

# Factores que influyen en el desarrollo de la microbiota

7

*S. Arboleya Montes, S. Delgado Palacio, M. Gueimonde Fernández*

## PUNTOS CLAVE

1. La interacción microbiota-hospedador en etapas tempranas de la vida resulta esencial para la posterior salud del individuo.
2. El establecimiento y desarrollo de la microbiota intestinal en el recién nacido se ve afectado por diversos factores pre, peri y postnatales.
3. La edad gestacional, el tipo de parto y la lactancia ejercen una fuerte influencia sobre el desarrollo de la microbiota.
4. La exposición pre- y postnatal a antibióticos afecta al proceso de desarrollo de la microbiota en el niños, el impacto de otras intervenciones médicas en etapas tempranas de la vida no es aún bien conocido.

## ESTABLECIMIENTO Y DESARROLLO DE LA MICROBIOTA EN EL NEONATO. IMPORTANCIA PARA LA POSTERIOR SALUD

La evidencia científica acumulada en los últimos años permite afirmar que el establecimiento y desarrollo de la microbiota intestinal resulta clave para la salud y bienestar del niño, y posteriormente del adulto. Esta evidencia subraya que la exposición perinatal a microorganismos, especialmente los primeros pasos de colonización microbiana, tienen un papel esencial en el desarrollo del individuo. Tradicionalmente se creía que los fetos eran estériles y que la exposición del recién nacido a los microorganismos se iniciaba durante el parto tras la rotura de la bolsa amniótica. Sin embargo, se ha demostrado la existencia de microorganismos en tejidos y muestras prenatales en condiciones normales, indicando que la exposición se inicia, aunque a pequeña escala, antes del parto. No obstante, es tras el nacimiento cuando el proceso de colonización microbiana se hace más intenso. Esta colonización proporciona un enorme estímulo antigénico que resulta necesario

para una maduración adecuada del sistema inmune del recién nacido, siendo el periodo neonatal temprano el momento más importante en este sentido. Estudios con diversos modelos animales libres de gérmenes han demostrado que la ausencia de microbiota durante este periodo inicial impide que se alcance la correcta homeostasis fisiológica. Cuando a estos animales, carentes de microorganismos, se les restablece la microbiota durante etapas tempranas de la vida se consigue restaurar también la posterior homeostasis. Sin embargo, esto no se logra si el restablecimiento de la microbiota tiene lugar en etapas posteriores de la vida, subrayando la importancia de la interacción microbiota-hospedador en el periodo neonatal.

Las alteraciones en el proceso de desarrollo de la microbiota durante este período inicial pueden aumentar el riesgo de padecer enfermedades, así por ejemplo se ha observado que alteraciones en la microbiota del niño preceden a la aparición de manifestaciones clínicas como el eczema atópico o al desarrollo de la obesidad. Incluso hay estudios recientes que sugieren que los efectos

de la microbiota intestinal alcanzan al sistema nervioso central y el cerebro. Por lo tanto, los primeros estadios de la vida infantil constituyen una oportunidad única para la modulación de la microbiota hacia el establecimiento de un perfil microbiano saludable en el individuo. Desafortunadamente, la existencia de una elevada variabilidad inter-individual, así como la variabilidad genética y ambiental (incluyendo la dieta) presente en diferentes poblaciones humanas, hace complicado definir qué composición microbiana constituye una “microbiota saludable”. Además, estudios recientes indican que la microbiota del niño está más conservada a nivel funcional que a nivel de composición microbiana, al igual que sucede en adultos. Dada la falta de una definición adecuada de “microbiota saludable”, la composición de la microbiota del niño nacido sano, a término, vaginalmente y alimentado exclusivamente con leche materna se ha considerado el estándar y un objetivo a alcanzar para el desarrollo de fórmulas infantiles. Pese a ello, diversos estudios han mostrado diferencias en la composición de la microbiota intestinal de niños con estas características (término, sanos, nacidos vaginalmente y alimentados exclusivamente con leche materna) de diferentes localizaciones geográficas, lo que sugiere que dicho estándar de “microbiota saludable” puede variar en su composición en función del marco genético y ambiental del que se trate.

