

Микробиота плодных оболочек при интактном плодном пузыре и доношенной беременности

Каганова М.А.¹, Спиридонова Н.В.¹, Махлина Е.А.²

¹ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России

²ООО «Консультативная клиника «Панацея» (Самара)

Microbiota of fetal membranes in intact amniotic sac and full-term pregnancy

Kaganova M.A.¹, Spiridonova N.V.¹, Makhlina E.A.²

¹Samara State Medical University

²Consultative clinic "Panatseya" LLC (Samara)

АННОТАЦИЯ

Цель исследования. Изучить микробный пейзаж плодных оболочек при интактном плодном пузыре и доношенной беременности

Материалы и методы. У 19 беременных (средний возраст 31.0 ± 5.3 года, средний срок гестации 39.3 ± 0.65 нед) с неповрежденными плодными оболочками во время elective кесарева сечения проводился забор ткани плодных оболочек с целью выявления следующих микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции: *Lactobacillus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas* spp., *Eubacterium* spp., *Sneathia* spp./*Leptotrichia* spp./*Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp./*Veillonella* spp./*Dialister* spp., *Lachnobacterium* spp./*Clostridium* spp., *Mobiluncus* spp./*Corynebacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Atopobium vaginae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma (urealyticum + parvum)*, *Candida* spp., *Mycoplasma genitalium*.

Результаты. Стерильные оболочки обнаружены у 5 беременных (26.3 %), в остальных случаях выявлена общая бактериальная масса (ОБМ) $10^{4.5}$ ($10^{3.5}-10^{5.8}$) геном-эквивалентов (ГЭ)/образец. Преобладали представители семейства *Enterobacteriaceae* — в среднем $10^{4.5}$ ГЭ/образец, лишь в одном случае выявлена *Candida* spp. В 42.1 % случаев при выявлении ОБМ конкретные виды микроорганизмов идентифицированы не были.

Заключение. На плодных оболочках при доношенной беременности допустимо присутствие ОБМ в среднем $10^{4.5}$ ($10^{3.5}-10^{5.8}$) ГЭ/образец, в которой преобладают *Enterobacteriaceae* в среднем $10^{4.5}$ ГЭ/образец.

Ключевые слова: плодные оболочки, плацента, полимеразная цепная реакция, ДНК-технологии, микробиота.

ABSTRACT

Aim of research. To study the microbial landscape of intact fetal membranes in full-term pregnancy.

Materials and methods. In 19 pregnant women (mean age — 31.0 ± 5.3 years, mean gestational age — 39.3 ± 0.65 weeks) with intact fetal membranes, the fetal membrane tissue was collected during elective cesarean section to detect by polymerase chain reaction the following microorganisms: *Lactobacillus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas* spp., *Eubacterium* spp., *Sneathia* spp./*Leptotrichia* spp./*Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp./*Veillonella* spp./*Dialister* spp., *Lachnobacterium* spp./*Clostridium* spp., *Mobiluncus* spp./*Corynebacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Atopobium vaginae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma (urealyticum + parvum)*, *Candida* spp., *Mycoplasma genitalium*.

Results. Sterile membranes were found in 5 pregnant women (26.3%), in the remaining cases, the total bacterial load (TBL) was $10^{4.5}$ ($10^{3.5}-10^{5.8}$) genome equivalents (GE) per sample. Representatives of the *Enterobacteriaceae* family prevailed — $10^{4.5}$ GE per sample on average, only in one case *Candida* spp. were detected. In 42.1% of cases, when determining TBL, specific types of microorganisms were not identified.

Поступила 23.10.2020

Принята 18.11.2020

Автор, ответственный за переписку

Каганова Мария Александровна: ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. 443079, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.

E-mail: mkaganova@yandex.ru

Received 23.10.2020

Accepted 18.11.2020

Corresponding author

Kaganova Mariya Aleksandrovna: Samara State Medical University, 89, Chapayevskaya str., Samara, 443079, Russia.

E-mail: mkaganova@yandex.ru

Conclusion. On the fetal membranes in full-term pregnancy, the average TBL corresponding to $10^{4.5}$ ($10^{3.5}$ – $10^{5.8}$) GE per sample, in which *Enterobacteriaceae* prevail in the amount of $10^{4.5}$ GE per sample on average, is acceptable.

