

Е.В. Шипицына



Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта,
Санкт-Петербург, Российская Федерация

Микробиом плаценты: сдвиг парадигмы или несовершенство методологии?

Стремительное развитие технологий высокопроизводительного секвенирования ДНК и методов биоинформатики в совокупности с существенным снижением их стоимости открыло широчайшие возможности изучения микробиома человека. В последние годы много внимания уделяется исследованиям микробиома верхних отделов репродуктивного тракта женщины и фетоплацентарной системы, которые традиционно считались стерильными. Получение неопровержимых доказательств существования микробиома плаценты позволило бы с большой долей уверенности говорить о колонизации плода микроорганизмами еще в утробе матери, что имело бы далеко идущие последствия не только для медицины, но и для фундаментальной биологии. Вопрос этот вызвал бурную дискуссию среди микробиологов, молекулярных биологов, акушеров-гинекологов, неонатологов. В последние несколько лет опубликован целый ряд исследований, как опровергающих, так и подтверждающих существующую в течение многих десятилетий догму о том, что плацента и плод стерильны во время здоровой беременности. Данный обзор литературы представляет критический анализ результатов исследований микробиома плаценты. Приведены аргументы как сторонников гипотезы резидентной микробиоты плаценты, так и их оппонентов. Особое внимание уделено методологическим требованиям к молекулярным исследованиям биологического материала с низкой микробной биомассой, соблюдение которых имеет критическое значение для получения достоверных результатов.

Ключевые слова: микробиом плаценты, микробиом плода, резидентная микробиота, высокопроизводительное секвенирование ДНК, микробная контаминация

Для цитирования: Шипицына Е.В. Микробиом плаценты: сдвиг парадигмы или несовершенство методологии? *Вестник РАМН.* 2021;76(5):436–448. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn1489>

436

Введение

Широкое внедрение технологий высокопроизводительного секвенирования ДНК в клиническую микробиологию позволило существенно расширить представления о микробиоте и микробиоме (совокупном геноме микробиоты) человека в норме и при различных заболеваниях. Последние несколько лет ознаменовались интенсивными исследованиями микробиоты верхних отделов репродуктивного тракта женщины, а также плаценты и плода. Впервые предположение о существовании резидентной (физиологической) микробиоты плаценты было сделано в 2014 г., когда К. Aagaard et al. сообщили о выявлении бактериальной ДНК в образцах плаценты, в том числе при доношенной беременности [1]. Сопоставление бак-

териальных сообществ плаценты с бактериальными сообществами других органов и систем показало сходство с микробиотой ротовой полости, что навело авторов на мысль о возможном происхождении микробиоты плаценты. Эта работа стала первой в череде исследований, характеризующих микробиоту плаценты, амниотической жидкости и плода, а также различия в микробиоте плаценты при различных акушерских состояниях [2–11].

Важнейшим следствием существования резидентной микробиоты плаценты представлялась вероятность того, что формирование микробиоты человека начинается еще в утробе матери, а не во время или сразу после родов, как считалось ранее. Эти представления не соответствовали хрестоматийным представлениям о стерильности матки и плода при здоровой беременности, живущимся

E.V. Shipitsyna

D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Placental Microbiome: a Paradigm Shift or Flaw in the Methodology?

Rapid development of high-throughput DNA sequencing technologies and bioinformatics methods, together with a substantial reduction of their cost, have provided tremendous opportunities for studying the human microbiome. In recent years, much attention has been paid to studies of the microbiome of the upper reproductive tract of woman and the fetoplacental system, which have traditionally been considered sterile. Obtaining irrefutable evidence of the existence of the placental microbiome would enable us to believe with a high degree of certainty that microorganisms colonize the fetus already in the womb, which would have far-reaching consequences not only for medicine, but also for basic biology. This issue triggered a heated discussion among microbiologists, molecular biologists, obstetricians, and neonatologists. In the past few years, a number of studies have been published, both refuting and confirming the dogma, accepted for many decades, that the placenta and fetus are sterile during a healthy pregnancy. This literature review is a critical analysis of the results of studies into the placental microbiome. It provides arguments both for supporters of the hypothesis of the resident microbiota of the placenta and their opponents. Particular attention is paid to the methodological requirements for molecular studies of biological material with low microbial biomass, compliance with which is crucial for obtaining reliable results.

Keywords: placental microbiome, fetal microbiome, resident microbiota, high-throughput DNA sequencing, microbial contamination

For citation: Shipitsyna EV. Placental Microbiome: a Paradigm Shift or Flaw in the Methodology? *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2021;76(5):436–448. (In Russ). doi: <https://doi.org/10.15690/vramn1489>

на выверенной десятилетиями доказательной базе. Одним из самых важных аргументов в пользу стерильности беременной матки и ее содержимого является незрелость иммунной системы развивающегося плода для создания симбионтных отношений с микроорганизмами, преодолевающими плацентарный барьер: способность к трансплацентарной передаче плоду хорошо документирована для целого ряда микроорганизмов и вирусов, однако речь в таких случаях идет об инфекции, часто с тяжелыми последствиями. Другой важный аргумент — богатый и длительный опыт выведения гнотобионтных (безмикробных) животных: успешное выращивание гнотобионтных новорожденных особей в стерильных условиях после стерильно проведенного кесарева сечения описано для целого ряда млекопитающих, включая человека.

Вскоре после этих публикаций последовали работы, ставящие под сомнение существование резидентной микробиоты плаценты и предлагающие альтернативное объяснение выявлению разнообразия бактерий в образцах плаценты и ее содержимого — микробной контаминации [12–18]. Это объяснение основывается на способности современных методов анализа ДНК обнаруживать экстремально низкие уровни бактерий, что делает разделение сигналов в образцах с низкой бактериальной биомассой, к числу которых относятся образцы плаценты и амниотической жидкости, от сигналов в образцах из окружающей среды чрезвычайно трудной задачей. И если контаминация плаценты бактериями родовых путей может быть решена исследованием только образцов, полученных при кесаревом сечении, то повсеместное присутствие бактерий в лаборатории, в том числе в наборах для выделения ДНК, является гораздо более серьезной методологической проблемой.

В данном обзоре литературы проведен анализ результатов исследований на тему микробиома плаценты и приведены аргументы сторонников гипотезы резидентной микробиоты плаценты и их оппонентов. Также очерчены методологические требования к исследованиям биологического материала с низкой микробной биомассой, позволяющие нивелировать влияние микробной контаминации на результаты исследований.

Парадигма стерильности матки при здоровой беременности

Матка и плод при здоровой беременности стерильны — такова исторически сложившаяся точка зрения. Защита плода от микробных патогенов является одной из основных функций плаценты. Для реализации защитной функции плацента имеет целый ряд анатомических, физиологических и иммунологических особенностей, препятствующих бактериальной колонизации [19, 20].

Несмотря на многоуровневую защиту, обеспечиваемую этими барьерами, многие микроорганизмы и вирусы обладают свойствами, позволяющими их преодолевать. К бактериальным агентам, способность которых к трансплацентарной передаче доказана, относятся *Treponema pallidum* (возбудитель сифилиса), *Listeria monocytogenes* (возбудитель листериоза), *Brucella* spp. (возбудитель бруцеллеза), к протозойным — *Toxoplasma gondii* (возбудитель токсоплазмоза), *Plasmodium* spp. (возбудитель малярии). Некоторые вирусы (энтеровирусы, вирус Зика, вирус краснухи, парвовирус В19) также способны вызывать трансплацентарную инфекцию [20]. Так, *L. monocytogenes* использует такие факторы вирулентности, как интерна-

лины (InlA и InlB), листериолизин О (гемолизин) и белок ActA, индуцирующий сборку актина, для преодоления кишечных, плацентарных и гематоэнцефалических барьеров [21]. Необходимость в этих факторах для успешного проникновения в клетки млекопитающих была продемонстрирована путем введения кодирующих эти факторы генов в комменсальные бактерии с использованием плазмидных векторов [22]. Необходимо подчеркнуть, однако, что речь в таких случаях всегда идет об инфекции, часто с тяжелыми последствиями для плода и новорожденного ребенка [20, 23].

