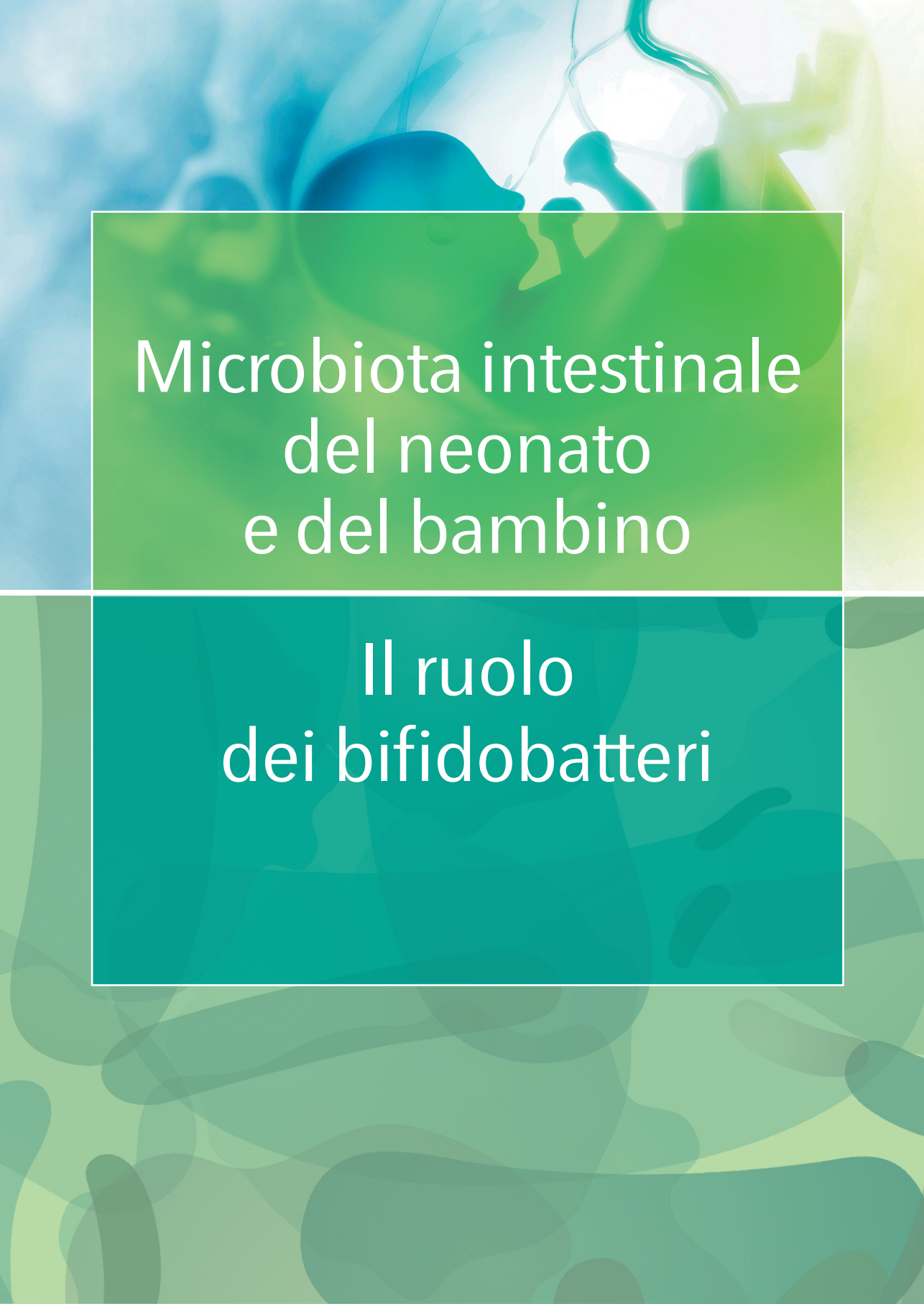




Microbiota intestinale del neonato e del bambino

Il ruolo dei bifidobatteri

Indice

CAP 1	Variazioni del microbiota intestinale nelle diverse età	pag. 2
CAP 2	Driver di disbiosi bifidobatterica nella prima infanzia	pag. 10
CAP 3	Conseguenze cliniche della disbiosi bifidobatterica sulla salute del bambino e dell'adulto	pag. 23
Bibliografia		pag. 33

In collaborazione con  **mb**
microbioma.it

Editore **Clorofilla srl** - editoria scientifica

Direttore responsabile
Massimo Barberi

Art Director
Stefania Maffoni

Autori
Ilaria Cavecchia
Medico chirurgo Specialista in malattie infettive
Cristiano Alex De Marzi
Medico chirurgo Specialista in Ginecologia e Ostetricia
Maria Colombo
Medico chirurgo Specialista in pediatria,
componente del board scientifico di Velleja Research
Maria Rosaria Matera
Medico chirurgo Specialista in neonatologia

Redazione
Lisa Triscioglio

Direzione e redazione
Clorofilla srl - editoria scientifica
Via Podgora 12A, 20122 Milano
Tel 02 39523784 - www.clorofillaweb.it
Iscrizione al ROC n. 25358

Copyright © 2019 - Questa pubblicazione è protetta da copyright. Tutti i diritti sono riservati.

Sono vietate la riproduzione e l'archiviazione in qualsiasi forma e qualsiasi mezzo elettronico, compresa la fotocopiatura, senza autorizzazione scritta dell'Editore.

Immagini di copertina di Adobe Stock:
Double Brain, Crystal light.

Nota dell'Editore

La realizzazione di questa pubblicazione è stata effettuata con la massima accuratezza. Ciò nonostante, l'Editore non è responsabile per errori, omissioni e/o inesattezze e per qualunque conseguenza derivata dalle informazioni ivi contenute.

Per qualsiasi immagine riprodotta e per cui non si sia ottenuta autorizzazione alla riproduzione, l'Editore è disponibile al riconoscimento dei diritti di copyright in capo agli aventi diritto.

Le informazioni riportate nella pubblicazione non sostituiscono le indicazioni contenute nel Riassunto delle Caratteristiche di Prodotto dei prodotti menzionati.

Pubblicazione fuori commercio riservata agli operatori sanitari.

Questa pubblicazione è stata realizzata grazie al contributo non condizionato di  **PharmExtracta**[®] S.p.A.

Variazioni del microbiota intestinale nelle diverse età

In pediatria i bifidobatteri (genere batterico appartenente al phylum *Actinobacteria*) rivestono particolare importanza. Fisiologicamente il microbiota intestinale di un neonato e di un lattante, fino al momento dello svezzamento, è infatti particolarmente ricco di bifidobatteri, che raggiungono anche il 50% del totale della popolazione microbica.

I bifidobatteri sono così numerosi nel piccolo paziente in quanto essenziali per metabolizzare gli HMO (Human Milk Oligosaccharides) del latte materno o, in sua assenza, i glicani presenti nella mucina, lo strato di muco che ispessisce la mucosa intestinale rendendola meno permeabile. HMO e glicani sono entrambi fonti di carboidrati complessi ad attività prebiotica per i batteri intestinali. Poiché sono solo i bifidobatteri, e non altri commensali, ad avere il corredo enzimatico capace di degradare gli HMO, la natura induce nella madre, nel terzo trimestre della gravidanza, un aumento importante dei suoi bifidobatteri intestinali in modo che possa trasmetterli al neonato al momento del parto.

Il passaggio vaginale, infatti, garantisce la colonizzazione del neonato con i batteri materni intestinali e vaginali.



L'impianto, lo sviluppo e la maturazione del microbiota intestinale è un processo graduale condizionato dalla modalità di parto e dal tipo di alimentazione neonatale

È talmente importante che il neonato abbia un microbiota ricco di bifidobatteri che, oltre alla colonizzazione durante il passaggio nel canale del parto, questi microrganismi vengono trasmessi al nascituro anche con l'allattamento, derivandoli sempre dall'intestino materno. La letteratura infatti sottolinea che i bambini più carenti di bifidobatteri neonatali, cioè con disbiosi bifidobatterica, sono proprio quelli nati attraverso parto cesareo e/o non allattati al seno.



I bambini nati da parto cesareo e/o non allattati al seno presentano disbiosi bifidobatterica, sono cioè carenti di bifidobatteri neonatali

Alcuni autori hanno pubblicato recentemente su *World Journal of Gastroenterology* uno studio che ha evidenziato come la disbiosi bifidobatterica neonatale correli fortemente e aumenti il rischio, anche in età adulta, di atopia, allergia, sindrome dell'intestino irritabile (IBS), malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD), cancro al colon-retto, celiachia e obesità.

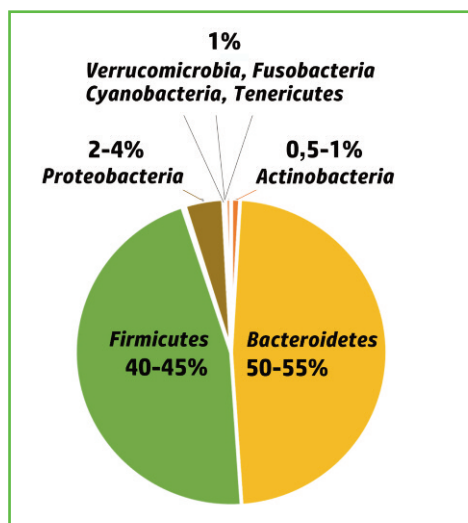
Composizione del microbiota intestinale di un adulto sano

L'intestino di un adulto ospita la più alta densità di microrganismi fondamentali per la sopravvivenza e la salute.

Nel colon formano una comunità chiamata microbiota intestinale, che viene descritto attraverso i phyla percentualmente più presenti:

- *Bacteroidetes* 50-55%
- *Firmicutes* 40-45%
- *Proteobacteria* 2-4%
- *Actinobacteria* 0,5-1%

Quantitativamente meno presenti, ma funzionalmente rilevanti, sono i phyla *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria*, *Tenericutes* e *Cyanobacteria* che, nell'insieme, arrivano appena all'1%.



Il microbiota intestinale di un adulto è costituito mediamente dal 50-55% di Bacteroidetes, dal 40-45% di Firmicutes, dal 2-4% di Proteobacteria e dallo 0,5-1% di Actinobacteria



Il phylum *Bacteroidetes*, tipico delle diete a base di proteine sia animali sia vegetali, carboidrati e grassi animali, è numericamente il più presente ma è poco variegato, essendo costituito da soli tre generi: il genere *Bacteroides* è intestinale, produce propionato e nelle diete ricche di proteine animali vede la crescita importante delle specie *Alistipes* e *Bilophila*; gli altri due generi, *Prevotella* e *Porphyromonas*, sono entrambi di derivazione orale e arrivano nell'intestino per deglutizione.

Nel microbiota intestinale di un adulto il phylum Bacteroidetes è il più abbondante



Il phylum *Firmicutes* è invece il più eterogeneo e quindi quello che maggiormente apporta geni operativi. Comprende i lattobacilli e gli enterococchi. È costituito da famiglie di Gram-positivi (*Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* e *Clostridiaceae*) e da classi di Gram-negativi (*Negativicutes* con i generi *Dialister*, *Veillonella*, *Weissella*).

I generi *Roseburia*, *Faecalibacterium* specie *prausnitzii*, *Coprococcus*, *Lachnospira* e *Blautia* producono, dalla digestione delle fibre alimentari, butirrato che è utilizzato dalle cellule di rivestimento della parete intestinale del colon come fonte di energia e come promotore della differenziazione delle cellule T naive in cellule T regolatorie in grado di coadiuvare la riduzione del processo infiammatorio.



