa doença silenciosa.

Indicações para o teste ALICE

Todas as pacientes com desejo reprodutivo podem ser beneficiadas de uma análise do ambiente microbiótico que o embrião encontrará no momento da implantação. O teste ALICE também pode ser de especial interesse para pacientes com histórico de RIF e RPL, já que a Endometrite Crônica pode estar associada a estas complicações.

Metodologia

O teste ALICE utiliza a mais recente tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) para fornecer informações sobre a microbiota do endométrio, analisando níveis específicos de bactérias relacionadas com a Endometrite Crônica. A tecnologia tem como base a extração de DNA seguida de amplificação e sequenciamento do gene RNA ribossômico bacteriano 16S.

Este gene bacteriano, conservado em todas as bactérias, apresenta 9 regiões variáveis com sequências de DNA específicas para cada espécie. Isto permite a **atribuição taxonômica e a quantificação relativa de cada bactéria presente em uma amostra.**

Amostras

Para realizar o teste ALICE é preciso apenas biopsiar uma pequena amostra de tecido endometrial.

Se a paciente está realizando o teste ERA, de receptividade endometrial, a análise poderá ser realizada com a mesma amostra, **sem necessidade de amostra adicional, nem de maior tamanho.**



Dia da biópsia

A coleta de amostra para o teste ALICE pode ser realizada entre os dias 15 e 25 do ciclo natural ou em P+5 em ciclo HRT.

Se a biópsia endometrial é realizada para a análise conjunta dos testes ERA e ALICE, é necessário seguir as instruções de coleta de acordo com o protocolo do teste ERA.



Resultados

O laudo do teste ALICE identifica as bactérias causadoras da Endometrite Crônica e sua abundância no microbioma endometrial.

Estas bactérias são: Enterococcus spp., Enterobacteriaceae, Streptococcus spp., Staphylococcus spp., Mycoplasma spp e Ureaplasma spp. Além disso, outros patógenos associados a infecções sexualmente transmissíveis (IST), como Chlamydia trachomatis e Neisseria gonorrhoeae, são relatados.

O relatório de resultados inclui a recomendação de antibioticoterapia para os patógenos detectados.

Laudo

As recomendações para terapia antimicrobiana serão sempre **guiadas por um microbiologista clínico especializado**, que irá aconselhar de forma individualizada a paciente ou o(a) médico(a).

ANALYSIS OF INFECTIOUS CHRONIC ENDOMETRITIS (ALICE)

Patient information	Sample information	Clinic information
Unique pat id.: XXX	Date received: XX/XX/XXXX	Clinic: XXX
Sample type: Endometrial biopsy	Report Date: XX/XX/XXXX	Clinician: Dr. XXX
Patient name: XXX	Cycle type: Natural	No. biopsy: XXX
Patient DOB: XX/XX/XXXX	Day of cycle: XX/XX/XXXX	
	Date of biopsy: XX/XX/XXXX	

TEST RESULT: POSITIVE FOR CHRONIC ENDOMETRITIS

Chronic endometritis caused by bacteria:

ALICE pathogens	%
Enterobacteriaceae	0.2%
<i>Escherichia spp.</i>	ND
<i>Klebsiella spp.</i>	0.2%
<i>Enterococcus spp.</i>	1%
<i>Staphylococcus spp.</i>	ND
<i>Streptococcus spp.</i>	4%
<i>Mycoplasma spp.</i>	ND
<i>Ureaplasma spp.</i>	30%
<i>Chlamydia spp.</i>	ND
<i>Neisseria spp.</i>	ND

