

Kuidas mõjutab elu teke soolestikus meie immuunsüsteemi arengut.

Merli Špitsmeister

Biokeemia ja biotehnoloogia Msc

Sünnieelsed mõjud mikrobioota kujunemisele

Traditsiooniliselt on peetud emakat steriilseks ja arvatud, et soole kolonisatsioon bakterite poolt algab sünnihetkel. Hiljutised uuringud on aga näidanud, et see protsess võib alata juba emakas. Baktereid on leitud tervete vastsündinute platsentast, nabanööri verest, looteveest ja loote membraanidest ilma mingi märgita infektsioonile või põletikule. (Rodriguez et al., 2015) Hetkel ei ole veel piisavalt selge, kas bakterite leidumine emakasiseses keskkonnas on juhuslik või süstemaatiline, kas need bakterid on elujõulised ja võimelised loote soolt koloniseerima ning mis mõju nad omavad imiku mikrobioota kujunemisele (Matamoros et al., 2013). Kahtlemata on see avastus on aga revolutsiooniline, kuna loote soolde jõudvad bakterid võivad suunata loote immuunset, metaboolset ja somaatilist arengut (Francino, 2014).

Hiirtel läbiviidud katsed on kinnitanud bakterite liikumist ema soolest loote omasse. Selle tõestamiseks manustati tiinetele hiirtele suukaudselt geneetiliselt märgistatud enterokokke ning keisrilõike järgselt oli võimalik antud tüvi järglaste mekooniumist isoleerida. (Jimenez et al., 2008) Ka mekoonium arvati varasemalt steriilne olevat, kuid nüüdseks on teada, et see sisaldab mitmeid baktereid: peamiselt batsille, enterokokke ja stafülokokke (Jimenez et al., 2008, Moles et al., 2013). Väiksel populatsioonil teostatud silmapaistev uuring annab alust arvata, et mekooniumi mikrobioota on emakasisest päritolu ning et see osaleb loote soole kolonisatsioonis (Gosalbes et al., 2013). Bakterite liigid mekooniumis sõltuvad ema dieedist ja käitumisest raseduse ajal. On leitud, et raseduse käigus muutub ema mikrobioota kaalu juurdevõtmist soodustavaks, kuid laste mikrobioota sarnaneb sünnijärgselt kõige rohkem ema esimese trimestri mikrobioomiga (Koren et al., 2012). Ema mikrobioota võib seega mõjutada imiku immuunsüsteemi ja mikrobioota kujunemist (Gosalbes et al., 2013).

Mitmed välised faktorid raseduse ajal nagu ravimid, haigused, stress ja raskemetallidega kokkupuude võivad mõjutada imiku arengut ja käitumist. Loomkatsed on näidanud, et ahvibeebidel, kelle emad olid raseduse ajal stressis, oli märgatavalt madalam bifidobakterite ja laktobatsillide tase. (Matamoros et al., 2013) Madal bifidobakterite ja laktobatsillide tase võib põhjustada koolikute teket (de Weerth et al., 2013), allergiaid, ärritunud soole sündroomi, tsöliaakiat ja muid häireid immuunsüsteemi töös (Sjögren et al., 2009, Brown et al., 2012).

Mikrobiota kujunemine sünnijärgselt

Kompleksne ökosüsteem sooles tekib läbi erinevate bakterite elule asumisele imiku ja varases lapseas (Francino, 2014). Esimesena koloniseerivad vastsündinu soole fakultatiivsed anaeroobid nagu kolibakterid ja teised enterobakterid. Mõne päeva jooksul kasutavad need bakterid ära algse hapniku varu ning tekitavad keskkonna, mis soodustab anaeroobide kolonisatsiooni - bifidobakterid, klostriidia, bakteroidid. (Matamoros et al., 2013, Rodríguez et al., 2015) Klostriidia omab tugevat mõju inimese immuunsusele, aidates autoimmuunsust ja kahjulikke põletikke maha suruda ning soodustades immunoglobuliin A-d (IgA) tootvate rakkude arengut jämesooles. On leitud, et põletikulise soolehaigusega patsientidel on klostriidia tase madal. (Lopetuso et al., 2013) Bifidobakterite kõrget taset varajases imikueas on seostatud kõrge sekretoorse IgA (sIgA) tasemega 6-kuuselt (Sjögren et al., 2009). sIgA on esmaseks immuunsüsteemi kaitseliiniks võõraste antigeenide suhtes limaskestal (Grönlund et al., 2000).