El proceso de colonización intestinal del recién nacido comienza con microorganismos anaerobios facultativos y aerotolerantes, como estafilococos, estreptococos, lactobacilos, enterococos y enterobacterias, que contribuyen a la creación de un ambiente adecuado para el desarrollo posterior de las poblaciones microbianas anaeróbicas estrictas, que incluyen microorganismos característicos como las bifidobacterias. En general, pese a la elevada variabilidad inter-individual existente, se puede decir que durante los primeros meses de vida la microbiota del niño está dominada por los filos Actinobacteria y Proteobacteria, en contraste con el predominio de Bacteroidetes y Firmicutes observado en adultos. El proceso de colonización inicial y el posterior desarrollo de la microbiota intestinal se ven afectados, como se discutirá más adelante, por numerosos factores,

tanto pre como postnatales. Los efectos sobre la microbiota de algunos de estos factores, como la edad gestacional, el tipo de parto o el tipo de lactancia del recién nacido, han sido estudiados con detalle. Sin embargo, aún se sabe poco sobre el impacto que otros factores, como la hospitalización, administración de medicamentos (antibióticos, vacunas, etc.) o el entorno geográfico y familiar, puedan tener sobre el establecimiento de la microbiota en el neonato.

Como se ha indicado anteriormente, las fases iniciales de la vida, cuando la microbiota está estableciéndose y el niño está aún madurando, pueden representar la ventana de oportunidad para la modulación de la microbiota. En estas etapas la microbiota, así como el establecimiento de la respuesta inmune, es aún inestable lo que la hace más susceptible a modulación. Más tarde, tras el destete, la complejidad y la diversidad de la microbiota aumentarán rápidamente, alcanzando la composición de un adulto a la edad de 2-3 años.

## FACTORES DETERMINANTES DEL DESARROLLO DE LA MICROBIOTA

Además de por los propios factores genéticos del individuo, la colonización y establecimiento de la microbiota intestinal se ve influenciada por diferentes factores, tanto de origen prenatal como de desarrollo posterior. Algunos de estos factores han sido estudiados con cierta profundidad, si bien el potencial efecto de otros es aún desconocido.

### Fondo genético

La microbiota intestinal es altamente variable entre individuos, sin embargo se han observado mayores similitudes entre personas con relaciones de parentesco que entre individuos no relacionados. Dichas similitudes podrían deberse a la influencia de la dieta o factores ambientales compartidos, pero también podrían reflejar una influencia del fondo genético del hospedador. Con el objetivo de resolver esta cuestión se han realizado estudios con niños gemelos y familiares. Trabajos llevados a cabo en diferentes países han demostrado mayor similitud en la composición de la microbiota intestinal entre gemelos mono-

cigóticos que en dicigóticos, y entre familiares respecto a individuos no relacionados. De un modo similar, en un estudio con hermanos trillizos dicoriónicos, compuestos por un par de gemelos monocigóticos y un hermano fraternal, se observó una mayor similitud entre los gemelos respecto al hermano fraternal durante las primeras semanas de vida, mostrando un claro efecto genético. Sin embargo, hay que señalar que al año de vida dichas diferencias habían desaparecido indicando que en ese momento los factores ambientales son el principal determinante en la composición microbiana.

También se ha observado que variaciones en genes relacionados con el metabolismo o el sistema inmune afectan a la composición y/o funcionalidad de la microbiota. Por otra parte, los factores genéticos del individuo juegan un papel primordial en la regulación de las secreciones intestinales, la motilidad del intestino y la superficie del epitelio celular, lo que sin duda afecta a la composición de la microbiota intestinal.

Por tanto, existen evidencias claras que confirman la influencia de factores genéticos en la composición y establecimiento de la microbiota intestinal; incluso se han observado mutaciones puntuales que pueden modificar dicha composición. Sin embargo, aún es difícil establecer una interacción directa entre dichos componentes debido a la gran influencia de la dieta, el ambiente o los factores maternos. Por ello, son necesarios más estudios para comprender claramente los mecanismos de interacción entre la microbiota y el genotipo humano.