Keywords: fetal membranes, placenta, polymerase chain reaction, DNA technology, microbiota.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время вопрос о нормальной микрофлоре и патогенных микроорганизмах фетоплацентарного комплекса стал наиболее актуальным. Сформировавшиеся в XX в. устойчивые представления о стерильности амниотической полости, плодных оболочек и плаценты при физиологически протекающей беременности все чаще и чаще подвергаются сомнению. В последние пять лет в результате проведенного масштабного исследования доказано — плацента обладает своей уникальной микрофлорой, которая в большей степени напоминает микрофлору ротовой полости, а не влагалища и цервикального канала [1–5].

Современные молекулярно-генетические исследования позволяют получить максимально полное и объективное представление о составе микрофлоры цервикального канала и фетоплацентарного комплекса. Появились работы, которые доказывают наличие бактерий в плаценте, амниотической жидкости, плодных оболочках, меконии; авторы предполагают, что первое столкновение с микробами происходит внутриутробно даже в условиях физиологически протекающей беременности [6–10]. Так, бактерии были выделены в 21–26 % плацент [11, 12] при доношенной физиологически протекающей беременности. Жизнеспособные бактерии (*Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. или *Propionibacterium* spp.) также были выделены из пуповинной крови здоровых новорожденных [13]. Однако в литературе недостаточно данных о характере микробного пейзажа плодных оболочек при физиологически протекающей беременности в норме, что и послужило причиной написания данной статьи.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить микробный пейзаж интактных плодных оболочек при доношенной беременности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 19 беременных со сроком гестации 37–41 нед. Исследование проводилось на базе родильных отделений ГБУЗ «Самарская городская клиническая больница

INTRODUCTION

Currently, the issue of the normal microbiota and pathogenic microorganisms of the fetoplacental complex has become the most relevant. The stable beliefs, formed in the XX century, about the sterility of the amniotic cavity, fetal membranes and placenta in normal pregnancy are increasingly calling into question. In the last five years, as a result of a large-scale study, it has been proved that the placenta has its own unique microbiota, which is more similar to the microbiota of the oral cavity, rather than of the vagina and cervical canal [1–5].

Modern molecular genetic studies make it possible to obtain the most complete and objective understanding of the cervical canal and fetoplacental complex microbiota. There are works that prove the presence of bacteria in the placenta, amniotic fluid, fetal membranes, meconium; the authors suggest that the first encounter with microbes occurs in utero, even in normal pregnancy [6–10]. Thus, bacteria were isolated in 21–26% of placentas [11, 12] during full-term normal pregnancy. Viable bacteria (*Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., or *Propionibacterium* spp.) have also been isolated from the umbilical cord blood of healthy newborns [13]. However, there is not enough data in the literature about the nature of the fetal membranes' microbial landscape in full-term normal pregnancy, which was the reason for this article being written.

AIM OF THE RESEARCH

To study the microbial landscape of intact fetal membranes in full-term pregnancy.

MATERIALS AND METHODS

The study included 19 pregnant women with a gestation period of 37–41 weeks. The research was conducted on the basis of maternity departments of the Pirogov Samara City Clinical Hospital No. 1. The mean age of the examinees was 31.0 ± 5.3 years, the first birth frequency was 36.8%; mean number of pregnancies per patient was 2.47 ± 1.71 ; mean gestational age was 39.3 ± 0.65 weeks (39–40.5 weeks).

№ 1 им. Н.И. Пирогова». Средний возраст обследуемых составил 31.0 ± 5.3 года, частота первых родов 36.8 %; среднее количество беременностей на одну пациентку 2.47 ± 1.71 ; средний срок гестации 39.3 ± 0.65 нед (39–40.5 нед).

Все пациентки были родоразрешены путем операции кесарева сечения в плановом порядке (показаниями являлись — неправильное положение и предлежание плода, наличие рубца на матке после предыдущей операции кесарева сечения, бесплодие в сочетании с отягощенным акушерским анамнезом, возраст).

Критерии исключения:

1. Беременные, относящиеся к группе высокого риска согласно порядку оказания помощи по профилю «Акушерство и гинекология» № 572 от 01.11.2012, по соматической патологии (сахарный диабет, гестационный диабет), особенностям плацентации.

2. Наличие острых и обострение хронических воспалительных заболеваний, в том числе кольпита.

3. Антибактериальная терапия во время беременности.