Сторонники теории внутриутробной колонизации плода могут возразить, что эпителиальные покровы других органов, содержащих резидентную микробиоту, также обладают рядом анатомических, физиологических и иммунологических особенностей для предотвращения микробной инвазии и борьбы с ней. Однако, говоря о микробиоте, связанной с плодом человека, следует учитывать, что некоторые важные компоненты иммунной системы, необходимые для обеспечения «бесконфликтной» пренатальной взаимосвязи с микробиотой, еще не созданы или еще не созрели у плода. Существенные отличия иммунной системы новорожденных детей от иммунной системы взрослых включают сниженную активность системы комплемента, сниженную способность продуцировать антитела против бактериальных полисахаридных антигенов и повышенное количество наивных Т-клеток и антиген-презентирующих клеток с соответственно наивной функциональной программой [24, 25]. Кроме ограниченного ряда антимикробных пептидов, которые экспрессируются в отдельных отделах плода [26], у плода нет иммунитета, необходимого для успешного преодоления бактериальной инвазии. Кроме того, исследования, описывающие ограниченные иммунные функции очень недоношенных новорожденных, показывают, что сложная иммунная система, необходимая для развития иммунологической толерантности к микробиоте, у плода еще не развита [25, 27]. Наконец тот факт, что кишечная проницаемость у недоношенных детей в течение первых двух дней жизни выше по сравнению со здоровыми доношенными детьми [28], позволяет предположить, что внутриутробный кишечник был бы проницаем для бактерий и способствовал бы конфликтам со слаборазвитой иммунной системой. Таким образом, даже если допустить, что плод колонизируется физиологической микробиотой уже в утробе матери, не ясно, как незрелая иммунная система плода способна ее контролировать.

Ранний эмбрион человека стерилен, в то время как младенец уже вскоре после родов имеет микробиоту, сопоставимую по сложности с микробиотой взрослого человека. Когда и как устанавливается симбиоз между человеком и его микробиотой, является предметом активных исследований. Меконий (первый стул) ребенка уже содержит микроорганизмы, но на сегодняшний день не ясно, является ли это результатом микробной колонизации во время [29] или после [30] родов либо колонизация плода происходит еще в утробе матери. Если колонизация происходит в утробе матери, тогда это имело бы большое значение для формирования ранней иммунной системы человека [31].

Обнаружение микроорганизмов в меконии часто предлагается в качестве доказательства в поддержку гипотезы внутриутробной колонизации. Однако обнаружение бактерий в меконии может быть результатом послеродовой колонизации, особенно если меконий собирается спустя некоторое время после родов. В исследовании

R. Hansen et al. (2015) только две трети образцов мекония содержали бактерии, при этом их количество было очень низким [32]. Авторы предположили, что существует «интервал колонизации мекония» — между излитием околоплодных вод и началом анализа мекония, который обеспечивает достаточную возможность размножения микробов, и микробная колонизация кишечника новорожденного происходит очень медленно во время родов и существенно ускоряется после родов. Это исследование подтвердило результаты множества ранних работ (обзор которых представлен недавно М. Perez-Muñoz et al. (2017) [19]) и подчеркнуло, насколько важно дифференцировать «интервал колонизации мекония» при анализе микробиоты кишечника новорожденного.

В пользу парадигмы стерильной матки может также говорить состав первичной микробиоты новорожденного ребенка. Если плод в утробе матери стерилен, первоначальная колонизация микроорганизмами должна зависеть от микробной среды, окружающей ребенка во время родов, и, таким образом, от способа родоразрешения. Напротив, если первичная микробиота приобретает внутриутробно, то профиль первичной микробиоты кишечника новорожденного не должен зависеть от способа родоразрешения. Результаты большинства исследований свидетельствуют, что первичная кишечная микробиота зависит от способа родоразрешения: при вагинальных родах обнаруживаются бактерии влагалища и/или кишечника матери, при кесаревом сечении — бактерии кожи (рис. 1), а с течением времени начинают преобладать типичные для кишечника бактериальные виды [33–38].

По мнению ряда авторов, наиболее убедительные доказательства против существования резидентной микробиоты в среде, окружающей плод, основаны на успешном опыте получения гнотобионтных животных с помощью кесарева сечения и выращивания их в стерильной среде [19]. Впервые выведение гнотобионтных животных было описано еще в конце XIX в., но только в 1940-х годах исследователи получили стабильно работающую методику выведения гнотобионтных грызунов, которая заключалась в проведении стерильного кесарева сечения и ручном кормлении стерилизованной искусственной пищей в асептическом изоляторе до достижения зрелости. С тех пор было успешно выведено множество разнообразных животных, как мелких, так и крупных [19]. Гнотобионтное потомство может быть получено из обычных животных путем переноса эмбрионов и асептической гистерэктомии (мелкие животные) или асептической гистеротомии (крупные животные). Полагают, таким образом, что сама возможность успешного проведения этих процедур доказывает стерильность среды, окружающей плод, так как даже при низком содержании микроорганизмов колонизировали бы потомство и быстро размножились бы до детектируемого уровня.

Сторонники гипотезы внутриутробной передачи микроорганизмов утверждают, что бактерии, присутствующие в окружающей среде плода, потенциально могут или не колонизировать плод, или оставаться на недетектируемом уровне после рождения. Однако такая ситуация маловероятна. Почти любой микроорганизм быстро и необратимо колонизирует гнотобионтных животных, так

438

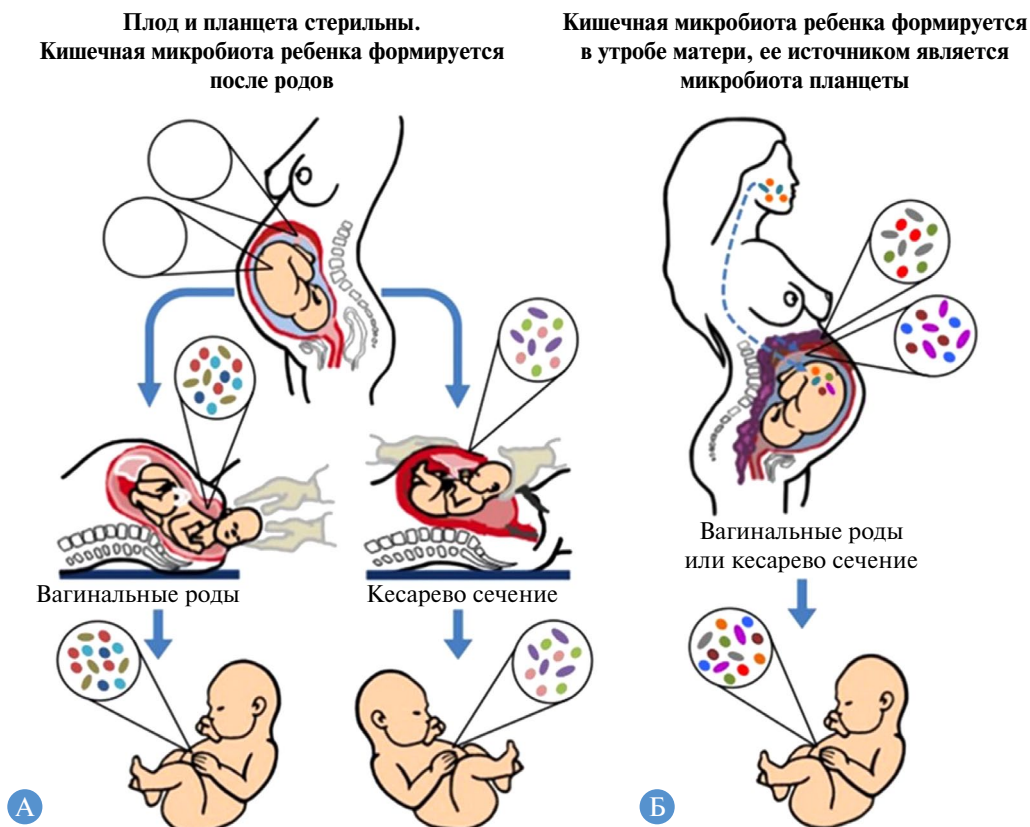


Рис. 1. Схематическое представление двух противоположных концепций формирования первичной микробиоты человека: А — плацента и плод стерильны при здоровой беременности, и кишечная микробиота ребенка формируется во время и после родов, при этом в случае вагинальных родов микробиота новорожденного имеет сходство с микробиотой влагалища матери, в случае кесарева сечения — с микробиотой ее кожи; Б — микробиота плода формируется еще в утробе матери, и ее источником служит микробиота плаценты, которая, в свою очередь, происходит из бактерий кишечника или ротовой полости матери. Адаптировано из: М. Perez-Muñoz et al. [19].