Esimeste elunädalate jooksul bakterite kooslus muutub, domineerivaks saab üks või paar tüve (Francino et al., 2014). Algselt madala keerukuse ja mitmekesisusega mikrobiota küpseb ja areneb tohutult, meenutades aastaselt juba oluliselt täiskasvanu oma, kuid tüüpiline täiskasvanu muster ja homöostaas kujuneb välja alles umbes kolmeaastaseks saades. Seetõttu on 3 esimest eluaastat kõige kriitilisem periood, mil toitumisega saab parandada lapse kasvu ja arengut. (Matamoros et al., 2013, Francino et al., 2014)

Mikrobiota areng imikueas on tugevalt seotud immuunsuse arenguga: bakterite-peremehe vaheliste suhete rajamine selles eas mõjutab immuunhaiguste tekke soodumust kogu elu jooksul (Francino, 2014). Mikrobiota mängib rolli immuunrakkude arengus ja erinevate immuunrakkude vahelises tasakaalus. Soole mikroobid soodustavad ka limaskesta alalhoidu. Soole limaskest on bakterivaba ala soole epiteeli ja bakteririkka soole vahel, ilma milleta toimuks pidev immuunsuse stimulatsioon ja põletik. (Houghteling and Walker, 2015)

Vastsündinu soole asustamist mikroobide poolt mõjutavad mitmed faktorid: enneaegsus, sünniviis, toitmiseviis, antibiootikumide kasutamine, haigla ja koduse keskkonna sanitaarsed tingimused, õdede-vendade ja koduloomade olemasolu (Matamoros et al., 2013).

- **Enneaegsus**

Soole kolonisatsioon enneaegsetel imikutel toimub ajalistest imikutest erinevalt ja „normaalne“ mikrofloora saavutatakse hiljem ning sageli puudulikult. Soole düsbioosis mängib suurt rolli sage laia toimespektriga antibiootikumide kasutamine enneaegsetel ning asjaolu, et enneaegsed ei saa elu alguses tarbida piisavalt

rinnapiima loomaks adekvaatne kaitsesüsteem ebaküpses soolestikus. (Sherman, 2010, Aceti et al., 2015) Enneaegsetel imikutel on mikrobiota mitmekesisus väiksem ning madalam anaeroobide (bifidobakterid ja bakteroidid) proportsioon ja kõrgem fakultatiivsete anaeroobide (enterokokk, streptokokk, stafülokokk ja erinevad enterobakterid) osakaal esimese kolme elukuu jooksul (Francino et al., 2014). Ka potentsiaalselt patogeensete bakterite nagu *Clostridium difficile* või *Klebsiella pneumoniae* tase on enneaegsetel kõrgem (Arbolea et al., 2012).

Häirunud mikrobiota tõttu suureneb soole läbilaskvus, mis võimaldab bakterite translokatsiooni läbi soole limaskesta ja seeläbi eluohtlike sündroomide teket (Francino et al., 2014). Bakteriaalne translokatsioon (BT) on soole bakterite, bakteriaalsete toksiinide või antigeenide tungimine läbi limaskesta normaaloludes steriilsesse koesse. Lokaalne BT on seotud nekrootilise enterokoliidiga (NEC), BT soolestikust kaugemale põhjustab sepsist ja erinevate organite töö häireid. (Sherman, 2010) Umbes 90% imikutest, kellel tekib NEC, on enneaegsed (Aceti et al., 2015). Konkreetseid patogeene, mis NEC põhjustavad, on raske tuvastada, kuid mõned uuringud on põhjustajatena välja toonud *Klebsiella* ja stafülokokid. Algseks põhjuseks peetakse pigem siiski kehva soole mikrobiootat (madal bifidobakterite tase). On leitud, et piimhappebakterite ja bifidobakterite olemasolu vastsündinu sooles takistab BT. (Sherman, 2010)

