

**VASTASYNTYNEEN SUOLISTOFLOORAN MUODOSTUMINEN JA SIIHEN
VAIKUTTAVAT TEKIJÄT**

Juho Pitkänen LK

Opiskelijanumero: 1979172

Oulu 12.3.2015

Ohjaajat:

Matti Uhari prof., Marjo Renko, dosentti

OULUN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

OULUN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

Lääketieteen koulutusohjelma

TIIVISTELMÄ

Pitkänen, Juho Matias

Vastasyntyneen suolistoflooran muodostuminen ja siihen vaikuttavat tekijät

Syventävien opintojen tutkielma: 28 sivua

Suolistofloora on hyvin monimutkainen bakteeriympäristö. Vastasyntyneen suolistofloora on epästabiilimpi ja dynaamisempi, kuin aikuisen. Useat tekijät muokkaavat vastasyntyneen suolistoflooran koostumusta. Suoliston bakteeristolla ajatellaan olevan merkittäviä vaikutuksia yksilön terveyteen. Uudenaikaiset 16S-rRNA- sekvensointiin perustuvat menetelmät ovat korvanneet klassiset menetelmät suolistoflooraa tutkittaessa. Kirjallisuuskatsauksessa käsitellään vastasyntyneen suolistoflooran koostumusta ja sen muodostumiseen vaikuttavia tekijöitä. Lisäksi katsauksessa esitellään suolistoflooran tutkimiseen käytettäviä menetelmiä historiasta nykypäivään.

Avainsanat: suolistofloora, vastasyntynyt

1. JOHDANTO	1
2. SUOLISTOFLOORAN TUTKIMISEEN KÄYTETTÄVÄT MENETELMÄT	3
2.1. Perinteiset menetelmät	3
2.1.1. Bakteeriviljely	3
2.1.2. Bakterien metaboliaan perustuvat määritykset	3
2.1.3. Rasvahappomääritys.....	4
2.2. Uudenaikaiset menetelmät	6
2.2.1. Fylogeneettiset menetelmät.....	6
2.2.1.1. 16S-rRNA- sekvensointi.....	7
2.2.1.2. Leimausmenetelmät.....	9
2.2.1.3. DNA-mikrosiru.....	9
2.2.2. Geneettinen potentiaali: metagenomiikka.....	10
2.2.3. Toiminnallinen aktiivisuus: metatranskriptomiikka, -proteomiikka ja -bolomiikka	12
2.2.3.1. Metatranskriptomiikka.....	12
2.2.3.2. Metaproteomiikka.....	13
2.2.3.3. Metabolomiikka.....	14
3. VASTASYNTYNEEN SUOLISTOFLOORA.....	15
3.1. Onko sikiöllä suolistofloora?	15
3.2. Vastasyntyneen suolistofloora ja sen muotoutuminen.....	16
4. VASTASYNTYNEEN SUOLISTOFLOORAN MUOTOUTUMISEEN VAIKUTTAVAT TEKIJÄT	18
4.1. Synnytystapa	18
4.2. Äidin ja muiden kontaktien suolistofloora.....	19
4.3. Antibioottihoito.....	19
4.3.1. Äidin saama antibioottihoito	19
4.3.2. Vastasyntyneen saama antibioottihoito	20
4.4. Vastasyntyneen ravitsemus.....	21
4.5. Probiootit.....	22
5. LOPUKSI	24
LÄHTEET	25

1. JOHDANTO

Aikuisen ihmisen suolistossa elää yli tuhat erilaista bakteerilajia, jotka yhdessä arkkibakteerien, virusten ja aitotumallisten lajien kanssa muodostavat 10^{14} mikrobia sisältävän ja 1,5-2 kg:n painoisen mikrobimassan. Yleisimmät noin 160 bakteerilajia muodostavat suurimman osan suolen mikrobimassasta, mutta suolistoflooran koostumus on yksilöllinen (1). Aikaisemmin on ajateltu, että suolistoflooran muodostuminen alkaisi syntymän jälkeen. Nykytutkimusten perusteella voidaan kuitenkin olettaa, että sikiön suolisto ei ole täysin steriili, vaan kolonisaatio saattaa alkaa jo ennen syntymää (2). Syntymässä suolistofloora altistuu joko synnytyskanavan tai ihon bakteeristolle, mikä osaltaan ohjaa sen kehittymistä (3). Suolistoflooran muodostumiseen vaikuttaa myös vastasyntyneen hoitopaikka (4). Vastasyntyneisyyskaudella suolistoflooran koostumus vaihtelee suuresti muistuttaen sekä äidin että hoitohenkilökunnan flooraa (5). Perimällä, antibioottihoidoilla sekä ravitsemuksella on merkittävä rooli lapsen mikrobiflooran mukautumisessa (6-8). Erityisen mielenkiinnon kohteena ovat olleet probiootit, joiden syöminen mahdollisesti vähentää lapsen allergiariskiä sekä koliikkia (9,10). Suolistoflooraan vaikuttamalla voitaneen tulevaisuudessa vähentää joidenkin yleisten sairauksien, kuten diabeteksen, Crohnin taudin, MS-taudin ja liikalihavuuden, riskiä (11-14). On ennustettu, että tulevaisuudessa sairauksia hoidetaan aiempaa yksilöllisemmin ottaen huomioon kunkin potilaan yksilöllinen bakteeriston koostumus (15).

