



Revisión

## Microorganismos en el líquido amniótico: ¿Realidad o contaminación?

### Microorganisms in amniotic fluid: Reality or contamination?

González-Rovira M, Nájjar AM, Moreno ML\*

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. Sevilla. España

\*Correspondencia: lmoreno@us.es

Recibido: 28.06.2022; aceptado: 19.07.2022

**Resumen:** El proceso de colonización temprana está emergiendo como un determinante clave dadas las importantes implicaciones de la exposición prenatal a los microorganismos en la programación fetal y, en consecuencia, para el desarrollo de enfermedades y en la salud humana. Existen estudios controvertidos sobre la teoría del útero estéril ya que diferentes estudios indican la presencia de un microbioma en la cavidad endometrial y en el líquido amniótico (LA) de embarazos a término sin complicaciones mediante técnicas dependientes de cultivo y técnicas moleculares, incluyendo enfoques de secuenciación de nueva generación, tanto en muestras de placenta, como en LA, cordón umbilical e incluso en tejidos fetales. Sin embargo, el dogma del útero estéril indica que la presencia de microorganismos en el LA está fundamentada en tres pilares, 1) un fenómeno de contaminación de las pruebas, 2) en la colonización microbiana en el momento del parto o 3) en la dificultad para recoger las muestras y procesarlas en el laboratorio preservando la esterilidad. La presente revisión pretende analizar los principales estudios existentes a favor de la esterilidad en los tejidos embrionarios durante el embarazo, y los que apoyan la teoría de la existencia de microbiota, así como las metodologías empleadas para la detección e identificación de microorganismos en muestras humanas con reducido número de microorganismos como es el LA.

**Abstract:** The early colonization process is emerging as a key determinant because of the important implications of prenatal exposure to microorganisms for fetal programming and, consequently, for the development of diseases and human health. There are controversial studies on the sterile uterus theory as different studies indicate the presence of a microbiome in the endometrial cavity and amniotic fluid (AF) of uncomplicated term pregnancies by culture-dependent and molecular techniques, including next-generation sequencing approaches, both in placental samples, AF, umbilical cord, and even fetal tissues. However, the sterile uterus dogma indicates that the presence of microorganisms in the LA is based on three pillars, 1) a phenomenon of contamination of the evidence, 2) microbial colonization at the time of delivery or 3) the difficulty to collect the samples and process them in the laboratory preserving sterility. The present review aims to analyze the main existing studies in favor of sterility in embryonic tissues during pregnancy, and those that support the theory of the existence of microbiota, as well as the methodologies used for the detection and identification of microorganisms in human samples with small numbers of microorganisms such as LA.

**Palabras clave:** Microbioma fetal, líquido amniótico, microbiota prenatal, infección intraamniótica.

**Keywords:** Microbiome, amniotic fluid, prenatal microbiota, intra-amniotic infection.

## 1. Introducción

El desarrollo del feto y de la placenta es un proceso continuo que comienza en el momento de la fecundación y que se encuentra altamente regulado ya que el control del paso de sustancias entre la madre y el feto es esencial para el crecimiento normal del mismo y para el mantenimiento de un embarazo saludable [1-3].

La placenta humana es un órgano altamente complejo, con forma redondeada que tiene una relación hemocorial, es decir, el tejido fetal penetra el endometrio y está en contacto con la sangre materna [4]. La placenta es un órgano muy especializado que interviene en la nutrición, regulación del crecimiento y metabolismo del feto, así como en su actividad endocrina [2]. Además, una función importante de la placenta es servir como barrera contra las infecciones ya que juega un papel esencial en la modulación de la inmunidad del embarazo, por lo que las disfunciones placentarias están relacionadas con complicaciones como preeclampsia, restricción del crecimiento intrauterino y muerte fetal [5].

El líquido amniótico (LA) es el fluido que rodea al feto después de las primeras semanas de gestación y se origina en el ectodermo. El LA se forma inicialmente por las células amniógenas procedentes de la cavidad amniótica, unos 12 días después de la fecundación y, aunque aporta una pequeña parte de éste, la mayor parte de su producción deriva del líquido intersticial materno por difusión a través de la membrana amniocoriónica de la decidua parietal [6]. A medida que se incrementan las semanas de gestación, el embrión comienza a orinar en la cavidad y a tragar fluido, siendo a partir de este momento la orina el principal componente del LA junto con el líquido de los pulmones, ya que la cornificación de la piel fetal impide la difusión del LA [2, 3].

El LA es una sustancia compleja y dinámica cuya composición y volumen cambia durante la gestación. Está principalmente constituido por agua (99 %), con una osmolaridad menor a la del plasma materno o fetal y además contiene electrolitos, péptidos, carbohidratos, lípidos, hormonas y proteínas [2, 7]. Entre las funciones esenciales del LA destacan la protección del feto de un traumatismo en el abdomen materno, la función antibacteriana frente a las infecciones, así como proporcionar el espacio y los factores

de crecimiento para permitir el desarrollo normal de los pulmones del feto y musculoesquelético y el sistema gastrointestinal [2, 8].