Probiotikumid võivad aidata normaliseerida ebanormaalsel soole kolonisatsiooni ja seeläbi vältida NEC teket (Aceti et al., 2015). Meta-analüüs probiotikumide (bifidobakterid või laktobatsillid) kasutamisest enneaegsetel imikutel, mis hõlmas 11 artiklit ja 2176 patsienti, näitas, et probiotikumide kasutamine vähendab NEC ja surma riski 30% (Deshpande et al., 2010). Lisaks sellele võivad probiotikumide poolt toodetavad bioaktiivsed ained vähendada soole läbitavust ja hoida ära muutuseid TJ (tight junction) valkudes (Sherman, 2010).

- **Antibiootikumide kasutamine**

Antibiootikumide kasutamine, eriti esimeste eluaastate jooksul, võib omada pikaajalisi efekte tervisele (Francino et al., 2014). On leitud, et Cefalexin'i manustamine neljal esimesel elupäeval muudab mikrobiota koostist ja vähendab selle mitmekesisust ning sarnane muutus mikrobiotas esineb ka imikutel, kelle emad saavad enne sünnitust antibiootikume (Tanaka et al., 2009). Ka Ampicillin'i ja Gentamycin'i tarbimine esimesel kahel elupäeval põhjustab muutusi mikrobiotas, mis ilmnevad veel kuu peale ravi lõppu (Fouhy et al., 2012).

Antibiootikumide kasutamine on seotud astma tekke kõrgema riskiga ning risk suureneb iga antibiootikumikuuriga (McKeever et al., 2002, Kozyrskyj et al., 2007, Marra et al., 2009). Ka ema rasedusaegne antibiootikumide kasutamine soodustab

lapsel atoopiliste haiguste, nagu astma, heinapalavik ja ekseem, teket ning nende esinemissagedus suureneb vastavalt ema antibiootikumikuuride arvule raseduse jooksul (Jędrychowski et al., 2006).

Loomadel põhinevad uuringud on andnud parema pildi varajase antibiootikumide kasutamise mõjust soole mikrobiootale. Põllumajanduses kasutatakse loomade kasvu kiirendamiseks madalates doosides antibiootikume. Hiinlaste läbiviidud uuringus otsiti sellele efektile seletust. Leiti, et antibiootikumide madala doosi manustamine hiirtele põhjustab märkimisväärseid muutusi mikrobioomis ning süsivesikute, lipiidide ja kolesterooli metabolismis. (Cho et al., 2012) Katsed mõnenädalastel hiirtel on selgelt näidanud, et antibiootikumide tarbimine põhjustab nihet Th1/Th2 tasakaalus Th2 suunas, soodustades seega atopia teket. Probiootikumide manustamine antibiootikumikuuri järgselt võib aga parandada soole mikrobiootat ja hoida seeläbi ära Th2 nihke. (Sudo et al., 2002)

Antibiootikumid suurendavad ka soole põletikku. On leitud, et Metronidazole soodustab limaskesta õhenemist, mis suurendab kontakti soole epiteeli rakkude ja mikroobide vahel, mis võimendab immuunsuse stimulatsiooni ja põletikku. (Wlodarska et al., 2011)

Antibiootikumid vähendavad soole mikroobide mitmekesisust, mistõttu ei teki kõikide tavaliste soolebakterite vastu õigeid antikehi ning nendega hiljem kokkupuutudes võib immuunsüsteem üle reageerida (Vangay et al., 2015).

- **Vaginaalne sünnitus vs keisrilõige**

Vaginaalselt sündinud vastsündinute mikrobioota sarnaneb ema vaginaalsele ja fekaalsele mikrobiootale (laktobatsillid ja bifidobakterid), keisrilõikega vastsündinute puhul pärinevad esimesed mikroobid aga ema nahalt ja haigla keskkonnast. Vaginaalselt sündinud imikud on suurema tõenäosusega koloniseeritud bifidobakterite ja bakteroidide poolt ning keisrilõikega sündinud imikud klostriidia ja streptokokkide poolt (Salminen et al., 2004, Penders et al., 2006, Fallani et al., 2010) ning keisrilõikega sündinud laste mikrobioota mitmekesisus on madalam (Rodriguez et al., 2015).