Il phylum Firmicutes è il più eterogeneo e include i più importanti batteri produttori di butirrato

Il phylum *Proteobacteria* è costituito da Gram-negativi pro-infiammatori fisiologicamente abbondanti solo nei neonati e nelle donne incinte. È costituito da sei sub-phyla: α -*Proteobacteria* (*Chlamydia*, *Rickettsia* e *Brucella*), β -*Proteobacteria* (*Neisseria*), γ -*Proteobacteria* (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Proteus*, *Haemophilus*, *Moraxella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia* e *Pseudomonas*), δ -*Proteobacteria* (*Desulfovibrio*), ϵ -*Proteobacteria* (*Campylobacter* e *Helicobacter*).



Il phylum Proteobacteria è costituito da soli Gram-negativi, patogeni e pro-infiammatori

Il phylum *Actinobacteria* è molto eterogeneo e include solo Gram-positivi dalle caratteristiche tipicamente antinfiammatorie. In vagina questo phylum è rappresentato dai generi *Atopobium* e *Gardnerella*, patogeni di derivazione intestinale, mentre nell'intestino dal genere *Bifidobacterium*. Non arrivano all'1% della composizione microbica intestinale totale negli adulti, mentre nei neonati, nelle donne nella fase finale della gravidanza e nel latte materno sono fisiologicamente molto abbondanti, anche fino al 50%.

Come anticipato, i bifidobatteri sono primariamente saccarolitici e quindi metabolizzano i glicani della mucina negli adulti, mentre nei neonati e nei lattanti anche gli HMO del latte materno.



Il phylum Actinobacteria è costituito da soli Gram-positivi dalle caratteristiche tipicamente antinfiammatorie e sono fisiologicamente molto abbondanti nel microbiota intestinale dei neonati, delle donne nella fase finale della gravidanza e nel latte materno

Il phylum *Verrucomicrobia* (batteri a forma di verruca) è costituito esclusivamente da Gram-negativi. Riveste particolare importanza il genere *Akkermansia* che, nella specie *muclniphila*, modula l'ambiente intestinale dell'ospite in senso antinfiammatorio e promuove l'integrità della barriera epiteliale attraverso la up-regolazione dell'espressione delle proteine delle *tight junction* (occludine e claudine). I flagelli di *Akkermansia muclniphila* presentano infatti una proteina, Amuc-1100, che interagisce con il recettore TLR2 (Toll-like receptor 2, una proteina transmembrana), rafforzando la solidità delle giunzioni serrate. Il termine *muclniphila* deriva dalla sua innata propensione a riconoscere il muco intestinale come elettiva fonte di carbonio.

Il suo alimentarsi di muco favorisce l'ulteriore ispessimento dello strato con conseguente miglioramento della consistenza della mucosa colonica, indice di una ripristinata integrità della barriera intestinale. Quando presente nell'adulto è quindi in grado di ridurre i meccanismi infiammatori LPS-mediati e il rischio di sviluppare epato-steatosi, steato-epatite, insulino-resistenza, sindrome metabolica, diabete, obesità e IBD.

Il phylum Verrucomicrobia include Akkermansia muclniphila, batterio dalla funzione protettiva intestinale grazie alla sua capacità di ridurre i meccanismi infiammatori LPS-mediati attraverso il ripristino dell'integrità della barriera intestinale



Il phylum *Fusobacteria* è rappresentato da soli Gram-negativi ad attività infiammatoria. Degni di nota sono i generi *Fusobacterium*, specie *nucleatum*, e *Sneathia*, entrambi batteri orali che dalla cavità buccale si trasferiscono in sede intestinale.

Il phylum Fusobacteria è rappresentato da soli Gram-negativi, patogeni e pro-infiammatori spesso di derivazione orale



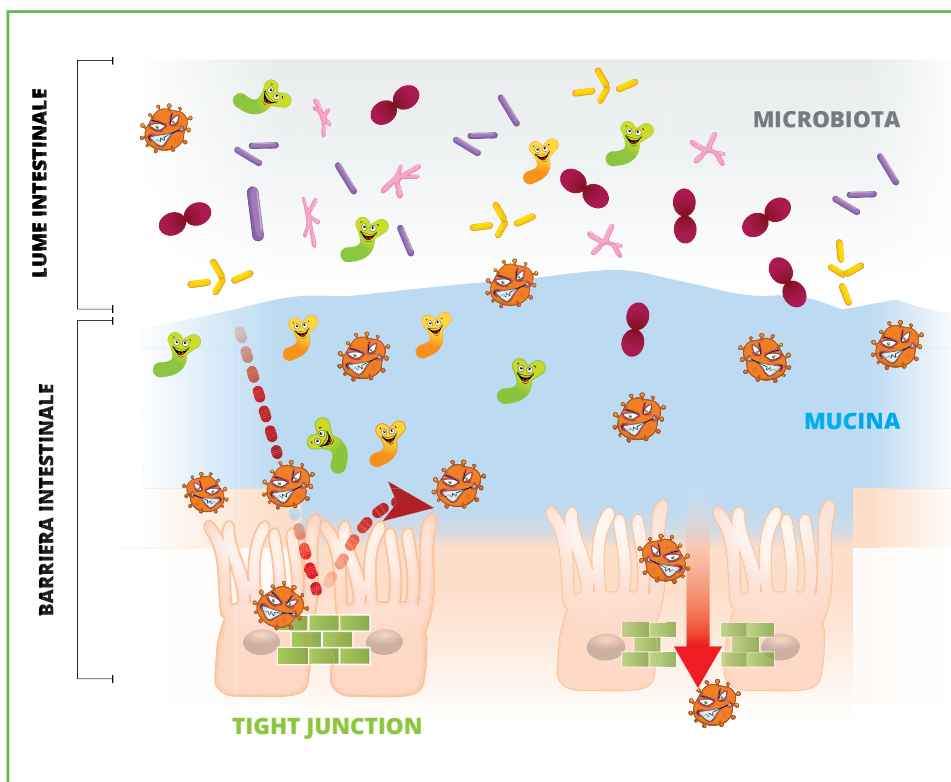
Il phylum *Tenericutes* include patogeni in ambito ginecologico come la classe *Mollicutes* (cioè senza parete batterica), rappresentata per esempio dal genere *Mycoplasma* specie *hominis* e dal genere *Ureaplasma* specie *urealyticum*.

Cambiamenti nella composizione del microbiota in gravidanza

Durante una gravidanza fisiologica il microbiota intestinale della donna si trasforma in senso pro-infiammatorio rispetto alla composizione di un adulto sano: aumenta in modo esponenziale il phylum *Proteobacteria*, costituito da tutti batteri Gram-negativi potenzialmente aggressivi e pericolosi,

e parallelamente si riducono in modo drastico i produttori di butirrato, come *Faecalibacterium prausnitzii*, responsabili della solidità delle giunzioni serrate.

Tali giunzioni, o *tight junctions*, saldano tra di loro le cellule e riducono il passaggio negli interstizi cellulari di liquidi extracellulari, molecole e macro-molecole provenienti dal lume.



Normalmente nel lume colonico i *Proteobacteria* sono presenti in quantità modeste comprese tra il 2 e il 4%. Nel microbiota di una donna incinta, in condizioni assolutamente fisiologiche, i *Proteobacteria* possono invece arrivare a valori anche superiori al 10%.

Essendo batteri Gram-negativi, il rilascio di LPS (lipopolisaccaridi costituenti la membrana che vengono liberati alla loro morte) e il loro eventuale assorbimento intestinale alimenta fenomeni infiammatori, normalmente transitori, forieri di aumento di peso e insulino-resistenza, entrambi tipici di una gravidanza comunque fisiologica. Al contempo il microbiota di una donna incinta è carente di batteri produttori di butirrato: tale diminuzione causa un aumento della permeabilità intestinale, facilitando così il passaggio nel lume intestinale di LPS che, una volta liberato, induce

un processo infiammatorio sub-clinico mediante aumento della produzione di $\text{TNF-}\alpha$ (citochina pro-infiammatoria).

*Il microbiota intestinale di una donna incinta, in condizioni fisiologiche, subisce un processo di deriva infiammatoria batterica attraverso l'incremento del phylum *Proteobacteria* e la diminuzione delle specie butirrato-produttrici*

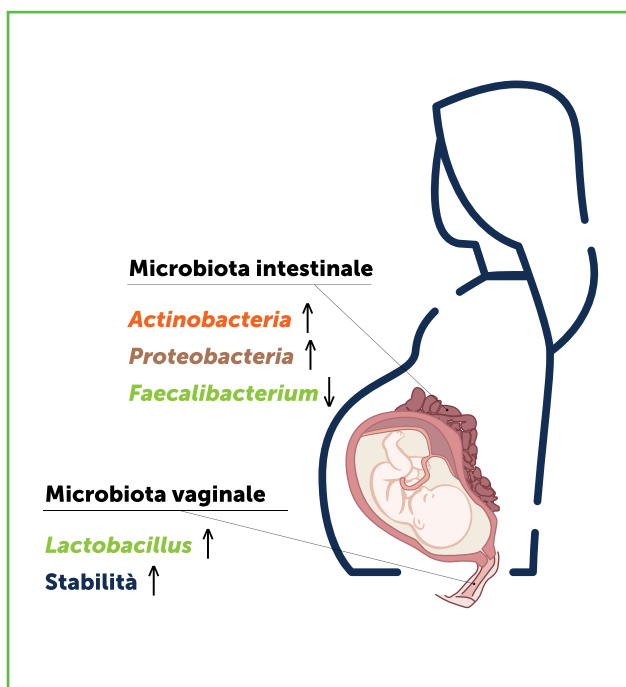


Perché la natura promuove questo incremento in senso pro-infiammatorio nella gestante?

Perché l'intero processo di deriva infiammatoria batterica, cioè aumento dei *Proteobacteria* e diminuzione delle specie butirrato-produttrici, è finalizzato a incrementare la fornitura di energia al feto, attraverso la costruzione di una coppia madre-feto per definizione insulino-resistente, e perché, terminata la gravidanza, la madre dovrà allattare, e solo appropriate riserve di grasso permetteranno di portare a termine tale obiettivo.

Il parto è un momento in cui la colonizzazione e la persistenza di batteri avvengono con estrema facilità perché il neonato è sterile, o scarsamente colonizzato, fino a qualche istante prima della nascita.

Durante il parto il neonato viene efficacemente colonizzato dai microbioti materni, vaginale e rettale in primis, e quindi risulterà riccamente contaminato dai medesimi phyla materni. Poiché la madre trasferirà il microbiota che le appartiene in quell'esatto momento, a livello vaginale trasferirà i lattobacilli, aumentati durante gravidanza affinché il microbiota sia più stabile e protetto, mentre a livello intestinale trasferirà la forte Gram-negatività che la caratterizza.



È possibile che l'evoluzione consenta l'arrivo, in un intestino delicato e non completamente maturo come quello neonatale, di specie batteriche potenzialmente pericolose appartenenti al phylum Proteobacteria senza porvi rimedio?

Un'altra modifica importante del microbiota materno, che avviene solo negli ultimi giorni della gravidanza, è l'aumento esponenziale dei bifidobatteri, phylum *Actinobacteria*, Gram positivi dalle caratteristiche tipicamente antinfiammatorie.

Nell'adulto sano non arrivano all'1% della composizione microbica del lume intestinale totale mentre nelle donne nella fase finale della gravidanza, nei neonati e nel latte materno sono fisiologicamente molto abbondanti, anche fino al 50%.

Questa esplosione di bifidobatteri, Gram-positivi, ha quindi la finalità di contrastare la Gram-negatività ereditata dal neonato attraverso il passaggio nel canale del parto.



Il microbiota intestinale di una donna incinta, in condizioni fisiologiche, cambia nell'ultimo periodo della gravidanza aumentando in modo esponenziale il phylum Actinobacteria rappresentato dal genere Bifidobacterium, Gram-positivo tipicamente antinfiammatorio

Perché la natura promuove il trasferimento massivo proprio dei bifidobatteri, e non di altri commensali?