Existe una gran controversia sobre la esterilidad uterina durante la gestación y la presencia de un microbioma en la cavidad endometrial y en LA de embarazos a término sin complicaciones [9]. La teoría de que el feto se desarrolla en un ambiente estéril ha sido refutada por estudios recientes, utilizando técnicas dependientes de cultivo y técnicas moleculares, tanto en placenta como en LA y cordón umbilical.

Dadas las importantes implicaciones de la exposición prenatal a los microorganismos para el desarrollo y la salud humana, en esta revisión se abordan los estudios que cuestionan el microbioma prenatal apostando por un fenómeno de contaminación, y por el contrario los hallazgos que han puesto en duda el dogma del útero estéril mediante sistemas tradicionales de cultivo, o mediante enfoques de secuenciación de nueva generación en muestras de placenta, LA, meconio e incluso tejidos fetales. Asimismo, se realiza una revisión detallada de las metodologías empleadas para la detección e identificación de microorganismos en muestras humanas.

## 2. Métodos

La búsqueda se realizó en las bases de datos PubMed, MEDLINE y SCOPUS. Las palabras clave utilizadas fueron: "líquido amniótico", "microbioma fetal", "microbiota prenatal". Los criterios de selección o filtros utilizados fueron: review, free full text, 10 years, clinical trial.

## 3. Resultados y discusión

### 3.1. Detección e identificación de microorganismos en muestras humanas

La detección e identificación de los microorganismos en muestras humanas de manera rutinaria en el laboratorio de microbiología emplea técnicas fenotípicas que están muy consolidadas. Sin embargo, para soslayar ciertas limitaciones de estas técnicas se suelen usar en algunos casos métodos moleculares, si bien su implementación no es universal en todos los laboratorios por el mayor coste y grado de especialización que se requiere para su aplicación [10]. Recientemente los métodos basados en proteómica han irrumpido de manera importante por su capacidad

para ejercer como arma diagnóstica resolviendo problemas biológicos [11].

Los recursos utilizados en investigación para determinar la presencia de microorganismos en muestras clínicas donde se presupone una escasa abundancia microbiana requieren en algunos casos la combinación de diversas técnicas. A continuación, se detallan las principales metodologías empleadas en el análisis microbiano de muestras clínicas como el líquido amniótico, la placenta, heces o saliva, entre otros.

### 3.1.1. Métodos fenotípicos

Son técnicas dependientes del cultivo microbiano y no son aplicables para la identificación de bacterias directamente de las muestras. En términos generales todos los microorganismos tienen unos requerimientos para su crecimiento tanto de fuente de energía, carbono, nitrógeno, algunas sales, oligoelementos y agua, aunque en algunas ocasiones es necesario adicionar además otras sustancias como vitaminas, factores o aminoácidos esenciales [12].

En el cultivo de muestras es esencial la correcta elección del medio de crecimiento y las condiciones de incubación, siendo la principal limitación de estas metodologías y la causa por la que muchos microorganismos no se detectan. Aunque el cultivo en medio sólido permite disponer fácilmente de las colonias bacterianas, el crecimiento en medio líquido suele ser mayor porque la disponibilidad de nutrientes también es mayor [10].

Existen limitaciones de la técnica de cultivo que no pueden ignorarse en un entorno de diagnóstico rutinario, ya que la mayoría de las muestras se procesan de manera aeróbica a menos que se indique específicamente, como podría ser el caso del LA y lo que proporcionaría un resultado relativamente inexacto. Además, existen limitaciones adicionales por las condiciones de crecimiento, las tasas de crecimiento de los microorganismos o incluso las bacteriocinas producidas por el crecimiento polimicrobiano que pueden alterar fácilmente los resultados de las pruebas de cultivo bacteriano [13].

### 3.1.2. Métodos moleculares

Los métodos moleculares son métodos directos que están basados en la detección del genoma del microorganismo en una muestra, y, por

ende, detectan la presencia o ausencia de este en la muestra. Debido a los problemas inherentes que presentan los sistemas de identificación fenotípicos anteriormente mencionados, los métodos moleculares son considerados los procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia.

El análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada ya que es un marcador housekeeping que está presente en todas las bacterias. Además, otros genes estables que codifican para las subunidades ribosómicas 5S, 23S y sus espacios intergénicos, permiten establecer relaciones filogenéticas entre los microorganismos y son otros marcadores empleados.