### Factores prenatales

La principal contribución a la génesis de la microbiota es la transmisión directa desde la madre. Como se ha indicado en la introducción, tradicionalmente se había considerado que la primera exposición del recién nacido al ambiente microbiano ocurría durante el parto. La cavidad amniótica se consideraba estéril; sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto la existencia de microorganismos en líquido amniótico y placenta en condiciones normales. También se ha demostrado la presencia de bacterias en el meconio, lo que sugiere que dichas bacterias po-

drían tener un origen intrauterino y, por lo tanto, la influencia materno-filial en la adquisición de la microbiota podría comenzar ya en la etapa prenatal. En cualquier caso, el nacimiento implicará un cambio drástico para el neonato que pasa de un ambiente con reducida carga microbiana a un ambiente cargado de millones de microorganismos, por lo que el contacto microbiano antes del nacimiento podría conllevar la impresión de un fenotipo inmune y una microbiota descendiente, preparándose de este modo, para el principal inóculo que será transferido durante el parto y la posterior lactancia.

Se ha observado que el embarazo conlleva cambios a todos los niveles en el organismo de la mujer, incluyendo también a la microbiota. A lo largo de la gestación se producen variaciones tanto en la microbiota de la vagina como en la intestinal. Aunque su implicación no está aún claramente definida, estos cambios en la composición de la microbiota parecen ser parte de una respuesta adaptativa para proporcionar al neonato un primer y específico inóculo microbiano/antigénico. Por lo tanto, diferentes factores externos, como el estrés o el tabaquismo durante el embarazo, podrían afectar a la composición de ese primer inóculo. El estrés durante el embarazo produce cambios hormonales que influyen sobre la microbiota de la madre, lo que puede traducirse en el traspaso de una microbiota alterada de la madre al niño en el ambiente intrauterino o durante/después del nacimiento. Estudios preliminares en modelos animales han observado una reducción en los niveles de lactobacilos y bifidobacterias en heces de recién nacidos de madres sometidas a estrés durante la gestación. El tabaquismo también parece tener influencia ya que los niños de madres fumadoras tienen mayor riesgo de padecer enfermedad intestinal inflamatoria, posiblemente por la adquisición de una microbiota aberrante, puesto que se ha observado que el cese del tabaquismo conlleva un decremento de Proteobacterias y un aumento de Actinobacterias.

La edad gestacional también resulta determinante para la correcta colonización y establecimiento de la microbiota intestinal. La última etapa del embarazo es clave para la maduración

del feto por lo que los niños prematuros, aún inmaduros, ven comprometido el desarrollo de una microbiota sana. Son muchos los factores pre y postnatales que juegan en contra del establecimiento de una microbiota adecuada en el niño prematuro: inmadurez del intestino, sistema inmune y cerebro; alta incidencia de nacimientos por cesárea, elevada frecuencia de tratamientos con antibióticos y otros medicamentos, oxígeno-terapia, alimentación parenteral y retraso en el comienzo de la alimentación enteral, problemas para el inicio de la alimentación con leche materna, etc. Todos estos factores, conjuntamente, contribuyen a la adquisición de una microbiota intestinal aberrante con las potenciales consecuencias a corto y largo plazo que esto implica. Varios estudios han señalado que los niños prematuros tienen una reducida diversidad microbiana unida a un retraso en la colonización por microorganismos anaerobios estrictos y una elevada colonización por microorganismos potencialmente patógenos. Además, los niños prematuros son inmunodeprimidos, lo que unido a la deficiente microbiota y una función barrera del intestino inmadura, los hace más proclives a enfermedades como la enterocolitis necrotizante (ECN) o sepsis, lo que conlleva un alto porcentaje de mortalidad en las primeras semanas de vida.