I bifidobatteri sono gli unici ad avere il corredo enzimatico necessario a metabolizzare gli HMO, fonte di carboidrati fondamentali per il lattante. L'importanza dei bifidobatteri per i neonati è testimoniata dalla loro presenza nel precolostrio e, a partire dall'innesco del travaglio, dal loro "viaggio" dall'intestino, sulla membrana delle cellule dendritiche, verso i dotti della ghiandola mammaria per poter contaminare la produzione e il rilascio di latte.

La letteratura ormai ha attestato con certezza il trasferimento verticale dei batteri materni al neonato sia attraverso il parto naturale sia con il passaggio dei bifidobatteri attraverso il latte materno. Una review del 2018, pubblicata su *Bioscience of Microbiota*, dimostra infatti che il DNA di determinati bifidobatteri presenti nelle feci della mamma prima del parto sono stati ritrovati nelle feci del neonato a pochi giorni dal parto e, dopo 30 giorni, anche nel latte materno. Affinché si determini una colonizzazione stabile e robusta, ovviamente i bifidobatteri devono moltiplicarsi nell'intestino del bambino. E per farlo devono potersi nutrire.

Perché la natura fa avere i lattobacilli al neonato?

Numericamente poco presenti nell'intestino dell'adulto, i lattobacilli, anch'essi Gram-positivi, rappresentano invece il gruppo dominante nell'area vaginale che, attraverso il parto, la madre trasferisce al neonato dopo l'aumento esponenziale caratteristico dell'ultimo trimestre di gravidanza.

È fondamentale che vengano trasmessi al neonato perché i lattobacilli, nell'area vaginale, producono acido lattico a partire dal glucosio ottenuto per catabolismo dal glicogeno, funzione fondamentale per il mantenimento di un adeguato pH e per la salubrità di tessuti altrimenti sempre a rischio d'infezione; inoltre, grazie alla α -galattosidasi (lattasi) di cui sono ricchi, questi batteri catabolizzano lo zucchero (lattosio) del latte che, dopo la nascita, sarà per alcuni mesi l'unico alimento del neonato.

Poiché con il trascorrere dei mesi il latte non sarà più un alimento primario, i lattobacilli tenderanno quasi a scomparire nell'intestino del bambino, mentre resteranno elevati numericamente nell'area vaginale.

Composizione ideale ed evoluzione del microbiota neonatale

Alla composizione percentuale tipica del microbiota di ogni adulto si arriva con il procedere del tempo attraverso un percorso che inizia nel momento della nascita e si completa verso i 30-36 mesi di età. Prima dei 3 anni circa, infatti, i phyla fisiologicamente e percentualmente dominanti nei neonati e nei lattanti, se partoriti a termine per via vaginale e allattati al seno, non coincidono con quelli degli adulti. In particolare la diversità è rappresentata dall'abbondanza di *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, al cui interno ritroviamo il genere *Bifidobacterium* che rappresenta il 40-50% del microbiota.

Il microbiota intestinale di un neonato o di un lattante, se partorito a termine per via vaginale e allattato al seno, è costituito da circa il 50% di Actinobacteria rappresentato dal genere Bifidobacterium, Gram-positivo tipicamente antinfiammatorio



Fondamentale è la presenza dei bifidobatteri che, essendo Gram-positivi, possono, fra le altre funzioni, opporsi alla dominanza del phylum *Proteobacteria*, costituito invece da specie batteriche Gram-negative. Poi però, col passare dei mesi, i bifidobatteri, da gruppo dominante nel neonato e nel lattante, diminuiscono numericamente declinando alcune loro funzioni al genere *Akkermansia*, phylum *Verrucomicrobia*, tipico dell'intestino adulto, con numeriche sempre estremamente basse, inferiori all'1%, ma comunque sufficienti per poter essere un domani trasferiti alla generazione successiva.

Driver di disbiosi bifidobatterica nella prima infanzia

La donna incinta diviene fisiologicamente insulino-resistente e quindi aumenta di peso, affinché possa nutrire il feto e poi allattare. Alla base di questi fenomeni infiammatori c'è una variazione della composizione del microbiota intestinale materno, in particolare un aumento durante i nove mesi delle specie batteriche Gram-negative, in particolare proteobatteri, che rilasciano LPS nel lume intestinale. Questa condizione, apparentemente negativa per la madre (infiammazione sistemica, insulino-resistenza, aumento di peso e talvolta anche diabete gestazionale), garantisce però la disponibilità di risorse energetiche per lo sviluppo e la crescita dell'embrione e poi per l'allattamento.

Il parto prematuro non permette la costruzione di un microbiota neonatale eubiotico

Se la donna, anche in caso di gravidanza fisiologica, va incontro a un parto prematuro, non ha il tempo necessario per aumentare la quota di bifidobatteri e quindi rischia di trasferire al neonato un corredo microbico di Gram-negativi e povero di bifidobatteri Gram-positivi. Quindi, in caso di parto pretermine, si configura per il neonato un'eccessiva induzione alla Gram-negatività: la madre è capace di trasferire al microbiota fetale solo una componente infiammatoria e patogena, costituita soprattutto da proteobatteri e *Clostridiales*, con conseguente aumento del rischio di sepsi precoce e tardiva.



In caso di parto pretermine una donna sana trasferisce al neonato un corredo microbico intestinale ricco di Gram-negativi e povero di bifidobatteri Gram-positivi perché non ha avuto a disposizione gli ultimi giorni della gravidanza per aumentare la quota di bifidobatteri

Inoltre questo processo infiammatorio LPS-mediato è sostenuto anche dalla contemporanea riduzione di *Faecalibacterium prausnitzii*, batterio produttore di butirrato, che induce un aumento della permeabilità intestinale e quindi un maggior passaggio di LPS in circolo. Il parto pretermine causerà quindi nel nascituro la costruzione di un microbiota carente o assente di bifidobatteri e il nascituro diverrà un lattante con disbiosi centrata sui bifidobatteri che, purtroppo, svolgerà un ruolo cruciale nell'evoluzione in età adulta verso patologie quali sovrappeso, obesità, atopia, asma e malattie gastrointestinali.

Il neonato pretermine, con un peso alla nascita uguale o inferiore al chilo e mezzo, è soggetto a rischio di enterocolite necrotizzante (NEC), sepsi e morte e la letteratura documenta l'assenza di bifidobatteri e una dominanza di proteobatteri e *Clostridiales*, con firme microbiche dominanti *Clostridium perfringens*, *Cronobacter sakazaki* e *Klebsiella*. La ricerca mostra anche che i bifidobatteri hanno un ruolo cruciale nella prevenzione della NEC, tanto che la loro supplementazione porta alla riduzione dell'incidenza di NEC e morte.

Ciò accade quando la madre è sana. Se invece ha una storia pregressa di infezioni ricorrenti, la gestante è esposta al rischio di un possibile eccesso di LPS, originato nei tessuti uterini ed extra-uterini, che può agire sui macrofagi della mucosa uterina dando inizio a una serie di eventi, come la produzione di prostaglandine, TNF- α e IL-1, che possono culminare nel parto pretermine e in una rottura prematura delle membrane.

Una donna incinta con storia pregressa di infezioni ricorrenti è esposta a un eccesso di LPS che, agendo sui macrofagi della mucosa uterina, può innescare la produzione di prostaglandine, TNF- α e IL-1 e culminare nel parto pretermine o in una rottura prematura delle membrane



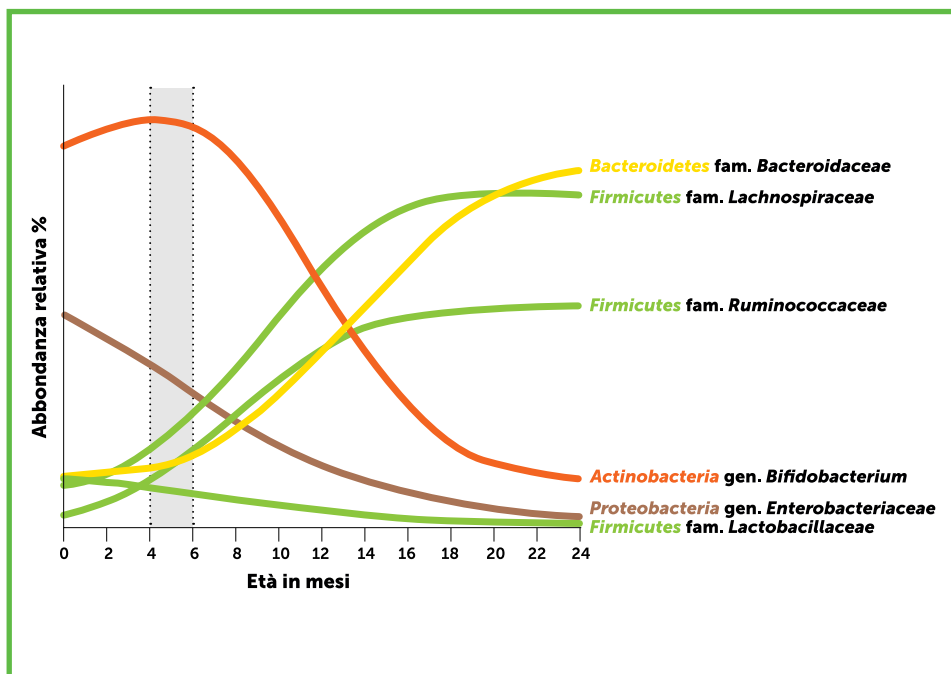
Se, inoltre, sono presenti noti fattori di rischio per l'insorgenza di sepsi neonatale (come corio-amnionite, liquido amniotico fortemente tinto, febbre materna, PROM prolungata, positività materna al tampone vagino-rettale per *S. agalactiae*) è necessaria la terapia antibiotica *peripartum*. Gli attinobatteri, phylum a cui appartengono i bifidobatteri, essendo antibiotico-sensibili, verranno così in gran parte eliminati dalla terapia in atto e si perderanno i loro geni in modo definitivo. Parallelamente i proteobatteri, più rapidi a ricolonizzare dopo l'utilizzo dell'antibiotico, saranno subito in eccesso e il neonato avrà così una quota elevata di LPS e, con la sua permeabilità intestinale ancora abbondante, un effetto infiammatorio rilevante.

Il quadro ottimale sarà quindi quello di una madre che porta a termine la gravidanza e partorisce naturalmente massimizzando così le opportunità di ingenerare nel figlio un microbiota favorevole.

Condizioni che favoriscono un microbiota neonatale disbiotico

Un bambino nato a termine per via vaginale riceverà dalla madre il suo consorzio microbico intestinale e vaginale.

Il passaggio da un microbiota iniziale dominato da *Actinobacteria* (bifidobatteri) e *Proteobacteria* se il bimbo è nato a termine, è stato partorito per via naturale ed è allattato al seno, a un microbiota adulto, dominato invece da *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, è un processo graduale che inizia attorno ai 6 mesi, con l'introduzione dell'alimentazione complementare, e termina attorno ai 3 anni di vita. Con il passare del tempo la quota predominante di bifidobatteri diminuisce fisiologicamente man mano che con lo svezzamento si introducono i cibi fino ad arrivare alla composizione di un microbiota intestinale adulto.



L'evoluzione che caratterizza il microbiota dalla nascita fino ad arrivare alla sua maturazione è un percorso programmato e determinato da varie condizioni perinatali.

Le due situazioni che più di tutte impattano sul microbiota e sono capaci di influenzare l'abbondanza relativa di ciascun membro batterico all'interno di una comunità, influenzandone quindi la struttura e le dinamiche, sono la modalità di parto e il tipo di alimentazione neonatale.



Esiste infatti una chiara correlazione tra la presenza di fattori che disturbano una corretta costruzione del microbiota intestinale, driver di disbiosi, e diversi disturbi immunitari e metabolici che possono essere diagnosticati negli anni successivi, come atopia, obesità, diabete, infiammazione cronica intestinale.

La modalità di parto come driver di disbiosi bifidobatterica nel neonato e nel lattante

Nei neonati a termine, la modalità di parto rappresenta un importante driver della composizione iniziale del microbiota intestinale.