### 3.1.3. Métodos proteómicos

Las técnicas de proteómica determinan el conjunto de proteínas expresadas por un genoma (proteoma). Las técnicas más usadas se basan en la electroforesis y en la espectrometría de masas. La espectrometría de masas tiene especial interés para la identificación de microorganismos y se centra en la detección de proteínas ribosómicas S y L (2.000 a 20.000 Da), consiguiendo una identificación a nivel de género y especie, y en ocasiones subespecies. En concreto, la espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization, desorción/ionización por láser asistida por matriz y TOF por el analizador time of flight, tiempo de vuelo) se ha convertido en un método de referencia para la identificación de una amplia gama de microorganismos, aunque por el momento requiere la confirmación mediante técnicas moleculares mucho más lentas. Sin embargo, el MALDI-TOF tiene potencial para convertirse en una tecnología de primera línea en un futuro próximo en combinación con otras tecnologías emergentes como los infrarrojos por transformada de Fourier y proporcionar información con impacto clínico de forma rápida y rentable [11].

### 3.1.4. Microscopía

La microscopía evalúa de manera directa la presencia o ausencia de bacterias, hongos y virus, así como diagnóstica de manera retrospectiva la presencia de microorganismos cuando existe evidencia microscópica de infiltración por leucocitos polimorfonucleares y otras células inflama-

torias. El examen microscópico en muestras humanas se puede realizar tanto con microscopios ópticos utilizando algún tipo de tinción como con los electrónicos.

Una vez obtenidas las muestras de LA se lleva a cabo un proceso de preparación haciéndolas pasar por un filtro estéril de 15 µm y centrifugación a 2300 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El fijador para microscopía electrónica se debe añadir cuidadosamente al sedimento celular y tras la fijación el pellet celular se debe lavar suavemente con tampón de lavado [14, 15].

### 3.2. Optimización de la detección de microorganismos viables

Las metodologías anteriormente mencionadas tienen limitaciones que, junto a la ausencia de uniformidad de los resultados desvelan la necesidad de una mejora técnica, así como del establecimiento de unas reglas estándar. Con el fin de optimizar la detección de microorganismos viables en el LA y la placenta, diversos estudios han llevado a cabo estrategias para 1) eliminar los falsos positivos y 2) aumentar la sensibilidad y/o especificidad.

#### *3.2.1. Estrategia de control de contaminación (ECC)*

Está ampliamente aceptado que los reactivos de laboratorio, los kits de extracción de ADN y los reactivos de PCR contienen bajos niveles de ADN, lo cual es un problema importante al trabajar con muestras de baja carga bacteriana, como podría ser el LA. Por otro lado, el ADN bacteriano puede llegar al LA procedente de microorganismos colonizadores de otras zonas del cuerpo. El tratamiento con ADNasa reduce drásticamente la contaminación por los reactivos en un 99 %. El uso de propidio monoazida (PMA) para evitar la amplificación por PCR de ADN procedente de bacterias no viables ha sido también utilizado con éxito [16].

#### *3.2.2. Aumento de la sensibilidad y/o especificidad*

Por otro lado, la mayoría de los estudios centrados en el LA utilizan métodos que producen amplicones cortos [17]. La secuenciación de una sola molécula en tiempo real (SMRT) es la tecnología central de PacBio que puede generar lecturas largas de alta fidelidad cuando se usa junto con la ECC, mejorando la sensibilidad y la especificidad en la elaboración de perfiles de

microbiota y disminuyendo el riesgo de falsos positivos [18].

### 3.3. Controversia sobre los microorganismos en el líquido amniótico

La presencia de patógenos en la cavidad amniótica, la placenta y el meconio se han investigado desde hace años como causas de infección o parto prematuro, sin embargo, recientemente se ha cuestionado el dogma de que la vida fetal sea estéril.

#### *3.3.1. Útero estéril*

Estudios recientes realizados en muestras de LA y en placenta, en diferentes estadios del embarazo y, utilizando diferentes metodologías, indican que el feto sano se desarrolla en un útero libre de microbiota (Tabla 1).

Los estudios centrados en la identificación de una población bacteriana en el LA de muestras en el segundo trimestre de embarazo y en partos a término, no encontraron biomasa bacteriana significativa [19-21]. A pesar de que estos datos solo responden al perfil microbiano del LA a término, indican la inexistencia de microorganismos en la zona uterina y de la existencia de microbiota bacteriana placentaria y del LA solamente asociada con el nacimiento prematuro. Además, se remarca la importancia de tener en cuenta la inevitable ocurrencia de contaminación ambiental, de los reactivos durante el proceso experimental o durante la recogida de muestras [22, 23].

La ruptura de la membrana amniótica (ROM) es la causa que ha sido propuesta para el inicio de la colonización microbiana, afirmándose que el desarrollo fetal en embarazos sin complicaciones tiene lugar en ausencia de microbiota en el LA ya que no se detectan bacterias en el LA en el grupo sin ROM mediante cultivo (anaeróbico y aeróbico) ni por PCR [20].