El uso prenatal de antibióticos es otro factor que ha demostrado afectar al proceso de establecimiento de la microbiota. La ingesta de antibióticos durante la gestación, especialmente hacia el final de la misma, ejerce un gran efecto produciendo un retraso en la posterior colonización del neonato por microorganismos beneficiosos, como bifidobacterias y lactobacilos, y un incremento en la colonización por microorganismos potencialmente patógenos como algunas enterobacterias. El uso de antibióticos durante la gestación también ha sido relacionado con un menor peso al nacer y un mayor riesgo de desarrollar eczema u obesidad. Una práctica muy extendida es el uso de antibióticos durante el parto, principalmente debido a la ruptura prematura de las membranas o a la existencia de colonización vaginal por estreptococos del grupo B, aunque en muchos casos se administran también en otras situaciones en las que se sospecha un riesgo de sepsis. Sin

embargo, un estudio reciente ha demostrado que dicha práctica tiene un efecto sobre la microbiota del recién nacido igual, o incluso más drástico, que la administración de antibióticos directamente a los niños durante los primeros días de vida. En este sentido son necesarios más estudios para llegar a comprender el efecto que tiene la administración de antibióticos en las primeras etapas de la vida sobre el establecimiento de la microbiota y sus consecuencias tanto en términos de incremento del posterior riesgo de enfermedad, como en la creación de reservorios de genes de resistencia en la microbiota, con la amenaza que esto supone para el éxito de tratamientos de enfermedades infecciosas en el futuro.

Numerosos estudios han demostrado que la adquisición de la microbiota intestinal es distinta si el nacimiento se produce por parto natural o por cesárea. En el caso del parto vaginal durante el tránsito por el canal del parto el niño adquiere bacterias procedentes de la microbiota vaginal e intestinal de la madre. Sin embargo, en los niños nacidos por cesárea la principal fuente de bacterias es el ambiente hospitalario, incluyendo el instrumental, los equipos y el personal médico. La composición microbiana intestinal en neonatos sanos nacidos a término es, por tanto, diferente en función del nacimiento; con un mayor predominio de lactobacilos en las primeras horas de vida cuando se produce parto vaginal, y dominancia de los estafilococos en las muestras de los niños nacidos por cesárea.

### Factores postnatales

De entre los factores postnatales que afectan al desarrollo de la microbiota el tipo de alimentación del recién nacido es el más extensamente estudiado. Numerosos trabajos han confirmado los beneficios a corto y largo plazo de la lactancia materna, en términos de establecimiento de microbiota intestinal y salud, frente al uso de fórmulas infantiles. La leche materna juega un papel muy importante en la composición y desarrollo de la microbiota intestinal, no solo por el aporte de oligosacáridos con efecto prebiótico, sino porque constituye una fuente constante de bacterias mutualistas o potencialmente probióticas para el intestino del lactante, siendo particularmente rica

en estafilococos, bacterias lácticas, corinebacterias, propionibacterias y bifidobacterias. A pesar de ello, existe gran variabilidad interindividual, de tal manera que la leche de cada mujer tiene una composición bacteriana específica, a modo de huella dactilar, de forma análoga a lo que sucede con la microbiota intestinal de niños y adultos. La microbiota intestinal de niños amamantados parece ser más estable, con dominancia de bifidobacterias y presencia de niveles bajos de microorganismos potencialmente patógenos como *Escherichia coli* o *Clostridium difficile*, en comparación con la de los niños alimentados con leche de fórmula, que presentan una microbiota más diversa y más parecida a la de los adultos.

Otro momento clave en el proceso de desarrollo de la microbiota intestinal es el periodo de destete del niño. La introducción de alimentos sólidos produce grandes cambios en la composición de la microbiota intestinal infantil y conduce a una composición microbiana estable, con dominancia de grupos microbianos similares a los del adulto, aproximadamente a los 2-3 años de edad. Con la introducción de alimentos sólidos se incrementan los Bacteroidetes y Firmicutes. El aumento progresivo tanto en la concentración de microorganismos como en el número de especies conduce a un rápido enriquecimiento tanto en diversidad microbiana como en la cantidad de genes funcionales de origen microbiano presentes en el ecosistema intestinal.

Por otra parte, al igual que sucede en la etapa prenatal, la administración de antibióticos supone la modificación de la composición de la microbiota del niño. El impacto de la exposición a antibióticos sobre el patrón de colonización durante los primeros años de vida es un tema de notable interés. Los efectos negativos de la antibioterapia en la composición de la microbiota se han puesto de manifiesto en varios estudios, observándose reducción de la diversidad y pérdida de bacterias beneficiosas, lo que puede conllevar un mayor riesgo de desarrollar enfermedades a medio y largo plazo.