La letteratura scientifica tradizionalmente descrive il feto come sterile in grembo e identifica come inizio della colonizzazione microbica il momento in cui le membrane si rompono, dando il via al percorso fetale attraverso il canale del parto: il feto passa attraverso la cervice e la vagina e il microbiota di queste due aree colonizza il neonato.

Questo tipo di trasferimento è definito verticale in quanto il microbiota è trasferito in modo diretto dalla madre alla prole.

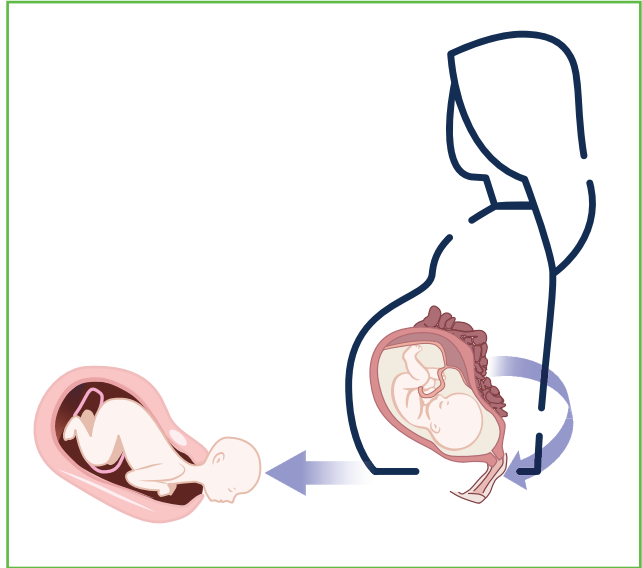
Il parto naturale assicura il trasferimento dei batteri vaginali e intestinali materni al neonato



Da un punto di vista batterico, un neonato è quindi un territorio praticamente disabitato in cui i primi colonizzatori hanno una scelta opzionale maggiore dei successivi e sono capaci di creare opportunità, o restrizioni, per il successivo insieme di colonizzatori microbici.

Con il parto la madre avvia perciò un trasferimento di batteri vaginali ed intestinali che poi continuerà con il trasferimento di una nuova selezione di batteri intestinali durante l'allattamento.

Immediatamente dopo la nascita l'intestino neonatale diventa quindi rapidamente colonizzato da una gran quantità di proteobatteri, dai lattobacilli, prevalentemente vaginali, e dai bifidobatteri di origine primariamente intestinale, trasferiti al neonato durante il periodo espulsivo.



Questo processo si dimostrerà fondamentale per la salute del futuro adulto.

Al contrario, i neonati partoriti con taglio cesareo, non essendo esposti direttamente ai batteri vaginali, vengono colonizzati da microrganismi derivanti principalmente dalla cute materna, o da quella del personale del reparto e dall'ambiente ospedaliero stesso.

Nel neonato il microbiota intestinale è quindi dominato dai bifidobatteri e dai *Proteobacteria*, specie batteriche potenzialmente aggressive e pericolose come *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Escherichia* spp., mostrando una scarsa ricchezza che, però, tenderà ad aumentare con il passare dei mesi e con lo svezzamento. I bambini nati attraverso parto cesareo mostrano inoltre una ridotta biodiversità intestinale e sono comunque meno spesso colonizzati da microrganismi come *Bifidobacterium* e *Bacteroides*, e più frequentemente colonizzati da membri del genere *Clostridium* e nello specifico da *Clostridium difficile*. Queste differenze dovute alle due diverse modalità di parto diminuiscono nel tempo e tendono ad attenuarsi, ma i neonati partoriti con taglio cesareo rimangono comunque più eterogenei, rispetto a quelli di derivazione vaginale, fino almeno al 12° mese di vita.

Le differenze di microbiota osservate tra i bambini nati attraverso le due diverse modalità sono state associate al concetto di un effetto protettivo del parto naturale. In particolare è stato suggerito come il taglio cesareo abbia implicazioni negative sulla salute a lungo termine.

I neonati partoriti con taglio cesareo sono meno protetti, con implicazioni negative sulla salute a lungo termine



In effetti nei bambini nati con taglio cesareo i livelli di numerose citochine sono notevolmente ridotti rispetto ai nati con parto vaginale, con possibili ripercussioni sul sistema immunitario. La nascita con parto cesareo è stata inoltre associata, in maniera statisticamente significativa, a un aumentato rischio di disturbi immunitari come asma, allergia e diabete di tipo 1 e a una maggiore incidenza di obesità.

I bambini partoriti con taglio cesareo presentano un maggior rischio di disturbi immunitari come asma, allergia e diabete di tipo 1 e una maggiore incidenza di obesità



Costatare che la modalità di parto, contribuendo ad alterare il microbiota del nascituro in maniera sicuramente rilevante, anche se tempo-dipendente, determina importanti conseguenze sulla salute dell'individuo adulto, sottolinea la necessità di costruire il più precocemente possibile un microbiota intestinale di derivazione materna garante di una sana maturazione e di un sano sviluppo del sistema immunitario e di quello metabolico dell'ospite.

La modalità di allattamento come driver di disbiosi bifidobatterica nel neonato e nel lattante

Le differenze nella composizione microbica intestinale tra i bambini allattati al seno e quelli alimentati con formula artificiale sono ben documentate, in particolare per quanto riguarda un aumento importante dei livelli di bifidobatteri presenti nei primi rispetto ai secondi.

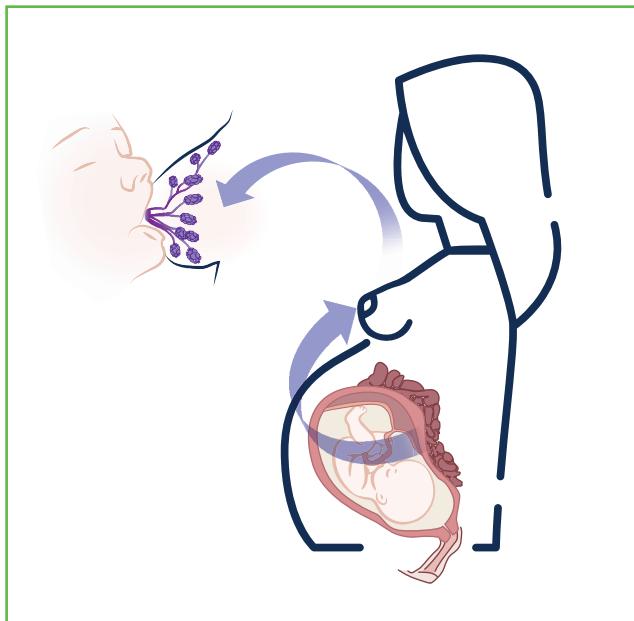
Abbiamo visto che il microbiota della cervice e della vagina, attraverso il passaggio del neonato in queste due aree, viene acquisito come eredità e, quindi, colonizza il neonato.

In particolare, i bifidobatteri, più di ogni altro gruppo batterico, sembrano essere soggetti al trasferimento verticale.

Oltre a questo meccanismo, che innesca un passaggio cadenzato di batteri vaginali e intestinali, la natura si è assicurata che il neonato riceva altri specifici batteri materni, solo intestinali, attraverso un'ulteriore e successiva modalità di trasferimento: l'allattamento.

La ghiandola mammaria viene colonizzata dai batteri fecali attraverso il circolo entero-mammario: le cellule dendritiche tra-

sportano, nella fase finale della gravidanza, i batteri prelevati dall'intestino, senza ucciderli, che vanno poi a essere depositati nella ghiandola mammaria dove si moltiplicano.



In questo modo la ghiandola mammaria, attraverso i dotti galattofori, rilascerà un latte contaminato dai batteri intestinali. I dati in merito indicano che nell'intestino materno, nella ghiandola mammaria e nel latte si trovano gli stessi ceppi che poi si rintracciano nell'intestino del neonato. I gruppi batterici con omologia genetica presenti sia nella madre sia nel figlio sono bifidobatteri, ma anche batteri tipici e dominanti il microbiota intestinale adulto come *Bacteroidetes*, *Clostridia*, *Proteobacteria* ed *Erysipelotrichia*, indicando un'acquisizione che si verifica in realtà già durante una fase molto iniziale della vita.

È quindi possibile identificare ceppi geneticamente identici nelle feci materne, nel latte materno e nel microbiota intestinale del bambino evidenziando l'importanza del trasferimento di specifici membri selezionati del microbiota intestinale materno al neonato.



L'allattamento è il sistema attraverso il quale la natura si è assicurata che, anche dopo la nascita, la madre potesse influenzare il microbiota neonatale con specifici ceppi

Sia il trasferimento verticale sia il trasferimento attivo sono processi fondamentali per la salute del futuro adulto.

Il microbiota intestinale dei bambini allattati al seno presenta una diversità inferiore di quella osservata in bambini nutriti con latte artificiale. L'elevata biodiversità del microbiota intestinale, parametro che nell'adulto correla con un miglior stato di salute, produce invece instabilità in un microbiota in formazione.

Nel neonato allattato al seno è infatti necessaria una eubiosi primariamente centrata sui bifidobatteri. E questa è necessariamente caratterizzata da una minor biodiversità. I bambini alimentati con formula artificiale sono invece esposti a ingredienti diversi che contribuiscono a creare differenti modelli di colonizzazione microbica intestinale.

Numerosi studiosi hanno riportato infatti che le feci dei neonati allattati al seno contengono elevati livelli di bifidobatteri e lattobacilli con scarsa presenza di patogeni, opportunisti e non, contrariamente a quelli dei neonati alimentati con formula artificiale, nei quali il microbiota appare dominato da stafilococchi, clostridi, enterobatteri e da batteri del genere *Atopobium*. Di conseguenza, anche i livelli di acidi grassi a catena corta risultano diversamente espressi nelle feci di neonati allattati al seno o alimentati con formula, con propionato e butirrato maggiormente presente nei secondi.

I bambini allattati al seno presentano una bassa biodiversità perché, per un miglior stato di salute, necessitano di un microbiota costituito da Bifidobatteri dominanti. Nel neonato vi è necessità di una eubiosi primariamente centrata sui Bifidobatteri



Da questo punto di vista è come se i bambini nutriti con latte artificiale ottenessero una divergenza anticipata verso la composizione tipica di un adulto, rispetto agli allattati al seno che, al contrario, sembrerebbero rispettare maggiormente la necessità di una maturazione più lenta, ma per questo forse maggiormente consolidata.

Similmente, se un bambino è allattato artificialmente, anche in forma mista, si costringe il suo microbiota a una maturazione anticipata con una conseguente immaturità immunitaria ed effetti sia nell'immediato sia nel futuro.

Sulla rivista *Nature* nel 2018 è stato infatti pubblicato uno studio, condotto sui campioni di feci di 903 bambini tra i 3 e i 36 mesi, in cui si evidenzia un netto aumento dei bifidobatteri nelle prime fasi di vita sempre e solo associato all'allattamento al seno, mentre l'abbandono del latte materno porta a un decremento anticipato dei bifidobatteri e quindi a immaturità immunitaria.

Sia i bambini allattati artificialmente sia quelli alimentati in forma mista hanno un microbiota caratterizzato da un decremento anticipato dei bifidobatteri, con una conseguente immaturità immunitaria che ha effetti sia nell'immediato sia nel futuro



Durante il periodo di allattamento esclusivo, il microbiota si diversifica in modo progressivo fino allo svezzamento, quando l'evoluzione verso il microbiota adulto, più stabile e complesso, diventa evidente.

Perché la natura si assicura di far avere i bifidobatteri al neonato?

La madre trasferisce i suoi bifidobatteri intestinali con il parto per contrastare la forte carica di Gram-negatività dei *Proteobacteria*, ma continua anche dopo attraverso l'allattamento. Medesimi ceppi di *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium bifidum* sono stati infatti osservati nel 25% delle coppie madri-neonato con persistenza, nel neonato, rilevabile fino al 1° anno di vita.