как ему нет конкуренции. Еще одним аргументом является то, что из-за ряда физиологических и анатомических различий нельзя проводить аналогию между животными и людьми. Однако описаны случаи (хоть и немногочисленные) создания и поддержания безмикробного статуса у людей с использованием протоколов, аналогичных тем, которые применяются для генерации крупных млекопитающих с помощью асептической гистеротомии. Впервые такой опыт был описан более 50 лет назад [39], в дальнейшем эта процедура применялась при подозрении на тяжелый иммунодефицит плода [40]. Стерильность новорожденных подтверждалась бактериологическими исследованиями биологических образцов (мекония, кожи), а также образцов с внутренних поверхностей изолятора. В опубликованных случаях сообщалось о продолжительности безмикробного статуса от 6 дней до 3 мес, после которого либо субъекты удалялись из стерильных изоляторов, либо происходила их колонизация микроорганизмами [39–41]. Хотя гнодобийные люди крайне редки по очевидным причинам, сама возможность их существования говорит в пользу парадигмы стерильности беременной матки.

Гипотеза физиологической микробной колонизации плаценты и плода

Первое предположение о существовании резидентной микробиоты плаценты было сделано К. Aagaard et al. в 2014 г. [1]. С применением высокопроизводительного секвенирования ДНК были охарактеризованы образцы плаценты у более чем 300 женщин, включая женщин со здоровой беременностью, преждевременными родами и случаями антенатальной инфекции в анамнезе. Авторы выделили до 0,002 мг бактериальной ДНК на 1 г плацентарной ткани и обнаружили очень низкий по биомассе, но «метаболически содержательный» микробиом, включающий виды *Fusobacterium*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria polysaccharea*, *Rhodococcus erythropolis*, *Propionibacterium acne*, *Streptomyces overmitilis*, *Bacteroides* spp., *Prevotella tannerae*, *Escherichia coli* (последний вид встречался чаще всего). Выявленные бактериальные таксоны и их генные профили сравнили с микробиомами полости рта, кожи, дыхательных путей (носа), влагалища и кишечника у небеременных контролей. В совокупности профили плацентарного микробиома были наиболее схожи с микробиомом полости рта. Эти данные побудили авторов предположить, что бактерии распространяются гематогенным путем из ротовой полости матери в плаценту и колонизируют плод внутриутробно. Далее авторы обнаружили ассоциацию микробиома плаценты с отдаленным анамнезом антенатальной инфекции (такой как инфекция мочевыводящих путей в первом триместре), а также с преждевременными родами [1].

Эта работа послужила импульсом для череды работ, основным исследовательским вопросом которых было существование физиологической микробиоты плаценты. Краткое обобщение этих работ приведено в табл. 1. В большинстве первых работ ответ на вопрос «Существует ли микробиота плаценты?» был положительным [2–8, 10, 11, 42]. Помимо того, авторы исследовали различия в профилях плацентарного микробиома при различных перинатальных состояниях. Так, R. Doyle et al. (2014) обнаружили бактериальную ДНК в большинстве исследованных образцов плаценты независимо от способа родоразрешения, при этом в случаях недоношенной беременности наблюдали более высокую частоту выявления

бактерий и их более широкий спектр, чем в случаях доношенной беременности [2]. K. Antony et al. (2015) показали, что среди женщин, перенесших преждевременные роды, избыточное увеличение массы тела во время беременности связано с измененным микробиомом плаценты и его метаболическим профилем [3]. Различные профили плацентарного микробиома были ассоциированы с низкой массой тела [4], а также с макросомией [11] новорожденного ребенка по сравнению с нормальной массой тела ребенка. J. Bassols et al. (2016) обнаружили различия в микробных профилях плацентарной микробиоты у женщин с гестационным сахарным диабетом и без него [5].

M. Collado et al. (2016) исследовали образцы плаценты, амниотической жидкости, молозива, мекония у новорожденных и кала у женщин у 15 пар мать–ребенок и выявили сходство микробных профилей мекония с микробными профилями плаценты, амниотической жидкости и молозива [6]. Результаты позволили авторам предположить, что кишечные микробы матери могут избирательно транспортироваться в молочную железу, плаценту и амниотическую жидкость, способствуя тем самым первоначальной внутриутробной колонизации кишечника плода.

Результаты исследования A. Prince et al. (2016) показали различия в микробных профилях плаценты при срочных и преждевременных родах, а также их варьирование в зависимости от наличия и тяжести хориоамнионита [7]. Связь определенных профилей плацентарной микробиоты с тяжелым хориоамнионитом, а также с более низкими длиной и массой тела новорожденного показана в работе R. Doyle et al. (2017) [8]. Помимо этого, результаты работы выявили большее сходство микробиоты плаценты с микробиотой влагалища, чем с микробиотой полости рта [8]. L. Gomez-Arango et al. (2017) в попытке выяснить происхождение микробиоты плаценты у беременных женщин с ожирением установили, что микробные профили плаценты имеют большее сходство с микробиотой полости рта, чем с микробиотой кишечника, хотя и обладают специфическими чертами [9]. L. Parnell et al. (2017) исследовали вопрос о вариациях в микробных профилях различных локусов плаценты и выявили различия в профилях амниона-хориона и базальной пластинки; относительно ворсин плаценты авторы предположили, что они не содержат резидентной микробиоты [10].

Таким образом, вышеприведенные исследования поставили под сомнение парадигму стерильной матки, предоставив свидетельства наличия бактерий в здоровой беременной матке. Странники концепции так называемого перинатального микробиома часто приводят результаты более ранних работ, проводившихся с использованием культурального метода. Так, небольшое количество *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus epidermidis* и *Propionibacterium acnes* выделялись из образцов пуповинной крови, полученной при плановом кесаревом сечении у здоровых новорожденных детей [43]. Эти данные были подтверждены в ходе эксперимента с мышами: беременным мышам орально вводили генетически меченые изоляты *E. faecium* от человека и впоследствии обнаруживали эти бактерии в амниотической жидкости [43]. Позднее эти же авторы проанализировали образцы мекония у здоровых новорожденных детей, рожденных либо вагинально, либо путем кесарева сечения, и выделили *E. coli* и бактерии родов *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Rothia*, *Bacteroides*, *Klebsiella*, *Enterobacter* [44]. И снова оральное введение беременным мышам меченых *E. faecium* приводило к выявлению их