Keisrilõige muudab soole mikrobioota arengumustrit. Isegi seitsmeaastasena erineb keisrilõikega sündinud laste mikrobioota vaginaalselt sündinud laste omast (Salminen et al., 2004). Piloottuuringus, kus ema vaginaalne kooslus kanti üle keisrilõikega sündinud vastsündinutele, sarnanes mikrobioom vaginaalselt sündinud imikute omaga juba 1-kuuselt (Dominguez-Bello et al., 2016).

Vaginaalne sünnitus soodustab ka erinevate tsütokiinide¹ tootmist, mis mõjutavad vastsündinu immuunsuse arengut (Malamitsi-Puchner et al., 2005).

Keisrilõikega lastel on täheldatud kõrgemat riski immuunhäirete, nagu allergiline nohu, astma ja tsöliaakia, tekkeks (Decker et al., 2010, Neu and Rushing, 2011). Metaboolsete ja immuunsusega seotud haiguste esinemissagedus maailmas aina kasvab, sh dramaatiliselt kõrge tõusuga imikute seas. See tõus võib olla seotud keisrilõikega sünnituste sagenemisega, mis on kasvanud oluliselt üle WHO poolt soovitatud 15 %. (Rodriguez et al., 2015)

- **Rinnapiim vs kunsttoit**

On leitud, et rinnaga toidetud imikute mikrobiotas domineerivad bifidobakterid, kunsttoidul olevatel imikutel aga kolibakterid, bakteroidid, klostriidia ja laktobatsillid (Penders et al., 2006, Fallani et al., 2010). Kõrge kolibakteri tase on iseloomulik toiduallergiaga imikutele ning suurendab ekseemi tekke riski (Penders et al., 2007, Brown et al., 2012). Klostriidia kõrget taset on seostatud tundlikkusega kunsttoidu suhtes, ärritunud soole sündroomiga, viliseva hingamisega, ekseemiga ja atoopilise dermatiidiga (Bjorksten, 2001, Penders et al., 2007, Brown et al., 2012). Bakteroidide kõrget taset on seostatud tüüp 1 diabeediga (Murri et al., 2013, Mejía-León et al., 2014).

Kuuendaks elupäevaks on rinnaga toidetud beebide mikrobiotas bifidobaktereid 1000x rohkem kui enterobaktereid, kuid kunsttoidul olevatel lastel ületab enterobakterite hulk 10x bifidobakterite hulga (Yoshioka et al., 1983). Enterobakterid (kolibakter, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Yersinia* jm) on potentsiaalsed haiguste tekitajad.

Rinnaga toidetud lastel on B vitamiinide tootmine mikrobiota poolt kõrgem (Bäckhed et al., 2015).

Rinnapiim mängib ka mitmeid täiendavaid rolle imiku soole mikrobiota ja immuunsüsteemi kujunemisel. Nende hulka kuulub prebiootiline toime – piimas olevad toitained soodustavad teatud tüüpi bakterite kasvu. Rinnapiima peamised komponendid, oligosahhariidid, seeduvad peensooles vaid osaliselt, peamine osa neist fermenteeritakse koolonis bifidobakterite poolt lühikese ahelaga rasvhapeteks. Rinnapiim soodustab seeläbi selektiivselt bifidobakterite rikka mikrobiota teket. (Coppa et al., 2004) Lisaks sellele sisaldab rinnapiim antimikroobseid aineid,

¹ Tsütokiinid vahendavad lühiajaliselt ja lokaalselt erinevaid bioloogilisi toimeid ja rakkudevahelist informatsiooni. Tsütokiinid reguleerivad immuunrakkude kasvu, diferentseerumist, aktivatsiooni ja immuunvastust.

põletikuvastaseid aineid ning mitmeid faktoreid, mis moduleerivad ja soodustavad vastsündinu immuunsüsteemi küpsemist (Blewett et al., 2008).

Sarnaselt emakasisesele keskkonnale, peeti ka rinnapiima vanasti steriilseks, kuid mitmed uuringud on näidanud, et rinnapiimas leidub baktereid (Collado et al., 2009, Martin et al., 2009, Jost et al., 2013). Rinnapiimast on muuhulgas isoleeritud järgmised bakterid: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Veillonella*, *Leptotrichia* ja *Prevotella* (Francino et al., 2014).