Perché i bifidobatteri sono i protagonisti nel neonato e nel lattante?

Perché i bifidobatteri sono gli unici ad avere il corredo enzimatico necessario a metabolizzare gli Human Milk Oligosaccharides (HMO), fonte di carboidrati fondamentali per il lattante.

Il latte materno è ricco di particolari oligosaccaridi che siamo soliti definire "indigeribili" in quanto il neonato manca della macchina enzimatica per farlo, costituita da fucosidasi, β -exosaminidasi, lacto-N-biosio-fosforilasi, sialidasi e β -galattosidasi. È per questo che i bifidobatteri aumentano di numero e, a partire dall'innesco del travaglio, forse sono presenti già nel precolostro; essendo primariamente saccarolitici privilegiano infatti la demolizione e metabolizzazione degli HMO del latte materno.



I bifidobatteri presentano il corredo enzimatico per demolire e metabolizzare gli HMO

Nelle feci dei neonati sono tre le specie fisiologicamente rilevanti, *Bifidobacterium longum-infantis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*. Con efficienza variabile alcuni bifidobatteri, in primis ceppi di *B. breve*, *B. longum-infantis* e *B. bifidum*, possiedono il pool enzimatico adatto a ricavarne rispettivamente fucosio, lacto-N-biosio, acido sialico e galattosio.

Nell'intestino, affinché si abbia una colonizzazione stabile, i bifidobatteri devono moltiplicarsi. E per farlo devono potersi nutrire. Grazie a una macchina enzimatica molto simile, i medesimi bifidobatteri sono in grado di degradare anche i glicani della mucina, lo strato di muco intestinale con funzioni di barriera. Ovviamente tale degradazione determina un feedback enterocitario che spinge le goblet cells a una continua neo-sintesi di mucina con il risultato di produrre un netto inspessimento dello strato di muco. Anche in questo caso la letteratura riporta il caso di un ceppo dotato dell'intera macchina biochimica finalizzata alla digestione della mucina, il *Bifidobacterium bifidum* PRL 2010.

Il bifidobatterio neonatale Bifidobacterium bifidum PRL 2010 è capace di degradare anche i glicani della mucina inducendone neo-sintesi e quindi aumentando lo spessore dello strato di muco intestinale dalla funzione protettiva di barriera



L'adulto non si nutre esclusivamente di latte, o per lo meno nell'età adulta questo diventa una tipologia di alimento meno importante. La macchina per la digestione di tali oligosaccaridi del latte perde quindi di necessità e, diminuendo il lavoro per i bifidobatteri, anche la loro rilevanza e la loro rilevabilità intestinale è minore. I bifidobatteri sono infatti fisiologicamente molto abbondanti solo nei neonati, nelle gravide nella fase finale della gravidanza e nel latte materno, mentre nell'adulto la loro presenza non arriva all'1% della composizione microbica intestinale. Nel lavoro di degradazione della mucina, che avviene invece anche nell'adulto, i bifidobatteri vengono sostituiti da un altro batterio, questa volta appartenente al phylum *Verrucomicrobia*, noto come *Akkermansia muciniphila*.

Nell'adulto i bifidobatteri sono davvero pochi e di questi la maggior parte, come *B. longum longum*, *B. adolescentis*, *B. catenolatum*, *B. pseudocatenolatum* ecc., non sa "fare il mestiere" che sapevano fare *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. infantis* e *B. bifidum* per carenze di tipo genetico. Seppur presenti in basse quantità, i ceppi di *B. breve*, *B. infantis* e *B. bifidum* non scompaiono del tutto nell'intestino adulto. Alcuni di loro sopravvivono, sempre che non vengano eliminati con terapie antibiotiche, pronti ad aumentare di numero nell'intestino di una donna incinta perché il ciclo ricominci di nuovo.

I bifidobatteri negli adulti sono numericamente pochi, ma sufficienti per essere trasferiti alla generazione successiva, perché non serve più metabolizzare gli HMO



Lo svezzamento può essere considerato un driver di disbiosi?

L'impatto della fase di svezzamento sullo sviluppo del microbiota è meno noto rispetto a quello legato all'alimentazione neonatale.

Durante lo svezzamento, grazie all'introduzione di una nuova varietà di sostanze, il parametro della biodiversità inizia ad aumentare e phyla tipicamente dominanti nel microbiota infantile, come *Actinobacteria* e *Proteobacteria*, vengono progressivamente sostituiti da *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, membri tipicamente dominanti il microbiota del soggetto adulto.

L'analisi del microbiota intestinale eseguita durante il periodo di alimentazione complementare, tra il 9° e il 18° mese di vita, ha rivelato un aumento dell'abbondanza relativa di alcune importanti famiglie batteriche, tra cui *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* e *Prevotellaceae*. Al contrario, l'abbondanza relativa di *Bifidobacteriaceae* e *Lactobacillaceae* diminuisce.



Lo svezzamento, grazie all'introduzione di una nuova varietà di sostanze, determina la riduzione di Actinobacteria e Proteobacteria, tipicamente infantili, e la loro sostituzione con Firmicutes e Bacteroidetes, dominanti invece il microbiota dell'adulto, con conseguente e fisiologico aumento della biodiversità del microbiota

Questi cambiamenti si devono all'aumentata ingestione di proteine animali, ortaggi, legumi e fibre vegetali e a un progressivo allontanamento dal latte materno.

È interessante notare che due specie fondamentali per la salute intestinale e metabolica dell'ospite, *Faecalibacterium prausnitzii* e *Akkermansia muciniphila*, generalmente assenti o comunque presenti a livelli molto bassi durante la prima infanzia, aumentano in maniera significativa, raggiungendo i valori normalmente associati all'età adulta rispettivamente a 12 e 24 mesi.

Nel caso di *Akkermansia* l'aumento sembrerebbe riflettere l'incremento graduale della produzione di mucina e di muco intestinale, principale fonte di carboidrati fermentati dal batterio, presente a livelli molto bassi durante la prima infanzia.

La cessazione definitiva dell'allattamento al seno e il passaggio a cibi più vari e solidi sono considerati comunque la principale causa dell'aumentata biodiversità osservata nel microbiota intestinale del bambino. Anche il semplice passaggio dal latte materno al latte bovino o adattato influenza fortemente lo sviluppo del microbiota intestinale. Già 5 giorni dopo la sospensione del latte materno in favore di quello vaccino si osserva un aumento dell'abbondanza relativa di *Bacteroides*, *Blautia* e *Ruminococcus* e una diminuzione di quella di *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, con un progressivo aumento della biodiversità e del pH fecale.

L'aumento della diversità batterica osservata durante lo svezzamento e/o la progressione verso un'alimentazione più varia e solida contribuisce a determinare importanti cambiamenti funzionali. È stato infatti riportato durante questa transizione un aumento dei livelli totali di acidi grassi a catena corta, in particolare di butirrato, direttamente collegabile all'incremento relativo di *Faecalibacterium*. Il cambiamento dietetico induce perciò lo sviluppo di un microbiota maturo con maggiore espressione di quei geni responsabili della degradazione di carboidrati complessi, amidi e xenobiotici e della produzione di vitamine.

Le terapie antibiotiche come driver di disbiosi bifidobatterica

Anche le terapie antibiotiche intra-partum oppure quelle utilizzate nei primi giorni di vita (o anche successivamente, nel bambino più grande) rappresentano un importante driver di disbiosi bifidobatterica.

L'analisi del microbiota fecale di neonati trattati con antibiotico nei primi 4 giorni di vita, rispetto al controllo non trattato, stando a uno studio pubblicato su FEMS nel 2009, rileva una carenza importante di bifidobatteri, che rimane tale fino al 2° mese di vita, e un incremento di *Enterobacteriaceae*, proteobatteri. E lo stesso risultato è stato osservato anche nei bimbi nati con taglio cesareo o con antibioticotераpia intra-partum.

Le terapie antibiotiche causano perciò una perdita transitoria di bifidobatteri, in quanto più sensibili di altri ceppi batterici, e la loro rapida sostituzione con batteri Gram-negativi più rapidi a ricolonizzare e dalle caratteristiche tipicamente infiammatorie.

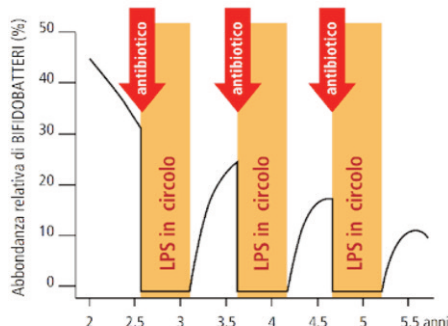
Gli antibiotici somministrati intra-partum o nei primi giorni di vita oppure nel bambino più grande causano perdita di bifidobatteri velocemente sostituiti da Gram-negativi tipicamente infiammatori



Uno studio uscito su Microbial Cell nel 2016, analizzando 142 bimbi dai 2 ai 7 anni ha dimostrato che gli antibiotici creano una carenza di bifidobatteri, con aumento di proteobatteri, che persiste per circa 6 mesi dopo ogni singola somministrazione. E ciò causa anche un ulteriore indebolimento della barriera intestinale che permette all'LPS di permeare l'intestino e raggiungere il circolo con conseguente aumento dell'infiammazione LPS-mediata. Lo studio mette infatti in relazione gli antibiotici con l'aumento di sovrappeso, la sindrome metabolica e l'obesità.

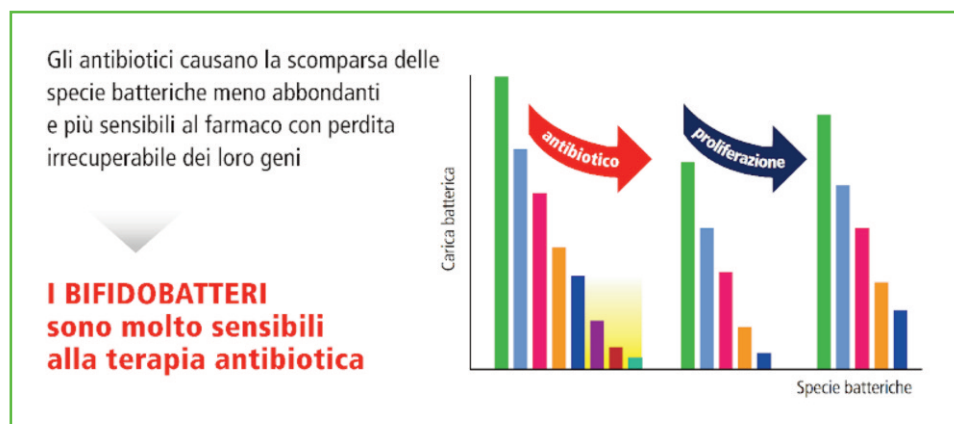
Ogni singola somministrazione porta alla perdita di BIFIDOBATTERI che si recuperano solo parzialmente in 6 mesi

I BIFIDOBATTERI VENGONO SOSTITUITI DAI GRAM NEGATIVI
tipicamente infiammatori
continuando ad alimentare la quota di LPS in circolo



Nella prima infanzia i bifidobatteri, dalle caratteristiche tipicamente antinfiammatorie, dopo ogni singola somministrazione antibiotica subiscono un importante decremento che però si recupera in circa sei mesi. Ma questo recupero è solo parziale perché non si arriverà mai a ristabilire la quota iniziale di partenza. E ogni successiva terapia antibiotica peggiorerà ancora di più la situazione e porterà a nuovi crolli verticali dei bifidobatteri, con periodi di importante prevalenza di Gram-negativi, alta concentrazione di LPS, infiammazione e relative conseguenze.

Inoltre, se il tempo che intercorre fra due somministrazioni di antibiotico fosse inferiore ai 6 mesi, la situazione sarebbe ancora più problematica perché i bifidobatteri non avrebbero tempo di moltiplicarsi e non sarebbe più possibile recuperarli. I loro geni sarebbero persi per sempre e si avrebbe un importante decremento della biodiversità intestinale.