Всем пациенткам было выполнено исследование образца плодных оболочек методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) (набор «Фемофлор 16») с помощью амплификатора ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология» (Москва)). Забор образца плодных оболочек проводился в стерильных условиях интраоперационно при вскрытии матки и плодного пузыря. В области посередине между плацентой и внутренним зевом с помощью стерильного конхотома с диаметром рабочей поверхности 9.4 мм отсекался стандартный образец плодной оболочки, который затем помещался в пробирку Эппендорф 1.5 мл с транспортной средой («Проба-Репид», ООО «НПО ДНК-Технология»). Изначально методика «Фемофлор 16» была разработана для оценки состояния влагалища. Но поскольку данная методика предназначена для анализа биоты различных биотопов, она также может быть применена и для анализа микрофлоры плодных оболочек [14–16]. Методика «Фемофлор 16» позволяет выявлять следующие микроорганизмы: *Lactobacillus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas* spp., *Eubacterium* spp., *Sneathia* spp./*Leptotrichia* spp./*Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp./*Veillonella* spp./*Dialister* spp., *Lachnobacterium* spp./*Clostridium* spp., *Mobiluncus* spp./*Corynebacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Atopobium vaginae*,

All patients were delivered by cesarean section in a planned manner (abnormal fetal lie and malpresentation, the presence of a scar on the uterus after a previous cesarean section, infertility in combination with poor obstetric history, older age were the indications).

Exclusion criteria:

1. Pregnant women belonging to the high-risk group according to the Order determining the Procedure for the provision of medical care in the field of Obstetrics and Gynecology No. 572 of November 1, 2012, having somatic pathology (diabetes mellitus, gestational diabetes), abnormalities of placentation.

2. The presence of acute and exacerbation of chronic inflammatory diseases, including colpitis.

3. Antibacterial therapy during pregnancy.

All patients were performed an examination of a fetal membranes sample by real-time PCR (PCR-RT) method, using Femoflor 16 Kit, and the DT-96 Amplifier (SPA DNA-Technology, Moscow). Samples of fetal membranes were taken under sterile conditions intraoperatively during the uterotomy and amniotomy. In the area between the placenta and the internal orifice of the uterus, a standard sample of the fetal membrane was cut off using a sterile conchotome with working surface of jaws being 9.4 mm in diameter, and put in Eppendorf tube 1.5 ml with transport medium (Proba-Rapid, DNA-Technology). Originally the Femoflor 16 method was developed for evaluation of vagina microbial environment. But since this method is used to analyze biota of various biotopes, it also can be used for fetal membranes microbiota analysis [14–16]. The Femoflor 16 test makes it possible to identify the following microorganisms: *Lactobacillus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas* spp., *Eubacterium* spp., *Sneathia* spp./*Leptotrichia* spp./*Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp./*Veillonella* spp./*Dialister* spp., *Lachnobacterium* spp./*Clostridium* spp., *Mobiluncus* spp./*Corynebacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Atopobium vaginae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma (urealyticum + parvum)*, *Candida* spp., *Mycoplasma genitalium*.

The analysis assessed the swab quality (SQ), which in all cases was adequate (more than 104 genome equivalents (GE) per sample); determined the amount of total bacterial load (TBL) — laboratory TBL (TBL), identified *Lactobacillus* spp. and other types listed above that are on this test panel. The quantitative assessment of the identified microor-

Mycoplasma hominis, *Ureaplasma (urealyticum + parvum)*, *Candida* spp., *Mycoplasma genitalium*.

При анализе оценивалось качество взятия мазка (КВМ), которое во всех случаях было адекватным (более 10^4 геном-эквивалентов (ГЭ)/образец), определялось количество общей бактериальной массы (ОБМ) — лабораторная ОБМ (ОБМл), *Lactobacillus* spp. и остальных вышеперечисленных видов, входящих в данную панель. Количественная оценка выявленных микроорганизмов приводилась как в абсолютных, так и в относительных показателях к ОБМл. Частота выявления данных микроорганизмов представлена в процентах к количеству пациенток в группах. Абсолютный показатель — количество ДНК искомого микроорганизма в образце, выраженное в ГЭ/мл, представленное в виде десятичного логарифма — lg. Относительный количественный показатель микроорганизма рассчитывали как отношение абсолютного количества искомого микроорганизма к абсолютному количеству рассчитанной ОБМ (ОБМр) в процентах. ОБМр получена из суммы абсолютного количества выявленных микроорганизмов в образце.