En relación con los estudios realizados en placenta, el grupo de Theis y colaboradores [24] empleó diferentes técnicas como el uso de cultivo, qPCR del gen ARNr 16S, secuenciación de dicho gen y secuenciación metagenómica, para determinar la microbiota de la placenta. En el cultivo de los tejidos placentarios no creció ninguna bacteria viable a excepción de una bacteria en una muestra que posteriormente no fue de-

**Tabla 1.** Principales estudios que demuestran la esterilidad del LA y útero. LA, líquido amniótico; PROM, rotura prematura de membranas; RCIU, restricción en el crecimiento intrauterino; PE, pre-eclampsia

Tipo de muestras	Cita	Obtención de las muestras	Número de muestras	Método de análisis	Hallazgos más relevantes
Líquido amniótico	18	Partos vaginales a término	n=24	Secuenciación metagenómica	La microbiota bacteriana del LA no pudo ser diferenciada de los controles de contaminación. La alteración de la microbiotamicrobiota bacteriana placentaria y del LA se asoció con el nacimiento prematuro
	20	Cesáreas electivas a término	n=51 n=14 (PROM)	Cultivo Secuenciación del gen ARNr 16S	Se demuestra que la colonización del bebé comienza después de las contracciones uterinas y la rotura de la membrana amniótica
	22	Amniocentesis	n= 42 LA de 37 embarazos (5 gemelares y 32 únicos)	Cultivo Secuenciación del gen ARNr 16S	Con los métodos de investigación microbiológica, no se identificaron microorganismos en LA de las embarazadas sanas
	21		Solo aquellos embarazos que llegaron a término y niños sanos	Secuenciación metagenómica	Se demuestra que el LA de la mitad de la gestación humana no tiene viromas o microbiomas detectables, aunque esto no impide la entrada de agentes microbiológicos más adelante en la gestación
Placenta	25	Cohorte 1: Cesáreas electivas	n=20 (RCIU) n=20 (PE) n=40 (control)	Secuenciación del gen ARNr 16S Secuenciación metagenómica	En la mayoría de las muestras de placenta no se detectó la presencia de bacterias, sino de infecciones bacterianas. El único microorganismo encontrado fue <i>Streptococcus agalactiae</i> , lo cual puede ser causa de una infección
		Cohorte 2: Cesáreas electivas Cesáreas intrapartos Partos vaginales	n=100 (RCIU) n=100 (PE) n=198 (control) n=100 (pretérmino)		
	24	Cesáreas electivas a término	n=29	Cultivo Secuenciación del gen ARNr 16S Secuenciación metagenómica	
Placenta, líquido amniótico y otros	5	Cesáreas electivas a término	n=50	Cultivo Secuenciación del gen ARNr 16S	No se encontraron evidencias que apoyen la existencia de un microbioma placentario en los 76 partos a término de los fetos sanos, ya que encuentran especies bacterianas pero que podrían deberse a contaminación
		Partos vaginales a término	n=26		

tectada mediante la secuenciación del gen ARNr 16S. La qPCR no indicó una mayor abundancia de genes bacterianos de ARNr 16S en los tejidos placentarios en relación con los controles técnicos (entornos de laboratorio y reactivos). Tam-

poco la secuenciación del gen ARNr 16S reveló notables diferencias en la composición o estructura de los perfiles bacterianos. Por último, los datos que se obtuvieron en el estudio de la metagenómica de los tejidos de la placenta identi-

ficaron microorganismos que claramente eran productos de una contaminación. En concreto, el 63,4 % de las secuencias bacterianas que fueron recuperadas de los tejidos placentarios, procedían de *Cyanothece*, *Candidatus*, *Phytoplasma* y *Chlorobium*. Estos resultados han sido corroborados por otros estudios más recientes basados en secuenciación metagenómica [21].

Así mismo, hay estudios que indican la inexistencia de microorganismos en el LA y la existencia de microorganismos en la placenta [17]. Mediante la tinción histológica de tejido demostraron que la placa basal materna de la placenta albergaba microorganismos y, por tanto, apoyando la idea de que la placenta no era estéril. Sin embargo, el cultivo de las muestras de LA resultó negativo tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Aunque la secuenciación del ARNr 16S detectó microorganismos en el LA, todas las muestras resultaron negativas para el cultivo, concluyéndose que era posible que el LA sano no contuviera bacterias viables, y el microbioma detectado fuese resultado de la liberación de ADN de microorganismos que se originan en otros sitios como por ejemplo la placenta.

Por último, existen estudios que han determinado si patologías como la pre-eclampsia (PE), la restricción en el crecimiento intrauterino (RCIU) y los partos a pre-término (PTB) se encuentran asociadas con la presencia de bacterias o ADN en la placenta de madres primerizas. El examen de muestras del tejido placentario y el uso de técnicas de metagenómica como la secuenciación de amplicones 16S, concluye que las infecciones bacterianas de la placenta en humanos no son una causa importante de las complicaciones relacionadas con este órgano en el embarazo y que esta no tiene un microbioma residente ya que el único organismo del que existe una gran evidencia de su presencia en la placenta antes del parto es *Streptococcus agalactiae*, el cual es un patógeno causante de las mayorías de sepsis neonatales [25].