Conseguenze cliniche della disbiosi bifidobatterica sulla salute del bambino e dell'adulto

Le evidenze scientifiche mettono sempre più in luce come la composizione iniziale del microbiota intestinale sia fondamentale per la salute del neonato e dell'adulto che diventerà.

Ciò che più di tutto influenza positivamente l'impianto del microbiota neonatale sono il parto naturale e l'allattamento al seno in quanto consentono l'attecchimento dei due gruppi batterici più rilevanti per la costruzione corretta del microbiota: lattobacilli nell'ambiente vaginale e bifidobatteri nell'intestino.

I lattobacilli, di origine vaginale, risultano fondamentali per derivare energia dallo zucchero disponibile del latte materno (lattosio) e per produrre acido lattico con funzioni antisettiche; i bifidobatteri risultano invece essenziali per l'effetto antinfiammatorio e anti-atopico e per la capacità di antagonizzare la preponderante presenza di Gram-negativi, *Proteobacteria*, trasmessi dalla madre.

I bifidobatteri nel microbiota intestinale del neonato sono fondamentali per il loro effetto antinfiammatorio, antiatopico e anti Gram-negatività



Inoltre, la presenza dei bifidobatteri è rilevante per le dinamiche di permeazione di LPS che, rilasciato dalle specie batteriche Gram-negative, è il driver di fenomeni legati a stati di infiammazione subclinica che, a loro volta, causano manifestazioni apparentemente scollegate tra loro, come asma e obesità.

Dal 1999, infatti, come pubblicato da *The Journal of Biological Chemistry*, si evidenzia come l'LPS sia in grado di attivare potentemente una cascata di eventi che, attraverso l'attivazione di cellule LPS sensibili come i monociti e macrofagi, genera una serie di risposte LPS-mediate; tra queste

l'attivazione di NF- κ B che porta alla sintesi e al rilascio di mediatori pro-infiammatori tra cui interleuchina-1, interleuchina-6, interleuchina-8 e fattore di necrosi tumorale α (TNF- α). Il recettore TLR4 è fortemente indicato come il recettore LPS dominante nei mammiferi e il componente della superficie cellulare responsabile del segnale LPS-mediato.

La salvaguardia di una eubiosi neonatale centrata sui bifidobatteri è quindi fondamentale.

La corretta colonizzazione intestinale del neonato promuove la salute futura

Numerose ricerche sono state condotte per scoprire le possibili conseguenze di una scorretta interazione tra il microbiota della prima infanzia e l'ospite. Molti studi hanno infatti dimostrato che determinate alterazioni del microbiota anticipano lo sviluppo successivo di alcune malattie e che solo una precoce colonizzazione adeguata, rispetto a una tardiva, può restituire un fenotipo sano.



Determinate alterazioni del microbiota anticipano lo sviluppo di alcune malattie

Animali germ-free, che mostravano un importante aumento delle cellule immunitarie e infiammatorie nelle mucose, venivano infatti "normalizzati" solo se sottoposti a una ricolonizzazione precoce, mentre un trapianto fecale eseguito in età adulta non era in grado di correggere la situazione. Inoltre, la colonizzazione neonatale di questi topi con un microbiota intestinale convenzionale si è dimostrata in grado di proteggere i tessuti da potenziali manifestazioni come autoimmunità, IBD e asma.

Alcuni dei risultati più convincenti derivano da prove sperimentali che indicano una relazione molto stretta tra l'esposizione precoce a microrganismi e lo sviluppo di patologie immunitarie.



La correzione di determinate alterazioni del microbiota si dimostra tanto più protettiva verso potenziali malattie quanto più l'intervento è precoce

Nonostante questa relazione sia nota da anni, scoperte molto attuali stanno fortemente contribuendo alla comprensione dettagliata di alcuni meccanismi in grado di modellare la risposta immunitaria. È stato per esempio dimostrato che l'attività della chemochina CXCL16, che modula l'accumulo di cellule T natural killer del tipo 1, è regolata nel colon e nei polmoni da fattori microbici. E questo tipo di cellule è uno dei responsabili di fenomeni infiammatori intestinali, IBD, autoimmunità e atopia.

Il trasferimento dalla madre al neonato di batteri vaginali, con il parto naturale, e intestinali, prima con il parto e poi con l'allattamento, si è dimostrato fondamentale per la salute del futuro adulto. *Gut microbiota* nel 2013 documenta e conferma infatti l'associazione fra il parto cesareo e lo sviluppo di patologie allergiche. Nello studio è stata osservata anche una minore diversità microbica nei neonati allergici all'inizio della patologia. Il parto cesareo è quindi associato a una minor diversità batterica durante i primi due anni di vita, una minor abbondanza e diversità del phylum e soprattutto minori livelli circolanti di Th1 durante l'infanzia, con conseguente maggiore risposta Th2. Se, infatti, i bifidobatteri, genere eterogeneo considerato "protettivo" e "necessario" nel neonato e nella prima infanzia, non dominano il microbiota del neonato, i *Proteobacteria* (specie Gram-negative e patogene come *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Escherichia* spp) non vengono antagonizzati e le conseguenze si ripercuotono sul bambino, ma anche sul futuro adulto.

World Journal of Gastroenterology pubblica che nel neonato e nel lattante la disbiosi bifidobatterica correla fortemente e aumenta il rischio, anche in età adulta, di sviluppare atopia, allergia (+20% asma), IBS, IBD, cancro al colon-retto, celiachia e obesità (+8% obesità grave, +64% sovrappeso).

La disbiosi bifidobatterica aumenta il rischio di sviluppare, anche in età adulta, atopia, allergia, IBS, IBD, cancro al colon-retto, celiachia e obesità precoce



L'eczema atopico come conseguenza di disbiosi bifidobatterica

Un numero sempre maggiore di studi epidemiologici evidenzia che l'impianto e lo sviluppo iniziale del microbiota intestinale influenzano il rischio di malattie allergiche nel bambino e nell'adulto, principalmente eczema atopico e asma. Già dal 2000 si documenta infatti come specifiche alterazioni del microbiota nel corso del primo anno di vita portino allo sviluppo successivo di disturbi atopici, confermando il ruolo fondamentale del microbiota.

Queste prime indagini hanno rilevato che alcune differenze, come l'aumento dei clostridi e la riduzione dei bifidobatteri, nel microbiota intestinale di lattanti ha poi portato, all'età di 2 anni, alla manifestazione atopica.

La riduzione di bifidobatteri neonatale può condurre alla manifestazione atopica entro i due anni



Nel 2012 anche uno studio pubblicato su *BMC Microbiology* ha verificato la differenza esistente fra il microbiota di bambini atopici e quello di bambini sani, rilevando la diminuzione dei livelli di *Faecalibacterium prausnitzii* e *Akkermansia muciniphila*, così come il corrispondente aumento della famiglia di *Enterobacteriaceae* appartenente al phylum proteobatteri. La comunità microbica intestinale associata all'atopia risulta quindi privata dei principali membri immunomodulatori del microbiota intestinale umano e arricchita invece in patobionti pro-infiammatori.

F. prausnitzii è considerato un microrganismo cruciale per l'omeostasi intestinale e dotato di una vasta gamma di attività antinfiammatorie. È un batterio butirrato-produttore, la cui assenza aumenta la permeabilità intestinale e quindi del passaggio di LPS in circolo. *Akkermansia muciniphila*, tipica dell'intestino di un adulto e di un bimbo svezzato, è stata recentemente associata a un ruolo protettivo-antinfiammatorio nell'intestino sano. Membri delle *Enterobacteriaceae*, fra cui *Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella* e *Salmonella*, concorrono nell'induzione di una risposta pro-infiammatoria e consolidano ulteriormente lo stato infiammatorio.

Anche altri studi hanno dimostrato che una bassa abbondanza relativa di produttori di butirrato in genere può precedere lo sviluppo di eczema atopico.



Il microbiota intestinale associato all'atopia presenta un consorzio microbico infiammatorio che può contribuire alla gravità della manifestazione atopica

Più recentemente uno studio americano, condotto su lattanti di 3 mesi, ha messo nuovamente in relazione la carenza di bifidobatteri, ma anche di *Faecalibacterium prausnitzii*, con la diagnosi di allergia a 2 anni e di asma a 4 anni.

Curr Microbiology nel 2015 pubblica uno studio che analizza il microbiota di 14 bambini atopici e di 15 sani confermando una carenza di bifidobatteri e *Akkermansia* e un livello aumentato di proteobatteri negli atopici rispetto ai sani.



Il microbiota intestinale dei bambini atopici è descritto come carente di bifidobatteri e di generi butirrato-produttori e contemporaneamente ricco di proteobatteri

Tutto questo è stato poi confermato ulteriormente da *PlosOne* nel 2017: *Akkermansia muciniphila* è risultata capace di migliorare la risposta metabolica e di ripristinare la funzione di barriera intestinale mediante modulazione dello spessore dello strato di muco. In questo articolo viene identificata la sua proteina piliforme di membrana esterna, Amuc-1100, come capace di attivare, attraverso il recettore TLR2, la up-regolazione dell'espressione delle proteine delle *tight junction*, con miglioramento della resistenza transepiteliale, e di favorire l'aumento di IL-10 e la riduzione del TNF- α .

Anche *Faecalibacterium* è stato individuato come microrganismo immunosoppressore positivamente

correlato con livelli elevati di IL-10 e il ripristino della funzione di barriera intestinale, funzione che può essere quindi modulata dal microbiota così come dalle risposte infiammatorie.

Anche uno studio eseguito su 646 bambini conferma la relazione fra diagnosi di atopia e carenza di bifidobatteri, con contemporaneo aumento di Gram-negativi, rivelando in particolare un'associazione diretta tra la presenza di *Escherichia coli* nei neonati di 1 mese e lo sviluppo di eczema nel primo anno di vita.

Diversi studi successivi hanno indicato inoltre come una ridotta diversità microbica nel microbiota della prima infanzia possa correlare direttamente con lo sviluppo successivo di eczema atopico. In particolare nel 2018 *Beneficial Microbes* ha dimostrato una chiara relazione fra il rapporto dei generi *Klebsiella* e *Bifidobacterium* durante la prima infanzia e lo sviluppo di allergie pediatriche, tanto da considerare tale rapporto come indicatore di un incremento del rischio di sviluppare allergia. Tanto più è alto il rapporto, tanto maggiore è la possibilità di sviluppare manifestazioni allergiche.

Nell'infanzia l'elevato rapporto di Klebsiella rispetto ai bifidi può essere considerato un indicatore di un incrementato rischio di sviluppare allergia



Ulteriore validazione arriva nel 2018 con una review di *International Immunopharmacology* che associa le malattie autoimmuni, favorite dallo squilibrio tra le risposte Th1 e Th2, e allergiche a una composizione alterata dei batteri residenti. Lo studio osserva come la colonizzazione batterica sia essenziale per spostare la risposta immunitaria del neonato dal tipo Th2, favorente l'allergia, verso il tipo Th1, essenziale per l'eliminazione dei patogeni. La causa più comune di alterazione della colonizzazione batterica dei neonati è identificata nell'uso di antibiotici.

La corretta colonizzazione batterica intestinale è essenziale per spostare la risposta immunitaria dal tipo Th2, favorente l'allergia, verso il tipo Th1, essenziale per l'eliminazione dei patogeni



L'asma allergico come conseguenza di disbiosi bifidobatterica

Anche se una correlazione netta ancora non esiste, è sempre più evidente come un determinato tipo di microbiota neonatale giochi un ruolo nella programmazione perinatale dell'asma.