Таблица 1. Работы, посвященные изучению микробиома плаценты человека

Автор, год	Основные исследовательские вопросы	Обследуемые группы	Тип(ы) клинического материала (время процессинга образцов). Метод(ы) исследования	Контроль контаминации	Выводы
K. Aagaard et al., 2014 [1]	Существует ли микробиота плаценты? Есть ли различия в профилях плацентарного микробиома при антенатальной инфекции и ПР?	КС роды в срок ($n = 53$); вагинальные роды в срок ($n = 178$); КС ПР ($n = 20$); вагинальные ПР ($n = 69$)	Образцы ворсин плаценты (< 1 ч после родов). Секвенирование гена 16S рРНК. Метагеномное секвенирование (у части женщин)	Секвенировали ограниченное число отрицательных контролей, которые генерировали сигналы	Микробиота плаценты выявляется как при доношенной, так и при недоношенной беременности независимо от способа родоразрешения. Микробиота плаценты имеет сходство с микробиотой полости рта. Есть различия в профилях плацентарного микробиома между женщинами с доношенной и недоношенной беременностью, а также с историей антенатальной инфекции и без нее
R. Doyle et al., 2014 [2]	Различаются ли профили плацентарного микробиома у женщин с ПР и родами в срок?	КС роды в срок ($n = 4$); вагинальные роды в срок ($n = 14$); вагинальные ПР ($n = 14$)	Образцы амниона и хориона (время не указано). Секвенирование гена 16S рРНК	Нет	Микробиота плаценты обнаруживается независимо от способа родоразрешения. Микробные профили плацентарных тканей различны у женщин с КС и вагинальными родами, а также между ПР и родами в срок
K. Antony et al., 2015 [3]	Различаются ли профили плацентарного микробиома у женщин с ПР и родами в срок? Различаются ли профили микробиома у женщин с избыточным увеличением массы тела при беременности?	КС ($n = 54$); вагинальные роды ($n = 183$); ПР у 62 из этих 237 пациенток	Образцы ворсин плаценты (сразу после родов). Секвенирование гена 16S рРНК. Метагеномное секвенирование (у 37 женщин)	Секвенировали ограниченное число отрицательных контролей, которые генерировали сигналы	Микробиота плаценты обнаруживается как при доношенной, так и при недоношенной беременности. Среди женщин с ПР выявлены различия в микробиоте плаценты у женщин с избыточным увеличением массы тела при беременности
J. Zheng et al., 2015 [4]	Существует ли ассоциация между микробиотой плаценты при доношенной беременности и массой тела ребенка?	Вагинальные роды в срок, нормальная масса тела ребенка ($n = 12$) и низкая масса тела ребенка ($n = 12$)	Образцы ворсин плаценты (сразу после родов). Секвенирование гена 16S рРНК	Нет	Микробиота плаценты существует. Обнаружены различия в профилях плацентарного микробиома при рождении детей с нормальной и низкой массой тела
J. Bassols et al., 2016 [5]	Существует ли ассоциация между микробиотой плаценты при доношенной беременности и гестационным сахарным диабетом?	Вагинальные роды в срок, нет гестационного сахарного диабета ($n = 11$) и есть гестационный сахарный диабет ($n = 11$)	Образцы ворсин плаценты (сразу после родов). Секвенирование гена 16S рРНК	Нет	При доношенной беременности обнаруживается микробиота плаценты. Существуют различия в микробных профилях плацентарной микробиоты у женщин с гестационным сахарным диабетом и без него

Продолжение табл. 1

Автор, год	Основные исследовательские вопросы	Обследуемые группы	Тип(ы) клинического материала (время процессинга образцов). Метод(ы) исследования	Контроль контаминации	Выводы
M. Collado et al., 2016 [6]	Существует ли микробиом плаценты и амниотической жидкости? Каковы микробные популяции плаценты, амниотической жидкости и молозива, и какую роль они играют в первичной микробиоте кишечника новорожденного ребенка?	15 пар мать—ребенок, КС роды в срок	Образцы плаценты (сразу после родов), амниотической жидкости, молозива, мекония, кала у женщин. Денатурирующий градиентный гель-электрофорез. Секвенирование гена 16S рРНК. Культуральный метод	Нет	При доношенной беременности плацента и амниотическая жидкость содержат микробные сообщества. Микробные профили мекония имеют сходство с микробными профилями плаценты, амниотической жидкости и молозива
A. Lauder et al., 2016 [12]	Существует ли микробиота плаценты при доношенной беременности?	КС роды в срок ($n = 1$); вагинальные роды в срок ($n = 5$); КС без хориоамнионита ($n = 2$)	Образцы плаценты со стороны плода и матери (сразу после родов). Количественная ПЦР в реальном времени. Секвенирование гена 16S рРНК	Пробы воздуха в лаборатории ($n = 11$); стерильные тампоны ($n = 8$); реагенты для выделения ДНК ($n = 8$); все контроли ввелись в статистический анализ	Микробные профили образцов плаценты не отличаются от микробных профилей отрицательных контролей
A. Prince et al., 2016 [7]	Ассоциирована ли микробиота плаценты с ПР и хориоамнионитом?	КС роды в срок без хориоамнионита ($n = 4$); вагинальные роды в срок без хориоамнионита ($n = 11$); КС роды в срок с хориоамнионитом ($n = 3$); вагинальные роды в срок с хориоамнионитом ($n = 9$); вагинальные ПР без хориоамнионита ($n = 11$); КС ПР с хориоамнионитом ($n = 5$); вагинальные ПР с хориоамнионитом ($n = 26$)	Образцы хориона и/или ворсин (во время родов). Метагеномное секвенирование. ПЦР для выявления уреаплазм и микоплазм. Культуральный метод для выявления уреаплазм и микоплазм	Не обозначено	Микробиота плаценты выявляется как при доношенной, так и при недоношенной беременности независимо от способа родоразрешения. Есть различия в микробиоте плаценты при срочных родах и ПР. Микробиота плаценты варьирует в зависимости от наличия и тяжести хориоамнионита
R. Doyle et al., 2017 [8]	Ассоциирована ли микробиота плаценты со сроком беременности, длиной и массой тела новорожденного ребенка и наличием хориоамнионита? Каково происхождение микробиоты плаценты (микробиота полости рта или микробиота влагалища)?	1097 женщин; доля ПР, родов путем КС и случаев хориоамнионита не обозначена	Образцы амниона и хориона (часть образцов плаценты получена сразу после родов, другая часть — спустя 1–24 ч, материал хранится при комнатной температуре). Количественная ПЦР в реальном времени. Секвенирование гена 16S рРНК	Проверялись реагенты для выделения ДНК. Если операционные таксономические единицы обнаруживали в отрицательных контролях, их удаляли из набора данных. Секвенировали только те образцы плаценты, которые содержали количество ДНК, эквивалентное 40 КОЕ/мл	При доношенной беременности обнаруживается микробиота плаценты. Микробиота плаценты имеет большее сходство с микробиотой влагалища, чем с микробиотой полости рта. Вариабельность микробиоты плаценты связана с тяжестью хориоамнионитом и более низкой массой тела новорожденного. Показано, что задержка обработки образца после получения увеличивает вероятность положительной ПЦР

Продолжение табл. 1

Автор, год	Основные исследовательские вопросы	Обследуемые группы	Тип(ы) клинического материала (время процессинга образцов). Метод(ы) исследования	Контроль контаминации	Выводы
L. Gomez-Arango et al., 2017 [9]	Каково происхождение микробиоты плаценты у беременных женщин с ожирением (микробиота полости рта или микробиота кишечника)?	КС, доношенная беременность ($n = 17$); вагинальные срочные роды ($n = 20$), из них 13 с нормальной массой тела и 24 с ожирением	Образцы плаценты со стороны плода (в течение 1 ч после родов). Секвенирование гена 16S рРНК	Проверялись реагенты для выделения ДНК и реагенты для амплификации. Если операционные таксономические единицы обнаруживали в отрицательных контролях, их удаляли из набора данных	При доношенной беременности микробиота плаценты обнаруживается независимо от способа родоразрешения. Микробиота плаценты имеет большее сходство с микробиотой полости рта, чем с микробиотой кишечника, хотя имеет и свои специфические черты
L. Parnell et al., 2017 [10]	Существует ли микробиота плаценты при доношенной беременности? Варьирует ли она между оболочками плода, ворсинками плаценты и базальной пластинкой?	КС роды в срок ($n = 34$); вагинальные роды в срок ($n = 23$)	Образцы амниона и хориона, ворсин, базальной пластины (в течение 12 ч после родов). Секвенирование гена 16S рРНК. Количественная ПЦР в реальном времени	Проверялись реагенты для выделения ДНК. Если операционные таксономические единицы обнаруживали в отрицательных контролях, их удаляли из набора данных. Секвенировали только те образцы плаценты, которые содержали количество > 34 копий гена 16S рРНК в 1 мкл	При доношенной беременности микробиота плаценты обнаруживается независимо от способа родоразрешения. Есть различия в микробных профилях амниона-хориона и базальной пластины. Вероятно, ворсины плаценты не содержат резидентной микробиоты
J. Zheng et al., 2017 [11]	Есть ли различия в микробиоте плаценты в случаях макросомии плода по сравнению с нормальной массой тела плода?	КС, доношенная беременность, есть макросомия плода ($n = 10$); КС, доношенная беременность, нет макросомии плода ($n = 10$)	Образцы ворсин (сразу после родов). Секвенирование гена 16S рРНК	Проверялись реагенты для выделения ДНК — амплификация гена 16S рРНК не давала детектируемых сигналов	При доношенной беременности микробиота плаценты обнаруживается в микробных профилях плаценты в случаях макросомии плода и нормальной массы тела плода
L. Leon et al., 2018 [13]	Различается ли микробиота плаценты при ПР и срочных родах?	КС, доношенная беременность ($n = 81$); вагинальные роды в срок ($n = 84$); КС, ПР ($n = 55$); вагинальные ПР ($n = 36$)	356 образцов паренхимы плаценты и 44 образца ворсин (сразу после родов). Секвенирование гена 16S рРНК	Проверялись реагенты для выделения ДНК в каждом раунде (анализировали реагенты из 19 наборов, которые дали ≥ 500 последовательностей). Операционные таксономические единицы с ≥ 2 чтениями в ≥ 2 контролях были удалены (исключая <i>Lactobacillus</i> , <i>Veillonella</i> и <i>Mycoplasma</i>)	Бактериальные профили образцов плаценты и контролей контаминации очень похожи. Наблюдаются микробные сигналы в образцах плаценты при срочных родах и ПР. Микробные профили плацентарных тканей зависели от способа родоразрешения. Хотя уникальной микробиоты плаценты при ПР не выявлено, некоторые бактерии (например, <i>Ureaplasma</i> и <i>Mycoplasma</i>) обнаруживались в повышенном количестве