### 3.3.2. Microbioma del líquido amniótico y placenta

Desde otra perspectiva, el papel del microbioma en el desarrollo de enfermedades está siendo cada vez más estudiado y la teoría de que el feto se desarrolla en un ambiente estéril ha sido rebatida mediante diferentes estudios utilizando técnicas cultivo-dependientes y técnicas molecu-

lares, tanto en placenta como en LA [26-28]. La Tabla 2 muestra una comparación entre los estudios más destacados.

El mecanismo exacto de transferencia de microorganismos de la madre al feto es aún desconocido [29], aunque se ha relacionado con el aumento de la permeabilidad de la mucosa intestinal materna que permite un mayor tránsito de microorganismos desde el lumen a la sangre y de ahí a zonas embrionarias como la placenta. Además, la presencia de ADN bacteriano en el LA y la placenta no implica la presencia de bacterias viables, aunque la exposición fetal a bacterias no viables podría influir en el desarrollo inmunológico del feto [16, 30, 31]. De este modo, se han propuesto tres rutas principales sobre el origen de la microbiota de la cavidad intraamniótica, 1) la oral-fetoplacentaria, 2) la gastrointestinal-fetoplacentaria y, 3) la genitourinaria-fetoplacentaria [32].

Se ha comparado la microbiota del LA y de la placenta con la de otras muestras fetales y maternas, como el meconio, el calostro, la cavidad oral del feto, la vagina, las heces maternas, el plasma materno, la cavidad oral materna, etc. con el fin de descubrir si existen mecanismos activos y selectivos por los cuales el feto se expone a las bacterias maternas o bien justificar que se trata de contaminación.

En el estudio de He y colaboradores [18] se comparó el microbioma de diferentes muestras fetales y maternas procedentes de partos vaginales y cesáreas, encontrando una mayor semejanza de la microbiota del meconio con la microbiota del LA en comparación con la microbiota de otras muestras maternas como por ejemplo la vaginal, lo que sugiere que el LA contribuye significativamente a su composición. Además, no se han descrito diferencias estructurales significativas en la microbiota del LA entre los recién nacidos por cesárea y los partos vaginales, hecho que apoya que no hubo contaminación vaginal microbiana secundaria obvia.

Así mismo, se ha visto que existe una mayor similitud entre la microbiota de la placenta y de la cavidad oral materna, en comparación con otras partes del cuerpo, mientras que la microbiota placentaria no presenta ninguna similitud con los posibles contaminantes durante el parto [26]. Además, se han encontrado en el espa-

**Tabla 2.** Resumen comparativo de los principales estudios que indican la existencia de una microbiota del LA y útero. ND, no determinado; LA, líquido amniótico; SMRT, secuenciación de una sola molécula en tiempo real

Tipo de muestras	Cita	Obtención de las muestras	Número de muestras		Método de análisis	Hallazgos más relevantes
Líquido amniótico y meconio	16	Cesáreas electivas	n=43 (LA) n=43 (meconio)		Análisis de las citoquinas en LA Secuenciación del gen ARNr 16S	La mayoría de las lecturas recuperadas en sus muestras de LA correspondían a comensales típicos de la piel, como <i>Propionibacterium acnes</i> y <i>Staphylococcus spp.</i> Estas bacterias pueden ser transferidas transitoriamente de la madre al feto, donde podrían ser inadecuadas para sobrevivir
	18	Cesáreas electivas	n=8 (LA)	n=39 (meconio)	Secuenciación del gen ARNr 16S	Aparecieron un total de 88 microorganismos en LA y 81 en meconio, afirmando la existencia de microbiota
Partos vaginales		n=31 (LA)	Secuenciación SMRT			
Líquido amniótico y placenta	17	Amniocentesis para LA Legrado con aspiración al vacío para placenta	n=64 (LA) n=1832 (placenta)		Cultivo Secuenciación del gen ARNr 16S	Las muestras de LA dieron negativo en cultivo, pero positivo en muestras de placenta, sugiriendo que la colonización bacteriana puede ocurrir durante embarazos sanos. El microbioma del tejido decidual tenía una baja diversidad, compuesto por filos como Proteobacterias, Thermus y Firmicutes
Placenta, líquido amniótico y otros	26	Cesáreas electivas a término	n=15		Cultivo Secuenciación del gen ARNr 16S	El LA y la placenta albergan comunidades microbianas únicas, que podría iniciar la colonización intestinal
	41	Cesáreas electivas	ND		Cultivo Secuenciación del gen ARNr 16S	Se encontraron bacterias cultivables en el intestino fetal durante la mitad de la gestación, pero no al final de esta. Sus resultados demuestran una microbiota fetal en mamíferos dinámica y viable durante todo el desarrollo en el útero
	37	Interrupciones electivas	En el 2º trimestre de gestación. Disección del feto en condiciones estériles		Cultivo Microscopía electrónica Ensayos de citometría de masa Ensayos inmunológicos	Presencia baja pero consistente de microbios en algunos de los fetos humanos sanos examinados, demostrando que dicha presencia microbiana prepara al sistema inmunológico del feto