Rinnapiimas on palju faktoreid (immunoglobuliinid, glükoproteiinid, glükolipiidid ja antimikroobsed peptiidid), mis võivad mõjutada, kuidas imiku immuunrakud reageerivad mikroobsetele komponentidele (Vidal and Donnet-Hughes, 2008). Rinnapiimas olevad bakterid on varased soole koloniseerijad ning lisaks õpetavad need imiku immuunsüsteemi tegema vahet, milliseid baktereid käsitleda normaalsete mikrofloora liikmetena ja milliseid ohumärgina. Rinnaga toidetud imikutel esineb vähem infektsioone ja neil on madalam risk autoimmuunhaiguste (reumatoidartriit, tsöliaakia, tüüp 1 diabeet) tekkeks. (Blewett et al., 2009)

- **Tahke toiduga alustamine**

Tahke toidu tutvustamise mõju imiku mikrobiotale ei ole veel eriti põhjalikult uuritud, kuid mõningad uuringud on näidanud, et mikroobne koostis muutub oluliselt nii tahke toidu tutvustamise perioodil kui rinnapiima lõppemisel. Värsketel uuringute põhjal arvatakse, et täiskasvanuliku mikrobiota kujunemise peamiseks käivitajaks on pigem rinnaga toitumise lõpetamine kui tahke toiduga alustamine. (Laursen et al., 2017)

330 Taani last hõlmavas uuringus leiti, et laktobatsillide, bifidobakterite, enterokokkide ja enterobakterite tase langes ning *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* ja *Bacteroidaceae* tase tõusis 9 ja 18 kuu vahel, mil tavaliselt minnakse üle piimal põhinevalt dieedilt tahkele toidule (Bergström et al., 2014). Sarnane trend ilmnis ka teises Euroopas läbiviidud uuringus (5 riiki ja 531 imikut hõlmav), kus võrreldi mikrobiota koostist 6 nädalasena ja 4 nädalat peale tahke toidu tutvustamist. Nähti langust bifidobakterite, enterobakterite ja klostriidia hulgas ning tõusu *Ruminococcaceae* ja *Lachnospiraceae* tasemes. (Fallani et al., 2011)

Vaid rinnapiima saavate imikute mikrobiota mitmekesisus on madal ning domineerivaks on bifidobakterid. Tahke toidu tutvustamine ja peretoidule üleminek suurendab soole mikroobset mitmekesisust ja täiskasvanutele iseloomulikud mikroobid hakkavad rohkem võimust võtma. Arvatakse, et see on normaalne ja tervislik soole mikrobiota arenguetapp. Hetkel ei ole aga selge, milline on optimaalne iga mikroobse

mitmekesisuse suurenemiseks mikrobioota arengu, immuunsuse küpsemise ja hilisema tervise seisukohast. (Laursen et al., 2017)

Tahke toidu tutvustamist ei ole siiski mõistlik alustada enne 6. elukuud, kuna alates sellest ajast suureneb bakteroidide osakaal mikrobiootas, mille järgselt on mikrobioota võimeline taimseid süsivesikuid ja kehavõõraid aineid (ksenobiootikume) lagundama ning vitamiine sünteesima (Koenig et al., 2011).

Koolikud

Häirunud soole mikrobioota võib tekitada beebidele ka koheseid probleeme. Kuni veerandil imikutest esineb koolikuid: ülearune ja lohutamatu nutt esimestel elukuudel. 5-10%-l juhtudest leitakse põhjus (näit. lehmapiimatalumatus), kuid enamikel juhtudest jääb põhjus teadmata. (de Weerth et al., 2013) On välja pakutud, et koolikute näol võib olla tegemist soole valu ja põletikuga, mida põhjustab varane patogeensete bakterite kõrge tase ning laktobatsillide ja bifidobakterite alanenud tase (de Weerth et al. 2013).