Окончание табл. 1

Автор, год	Основные исследовательские вопросы	Обследуемые группы	Тип(ы) клинического материала (время поступления образцов). Метод(ы) исследования	Контроль контаминации	Выводы
E. Lim et al., 2018 [14]	Содержит ли амниотическая жидкость при доношенной беременности бактериальные сообщества и/или сообщества эукариотических вирусов?	Доношенная неосложненная беременность, элективное КС ($n = 24$)	Образцы амниотической жидкости (во время родов). Секвенирование гена 16S рРНК. Количественная ПЦР в реальном времени. Метатеномное секвенирование	Проверялись реагенты для выделения ДНК и реагенты для амплификации	Бактериальные сообщества, выявленные в амниотической жидкости при здоровой беременности, существенно не отличаются по концентрации и составу от сообществ, выявленных в отрицательных контрольных образцах. Вирусные последовательности очень редки, свидетельств корового вируса не обнаружено
J. Leiby et al., 2018 [15]	Существует ли микробиота плаценты и отличается ли она при ПР?	Доношенная беременность ($n = 20$); ПР ($n = 20$)	Образцы плаценты со стороны матери и плода (сразу после родов). Количественная ПЦР в реальном времени. Секвенирование гена 16S рРНК. Метатеномное секвенирование	Реагенты для выделения ДНК (два разных набора); пробы воздуха; пробы воды	Бактериальные сообщества, выявленные в плаценте как при срочных родах, так и при ПР, существенно не отличаются по концентрации и составу от сообществ, выявленных в отрицательных контрольных образцах
K. Theis et al., 2019 [16]	Содержит ли плацента резидентную микробиоту при доношенной беременности (до наступления родовой деятельности)?	КС, доношенная беременность, до наступления родовой деятельности ($n = 29$)	Образцы амниона и хориона до базальной пластины (сразу после родов). Культуральный метод. Количественная ПЦР в реальном времени. Секвенирование гена 16S рРНК. Метатеномное секвенирование	Пробы воздуха в лаборатории; пробы с поверхности рабочего бокса; реагенты для выделения ДНК; все контроли включены в статистический анализ	Анализ образцов плаценты при родоразрешении путем КС (до наступления родовой деятельности) с применением нескольких методов не выявил резидентную микробиоту
A. Kiretman et al., 2019 [17]	Существует ли микробиота плаценты?	28 женщин, родоразрешенных путем КС, из них 22 женщины с нормальной беременностью, 6 женщин с преэклампсией	Образцы плаценты из нескольких локусов. Культуральный метод, микроскопическое исследование после окраски по Граму. Иммуногистохимический метод. Сканирующая электронная микроскопия. Количественная ПЦР в реальном времени	Реагенты для выделения ДНК	Плод развивается в стерильной среде. Если микробиом плаценты существует, он представлен очень низкой биомассой, поэтому его клиническая значимость минимальна или отсутствует
M. de Goffau et al., 2019 [18]	Существует ли микробиота плаценты и ассоциирована ли она с преэклампсией, ПР и низкой массой тела плода?	537 женщин, из них 318 женщин с неблагоприятными исходами беременности и 219 здоровых женщин	Образцы терминальных ворсин плаценты (в течение 3 ч после родов). Культуральный метод. Количественная ПЦР в реальном времени. Секвенирование гена 16S рРНК. Метатеномное секвенирование	Реагенты для выделения ДНК	В подавляющем большинстве случаев плацента до наступления родовой деятельности не содержит бактерий ни при неосложненной, ни при осложненной беременности (единственное исключение составляют стрептококки группы В, ДНК которых обнаруживается примерно в 5% случаев)

Примечание. КС — кесарево сечение; ПР — преждевременные роды.

в образцах мекония. Эти эксперименты позволили авторам предположить внутриутробный путь формирования микробиоты плода.

Сторонники теории физиологической микробной колонизации плаценты и плода предлагают несколько путей проникновения бактерий в плаценту, включая восхождение из нижних отделов репродуктивного тракта, проникновение через кровоток матери или активный перенос микроорганизмов иммунными клетками из кишечника или полости рта (см. рис. 1). В целом эти исследования свидетельствуют в пользу предположения, что фето-плацентарная среда развивалась, чтобы способствовать созданию разнообразной микробиоты, которая в дальнейшем играет роль в приобретении и формировании кишечной микробиоты новорожденного посредством внутриутробной передачи микроорганизмов [45].

Контаминация как причина обнаружения ДНК бактерий в плаценте и у плода: методологические аспекты изучения биологического материала с низкой микробной биомассой

444

Вскоре после первых публикаций, обосновывающих существование резидентной микробиоты плаценты, последовали работы, объясняющие выявление бактерий в образцах плаценты контаминацией [12–18]. Хорошо известно, что численность микроорганизмов в участках тела человека, достоверно обладающих резидентной микробиотой, таких как кишечник, ротовая полость или влагалище, огромна. В то же время результаты исследований микробиоты плаценты и амниотической жидкости, в которых оценивались ее количественные параметры, указывают на низкое содержание бактерий в данных сайтах [8, 10, 12, 14, 16, 17]. Сравнения бактериальной массы в образцах плаценты с бактериальной массой в образцах из ротовой полости, влагалища и отрицательных контрольных образцов [12] выявили различия в несколько порядков между плацентой, с одной стороны, и ротовой полостью и влагалищем, с другой, и отсутствие различий между плацентой и отрицательными контролями (рис. 2).

Очевидно, что основным источником контаминации при вагинальных родах является микробиота родовых путей. Данная методологическая проблема может быть решена исследованием только образцов, полученных при кесаревом сечении, до установления родовой деятельности. Гораздо более трудноразрешимой проблемой при исследовании биологического материала с применением современных высокочувствительных технологий секвенирования ДНК является повсеместное присутствие микроорганизмов (в малых количествах) в лаборатории, в том числе китах для выделения ДНК, в связи с чем обнаружение бактерий в реагентах даже получило неформальное название «китом» [46, 47].