cio intraamniótico múltiples bacterias descritas como patógenos dentales, lo que unido al hecho de que no todas las bacterias de dicho espacio se encuentran en la vagina, apoya la disemina-

ción hematógena desde otras zonas del cuerpo a la cavidad intraamniótica. Todo ello explicaría que, durante el embarazo, las hormonas sexuales alteran la topografía y permeabilidad de

los tejidos gingivales, aumentando el riesgo de traslocación de dichas bacterias [33, 34].

De acuerdo con otros estudios, Stinson y colaboradores [16, 31] describieron la semejanza entre la microbiota del LA y los comensales típicos de la piel como *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus spp.* [26, 33]. Dadas las medidas que tomaron para la toma de las muestras, descartan que sea contaminación. Además, sugieren que, durante la gestación, las alteraciones del microbioma materno alteran la salud del feto [35] y que, los cambios en la regulación inmunitaria en la barrera materno-fetal pueden dar lugar a diferencias en la capacidad de los microorganismos para acceder y persistir en el entorno fetal, así como la posibilidad de que algunos microorganismos puedan persistir en un estado viable pero no cultivable [36].

Por otro lado, se ha encontrado en tejidos fetales de embarazos sanos interrumpidos durante el segundo trimestre, la presencia de células T de memoria, una baja abundancia microbiana y una respuesta activa de estas células para proteger a las bacterias fetales. Demuestran por primera vez que dicha presencia microbiana prepara al sistema inmunitario fetal, situando así la memoria microbiana temprana en el contexto de la preparación inmunitaria fetal, un concepto no explorado antes en la inmunidad fetal [37].

Por último, estudios recientes han afirmado que la existencia de una microbiota uterina y los cambios en su composición podrían afectar a la fertilidad de la madre. Por lo tanto, el conocimiento de dicha microbiota permitiría establecer un tratamiento personalizado, gracias al manejo del microbioma durante las terapias de reproducción asistida [29].

### 3.3.3. Artefacto de contaminación

A lo largo del proceso de muestreo y con la finalidad de evitar eficazmente la existencia de falsos positivos, en diferentes estudios se han tomado controles negativos a lo largo del proceso de muestreo. Hasta el momento, los resultados obtenidos sugieren que los métodos moleculares por sí solos no son suficientes para reafirmar la esterilidad del útero y que es necesaria su combinación con técnicas microscópicas, inmunitarias, etc., que proporcionen evidencia de la presencia de bacterias.

En el estudio llevado a cabo por Liu y colaboradores [38] ninguna de las muestras del control negativo tuvo contenido de ADN que alcanzara el límite de detección en el NanoDrop ya que la tecnología de espectroscopia es la base principal para identificar la solución de la muestra de ADN [39]. Por otro lado, Rackaityte y colaboradores [40] utilizando los datos de secuenciación del gen ARNr 16S de las muestras control, informaron que en el 70 % de sus muestras había una carga bacteriana baja e indistinguible de los controles positivos, a pesar de haber potenciado la señal bacteriana mediante la mejora de métodos moleculares actuales.

## 4. Conclusiones

La presencia de microorganismos en el LA es especialmente importante ya que puede tener un impacto en el desarrollo de la inmunidad del recién nacido, así como modelar la constitución de su microbiota futura. Sin embargo, a pesar de la evidencia de los beneficios que nos aporta el microbioma en las diferentes partes del cuerpo humano, es evidente que alteraciones en su equilibrio pueden producir consecuencias negativas en el devenir de la gestación, como es el caso de la infección intrauterina o la preeclampsia que podrían dar lugar a un parto prematuro.

A pesar de todos los estudios existentes para dilucidar la existencia de microbiota en el LA, placenta y otras zonas uterinas durante el embarazo, son necesarias nuevas investigaciones para conocer de manera precisa esta posible presencia y su función en el LA y otras zonas durante el embarazo. La escasa biomasa en el LA y la dificultad en la recogida y/o procesamiento de las muestras hacen insostenible la realización de ensayos consistentes que no se consideren artefactos contaminantes y que cumplan estrictamente con las ECC.

### Contribuciones de los autores

Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito. Conceptualización, MG-R, AMN y MLM; escritura-preparación del borrador, MG-R y AMN; escritura: revisión y edición, MG-R y MLM.