Обработку результатов исследования проводили с помощью программ STATISTICA 10.0, SPSS 13. Данные представлены как абсолютные количества в виде среднего десятичных логарифмов. Частота выявления микроорганизмов — в процентах; относительное содержание микроорганизмов — в процентах относительно рассчитанной ОБМр. Количественные показатели представлены в виде среднего арифметического (M) со стандартным отклонением (δ). Сравнение абсолютного количества в группах выполнялось с помощью критерия Манна — Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного анализа плодных оболочек представлены в табл. 1. Как видно из таблицы, ОБМл определялась только в 14 случаях (73.6 %), в среднем титре $10^{4.54}$ ГЭ/образец. Частота ОБМр составила 6 случаев (31.5 %) (табл. 1).

В 8 случаях (42.1 %) наблюдалось превышение ОБМл над ОБМр — выявлялись так называемые неизвестные виды, которые идентифицировать с помощью панели реагентов «Фемофлор 16» не представляется возможным. Относительно идентифицированных видов процент «неизвестных» видов был низким (2.08 ± 0.08 %). Стерильные оболочки (ОБМл = 0 и ОБМр = 0) наблюдались в 5 случаях (26.3 %).

анализ был проведен как в абсолютных, так и в относительных показателях с reference to the TBLl. The frequency of detection of these microorganisms is presented as a percentage of the number of patients in the groups. The absolute quantity of DNA of the desired microorganism in the sample expressed in GE per ml, presented as a decimal logarithm — lg. The relative quantity of the microorganism was calculated as the ratio of the absolute amount of the desired microorganism to the absolute amount of the calculated TBL (TBLc) as a percentage. The TBLc is derived from the sum of the absolute quantity of detected microorganisms in the sample.

The results of the study were processed using the STATISTICA 10.0, SPSS 13 softwares. The data is presented as absolute quantities in the form of the mean of decimal logarithms. The detection frequency of microorganisms — as a percentage; the relative quantity of microorganisms — as a percentage relative to the calculated TBLc. Quantitative indicators are presented in the form of an arithmetic mean (M) with a standard deviation (δ). The comparison of the absolute quantity in the groups was performed using the Mann-Whitney test. The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the fetal membranes analysis are presented in Table 1. As it can be seen, TBLl was detected only in 14 cases (73.6%), the mean titer is $10^{4.54}$ GE/ml. The frequency of TBLc was 6 cases (31.5%) (Table 1).

In 8 cases (42.1%) TBLl exceeded TBLc — so called unknown species were detected, which could not be identified with Femoflor 16 test panel. The percentage of “unknown” species relative to identified species was low ($2.08 \pm 0.08\%$). Sterile membranes (TBLl = 0 and TBLc = 0) were seen in 5 cases (26.3%).

In intact fetal membranes, mainly the representatives of the *Enterobacteriaceae* family were detected (5 cases (26.3%)), only in 1 case — *Candida* spp., which can be associated with the contact of the fetal membranes with the cervical canal.

In recent years, the research is conducted for studying the microbiota of the fetoplacental complex, and it is reported of the detection of bacteria in the placental and fetal membrane samples without signs of infection, based on the results of clinical and histological analysis [12, 17]. Back in 2005, it was shown that the fetal membranes in normal pregnancy often contain bacteria, but this does not

Таблица 1. Распределение микроорганизмов интактных плодных оболочек при доношенной беременности
Table 1. Distribution of microorganisms in intact fetal membranes in full-term pregnancy