В нескольких работах сравнительный анализ последовательностей бактериальной ДНК, полученной из образцов плаценты и образцов окружающей среды, показал отсутствие значимых различий [12, 13, 15–18]. На рис. 3 представлены результаты анализа методом секвенирования гена 16S рРНК образцов плаценты, образцов слюны и ряда отрицательных контролей: контролей экстракции и контролей секвенирования (образцов, не содержащих клинического материала, которые анализируются так же, как клинические образцы, начиная со стадии экстракции и секвенирования ДНК соответственно), а также образцов воздуха в операционной. При этом для экстракции ДНК использовали два разных набора реагентов — MO BIO и PSP. Хорошо видно, что образцы плаценты имели бактериальные сообщества, не отличающиеся от бактериальных сообществ отрицательных контрольных образцов, при этом бактериальные сообщества плаценты и отрицательных контролей были специфичны для каждого набора: в наборе MO BIO доминировали представители *Clostridiales*, а в наборе PSP — представители *Sediminibacterium* и *Bradyrhizobiaceae*. В то же время образец слюны, обладающей высокой микробной биомассой, имел микробный состав, присущий ротовой полости и не зависящий от используемого набора для экстракции ДНК.

Наиболее убедительные доказательства того, что бактерии, выявляемые в плаценте, являются результатом контаминации, были получены в недавнем исследовании M. de Goffau et al. (2019), опубликованном в журнале Nature [18]. Были проанализированы образцы плаценты (в большинстве случаев полученные при кесаревом сече-

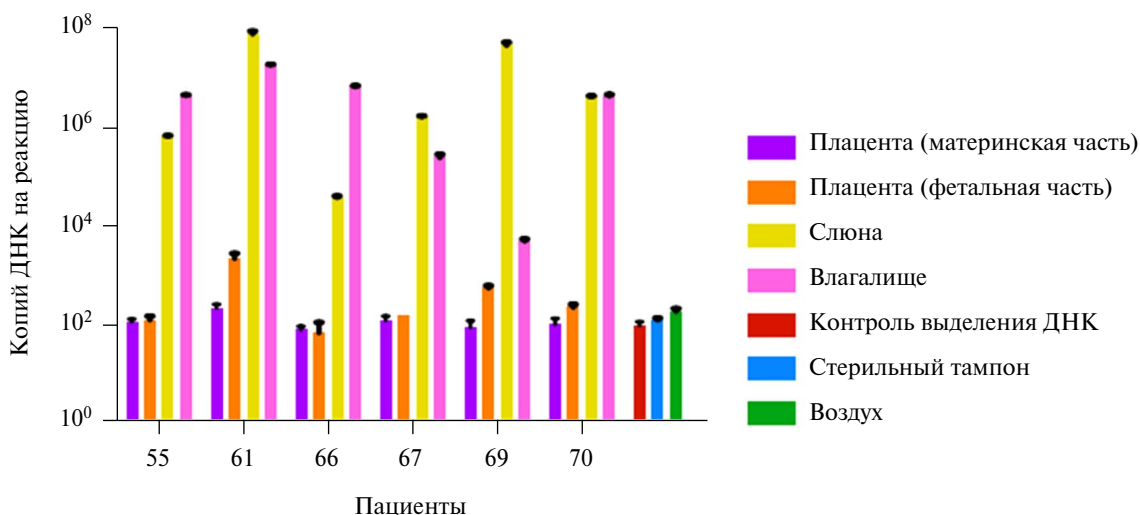


Рис. 2. Число копий гена 16S рРНК, определенное методом количественной ПЦР при анализе образцов плаценты, слюны, влагалища (полученных у 6 женщин) и отрицательных контролей.

Адаптировано из: A. Lauder et al. [12]

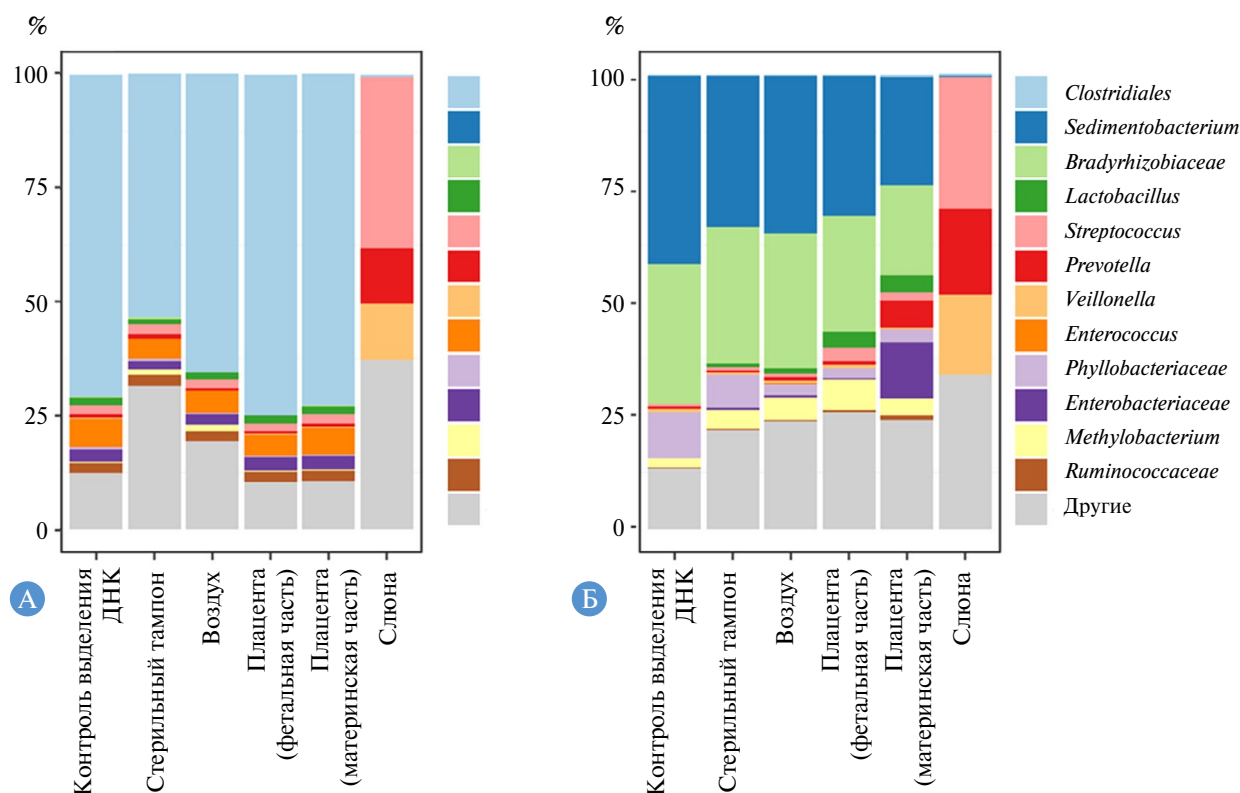


Рис. 3. Бактериальный состав образцов плаценты, слюны и отрицательных контролей, % от общего содержания бактерий. ДНК выделена с применением набора реагентов MO BIO (А), PSP (Б). Микробный состав образцов плаценты напоминает состав отрицательных контрольных образцов, тогда как в слюне выявляется микробиота, состав которой не зависит от набора для экстракции ДНК. Адаптировано из: D. Kim et al. [47].

нии до установления родовой деятельности) от 537 женщин с использованием культурального метода, количественной ПЦР в реальном времени и секвенирования, при этом секвенирование выполнялось с применением двух методов, а именно метода «дробовика» [48] и метода секвенирования гена 16S рРНК [49], чтобы принять в расчет потенциальное специфическое влияние каждого метода. Далее авторы использовали одни и те же процедуры для анализа биологического материала и всех отрицательных контролей. Результаты работы позволили сделать однозначное заключение: плацента во время здоровой беременности стерильна, и выявление бактерий убедительно объясняется контаминацией. Методологические детали, представленные в статье, показали, насколько вездесущими могут быть контаминирующие бактерии. Так, с помощью секвенирования в образцах плаценты были обнаружены два вида патогенных бактерий: *Vibrio cholerae* и *Streptococcus pneumoniae*. Сопоставление последовательностей этих бактерий, обнаруженных в плаценте, показало их идентичность последовательностям бактерий, которые ранее были выявлены в других клинических образцах и секвенированы на том же аппарате. Таким образом, обнаружение этих бактерий, скорее всего, являлось результатом загрязнения секвенатора [18]. Далее авторы подтвердили выводы предыдущих исследований, что в коммерческих наборах для экстракции ДНК присутствует относительно разнообразная микробиота, и, более того, идентифицировали сообщества бактерий, специфические для определенных китов.