### Conflicto de intereses

Los autores no declaran ningún conflicto de intereses.



## Referencias bibliográficas

1. Purizaca M. Modificaciones fisiológicas en el embarazo. *Rev Peru Ginecol Obstet.* 2010;56(1):57-69.
2. Morgan-Ortiz F, Morgan-Ruiz FV, Quevedo-Castro E, Gutierrez-Jimenez G, Báez-Barraza J. Anatomía y fisiología de la placenta y líquido amniótico. *Rev Med UAS.* 2015;5(4):156-64.
3. Fitzsimmons ED, Bajaj T. Embryology, Amniotic Fluid. *StatPearls.* 2022;31082133.
4. Burton GJ, Jauniaux E. Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2018;218(2S):S745-61.
5. Sterpu I, Fransson E, Hugerth LW, Du J, Pereira M, Cheng L, Radu SA, Calderón-Pérez L, Zha Y, Angelidou P, et al. No evidence for a placental microbiome in human pregnancies at term. *Am J Obstet Gynecol.* 2021;224(3):296-e1.
6. González-Merlo J, González E. La placenta, las membranas ovulares, el líquido amniótico y sus funciones. En: González-Merlo J, editor. *Obstetricia.* 7ª ed. Madrid: Elsevier; 2018. p. 57-59.
7. Tong XL, Wang L, Gao TB, Qin YG, Qi YQ, Xu YP. Potential function of amniotic fluid in fetal development- Novel insights by comparing the composition of human amniotic fluid with umbilical cord and maternal serum at mid and late gestacion. *J Chin Med Assoc.* 2009;72(7):368-73.
8. Madar H, Brun S, Coatleven F, Chabanier P, Gomer H, Nithart A, Coustel MA, Merlot B, Horovitz J, Dallay D, et al. Fisiología y regulación del líquido amniótico. *EMC Ginecol Obstet.* 2016;52(4):1-10.
9. Blaser MJ, Devkota S, McCoy KD, Relman DA, Yassour M, Young VB. Lessons learned from the prenatal microbiome controversy. *Microbiome.* 2021;9(1):1-7.
10. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(8):601-8.
11. Oviaño M, Rodríguez-Sánchez B. MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed).* 2021;39(4):192-200.
12. Fernández A, García C, Saéz JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Proced Microbiol Clin.* 2010;37:1-52.
13. Abayasekara LM, Perera J, Chandrasekharan V, Gnaman VS, Udunuwara NA, Liyanage DS, Bulathsinhala NE, Adikary S, Aluthmuhandiram JVS, Thanaseelan CS, et al. Detection of bacterial pathogens from clinical specimens using conventional microbial culture and 16S metagenomics: a comparative study. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):631.
14. Gomez-Lopez N, Romero R, Garcia-Flores V, Xu Y, Leng Y, Alhousseini A, Hassan SS, Panaitescu B. Amniotic fluid neutrophils can phagocytize bacteria: A mechanism for microbial killing in the amniotic cavity. *Am J Reprod Immunol.* 2017;78(4):e12723.
15. Galaz J, Romero R, Xu Y, Miller D, Slutsky R, Levenson D, Hsu CD, Gomez-Lopez N. Cellular immune responses in amniotic fluid of women with preterm clinical chorioamnionitis. *Inflamm Res.* 2020;69(2):203-16.
16. Stinson, LF, Boyce, MC, Payne, MS, Keelan, JA. The not-so-sterile womb: evidence that the human fetus is exposed to bacteria prior to birth. *Front Microbiol.* 2019;10:1124.
17. Zhu, L, Luo, F, Hu, W, Han, Y, Wang, Y, Zheng, H, Guo X, Qin J. Bacterial Communities in the Womb During Healthy Pregnancy. *Front Microbiol.* 2018;9:2163.
18. He Q, Kwok LY, Xi X, Zhong Z, Ma T, Xu H, Meng H, Zhao F, Zhang H. The meconium microbiota shares more features with the amniotic fluid microbiota than the maternal fecal and vaginal microbiota. *Gut Microbes.* 2020;12(1):e1794266.
19. Lim ES, Rodríguez C, Holtz LR. Amniotic fluid from healthy term pregnancies does not harbor a detectable microbial community. *Microbiome.* 2018;6(1):1-8.