Numerose prove sperimentali hanno infatti evidenziato la rilevanza del microbiota intestinale nel determinare la presenza di cellule immunitarie e il loro reclutamento nei diversi tessuti, nonché nello sviluppo di tolleranza immunitaria. È stato infatti chiaramente dimostrato che la modifica del microbiota

conseguente a terapia antibiotica aumenta il rischio di asma allergico negli animali da laboratorio. Lo stretto legame tra esposizione ad antibiotici nella fase perinatale e il rischio successivo di sviluppo di malattie allergico-asmatiche è supportato anche dall'epidemiologia.



La modifica del microbiota conseguente a terapia antibiotica perinatale aumenta il rischio di sviluppare malattie allergico-asmatiche

Recenti prove suggeriscono infatti che il rischio di soffrire di asma sia più alto in bambini che hanno manifestato disbiosi del microbiota intestinale durante i primi 100 giorni di vita. E tale rischio sembra associato a particolari fluttuazioni del microbiota. In particolare, in uno studio che ha analizzato il microbiota intestinale di 319 bambini si è evidenziato che quelli a rischio di manifestazione asmatica presentano una significativa diminuzione dell'abbondanza relativa di generi come *Faecalibacterium*, *Lachnospira*, *Rothia* e *Veillonella*. Inoltre, l'impianto di questi gruppi batterici in topi germ-free ha ridotto l'infiammazione delle prime vie aeree, suggerendo che l'assenza di alcuni gruppi microbici possa svolgere sicuramente un ruolo causale nello sviluppo dell'asma. È stata anche osservata, come per l'eczema atopico, un'associazione tra la riduzione della biodiversità intestinale durante il primo mese di vita e una maggiore prevalenza di asma nei bambini di 7 anni. Contemporaneamente la scarsa presenza di *Lachnospira* e l'abbondanza di *Clostridi* a 3 mesi sono risultati associati a un incremento del rischio di asma a 4 anni di età.

La dimostrazione che i bambini allergici presentano un aumento di *Clostridi* e una contemporanea riduzione di bifidobatteri rispetto ai soggetti non allergici era già nota agli inizi del 2000. I risultati di uno studio pubblicato su *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* nel 2001 suggeriscono infatti che il rapporto *Lachnospira/Clostridium* potrebbe essere usato, oltre alla rilevazione del contenuto intestinale di bifidobatteri, come un marcatore microbico per prevedere il rischio di sviluppo di asma.



L'elevato rapporto tra Lachnospira e Clostridium può essere usato per rilevare il contenuto di bifidobatteri e come un indicatore di incremento del rischio di sviluppare asma

In particolare, la presenza di *Clostridium difficile* rilevata nel primo mese di vita, in concomitanza con un'assenza di bifidobatteri, è risultata positivamente associata alla manifestazione di asma entro i 6-7 anni di età.

La più forte correlazione tra composizione del microbiota intestinale neonatale e la possibile successiva manifestazione atopica dipende però in assoluto dal contenuto in bifidobatteri.



La disbiosi bifidobatterica neonatale è il maggior indicatore di rischio di sviluppare asma

Coliche infantili e *wheezing* come conseguenze di disbiosi bifidobatterica

Anche nel neonato e nel lattante agitato, irritato, con difficoltà a riposare e con pianto continuativo (causato tra l'altro da dolore addominale e coliche) è stata osservata una correlazione con la scarsità dei bifidobatteri, in particolare del genere *Bifidobacterium bifidum*.

L'agitazione e il pianto continuativo, anche causato da dolore addominale e coliche, è correlato alla scarsità dei bifidobatteri, in particolare del genere Bifidobacterium bifidum



Già nel 2001 su *Archives of Disease in Childhood* è stata infatti evidenziata la correlazione fra bambini agitati con coliche e la scarsa presenza di bifidobatteri, parallelamente all'aumento di clostridi e al successivo sviluppo di atopie. Lo studio ha infatti mostrato che l'agitazione durante la 7° settimana di vita e il pianto da colica durante la 12° sono caratteristiche che differenziano significativamente i bambini che in seguito hanno sviluppato una malattia atopica. È stato quindi dimostrato che un ridotto e precoce apporto di bifidobatteri nel microbiota intestinale ha preceduto il successivo sviluppo prima di agitazione e coliche e poi di atopia.

Successivamente su *PlosOne* nel 2012 è stato confermato che, nel neonato e nel lattante, il pianto continuativo da coliche è inversamente proporzionale alla crescita dei bifidobatteri, in particolare di *B. bifidum*. Lo studio aveva l'obiettivo di correlare la crescita bifidobatterica alla riduzione del pianto continuativo per coliche nel neonato. I risultati hanno confermato che la formazione del microbiota intestinale è un processo graduale e che i bifidobatteri, nel giro di poche settimane, emergono come il gruppo batterico dominante che correla con la riduzione del pianto continuativo. I dati registrati dimostrano che singole specie di *Bifidobacterium* esercitano effetti distinti sull'immunità e sul rischio di malattia: i bambini allergici sono più spesso colonizzati da *Bifidobacterium adolescentis*, mentre i bambini sani ospitano principalmente ceppi di *Bifidobacterium bifidum*.

Un altro recentissimo studio pubblicato su *Nature Medicine* nel 2018 ha analizzato il microbiota fecale di bambini con wheezing, evidenziando una significativa riduzione di bifidobatteri e un minor livello di citochine Th1 rispetto al controllo sano, che presenta un maggior livello di citochine Th2. Non è stata invece rilevata alcuna differenza significativa nella quantità di lattobacilli ed è stato dimostrato che solo basse quantità di *Bifidobacterium* sono correlate ad asma.

I disturbi metabolici come conseguenza di disbiosi bifidobatterica

Il fenotipo obeso e alcuni disturbi legati all'obesità sono correlati a un'alterazione della composizione del microbiota intestinale. Il microbiota "obesogenico", quello cioè capace di estrarre con una performance maggiore del normale l'energia residua presente nel contenuto intestinale, può essere foriero di malattia metabolica e obesità.

Studi sperimentali finalizzati a comprendere il legame tra microbiota e obesità, da valutare comunque con attenzione per capire se i risultati ottenuti sui modelli murini siano traslabili all'uomo, ci hanno permesso di comprendere la possibile genesi batterica del disturbo.



Precise alterazioni del microbiota intestinale sono correlate con l'obesità

Negli ultimi anni è stato infatti suggerito come i primi asset microbici colonizzanti il neonato possano effettivamente predire il futuro sovrappeso nei bambini. In particolare è stato osservato che l'abbondanza di bifidobatteri in soggetti di 6-12 mesi è inversamente correlata con il sovrappeso a 7 anni; inoltre, un ampio studio eseguito su 909 neonati di 1 mese di vita ha osservato una correlazione tra la presenza di *Bacteroides fragilis* e la misura del BMI analizzata successivamente tra 1 e 10 anni. Maggiore è la presenza del batterio, più elevato è il BMI.



L'abbondanza di bifidobatteri nei neonati e nei lattanti è inversamente correlata con il sovrappeso

I fattori capaci di disturbare l'equilibrio microbico durante i primi mesi di vita, e che quindi possono svolgere un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'obesità infantile e dello sviluppo di sindrome metabolica, sono molteplici. Sicuramente una barriera intestinale non correttamente funzionante è una di queste criticità, così come lo è l'esposizione antibiotica nella prima infanzia. Le terapie antibiotiche ripetute sono, in particolare, un fattore rilevante per il successivo sviluppo di malattie metaboliche.



Le terapie antibiotiche sono un fattore favorente lo sviluppo di malattie metaboliche

Diverse analisi su modelli murini hanno infatti dimostrato che l'alterazione del microbiota intestinale provocata dagli antibiotici durante la prima infanzia può determinare conseguenze metaboliche di lunga durata, come l'adiposità localizzata, l'aumento di peso, la resistenza all'insulina, il diabete di tipo 2 e la steatosi epatica. In uno di questi studi è stato anche osservato un dato ancora più preoccupante, ovvero come l'effetto sull'ospite rimanga sostenuto nel tempo, anche quando le alterazioni del microbiota sono scomparse.

Le conseguenze metaboliche dell'alterazione del microbiota, provocata dalle terapie antibiotiche, permangono per lungo tempo, anche dopo la scomparsa di tali modifiche



Un recente studio eseguito su più di 260.000 persone ha rilevato che, oltre alla correlazione fra esposizione antibiotica e obesità, in realtà è ancora più significativa la correlazione fra infezioni e obesità. E questi risultati dimostrano in modo chiaro l'importanza causale dei batteri nella genesi di un fenotipo obeso.

Un'ulteriore ampia analisi eseguita su una numerosa coorte di bambini ha confermato l'esistenza di un'associazione diretta tra l'uso dell'antibiotico nella prima infanzia e l'obesità infantile suggerendo, quindi, che la disbiosi causata dall'esposizione a tali farmaci, in una fase prenatale o postnatale, possa effettivamente aumentare il rischio di diventare obesi.

Numerosi altri studi epidemiologici hanno invece dimostrato come l'esposizione agli antibiotici si associ anche a effetti metabolici a lungo termine.

Anche nel caso dell'obesità il ruolo dei bifidobatteri è dominante, tanto che la loro abbondanza in neonati e lattanti è risultata inversamente proporzionale, o addirittura antagonista, alla Gram-negatività totale del microbiota. La somministrazione antibiotica, riducendo infatti la presenza di bifidobatteri, favorisce la crescita di popolazioni Gram-negative che liberano grandi quantità di LPS in grado di indurre infiammazione TNF-mediata, anche per lunghi periodi.

La somministrazione di 3-4 cicli di terapia antibiotica potrebbe essere sufficiente per esporre un bambino allo stimolo infiammatorio LPS-mediato anche per 18 mesi durante i suoi primi 5-6 anni di vita. Una così lunga perturbazione infiammatoria potrebbe sicuramente innescare meccanismi obesogenici.

Maggiore è il numero di bifidobatteri intestinali in un bambino e minore è il rischio di sviluppo di un fenotipo obeso, anche dopo la scomparsa di tali modifiche



Le malattie infiammatorie intestinali come conseguenza di disbiosi bifidobatterica

Le IBD, la IBS, il diabete mellito di tipo 1 (DT1) e altri disturbi cronici che possono manifestarsi nella vita adulta sono stati associati alla disbiosi bifidobatterica infantile precoce.

Per le malattie intestinali alcuni studi hanno suggerito una correlazione tra la presenza di alcuni *pattern* microbici neonatali e la successiva manifestazione di disturbi infiammatori. Sebbene manchino ancora dati conclusivi, non può essere messa in discussione la forte correlazione esistente tra IBD e un *pattern*

microbico caratterizzato nell'adulto da un eccesso di *Proteobacteria*, con netta preponderanza del genere *Escherichia*, e assenza o forte riduzione del genere *Faecalibacterium*.



È forte la correlazione fra IBD ed eccesso di proteobatteri e riduzione di Faecalibacterium nell'adulto

Più netta è invece la correlazione tra microbiota neonatale e manifestazione di DT1. Studi longitudinali eseguiti sui bambini hanno dimostrato una bassa biodiversità microbica intestinale e una diminuzione dell'abbondanza del batterio produttore di butirrato per eccellenza, *Faecalibacterium prausnitzii*. Le specie che producono butirrato sono infatti più abbondanti nei bambini non diabetici ed è stato suggerito che questi batteri abbiano un ruolo chiave nel ridurre il rischio di sviluppare DT1.



È netta la correlazione fra DT1 e variazioni del microbiota neonatale, che risulta caratterizzato da bassa biodiversità e riduzione di Faecalibacterium

Alcuni studi hanno anche valutato l'influenza di un precoce impianto di microbiota sulla successiva progressione a diabete autoimmune. Gli esperimenti sui topi NOD (non obesi e diabetici) hanno dimostrato che le modificazioni precoci del microbiota, ottenute con trattamenti antibiotici a basse dosi, alterano effettivamente il microbiota intestinale e le popolazioni di linfociti T, aumentando così il rischio di diabete e accelerandone lo sviluppo.