Работа M. de Goffau et al. [18] определила пять различных моделей контаминации при исследовании образцов плаценты — контаминация:

- плаценты бактериями родовых путей в процессе родоразрешения;
- образцов биопсии во время их отмывания фосфатно-солевым буфером;
- ДНК в процессе ее экстракции;
- реагентов, используемых для амплификации ДНК перед секвенированием;
- реагентов или оборудования, используемых для секвенирования.

Интересно отметить, что единственным микроорганизмом в исследовании M. de Goffau et al. [18], продуцирующим «биологические», а не «контаминирующие» сигналы в плаценте, был *Streptococcus agalactiae*, который выявляли до установления родовой деятельности примерно у 5% женщин. *S. agalactiae* (или стрептококк группы В) — это перинатальный патоген, ассоциированный с тяжелыми (хотя и редкими) неонатальными инфекциями. Основным способом его передачи от матери ребенку считается интранатальный путь, тогда как трансплацентарная передача рассматривается как редкий способ. M. de Goffau et al. [18] не обнаружили связи между присутствием в плаценте *S. agalactiae* и преэклампсией, преждевременными родами и низкой массой тела плода. Тем не менее обнаружение *S. agalactiae* в плаценте каждой 20-й женщины может иметь важное значение для стратегий профилактики неонатальных стрептококковых инфекций, и этот вопрос заслуживает дальнейшего изучения.

Исследование M. de Goffau et al. [18] ясно продемонстрировало, что реальные биологические сигналы могут быть дифференцированы от контаминирующих сигналов, если:

- сигналы стабильно детектируются в биологических образцах с использованием разных методов экстракции и детекции ДНК;
- результаты не варьируют в зависимости от серии реагентов для анализа образцов;
- сигналы превышают минимальный порог детекции;
- сигналы полностью отсутствуют в отрицательных контролях или значительно менее выражены, чем в биологических образцах;
- выявленная ДНК принадлежит микроорганизму, присутствие которого в данном биологическом материале имеет биологический смысл (например, выявлен известный патоген).

Молекулярный анализ образцов органов и тканей, предположительно обладающих микробиотой с низкой биомассой, требует строгих методологических подходов к идентификации экзогенной ДНК и эффективной ее дифференциации от эндогенной ДНК, т.е. происходящей из изучаемого материала. Низкую микробную биомассу определяют как 10 копий гена 16S рРНК (эквивалентно 5–10 колониеобразующим единицам) в 1 мкл образца, тогда как высокую микробную биомассу — как 10⁵ копий и выше [50]. Включение адекватных технических контролей для выявления потенциальных источников контаминации ДНК при исследовании биологического материала с низкой микробной биомассой, таких как плацента, является абсолютно необходимым условием получения надежных результатов. В настоящее время предлагается ряд статистических и биоинформатических методов идентификации и отделения контаминирующих последовательностей ДНК [51]. Следует отметить, однако, что при высоком (> 50%) уровне контаминации все методы теряют способность надежно идентифицировать контаминирующие сиквенсы [52].

Работа M. de Goffau et al. [18] также внесла больше ясности в вопрос о возможных путях бактериальной колонизации плода. Содержание вагинальных бактерий в плаценте было ниже в пробах, полученных в ходе elective, чем экстренного, кесарева сечения, что свидетельствует о восходящем или гематогенном распространении бактерий. Механические манипуляции в области гениталий во время вагинальных родов или операции кесарева сечения могут приводить к транзитной бактериемии и гематогенному распространению бактерий [53]. Аналогично гематогенное распространение бактерий как результат транзитной бактериемии может объяснять присутствие небольшого количества бактерий ротовой полости в плаценте или у плода. Такой способ распространения может приводить к колонизации плода непосредственно перед родами [53].

Заключение

Технологии высокопроизводительного секвенирования ДНК и развивающиеся параллельно с ними технологии биоинформатики без преувеличения открыли огромные возможности изучения микробиоты человека в различных участках его тела и при различных состояниях. Трудно представить себе другие методы, которые бы с такой полнотой раскрывали композицию микробного сообщества и долю каждого вида/группы микроорганизмов (в подавляющем большинстве бактерий) в этом сообществе. Необходимо помнить, однако, что с применением этих технологий мы выявляем бактериальную ДНК, а выявление ДНК само по себе не может считаться доказательством существования микробиома. Микробиом — это совокупность геномов микроорганизмов, и это понятие неотделимо от понятия микробиоты. Даже если бы удалось (или удастся в будущем) воспроизводимо продемонстрировать присутствие в плаценте биологических, а не контаминирующих последовательностей ДНК, далее потребовалась бы (или потребуется в будущем) демонстрация пролиферирующей способности и метаболической активности бактерий плаценты, потому что только так можно доказать существование жизнеспособного, функционирующего бактериального сообщества, которое имеет право называться микробиотой. Таким образом, вопрос о том, когда и как устанавливается симбиоз человека с его микробиотой, остается открытым, интригующим, фундаментальным, но на сегодняшний день доказательства того, что плацента является микробным резервуаром и источником первичной микробиоты человека, значительно проигрывают доказательствам обратного.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-115-50418.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Участие авторов. Вся поисково-аналитическая работа и написание статьи были выполнены лично автором.

Выражение признательности. Рисунки, представленные в данном обзоре, заимствованы из статей, опубликованных издательством BioMed Central и распространяемых в соответствии с лицензией Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), разрешающей неограниченное использование, распространение и воспроизведение опубликованного материала, с указанием авторства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aagaard K, Ma J, Antony KM, et al. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med.* 2014;6(237):237ra65. doi: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
2. Doyle RM, Alber DG, Jones HE, et al. Term and preterm labour are associated with distinct microbial community structures in placental membranes which are independent of mode of delivery. *Placenta.* 2014;35(12):1099–1101. doi: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.10.007>
3. Antony KM, Ma J, Mitchell KB, et al. The preterm placental microbiome varies in association with excess maternal gestational weight gain. *Am J Obstet Gynecol.* 2015;212(5):653.e1–16. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.12.041>
4. Zheng J, Xiao X, Zhang Q, et al. The Placental Microbiome Varies in Association with Low Birth Weight in Full-Term Neonates. *Nutrients.* 2015;7(8):6924–6937. doi: <https://doi.org/10.3390/nu7085315>
5. Bassols J, Serino M, Carreras-Badosa G, et al. Gestational diabetes is associated with changes in placental microbiota and microbiome. *Pediatr Res.* 2016;80(6):777–784. doi: <https://doi.org/10.1038/pr.2016.155>
6. Collado MC, Rautava S, Aakko J, et al. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Rep.* 2016;6:23129. doi: <https://doi.org/10.1038/srep23129>
7. Prince AL, Ma J, Kannan PS, et al. The placental membrane microbiome is altered among subjects with spontaneous preterm birth with