20. Rehbinder EM, Lødrup KC, Staff AC, Angell IL, Landrø L, Hilde K, Gaustad P, Rudi K. Is amniotic fluid of women with uncomplicated term pregnancies free of bacteria? *Am J Obstet Gynecol.* 2018;219(3):289.e1-e12.
21. Wang H, Yang GX, Hu Y, Lam P, Sangha K, Siciliano, D, Swenerton A, Miller R, Tilley P, Dadelszen PV, et al. Comprehensive human amniotic fluid metagenomics supports the sterile womb hypothesis. *Sci Rep.* 2022;12(1):1-13.
22. Liu Y, Li X, Zhu B, Zhao H, Ai Q, Tong Y, Shengtang Q, Feng Y, Wang Y, Wang S, et al. Midtrimester amniotic fluid from healthy pregnancies has no microorganisms using multiple methods of microbiologic inquiry. *Am J Obstet Gynecol MFM.* 2020;223(2):248-e1.
23. ung E, Romero R, Yoon BH, Theis KR, Gudicha DW, Tarca AL, Diaz-Primera R, Winters AD, Gomez-Lopez N, Yeo L, et al. Bacteria in the amniotic fluid without inflammation: early colonization vs. contamination. *J Perinat Med.* 2021;7,49(9):1103-21.
24. Theis KR, Romero R, Winters AD, Greenberg JM, Gomez-Lopez N, Alhousseini A, Bieda J, Maymon E, Pacora P, Fettweis JM, 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.
25. de Goffau MC, Lager S, Sovio U, Gaccioli F, Cook E, Peacock SJ, Parkhill J, Charnock-Jones DS, Smith GCS. Human placenta has no microbiome but can contain potential pathogens. *Nature.* 2019;572(7769):329-34.
26. Collado M, 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;6(1):1-13
27. Gschwind R, Fournier T, Kennedy S, Tsatsaris V, Cordier AG, Barbut F, Butel MJ, Wydau-Dematteis S. Evidence for contamination as the origin for bacteria found in human placenta rather than a microbiota. *PLoS One* 2020;15(8):e0237232.
28. Coscia A, Bardanzellu F, Caboni E, Fanos V, Peroni DG. When a Neonate Is Born, So Is a Microbiota. *Life.* 2021;11(2):148.
29. Toson B, Simon C, Moreno I. The Endometrial Microbiome and Its Impact on Human Conception. *Int J Mol Sci.* 2022;23(1):485.
30. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, Gotsch F, Kim CJ, Erez O, Edwin S, Relman DA. Microbial prevalence, diversity, and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PloS one.* 2008;3(8):e3056.
31. Stinson LF, Keelan JA, Payne MS. Characterization of the bacterial microbiome in first-pass meconium using propidium monoazide (PMA) to exclude nonviable bacterial DNA. *Lett Appl Microbiol.* 2019;68(5):378-85.
32. Pelzer E, Gomez-Arango LF, Barrett HL, Nitert MD. Maternal health and the placental microbiome. *Placenta.* 2017;54:30-7.
33. Vytla, S, Mendz, G, Quinlivan, J. Dental bacterial DNA are present in the amniotic cavity of healthy pregnant women at term. *Transl Med.* 2016;6(4).
34. Wu H, Sun W, Chen H, Wu Y, Ding W, Liang S, Huang X, Chen H, Zeng Q, Li Z, et al. Health-related quality of life in different trimesters during pregnancy. *Health Qual Life Outcomes.* 2021;19(1):182.
35. Han S, Ellberg CC, Olomu IN, Vyas AK. Gestational microbiome: Metabolic perturbations and developmental programming. *Reproduction.* 2021;162(6):85-98.
36. Peroni DG, Nuzzi G, Trambusti I, Di Cicco ME, Comberiati P. Microbiome Composition and Its Impact on the Development of Allergic Diseases. *Front Immunol.* 2020;23(11):700.
37. Mishra A, Lai GC, Yao LJ, Aung TT, Shental N, Rotter-Maskowitz A, Sphepherdson E, Singh GSN, Pai R, Shanti A, et al. Microbial exposure during early human development primes fetal immune cells. *Cell.* 2021;184(13):3394-409.

38. Liu CJ, Liang X, Niu ZY, Jin Q, Zeng XQ, Wang WX, Li MY, Chen XR, Meng HY, Shen R, et al. Is the delivery mode a critical factor for the microbial communities in the meconium? *E Bio Med.* 2019;49:354-63.
39. Hindash DA, Hindash A. Quantitative Analysis of DNA Samples. *Adv Sci Eng Technol Int Confer.* 2022;1-3.
40. Rackaityte E, Halkias J, Fukui EM, Mendoza VF, Hayzelden C, Crawford ED, Fujimura KE, Burt TD, Lynch SV, et al. Viable bacterial colonization is highly limited in the human intestine in utero. *Nat Med.* 2020;26(4):599-607.
41. Younge N, McCann JR, Ballard J, Plunkett C, Akhtar S, Araújo-Pérez F, Murtha A, Brandon D, Seed PC. Fetal exposure to the maternal microbiota in humans and mice. *JCI insight.* 2019;4(19):e127806.

Este trabajo debe ser citado como:

González-Rovira M, Nájjar AM, Moreno ML. Microorganismos en el líquido amniótico: ¿Realidad o contaminación? *Rev Esp Cien Farm.* 2022;3(1):61-71.