Teadusuuringud on näidanud, et koolikutega imikutel on mikrobioota mitmekesisus märgatavalt madalam võrreldes imikutega, kellel koolikuid ei esine. Koolikutega beebide mikrobiootas on proteobakterite (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Vibrio*, *Yersinia* ja *Pseudomonas*) osakaal rohkem kui 2x suurem, ning bifidobakterite ja laktobatsillide tase oluliselt madalam võrreldes tervete beebidega (Savino et al., 2004, de Weerth et al., 2013). On leitud, et mida väiksem on bifidobakterite ja laktobatsillide proportsioon kogu bakterite hulgas, seda rohkem esineb beebidel nutmist ja rahulolematust esimese kolme elukuu jooksul (Pärty et al., 2013).

Itaalias 589 imikut hõlmavas uuringus leiti, et laktobatsillide manustamine vastsündinutele esimesed kolm kuud vähendas koolikute ja toidu tagasiheite esinemist. Kolmekuusena oli keskmine nutu aeg 38 vs 71 minutit (probiootikume saav grupp vs platseebo), tagasiheidete arv päevas 2,9 vs 4,6. (Indrio et al., 2014)

Koolikutega imikute väljaheites on tervete imikutega võrreldes rohkem gaase moodustavaid koliforme ning kalprotektiini² tase on 2x kõrgem (Rhoads et al., 2009, Savino et al., 2009).

² Kalprotektiini kõrge tase näitab soole põletikku.

Kasutatud kirjandus

Aceti, A., Gori, D., Barone, G., Callegari, M. L., Di Mauro, A., Fantini, M. P., ... & Zuccotti, G. (2015). Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants: systematic review and meta-analysis. *Italian journal of pediatrics*, *41*(1), 89.

Arboleya, S., Binetti, A., Salazar, N., Fernández, N., Solís, G., Hernández-Barranco, A., ... & Gueimonde, M. (2012). Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS microbiology ecology*, *79*(3), 763-772.

Björkstén, B., Sepp, E., Julge, K., Voor, T., & Mikelsaar, M. (2001). Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *Journal of allergy and clinical immunology*, *108*(4), 516-520.

Blewett, H. J. H., Cicalo, M. C., Holland, C. D., & Field, C. J. (2008). The immunological components of human milk. *Advances in food and nutrition research*, *54*, 45-80.

Brown, K., DeCoffe, D., Molcan, E., & Gibson, D. L. (2012). Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients*, *4*(8), 1095-1119.

Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., ... & Khan, M. T. (2015). Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell host & microbe*, *17*(5), 690-703.

Cho, I., Yamanishi, S., Cox, L., Methé, B. A., Zavadil, J., Li, K., ... & Li, H. (2012). Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*, *488*(7413), 621-626.

Collado, M. C., Delgado, S., Maldonado, A., & Rodríguez, J. M. (2009). Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Letters in applied microbiology*, *48*(5), 523-528.

Coppa, G. V., Bruni, S., Morelli, L., Soldi, S., & Gabrielli, O. (2004). The first prebiotics in humans: human milk oligosaccharides. *Journal of clinical gastroenterology*, *38*, S80-S83.

de Weerth, C., Fuentes, S., Puylaert, P., & de Vos, W. M. (2013). Intestinal microbiota of infants with colic: development and specific signatures. *Pediatrics*, *131*(2), e550-e558.

de Weerth, C., Fuentes, S., & de Vos, W. M. (2013). Crying in infants: On the possible role of intestinal microbiota in the development of colic. *Gut Microbes*, *4*(5), 416-421.

Decker, E., Engelmann, G., Findeisen, A., Gerner, P., Laaß, M., Ney, D., ... & Hornef, M. W. (2010). Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children. *Pediatrics*, *125*(6), e1433-e1440.

Deshpande, G., Rao, S., Patole, S., & Bulsara, M. (2010). Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *Pediatrics*, *125*(5), 921-930.

Dominguez-Bello, M. G., De Jesus-Laboy, K. M., Shen, N., Cox, L. M., Amir, A., Gonzalez, A., ... & Mendez, K. (2016). Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nature medicine*, *22*(3), 250-253.

Fallani, M., Young, D., Scott, J., Norin, E., Amarri, S., Adam, R., ... & Doré, J. (2010). Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, *51*(1), 77-84.