Otros factores con influencia en el desarrollo de la microbiota intestinal son los relacionados con el ambiente postnatal. Por ejemplo, la estancia del niño en el ambiente hospitalario, fre-

cuentemente asociada al uso de medicamentos, conlleva mayor riesgo de infecciones y se ha relacionado con un incremento de la colonización por *C. difficile* que parece asociado a cambios en la composición de la microbiota. El ambiente de las unidades de cuidados intensivos neonatales y los frecuentes tratamientos profilácticos con antibióticos de amplio espectro predisponen a sufrir infecciones nosocomiales. De modo similar, otro de los factores relacionados con el ambiente postnatal que cabe destacar es la estructura familiar. En este sentido la existencia de hermanos y/o la presencia de animales en el entorno familiar resultan beneficiosos y tienen influencia en la composición de la microbiota intestinal, posiblemente en relación con la “hipótesis de la higiene”. Según esta teoría, los niños que disfrutaran de ambientes con un elevado nivel de higiene no están sometidos a una estimulación microbiana suficiente. Este hecho modifica la composición de la microbiota intestinal, y por tanto, la modulación y maduración del sistema inmunitario neonatal. Es necesario también tener en cuenta que tanto la dieta como el contacto madre-hijo o la estructura familiar están fuertemente condicionados por la localización geográfica y las costumbres de cada lugar. Así, varios estudios han observado diferencias en la composición microbiana intestinal entre cohortes de niños de iguales características pero procedentes de ambientes o localizaciones geográficas diferentes.

Como conclusión se puede decir que en el correcto desarrollo de la microbiota intestinal en el periodo postnatal influyen numerosos factores, unos de la madre y otros del ambiente. Probablemente la madre representa el factor más influyente, debido al contacto íntimo que se establece entre madre-hijo ya desde el nacimiento, así como a la alimentación materna.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS PARA FACILITAR EL DESARROLLO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN EL NEONATO**

El incremento del conocimiento sobre el proceso de establecimiento y desarrollo de la microbiota intestinal y los factores que lo afectan y determinan, constituye el punto de partida para

el desarrollo de estrategias destinadas a facilitar el establecimiento de una microbiota con la composición más adecuada en cada caso. Como se ha indicado a lo largo de este capítulo, algunos de los factores que influyen en este proceso y sus efectos son bien conocidos, sin embargo en otros muchos casos, como los relacionados con intervenciones médicas (antibióticos, fármacos, vacunas, nutrición enteral/parenteral, etc.), aún no sabemos con suficiente detalle sus efectos sobre la microbiota.