Показатель, микроорганизмы Indicator, microorganisms	Частота выявления, абс. (%) Detection rate, abs. (%)	Абсолютный показатель — lg (M) Absolute indicator — lg (M)	Относительная частота (%) Relative ratio (%)
КВМ / SQ	19 (100)	5.04	—
ОБМл / TBLl	14 (73.7)	4.54	100
ОБМр / TBLc	6 (31.5)	4.53	97.8 ± 0.08
<i>Lactobacillus</i> spp.	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Enterobacteriaceae</i> spp.	5 (26.3)	4.53	97.8 ± 0.08
<i>Streptococcus</i> spp.	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Staphylococcus</i> spp.	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Prevotella bivia</i> + <i>Porphyromonas</i> spp.	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Eubacterium</i> spp.	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Sneathia</i> spp. + <i>Leptotrichia</i> spp. + <i>Fusobacterium</i> spp.	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Megasphaera</i> spp. + <i>Veillonella</i> spp. + <i>Dialister</i> spp.	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Lachnobacterium</i> spp. + <i>Clostridium</i> spp.	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Mobiluncus</i> spp. + <i>Corynebacterium</i> spp.	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Atopobium vaginae</i>	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Candida</i> spp.	1 (5)	1.82	0.19 ± 0.02
<i>Mycoplasma hominis</i>	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Ureaplasma (urealyticum + parvum)</i>	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Mycoplasma genitalium</i>	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
Неизвестные виды / Undetected species	8 (42.1)	2.89	2.08 ± 0.08

В интактных плодных оболочках выявлялись в основном представители семейства *Enterobacteriaceae* (5 случаев (26.3 %)), только в 1 случае выявлена *Candida* spp., что можно связать с ее контактным попаданием на плодные оболочки из цервикального канала.

В последние годы проводятся исследования, направленные на изучение микробиоты фетоплацентарного комплекса, а также сообщается об обнаружении бактерий в образцах плаценты и плодных оболочек без признаков инфекции по результатам клинического и гистологического анализа [12, 17]. Еще в 2005 г. было показано, что плодные оболочки при физиологически протекающей беременности часто содержат бактерии, но к осложнениям гестации это не приводит, и данных о наличии инфекции при гистологическом исследовании плодных оболочек и плаценты нет [18].

Было установлено, что плацентарный микробиом наиболее сходен с микробиомом полости рта (наддесневой бляшки и спинки языка) и не

lead to gestational complications, and there is no data on the presence of infection during histological examination of the fetal membranes and placenta [18].

It was found that the placenta microbiome is most similar to the microbiome of the oral cavity (supragingival plaque and dorsum of the tongue) and is not identical to the intestinal and vaginal microbiomes [4, 5]. Thus, the ascending pathway of bacterial colonization of the placenta and fetal membranes is not dominant and, most likely, is realized with the loss of the barrier function of the cervical canal and the fetal membranes continuity [4], which, in fact, confirms our study. In pregnant women with intact fetal membranes, the frequency of microbial DNA detection is 73.7%; but in 42.1% of cases, it was impossible to identify microorganisms using the Femoflor 16 test panel, which is due to its orientation to identify representatives of the vaginal biotope, while the DNA of other species is present on the fetal membranes. Our results are

идентичен кишечным и влагалищным микробиомам [4, 5]. Таким образом, восходящий путь бактериальной колонизации плаценты и плодных оболочек не является доминирующим и, скорее всего, реализуется при утрате барьерной функции цервикального канала, нарушении целостности плодных оболочек [4], что, по сути, подтверждает наше исследование. У беременных с интактными плодными оболочками частота выявления ДНК микроорганизмов составляет 73.7 %, но в 42.1 % случаев идентифицировать микроорганизмы с помощью стандартной панели реагентов «Фемофлор 16» было невозможно, что связано с ориентацией панели на выявление представителей влагалищного биотопа, а на плодных оболочках присутствует ДНК других видов. Наши данные подтверждаются данными литературы, где несовпадения ОБМл и ОБМр при анализе ДНК методом ПЦР-РВ аналогично объясняются тем, что к части ДНК бактерий в стандартных панелях не представлены реагенты, лаборатория определяет некую бактериальную массу, но выделить конкретное семейство не представляется возможным [3]. В результате нашего исследования у пациенток на плодных оболочках выделены исключительно представители семейства *Enterobacteriaceae*, лишь в одном случае грибы рода *Candida*.