Fouhy, F., Guinane, C. M., Hussey, S., Wall, R., Ryan, C. A., Dempsey, E. M., ... & Cotter, P. D. (2012). High-throughput sequencing reveals the incomplete, short-term recovery of infant gut microbiota following parenteral antibiotic treatment with ampicillin and gentamicin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *56*(11), 5811-5820.

Francino, M. P. (2014). Early development of the gut microbiota and immune health. *Pathogens*, *3*(3), 769-790.

Gosalbes, M. J., Llop, S., Valles, Y., Moya, A., Ballester, F., & Francino, M. P. (2013). Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clinical & Experimental Allergy*, *43*(2), 198-211.

Grönlund, M. M., Arvilommi, H., Kero, P., Lehtonen, O. P., & Isolauri, E. (2000). Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0–6 months. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*, *83*(3), F186-F192.

Houghteling, P. D., & Walker, W. A. (2015). Why is initial bacterial colonization of the intestine important to the infant's and child's health?. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, *60*(3), 294.

Indrio, F., Di Mauro, A., Riezzo, G., Civardi, E., Intini, C., Corvaglia, L., ... & Del Vecchio, A. (2014). Prophylactic use of a probiotic in the prevention of colic, regurgitation, and functional constipation: a randomized clinical trial. *JAMA pediatrics*, *168*(3), 228-233.

- Jędrychowski, W., Gałaś, A., Whyatt, R., & Perera, F. (2006). The prenatal use of antibiotics and the development of allergic disease in one year old infants. A preliminary study. *International journal of occupational medicine and environmental health*, 19(1), 70-76.
- Jiménez, E., Marín, M. L., Martín, R., Odriozola, J. M., Olivares, M., Xaus, J., ... & Rodríguez, J. M. (2008). Is meconium from healthy newborns actually sterile?. *Research in microbiology*, 159(3), 187-193.
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C., & Chassard, C. (2013). Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *British Journal of Nutrition*, 110(7), 1253-1262.
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., ... & Ley, R. E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4578-4585.
- Koren, O., Goodrich, J. K., Cullender, T. C., Spor, A., Laitinen, K., Bäckhed, H. K., ... & Bäckhed, F. (2012). Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell*, 150(3), 470-480.
- Kozyrskyj, A. L., Ernst, P., & Becker, A. B. (2007). Increased risk of childhood asthma from antibiotic use in early life. *CHEST Journal*, 131(6), 1753-1759.
- Laursen, M. F., Bahl, M. I., Michaelsen, K. F., & Licht, T. R. (2017). First Foods and Gut Microbes. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Petito, V., & Gasbarrini, A. (2013). Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut pathogens*, 5(1), 23.
- Malamitsi-Puchner, A., Protonotariou, E., Boutsikou, T., Makrakis, E., Sarandakou, A., & Creatsas, G. (2005). The influence of the mode of delivery on circulating cytokine concentrations in the perinatal period. *Early human development*, 81(4), 387-392.
- Marra, F., Marra, C. A., Richardson, K., Lynd, L. D., Kozyrskyj, A., Patrick, D. M., ... & FitzGerald, J. M. (2009). Antibiotic use in children is associated with increased risk of asthma. *Pediatrics*, 123(3), 1003-1010.
- Martín, R., Jiménez, E., Heilig, H., Fernández, L., Marín, M. L., Zoetendal, E. G., & Rodríguez, J. M. (2009). Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Applied and environmental microbiology*, 75(4), 965-969.

Matamoros, S., Gras-Leguen, C., Le Vacon, F., Potel, G., & de La Cochetiere, M. F. (2013). Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends in microbiology*, *21*(4), 167-173.

McKeever, T. M., Lewis, S. A., Smith, C., Collins, J., Heatlie, H., Frischer, M., & Hubbard, R. (2002). Early exposure to infections and antibiotics and the incidence of allergic disease: a birth cohort study with the West Midlands General Practice Research Database. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *109*(1), 43-50.

Mejía-León, M. E., Petrosino, J. F., Ajami, N. J., Domínguez-Bello, M. G., & de La Barca, A. M. C. (2014). Fecal microbiota imbalance in Mexican children with type 1 diabetes. *Scientific reports*, *4*, 3814.