En cualquier caso, se está haciendo evidente que algunos de estos factores poseen un gran impacto sobre el establecimiento de la microbiota, haciendo necesario el desarrollo de intervenciones dirigidas a minimizar dichos efectos y/o restablecer una microbiota con una composición adecuada. En este sentido, los probióticos y prebióticos, cuyas propiedades y características se cubren con detalle en otros capítulos de este libro, han sido extensamente estudiados como moduladores de la microbiota intestinal. Varios estudios han mostrado que la administración de probióticos y/o prebióticos a embarazadas y/o recién nacidos ejerce un efecto beneficioso en la composición de su microbiota intestinal, jugando un papel relevante en la prevención de enfermedades. En los últimos tiempos, gracias a la mejora y adición de prebióticos y probióticos a las fórmulas y preparados infantiles, las microbiotas de los niños alimentados con fórmulas artificiales se asemejan cada vez más a los de niños alimentados con leche materna. Sin embargo, pese a estos prometedores resultados, aún es necesario realizar más estudios para determinar qué probióticos y/o prebióticos, qué dosis y qué tipo y tiempo de administración son más adecuados, así como incorporar los probióticos y prebióticos a la práctica clínica.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aggett PJ, Agostoni C, Axelsson I, Edwards CA, Goulet O, Hernell Ö, et al.; ESPGHAN Committee on Nutrition. Nondigestible carbohydrates in the diets of infants and young children: A commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003; 36: 329-37.
- Ang L, Arbolea S, Lihua G, Chuihui Y, Nan Q, Suarez M, et al. The establishment of the infant intestinal microbiome is not affected by rotavirus vaccination. *Sci Rep.* 2014 ;4: 7417.
- Arbolea S, Sánchez B, Milani C, Duranti S, Solís G, Fernández N, et al. Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics. *J Pediatr.* 2015; 166: 538-44.
- Avershin E, Storro O, Oien T, Johnsen R, Pope P, Rudi K. Major fecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children. *FEMS Microbiol Ecol.* 2014; 87: 280-90.
- Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe.* 2015; 17: 690-703.
- Bergström A, Skov TH, Bahl MI, Roager HM, Christensen LB, Ejlerskov KT, et al. Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal, explorative study of a large cohort of Danish infants. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80: 2889-900.
- Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr.* 2012; 96: 544-51.
- Cox LM, Yamanishi S, Sohn J, Alekseyenko AV, Leung JM, Cho I, et al. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell.* 2014; 158: 705-21.
- DiGiulio DB. Diversity of microbes in amniotic fluid. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2012; 17: 2-11.
- Domínguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, 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: 11971-5.
- Faa G, Gerosa C, Fanni D, Nemolato S, van Eyken P, Fanos V. Factors influencing the development of a personal tailored microbiota in the neonate, with particular emphasis on antibiotic therapy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013; 26(Suppl 2): 35-43.
- Fallani M, Amarri S, Uusijarvi A, Adam R, Khanna S, Aguilera M, et al.; INFABIO team. Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. *Microbiology.* 2011; 157: 1385-92.
- Fouhy F, Guinane CM, Hussey S, Wall R, Ryan CA, Dempsey EM, et al. High-Throughput Sequencing Reveals the Incomplete, Short-Term Recovery of Infant Gut Microbiota following Parenteral Antibiotic Treatment with Ampicillin and Gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56: 5811-20.
- Gueimonde M, Sakata S, Kalliomaki M, Isolauri E, Benno Y, Salminen S. Effect of maternal consumption of lactobacillus GG on transfer and establishment of

- fecal bifidobacterial microbiota in neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006; 42: 166-70.
- Hansen CH, Nielsen DS, Kverka M, Zakostelska Z, Klimesova K, Hudcovic T, et al. Patterns of early gut colonization shape future immune responses of the host. *PLoS One.* 2012; 7: e34043.
  - Hesla HM, Stenius F, Jäderlund L, Nelson R, Engstrand L, Alm J, et al. Impact of lifestyle on the gut microbiota of healthy infants and their mothers—the ALADDIN birth cohort. *FEMS Microbiol Ecol.* 2014; 90: 791-801.
  - Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012; 486: 207-14.
  - Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol.* 2008; 159: 187-93.
  - Kalliomäki M, Collado MC, Salminen S, Isolauri E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr.* 2008; 87: 534-8.
  - Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108: 4578-85.
  - Moles L, Gómez M, Heilig H, Bustos G, Fuentes S, de Vos W, et al. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One.* 2013; 8: e66986.
  - Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. The infant microbiome development: mom matters. *Trends Mol Med.* 2015; 21: 109-17.
  - Munyaka PM, Khafipour E, Ghia JE. External influence of early childhood establishment of gut microbiota and subsequent health implications. *Front Pediatr.* 2014; 2: 109.
  - Murphy K, O' Shea CA, Ryan CA, Dempsey EM, O' Toole PW, Stanton C, et al. The Gut Microbiota Composition in Dichorionic Triplet Sets Suggests a Role for Host Genetic Factors. *PLoS One.* 2015; 10: e0122561.
  - Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, et al. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science.* 2012; 336: 489-93.
  - Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11: 227-38.
  - Spor A, Koren O, Ley R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9: 279-90.
  - Turnbaugh PJ, Quince C, Faith JJ, McHardy AC, Yatsunenko T, Niaz F, et al. Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107: 7503-8.
  - Wopereis H, Oozeer R, Knipping K, Belzer C, Knol J. The first thousand days - intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. *Pediatr Allergy Immunol.* 2014; 25: 428-38.
  - Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* 2012; 486: 222-7.