Семейство *Enterobacteriaceae* выявлялось в исследованиях других авторов, которые также идентифицировали: *Protobacteria*, *Bacteroides*, *Fusobacteria* и *Tenericutes* [19, 20]. Мнения о жизнеспособности данных бактерий в литературе разнятся. В недавнем исследовании L. Zhu et al. [21] микробы культивировались с плодной части плаценты в 20.7 % случаев (379 из 1832 образцов), полученной во время кесарева сечения при доношенной беременности без клинических признаков хориоамнионита; из них в 13.5 % (247 из 1832 образцов) случаев в плацентах обнаружена культура *E. coli*. Однако ряд других исследований свидетельствует о том, что вклад в выявление ДНК различных бактерий как на плаценте, так и на плодных оболочках вносит загрязнение образцов, либо наличие ДНК свидетельствует лишь о том, что данные виды бактерий присутствовали на плаценте и плодных оболочках, но они не жизнеспособны и не дают роста при культивировании на средах. Возможно, активно размножающейся динамичной микробиоты в плаценте и плодных оболочках и не существует, как это имеет место во влагалище, но сам факт наличия ДНК определенных микроорганизмов свидетельствует в пользу важных им-

confirmed by the literature data, where the discrepancies between TBLl and TBLc in the analysis of DNA by PCR-RT are similarly explained by the fact that the reagents for the part of the bacterial DNA are not presented in the standard test panels, so the laboratory determines a certain bacterial load, but has no opportunity to detect a specific bacteria family [3]. As a result of our research, only representatives of the *Enterobacteriaceae* family were identified on the fetal membranes of patients; and only in one case — fungi of the *Candida* spp.

The *Enterobacteriaceae* family was detected by other authors, who have also identified: *Protobacteria*, *Bacteroides*, *Fusobacteria*, and *Tenericutes* [19, 20]. Opinions concerning the viability of these bacteria differ in the literature. In the recent study by L. Zhu et al. [21], in 20.7% of cases (379 out of 1.832 samples) the viable bacteria were obtained from the fetal part of placenta during cesarean section in full-term pregnancy without clinical signs of chorioamnionitis; of these, in 13.5% (247 out of 1.832 samples) of cases, *E. coli* culture was identified in the placentas. However, a number of other studies indicate that the contamination of the samples contributes to the detection of DNA of various bacteria both on the placenta and on the fetal membranes; or the presence of DNA only shows that these species of bacteria were present on the placenta and the fetal membranes, but they are not viable and do not exhibit growth when cultured on media. It is possible that the actively growing dynamic microbiota in the placenta and the fetal membranes does not exist as is the case in the vagina, but the very fact of the presence of certain microorganisms' DNA suggests important immunological processes, which are based on the microbial antigen presentation and the production of the cellular and humoral immunity factors in response [4, 5].

CONCLUSION

On the fetal membranes in full-term pregnancy, the presence of a total bacterial load of $10^{4.5}$ ($10^{3.5}$ – $10^{5.8}$) GE per sample is acceptable. Unidentified microorganisms were detected in the fetal membrane samples in 42.1% of cases, but their titer was insignificant ($10^{2.89}$ GE per sample). With an intact amniotic sac, the quantity of *Enterobacteriaceae* spp. representatives detected on the fetal membranes corresponds to $10^{4.5}$ GE per sample on average.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

мунологических процессов, в основе которых лежит презентация антигенов микробов и выработка в ответ факторов клеточного и гуморального иммунитета [4, 5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На плодных оболочках при доношенной беременности допустимо присутствие общей бактериальной массы — $10^{4.5}$ ($10^{3.5}$ – $10^{5.8}$) ГЭ/образец.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Parnell L.A., Briggs C.M., Cao B. et al. Microbial communities in placentas from term normal pregnancy exhibit spatially variable profiles // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7: 11200. doi: 10.1038/s41598-017-11514-4.
2. Bagga R., Arora P. Genital micro-organisms in pregnancy // *Front. Public Health.* 2020. Vol. 8: 225. doi: 10.3389/fpubh.2020.00225.
3. Lim E.S., Rodriguez C., Holtz L.R. Amniotic fluid from healthy term pregnancies does not harbor a detectable microbial community // *Microbiome.* 2018. Vol. 6: 87. doi: org/10.1186/s40168-018-0475-7.
4. Aagaard K., Ma J., Antony K.M. et al. The placenta harbors a unique microbiome // *Sci. Transl. Med.* 2014. Vol. 6 (237): 237ra65.
5. Collado M.C., Rautava S., Aakko J., Isolauri E., Salminen S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6: 23129.
6. Ardisson A.N., de la Cruz D.M., Davis-Richardson A.G. et al. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth // *PLoS One.* 2014. Vol. 9 (3): e90784.
7. Moles L., Gómez M., Heilig H. et al. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life // *PLoS One.* 2013. Vol. 8 (6): e66986.
8. Satokari R., Grönroos T., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E. *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* DNA in the human placenta // *Lett. Appl. Microbiol.* 2009. Vol. 48 (1). P. 8–12.
9. Bearfield C., Davenport E.S., Sivapathasundaram V., Allaker R.P. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth // *BJOG.* 2002. Vol. 109 (5). P. 527–533.
10. Rautava S., Collado M.C., Salminen S., Isolauri E. Probiotics modulate host-microbe interaction in the placenta and fetal gut: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial // *Neonatology.* 2012. Vol. 102 (3). P. 178–184.
11. Hillier S.L., Martius J., Krohn M. et al. A case-control study of chorioamnionitis and histologic chorioamnionitis in prematurity // *N. Engl. J. Med.* 1988. Vol. 319. P. 972–978.
12. Stout M.J., Conlon B., Landeau M. et al. Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2013. Vol. 208. P. 226.e1–226.e7. doi: org/10.1016/j.ajog.2013.01.018.
13. Jimenez E., Fernandez L., Marin M.L. et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of