Moles, L., Gómez, M., Heilig, H., Bustos, G., Fuentes, S., de Vos, W., ... & Jiménez, E. (2013). Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PloS one*, *8*(6), e66986.

Murri, M., Leiva, I., Gomez-Zumaquero, J. M., Tinahones, F. J., Cardona, F., Soriguer, F., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC medicine*, *11*(1), 46.

Neu, J., & Rushing, J. (2011). Cesarean versus vaginal delivery: long-term infant outcomes and the hygiene hypothesis. *Clinics in perinatology*, *38*(2), 321-331.

Penders, J., Thijs, C., van den Brandt, P. A., Kummeling, I., Snijders, B., Stelma, F., ... & Stobberingh, E. E. (2007). Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut*, *56*(5), 661-667.

Pärty, A., Kalliomäki, M., Endo, A., Salminen, S., & Isolauri, E. (2012). Compositional development of Bifidobacterium and Lactobacillus microbiota is linked with crying and fussing in early infancy. *PloS one*, *7*(3), e32495.

Rhoads, J. M., Fatheree, N. Y., Norori, J., Liu, Y., Lucke, J. F., Tyson, J. E., & Ferris, M. J. (2009). Altered fecal microflora and increased fecal calprotectin in infants with colic. *The Journal of pediatrics*, *155*(6), 823-828.

Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., ... & Marchesi, J. R. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial ecology in health and disease*, *26*(1), 26050.

Salminen, S., Gibson, G. R., McCartney, A. L., & Isolauri, E. (2004). Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut*, *53*(9), 1388-1389.

Savino, F., Cresi, F., Pautasso, S., Palumeri, E., Tullio, V., Roana, J., ... & Oggero, R. (2004). Intestinal microflora in breastfed colicky and non-colicky infants. *Acta paediatrica*, 93(6), 825-829.

Savino, F., Cordisco, L., Tarasco, V., Calabrese, R., Palumeri, E., & Matteuzzi, D. (2009). Molecular identification of coliform bacteria from colicky breastfed infants. *Acta Paediatrica*, 98(10), 1582-1588.

Sherman, M. P. (2010). New concepts of microbial translocation in the neonatal intestine: mechanisms and prevention. *Clinics in perinatology*, 37(3), 565-579.

Sjögren, Y. M., Jenmalm, M. C., Böttcher, M. F., Björkstén, B., & Sverremark-Ekström, E. (2009). Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. *Clinical & Experimental Allergy*, 39(4), 518-526.

Sjögren, Y. M., Tomcic, S., Lundberg, A., Böttcher, M. F., Björkstén, B., Sverremark-Ekström, E., & Jenmalm, M. C. (2009). Influence of early gut microbiota on the maturation of childhood mucosal and systemic immune responses. *Clinical & Experimental Allergy*, 39(12), 1842-1851.

Sudo, N., Yu, X. N., Aiba, Y., Oyama, N., Sonoda, J., Koga, Y., & Kubo, C. (2002). An oral introduction of intestinal bacteria prevents the development of a long-term Th2-skewed immunological memory induced by neonatal antibiotic treatment in mice. *Clinical & Experimental Allergy*, 32(7), 1112-1116.

Tanaka, S., Kobayashi, T., Songjinda, P., Tateyama, A., Tsubouchi, M., Kiyohara, C., ... & Nakayama, J. (2009). Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 56(1), 80-87.

Vangay, P., Ward, T., Gerber, J. S., & Knights, D. (2015). Antibiotics, pediatric dysbiosis, and disease. *Cell host & microbe*, 17(5), 553-564.

Vidal, K., & Donnet-Hughes, A. (2008). CD14: a soluble pattern recognition receptor in milk. In *Bioactive Components of Milk* (pp. 195-216). Springer New York.

Wlodarska, M., Willing, B., Keeney, K. M., Menendez, A., Bergstrom, K. S., Gill, N., ... & Finlay, B. B. (2011). Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Infection and immunity*, 79(4), 1536-1545.

Yoshioka, H., Iseki, K. I., & Fujita, K. (1983). Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics*, 72(3), 317-321.