Anche nell'uomo recenti evidenze suggeriscono un ruolo della disbiosi precoce nello sviluppo futuro del diabete autoimmune. È stato dimostrato per esempio che le perturbazioni del microbiota durante la prima infanzia possono generare uno stato pro-infiammatorio LPS-mediato che facilita lo sviluppo di malattie autoimmuni. A questo proposito, alcune indagini hanno riportato l'esistenza di pattern microbici in neonati che in seguito hanno sviluppato DT1, più difficilmente rintracciabili in bambini sani.

Bibliografia

- Allali I, Arnold JW, Roach J, Cadenas MB, Butz N, Hassan HM, Koci M, Ballou A, Mendoza M, Ali R, Azcarate-Peril MA. A comparison of sequencing platforms and bioinformatics pipelines for compositional analysis of the gut microbiome. *BMC Microbiol* 2017; 17 (1): 194.
- Avershina E, Lundgard K, Sekelja M, Dotterud C, Storro O, Oien T, Johnsen R, Rudi K. 2016. Transition from infant- to adultlike gut microbiota. *Environ Microbiol* 18:2226 –2236.
- Backhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, Li Y, Xia Y, Xie H, Zhong H, Khan MT, Zhang J, Li J, Xiao L, Al-Aama J, Zhang D, Lee YS, Kotowska D, Colding C, Tremaroli V, Yin Y, Bergman S, Xu X, Madsen L, Kristiansen K, Dahlgren J, Wang J. 2015. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe* 17:690 –703.
- Binda C, Lopetuso LR, Rizzatti G, Gibiino G, Cennamo V, Gasbarrini A. Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Dig Liver Dis* 2018 May; 50 (5): 421-428.
- Brotman RM, Ravel J, Bavoil PM, Gravitt PE, Ghanem KG. Microbiome, sex hormones, and immune responses in the reproductive tract: challenges for vaccine development against sexually transmitted infections. *Vaccine*. 2014 Mar 20;32(14):1543-52.
- Conroy ME, Shi HN, Walker WA. 2009. The long-term health effects of neonatal microbial flora. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 9:197–201.
- De Gooijau MC, Fuentes S, van den Bogert B, Honkanen H, de Vos WM, Welling GW, Hyoty H, Harmsen HJ. 2014. Aberrant gut microbiota composition at the onset of type 1 diabetes in young children. *Diabetologia* 57:1569 – 1577.
- De Vos WM. Microbe Profile: Akkermansia muciniphila: a conserved intestinal symbiont that acts as the gate-keeper of our mucosa. *Microbiology*. 2017;163(5):646-648.
- Di Pierro F. *Argomenti di Terapia Batterica* (II Edizione 2019) CEC Editore Srl pg 397-452.
- Di Pierro F, Basile I, Danza ML, Venturelli L, Contini R, Risso P, Colombo M. Use of a probiotic mixture containing Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB12 and Enterococcus faecium L3 in atopic children. *Minerva Pediatr* 2018; 70 (5): 418-424.
- DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, Gotsch F, Kim CJ, Erez O, Edwin S, Relman DA. 2008. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One* 3:e3056.
- Dogra S, Sakwinska O, Soh SE, Ngom-Bru C, Brück WM, Berger B, et al. Dynamics of infant gut microbiota are influenced by delivery mode and gestational duration and are associated with subsequent adiposity. *MBio*. 2015;6:e02419-14.
- Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:11971–11975.
- Dominguez-Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, Cox LM, Amir A, Gonzalez A, Bokulich NA, Song SJ, Hoashi M, Rivera-Vinas JI, Mendez K, Knight R, Clemente JC. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nat Med*. 2016 Mar;22(3):250-3.
- Gomes AC, Hoffmann C, Mota JF. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut Microbes* 2018; 9 (4): 308-325.

Gomez-Llorente MA, Romero R, Chueca N, Martinez-Cañavate A, Gomez-Llorente C. Obesity and Asthma: A Missing Link. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7). pii: E1490.

Guarino A, Lo Vecchio A, Berni Canani R. Chronic diarrhoea in children. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2012; 26 (5): 649-61.

Haahtela T, Holgate S, Pawankar R, Akdis CA, Benjaponpitak S, Caraballo L, Demain J, Portnoy J, von Hertzen L; WAO Special Committee on Climate Change and Biodiversity. The biodiversity hypothesis and allergic disease: world allergy organization position statement. *World Allergy Organ J* 2013; 6 (1): 3.

Haberman Y, Tickle TL, Dexheimer PJ, Kim MO, Tang D, Karns R, Baldassano RN, Noe JD, Rosh J, Markowitz J, Heyman MB, Griffiths AM, Crandall WV, Mack DR, Baker SS, Huttenhower C, Keljo DJ, Hyams JS, Kugathasan S, Walters TD, Aronow B, Xavier RJ, Gevers D, Denson LA. Pediatric Crohn disease patients exhibit specific ileal transcriptome and microbiome signature. *J Clin Invest* 2014; 124 (8): 3617-33.

Hagen PC, Skelley JW. Efficacy of Bifidobacterium Species in Prevention of Necrotizing Enterocolitis in Very-Low Birth Weight Infants. A Systematic Review. *J Pediatr Pharmacol Ther* 2019; 24 (1): 10-15.

Hansen R, Scott KP, Khan S, Martin JC, Berry SH, Stevenson M, Okpapi A, Munro MJ, Hold GL. 2015. First-pass meconium samples from healthy term vaginally-delivered neonates: an analysis of the microbiota. *PLoS One* 10:e0133320.

Hill CJ, Lynch DB, Murphy K, Ulaszewska M, Jeffery IB, O'Shea CA, Watkins C, Dempsey E, Mattivi F, Tuohy K, Ross RP, Ryan CA, O'Toole PW, Stanton C. Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the INFANTMET Cohort. *Microbiome.* 2017 17;5(1):4.

Jacobson A, Lam L, Rajendram M, Tamburini F, Honeycutt J, Pham T, Van Treuren W, Pruss K, Stabler SR, Lugo K, Bouley DM, Vilches-Moure JG, Smith M, Sonnenburg JL, Bhatt AS, Huang KC, Monack D. A Gut Commensal-Produced Metabolite Mediates Colonization Resistance to Salmonella Infection. *Cell Host Microbe* 2018; 24 (2): 296-307.e7.

Jimenez E, Fernandez L, Marin ML, Martin R, Odriozola JM, Nueno-Palop C, Narbad A, Olivares M, Xaus J, Rodriguez JM. 2005. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* 51:270–274.

Johnson CC, Ownby DR. 2017. The infant gut bacterial microbiota and risk of pediatric asthma and allergic diseases. *Transl Res* 179:60–70.

Kalliomäki et al. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Jan;107(1):129-34.

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.

Khokhlova EV, Smeianov VV, Efremov BA, Kafarskaia LI, Pavlova SI, Shkorporov AN. Anti-inflammatory properties of intestinal Bifidobacterium strains isolated from healthy infants. *Microbiol Immunol* 2012; 56 (1): 27-39.

Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(Suppl 1): S4578 – S4585.

Korpela K et al. Antibiotic use in childhood alters the gut microbiota and predisposes to overweight. *Microb Cell* 2016 Jul 4; 3 (7): 296-298.

Kostic AD, Gevers D, Siljander H, Vatanen T, Hyötyläinen T, Hamalainen AM, Peet A, Tillmann V, Poho P, Mattila I, Lahdesmaki H, Franzosa EA, Vaarala O, de Gooijau M, Harmsen H, Ilonen J, Virtanen SM, Clish CB, Oresic M, Huttenhower C, Knip M, DABIMMUNE Study Group, Xavier RJ. 2015. The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell Host Microbe* 17:260–273.

Langdon A. et al. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome Medicine* 2016; 8: 39.

Li DK, Chen H, Ferber J, Odouli R. 2017. Infection and antibiotic use in infancy and risk of childhood obesity: a longitudinal birth cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 5:18–25.

Lugli GA, Rodriguez JM, Bode L, de Vos W, Gueimonde M, Margolles A, van Sinderen D, Ventura M. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev* 2017; 81 (4). pii: e00036-17.

Makino H. Bifidobacterial strains in the intestines of newborns originates from their mothers. *Bios Mic Food H* 2018; 37 (4): 79-85.

Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, Belzer C, Delgado Palacio S, Arboleya Montes S, Mancabelli L, Lugli GA, Rodriguez JM, Bode L, de Vos W, Gueimonde M, Margolles A, van Sinderen D, Ventura M. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev* 2017; 81 (4). pii: e00036-17.

Mohan R et al. Effects of Bifidobacterium lactis BB12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double blind. *J. Clin Microbiol* 2006 Nov; 44 (11): 4025-31.

Nuriel-Ohayon M, Neuman H, Koren O. 2016. Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy. *Front Microbiol* 7:1031.

Nylund L, Nermes M, Isolauri E, Salminen S, de Vos WM, Satokari R. 2015. Severity of atopic disease inversely correlates with intestinal microbiota diversity and butyrate-producing bacteria. *Allergy* 70: 241–244.

O'Sullivan A, Farver M, Smilowitz JT. 2015. The influence of early infant-feeding practices on the intestinal microbiome and body composition in infants. *Nutr Metab Insights* 8:1–9.

Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, Glickman JN, Siebert R, Baron RM, Kasper DL, Blumberg RS. 2012. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* 336:489–493.

Pärtty A, Kalliomäki M, Endo A, Salminen S, Isolauri E. Compositional development of Bifidobacterium and Lactobacillus microbiota is linked with crying and fussing in early infancy. *PLoS One* 2012; 7 (3): e32495.

Pei Z, Heinrich J, Fuertes E, Flexeder C, Hoffmann B, Lehmann I, Schaaf B, von Berg A, Koletzko S, Influences of Lifestyle-Related Factors on the Immune System and the Development of Allergies in Childhood plus Air Pollution and Genetics (LISAplus) Study Group. 2014. Cesarean delivery and risk of childhood obesity. *J Pediatr* 164:1068–1073.e2.

Reinhardt C, Reigstad CS, Backhed F. 2009. Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 48:249–256.

Rodriguez JM. 2014. The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Adv Nutr* 5:779–784.

Sela DA, et al. (2008) The genome sequence of Bifidobacterium longum subsp. infantis reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:18964–18969.

Sevelsted A, Stokholm J, Bonnelykke K, Bisgaard H. 2015. Cesarean section and chronic immune disorders. *Obstet Gynecol Surv* 70:303–305.

Simonytė Sjödin K, Hammarström ML, Rydén P, Sjödin A, Hernell O, Engstrand L, West CE. Temporal and long-term gut microbiota variation in allergic disease: A prospective study from infancy to school age. *Allergy* 2019; 74 (1): 176-185.

- Tojo R et al. Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J Gastroenterol* 2014 Nov 7; 20 (41): 15163-15176.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444 (7122): 1027-31.
- Turroni F, Taverniti V, Ruas-Madiedo P, Duranti S, Guglielmetti S, Lugli GA, Gioiosa L, Palanza P, Margolles A, van Sinderen D, Ventura M. *Bifidobacterium bifidum* PRL 2010 modulates the host innate immune response. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(2):730-40.
- Turta O, Rautava S. 2016. Antibiotics, obesity and the link to microbes: what are we doing to our children? *BMC Med* 14:57.
- Van Nimwegen FA, Penders J, Stobberingh EE, Postma DS, Koppelman GH, Kerkhof M, Reijmerink NE, Dompeling E, van den Brandt PA, Ferreira I, Mommers M, Thijs C. 2011. Mode and place of delivery, gastrointestinal microbiota, and their influence on asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol* 128:948 -955.e1-3.
- Vellend M. 2010. Conceptual synthesis in community ecology. *Q Rev Biol* 85:183-206.
- Ventura M, O'Flaherty S, Claesson MJ, Turroni F, Klaenhammer TR, van Sinderen D, O'Toole PW. 2009. Genome-scale analyses of healthpromoting bacteria: probiogenomics. *Nat Rev Microbiol* 7:61-71.