В образцах плодных оболочек выявлены неидентифицированные микроорганизмы в 42.1 % случаев, но их титр был незначительным ($10^{2.89}$ ГЭ/образец). При целом плодном пузыре на плодных оболочках определяются представители *Enterobacteriaceae* в среднем $10^{4.5}$ ГЭ/образец.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

REFERENCES

1. Parnell L.A., Briggs C.M., Cao B. et al. (2017). Microbial communities in placentas from term normal pregnancy exhibit spatially variable profiles. *Sci. Rep.*, 7: 11200. doi: 10.1038/s41598-017-11514-4.
2. Bagga R., Arora P. (2020). Genital micro-organisms in pregnancy. *Front. Public Health*, 8: 225. doi: 10.3389/fpubh.2020.00225.
3. Lim E.S., Rodriguez C., Holtz L.R. (2018). Amniotic fluid from healthy term pregnancies does not harbor a detectable microbial community. *Microbiome*, 6: 87. doi: org/10.1186/s40168-018-0475-7.
4. Aagaard K., Ma J., Antony K.M. et al. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Sci. Transl. Med.*, 6 (237): 237ra65.
5. Collado M.C., Rautava S., Aakko J., Isolauri E., Salminen S. (2016). Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci. Rep.*, 6: 23129.
6. Ardisson A.N., de la Cruz D.M., Davis-Richardson A.G. et al. (2014). Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PLoS One*, 9 (3): e90784.
7. Moles L., Gómez M., Heilig H. et al. (2013). Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One*, 8 (6): e66986.
8. Satokari R., Grönroos T., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E. (2009). *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* DNA in the human placenta. *Lett. Appl. Microbiol.*, 48 (1), 8–12.
9. Bearfield C., Davenport E.S., Sivapathasundaram V., Allaker R.P. (2002). Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG*, 109 (5), 527–533.
10. Rautava S., Collado M.C., Salminen S., Isolauri E. (2012). Probiotics modulate host-microbe interaction in the placenta and fetal gut: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neonatology*, 102 (3), 178–184.
11. Hillier S.L., Martius J., Krohn M. et al. (1988). A case-control study of chorioamnionitis and histologic chorioamnionitis in prematurity. *N. Engl. J. Med.*, 319, 972–978.
12. Stout M.J., Conlon B., Landeau M. et al. (2013). Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 208, 226.e1–226.e7. doi: org/10.1016/j.ajog.2013.01.018.
13. Jimenez E., Fernandez L., Marin M.L. et al. (2005). Isolation of commensal bacteria from umbilical cord