- and without chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;214(5):627.e1–627.e16. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.01.193>
8. Doyle RM, Harris K, Kamiza S, et al. Bacterial communities found in placental tissues are associated with severe chorioamnionitis and adverse birth outcomes. Terry J, ed. *PLoS One.* 2017;12(7):e0180167. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180167>
 9. Gomez-Arango LF, Barrett HL, McIntyre HD, et al. Contributions of the maternal oral and gut microbiome to placental microbial colonization in overweight and obese pregnant women. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–10. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03066-4>
 10. Parnell LA, Briggs CM, Cao B, et al. Microbial communities in placentas from term normal pregnancy exhibit spatially variable profiles. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–11. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11514-4>
 11. Zheng J, Xiao X-H, Zhang Q, et al. Correlation of placental microbiota with fetal macrosomia and clinical characteristics in mothers and newborns. *Oncotarget.* 2017;8(47):82314–82325. doi: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19319>
 12. Lauder AP, Roche AM, Sherrill-Mix S, et al. Comparison of placenta samples with contamination controls does not provide evidence for a distinct placenta microbiota. *Microbiome.* 2016;4(1):29. doi: <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0172-3>
 13. Leon LJ, Doyle R, Diez-Benavente E, et al. Enrichment of clinically relevant organisms in spontaneous preterm-delivered placentas and reagent contamination across all clinical groups in a large pregnancy cohort in the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(14). doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.00483-18>
 14. Lim ES, Rodriguez C, Holtz LR. Amniotic fluid from healthy term pregnancies does not harbor a detectable microbial community. *Microbiome.* 2018;6(1):87. doi: <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0475-7>
 15. Leiby JS, McCormick K, Sherrill-Mix S, et al. Lack of detection of a human placenta microbiome in samples from preterm and term deliveries. *Microbiome.* 2018;6(1):196. doi: <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0575-4>
 16. Theis KR, Romero R, Winters AD, et al. Does the human placenta delivered at term have a microbiota? Results of cultivation, quantitative real-time PCR, 16S rRNA gene sequencing, and metagenomics. *Am J Obstet Gynecol.* 2019;220(3):267.e1–267.e39. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2018.10.018>
 17. Kuperman AA, Zimmerman A, Hamadia S, et al. Deep microbial analysis of multiple placentas shows no evidence for a placental microbiome. *BJOG.* 2019;127(2):159–169. doi: <https://doi.org/10.1111/1471-0528.15896>
 18. de Goffau MC, Lager S, Sovio U, et al. Human placenta has no microbiome but can contain potential pathogens. *Nature.* 2019;572(7769):329–334. doi: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1451-5>
 19. Perez-Muñoz ME, Arrieta M-C, Ramer-Tait AE, Walter J. A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome.* 2017;5(1):48. doi: <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0268-4>
 20. Heerema-McKenney A. Defense and infection of the human placenta. *APMIS.* 2018;126(7):570–588. doi: <https://doi.org/10.1111/apm.12847>
 21. Lecuit M. Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(6):430–436. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01146.x>
 22. Yagnik B, Padh H, Desai P. Construction of a new shuttle vector for DNA delivery into mammalian cells using non-invasive *Lactococcus lactis*. *Microbes Infect.* 2016;18(4):237–244. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.11.006>
 23. Giakoumelou S, Wheelhouse N, Cuschieri K, et al. The role of infection in miscarriage. *Hum Reprod Update.* 2016;22(1):116–133. doi: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv041>
 24. Tsafaras GP, Ntontsi P, Xanthou G. Advantages and Limitations of the Neonatal Immune System. *Front Pediatr.* 2020;8:5. doi: <https://doi.org/10.3389/fped.2020.00005>
 25. Velilla PA, Rugeles MT, Chougnat CA. Defective antigen-presenting cell function in human neonates. *Clin Immunol.* 2006;121(3):251–259. doi: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.08.010>
 26. Kai-Larsen Y, Gudmundsson GH, Agerberth B. A review of the innate immune defence of the human foetus and newborn, with the emphasis on antimicrobial peptides. *Acta Paediatr.* 2014;103(10):1000–1008. doi: <https://doi.org/10.1111/apa.12700>
 27. Pérez A, Bellón JM, Gurbindo MD, Muñoz-Fernández MA. Impairment of stimulation ability of very-preterm neonatal monocytes in response to lipopolysaccharide. *Hum Immunol.* 2010;71(2):151–157. doi: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.11.011>
 28. Van Elburg RM, Fetter WPF, Bunkers CM, Heymans HSA. Intestinal permeability in relation to birth weight and gestational and postnatal age. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2003;88(1):F52–55. doi: <https://doi.org/10.1136/fn.88.1.f52>
 29. Ferretti P, Pasolli E, Tett A, et al. Mother-to-infant microbial transmission from different body sites shapes the developing infant gut microbiome. *Cell Host Microbe.* 2018;24(1):133–145.e5. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.005>
 30. Korpela K, Costea P, Coelho LP, et al. Selective maternal seeding and environment shape the human gut microbiome. *Genome Res.* 2018;28(4):561–568. doi: <https://doi.org/10.1101/gr.233940.117>
 31. Du Toit A. Microbiome: Baby steps towards the microbiome. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(5):268. doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.47>
 32. Hansen R, Scott KP, Khan S, et al. First-Pass Meconium Samples from Healthy Term Vaginally-Delivered Neonates: An Analysis of the Microbiota. *PLoS One.* 2015;10(7):e0133320. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133320>
 33. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(26):11971–11975. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>
 34. Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, et al. The infant microbiome development: Mom matters. *Trends Mol Med.* 2015;21(2):109–117. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.12.002>
 35. Shin H, Pei Z, Martinez KA, et al. The first microbial environment of infants born by C-section: the operating room microbes. *Microbiome.* 2015;3:59. doi: <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0126-1>
 36. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe.* 2015;17(5):690–703. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.004>
 37. Bokulich NA, Chung J, Battaglia T, et al. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med.* 2016;8(343):343ra82. doi: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad7121>
 38. Dominguez-Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, et al. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nature Medicine.* 2016;22(3):250–253. doi: <https://doi.org/10.1038/nm.4039>
 39. Barnes RD, Fairweather DVI, Holliday J, et al. A germ-free infant. *Lancet.* 1969;293(7587):168–171. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(69\)91187-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(69)91187-8)
 40. Malinak LR, Wilson R, South MA, et al. Germ-free delivery. The initiation of management of infants with a high probability of congenital immune deficiency states. *Am J Obstet Gynecol.* 1973;116(2):201–204. doi: [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(73\)91051-X](https://doi.org/10.1016/0002-9378(73)91051-X)
 41. Wilson R, Mastromarino A. Gnotobiotic human infants. *Am J Clin Nutr.* 1977;30(11):1896–1903. doi: <https://doi.org/10.1093/ajcn/30.11.1896>
 42. Pelzer E, Gomez-Arango LF, Barrett HL, Nitert MD. Review: Maternal health and the placental microbiome. *Placenta.* 2017;54:30–37. doi: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.12.003>
 43. Jiménez E, Fernández L, Marín ML, et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born

- by cesarean section. *Curr Microbiol.* 2005;51(4):270–274. doi: <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0020-3>
44. Jiménez E, Marín ML, Martín R, et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol.* 2008;159(3):187–193. doi: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.007>
45. Wassenaar TM, Panigrahi P. Is a foetus developing in a sterile environment? *Lett Appl Microbiol.* 2014;59(6):572–579. doi: <https://doi.org/10.1111/lam.12334>
46. Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol.* 2014;12(1):87. doi: <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0087-z>
47. Kim D, Hofstaedter CE, Zhao C, et al. Optimizing methods and dodging pitfalls in microbiome research. *Microbiome.* 2017;5(1):52. doi: <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0267-5>
48. Quince C, Walker AW, Simpson JT, et al. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat Biotechnol.* 2017;35(9):833–844. doi: <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>
49. Hamady M, Knight R. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Res.* 2009;19(7):1141–1152. doi: <https://doi.org/10.1101/gr.085464.108>
50. Bender JM, Li F, Adisetiyo H, et al. Quantification of variation and the impact of biomass in targeted 16S rRNA gene sequencing studies. *Microbiome.* 2018;6(1):155. doi: <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0543-z>
51. Karstens L, Asquith M, Davin S, et al. Controlling for Contaminants in Low-Biomass 16S rRNA Gene Sequencing Experiments. *mSystems.* 2019;4(4). doi: <https://doi.org/10.1128/msystems.00290-19>
52. O’Callaghan JL, Turner R, Dekker Nitert M, et al. Re-assessing microbiomes in the low-biomass reproductive niche. *BJOG.* 2020;127(2):147–158. doi: <https://doi.org/10.1111/1471-0528.15974>
53. Hornef M, Penders J. Does a prenatal bacterial microbiota exist? *Mucosal Immunol.* 2017;10(3):598–601. doi: <https://doi.org/10.1038/mi.2016.141>

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Шипицына Елена Васильевна, д.б.н. [*Elena V. Shipitsyna*, PhD in Biology]; адрес: 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3 (address: 3, Mendeleevskaya Line, 199034, St. Petersburg, Russia); e-mail: shipitsyna@inbox.ru, SPIN-код: 7660-7068, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2309-3604>