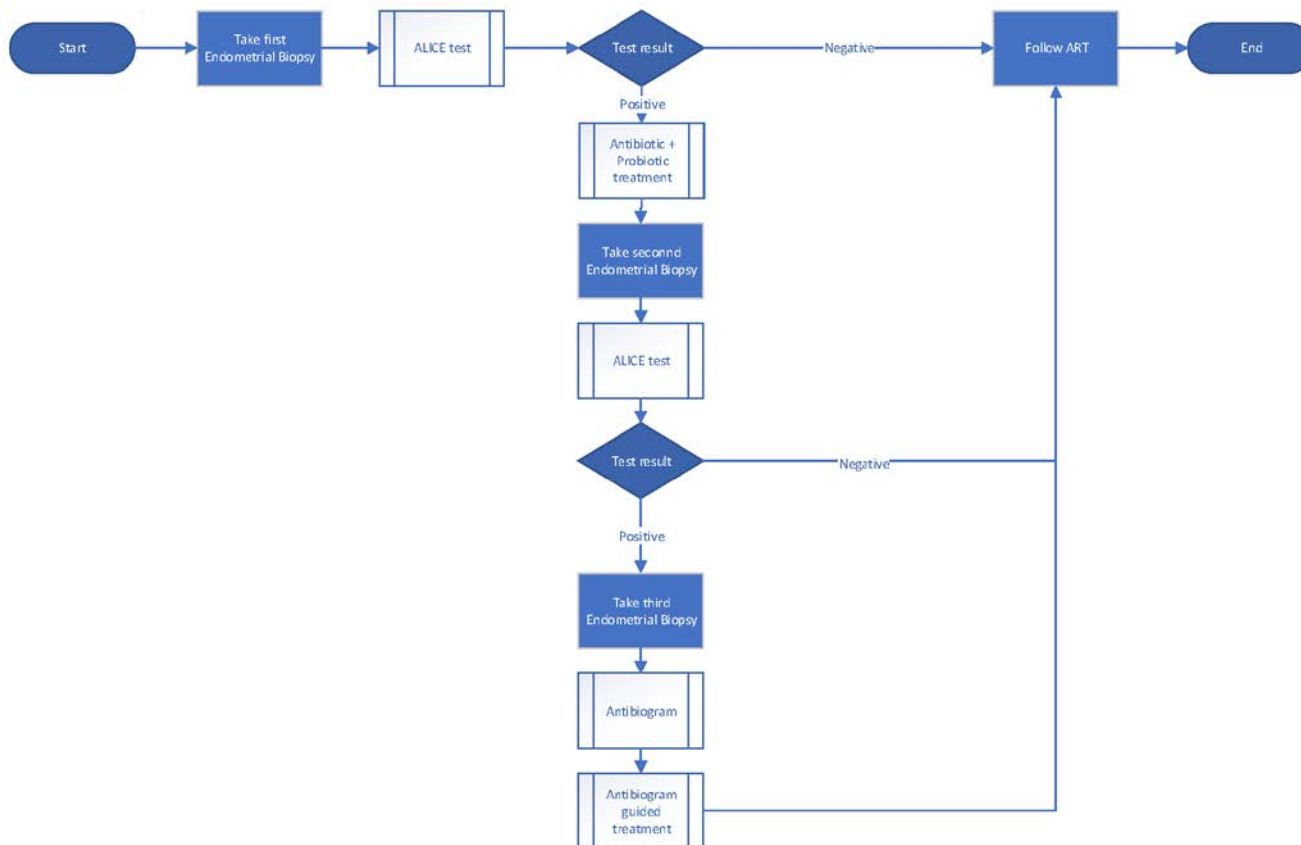
INTERPRETATION OF YOUR RESULT AND RECOMMENDATION:

DNA from chronic endometritis causing bacteria has been detected in a significant amount in the endometrial sample.

Recommendation: Antibiotic therapy followed by probiotic treatment is recommended before continuing with ART. Please find below the suggested therapy based on the bacteria detected. We also recommend the analysis of a second sample after treatment, to confirm the restoration of a favourable environment for implantation.

Suggested therapy: Metronidazole 500mg/12h for 7 days followed by vaginal *Lactobacilli* probiotics.

Fluxograma EMMA



Benefícios de detectar patógenos da EC por NGS vs métodos tradicionais

O diagnóstico atual de EC é tradicionalmente baseado em histologia, histeroscopia e / ou cultura microbiana.

No entanto, esses três métodos clássicos fornecem resultados inconclusivos ou falsos em 80% dos casos. Enquanto a histologia geralmente subdiagnostica a EC, a histeroscopia geralmente superdiagnostica a doença.

A microbiologia molecular apresenta a possibilidade de, em apenas um teste, obter resultados equivalentes aos resultados combinados obtidos pela histologia, histeroscopia e cultura microbiana (Moreno et al., Am J Obstet Gynecol, 2018).

Referências

Moreno I, Codoñer FM, Vilella F, Valbuena D, Martinez-Blanch JF, Jimenez-Almazan J, Alonso R, Alama P, Remohi J, Pellicer A, Ramon D, Simon C. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *Am J Obstet Gynecol.* 2016; 215:684-703.

Moreno I, Cicinelli E, Garcia-Grau I, Gonzalez M, Bau D, Vilella F, De Ziegler D, Resta L, Valbuena D, Simon C. The diagnosis of chronic endometritis in infertile asymptomatic women: a comparative study of histology, microbial cultures, hysteroscopy, and molecular microbiology. *Am J Obstet Gynecol.* 2018, DOI: 10.1016/j.ajog.2018.02.012.

PACOTE DE SAÚDE ENDOMETRIAL

✦ ERA ✦ EMMA ✦ ALICE

Pack Endometrial: ERA, EMMA, ALICE
ERA: expressão de 248 genes para facilitar a pET

✦ EMMA Endometrial Microbiome
Metagenomic Analysis

Análise completa do Microbioma
Aconselhamento microbiológico para um tratamento individualizado

✦ ALICE Analysis of Infectious
Chronic Endometritis

Edometrite Crônica : 8 bactérias patogênicas
Aconselhamento microbiológico para um tratamento individualizado

igenomix 
PIONEERS IN REPRODUCTIVE GENETICS