- healthy neonates born by cesarean section // *Curr. Microbiol.* 2005. Vol. 51. P. 270–274.
14. Болдырева М.Н., Липова Е.В., Алексеев Л.П., Витвицкая Ю.Г., Гуськова И.А. Характеристика биоты урогенитального тракта у женщин репродуктивного возраста методом ПЦР в реальном времени // *Журн. акушерства и женских болезней.* 2009. Т. 58, № 6. С. 36–42.
 15. Сухих Г.Т., Прилепская В.Н., Трофимов Д.Ю. и др. Применение метода полимеразной цепной реакции в реальном времени для оценки микробиоценоза урогенитального тракта у женщин: медицинская технология. М., 2011. 34 с.
 16. Ворошилина Е.С., Тумбинская Л.В., Донников А.Е., Плотко Е.Э., Хаютин Л.В. Биоценоз влагалища с точки зрения количественной полимеразной цепной реакции: что есть норма? // *Акушерство и гинекология.* 2011. № 1. С. 57–65.
 17. Fortner K.B., Grotegut C.A., Ransom C.E. et al. Bacteria localization and chorion thinning among preterm premature rupture of membranes // *PLoS One.* 2014. Vol. 9 (1): e83338. doi: org/10.1371/journal.pone.0083338.
 18. Steel J.H., Malatos S., Kennea N. et al. Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor // *Pediatr. Res.* 2005. Vol. 57 (3). P. 404–411. doi: org/10.1203/01.PDR.0000153869.96337.90.
 19. Mitchell C.M., Haick A., Nkwopara E. et al. Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2015. Vol. 212 (5). P. 611.e1–611.e9.
 20. Younes J.A., Lievens E., Hummelen R. et al. Women and their microbes: the unexpected friendship // *Trends. Microbiol.* 2017. Vol. 26. P. 16–32. doi: 10.1016/j.tim.2017.07.008.
 21. Zhu L., Luo F., Hu W. et al. Bacterial communities in the womb during healthy pregnancy // *Front. Microbiol.* 2018. Vol. 9: 2163.
 - blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr. Microbiol.*, 51, 270–274.
 14. Boldyreva M.N., Lipova E.V., Alexeev L.P., Vitviskaya Ju.G., Gouskova I.A. (2009). Features of urogenital tract's biota determined by means of real-time PCR among women of reproductive age. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases*, 58 (6), 36–42.
 15. Suhik G.T., Prilepskaja V.N., Trofimov D.Ju. et al. (2011). *Assessment of Microbiocenosis of Woman's Genitourinary Tract by Real-time PCR: Medical Technology.* Moscow, 34 p. In Russ.
 16. Voroshilina E.S., Tumbinskaya L.V., Donnikov A.E., Plotko E.A., Khayutin L.V. (2011). Vaginal biocenosis in the context of view of quantitative polymerase chain reaction: what is its norm? *Obstetrics and Gynecology*, 1, 57–65. In Russ.
 17. Fortner K.B., Grotegut C.A., Ransom C.E. et al. (2014). Bacteria localization and chorion thinning among preterm premature rupture of membranes. *PLoS One*, 9 (1): e83338. doi: org/10.1371/journal.pone.0083338.
 18. Steel J.H., Malatos S., Kennea N. et al. (2005). Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatr. Res.*, 57 (3), 404–411. doi: org/10.1203/01.PDR.0000153869.96337.90.
 19. Mitchell C.M., Haick A., Nkwopara E. et al. (2015). Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 212 (5), 611.e1–611.e9.
 20. Younes J.A., Lievens E., Hummelen R. et al. (2017). Women and their microbes: the unexpected friendship. *Trends. Microbiol.*, 26, 16–32. doi: 10.1016/j.tim.2017.07.008.
 21. Zhu L., Luo F., Hu W. et al. (2018). Bacterial communities in the womb during healthy pregnancy. *Front. Microbiol.*, 9: 2163.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Каганова Мария Александровна — канд. мед. наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Спирidonova Наталья Владимировна — д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Махлина Елена Алексеевна — врач акушер-гинеколог ООО «Консультативная клиника «Панacea» (Самара).

Образец цитирования: Каганова М.А., Спирidonova Н.В., Махлина Е.А. Микробиота плодных оболочек при интактном плодном пузыре и доношенной беременности // *Journal of Siberian Medical Sciences.* 2021. № 1. С. 4–11.

ABOUT THE AUTHORS

Kaganova Mariya Aleksandrovna — Cand. Sci. (Med.), Assistant Professor, Obstetrics and Gynecology Department, Samara State Medical University.

Spiridonova Natalya Vladimirovna — Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Obstetrics and Gynecology Department, Samara State Medical University.

Makhlina Elena Alekseevna — Obstetrician-gynecologist, Consultative clinic "Panatseya" LLC (Samara).

Citation example: Kaganova M.A., Spiridonova N.V., Makhlina E.A. (2021). Microbiota of fetal membranes in intact amniotic sac and full-term pregnancy. *Journal of Siberian Medical Sciences*, 1, 4–11.