Suuri muuntuvuus tekee mikrobiflooran tutkimisesta haasteellista. Mikrobiflooraa on perinteisesti tutkittu kasvattamalla bakteereita kasvatusalustoilla ja tunnistamalla niitä viljelmistä. Näin saadaan selville kuitenkin vain murto-osa suolistoflooran mikrobikoostumuksesta (16,17). Uudenaikaisilla, korkean suorituskyvyn menetelmillä voidaan tutkia ihmisen mikrobiston koko genomi-informaatiota eli mikrobiomia. PCR (Polymerase Chain Reaction) -pohjaisilla menetelmillä on mahdollisuus päästä tarkkaan lajitunnistukseen. Näillä 16S-rRNA-jaksojen sekvensointiin perustuvilla menetelmillä ei kuitenkaan saada tietoa bakteeriston toiminnallisesta aktivaatiosta. Suolistoflooran muutosten tutkimiseen onkin kehitetty menetelmiä, joilla voidaan tutkia mikrobiston dynamiikkaa sairauksien ja hoitojen aikana. Nämä menetelmät pureutuvat kaikkien geenien sijaan

kyseisellä hetkellä aktiivisiin geeneihin, käyttävät hyväksi proteiinitason analytiikkaa tai tutkivat mikrobien metaboliitteja. (16).

2. SUOLISTOFLOORAN TUTKIMISEEN KÄYTETTÄVÄT MENETELMÄT

2.1. Perinteiset menetelmät

2.1.1. Bakteriviljely

Suolistoflooraa on perinteisesti tutkittu kasvattamalla bakteereja kasvatusalustoilla ja tunnistamalla niitä viljelmistä. Tämä menetelmä on kuitenkin työläs sekä rajoitettu. On arvioitu, että bakteeriston täydellinen eristäminen ja viljely yhdestä ihmisen ulostenäytteestä vaatisivat kokonaisen miestyövuoden laboratoriotyötä. Tämän jälkeenkin tekniikka on epäherkkä ja huonosti toistettavissa (18). Moore ja Holdeman törmäsivät jo 1970-luvulla haasteisiin, joita suolistoflooran monimuotoisuus aiheuttaa viljelytutkimuksille. Heidän havaintojensa mukaan suolistobakteerien kasvatukseen *in vitro* tarvittavat olosuhteet olivat erityisen haastavat. He ymmärsivät myös, että massiivisen mikrobiston merkityksen selvittäminen vaatisi valtavan määrän viljelyitä, tunnistamista ja tiedon käsittelyä (19). Mooren ja Holdemanin tekemä viljelytutkimus havaitsi suoliston mikrobiflooran sisältävän noin 400–500 bakteerilajia (20). Tätä pidettiin yleisenä totuutena molekyylietekniikoiden kehittymiseen asti. Menetelmien uudistuttua on havaittu, että viljelyllä saadaan tunnistettua vain osa suoliston bakteerilajeista. Eckburg ryhmineen tutki kolmen terveen aikuisen suolistoflooraa uudenaikaisella tutkimusmenetelmällä havaiten, että löydetyistä 395 bakteerifylotyypistä vain 20 % oli tunnistettu aikaisemmin bakteeriviljelmistä (17). Vastaavasti japanilaisvanhuksilla teetetyssä tutkimuksessa 46 % fylotyypeistä oli aikaisemmin tunnistettu viljelemällä (21). Koska suurin osa suolistobakteereista on anaerobeja, useimpia niistä ei pystytä viljelemään. Uudenaikaiset menetelmät ovatkin ajaneet ohi viljelymenetelmistä. Bakteerilajin määritys vaatii kuitenkin, että bakteeri on viljeltävissä ja usean geenitoiminnon suhteen luonnehdittavissa (22).

2.1.2. Bakterien metaboliaan perustuvat määritykset

Huomattavasti bakteeriviljelyä herkempiin tuloksiin päästään tutkimalla bakteerien komponentteja, hormonimetaboliitteja ja entsyymiaktiivisuutta. Nämä tutkimusmenetelmät ovat kuitenkin yhtä työläitä kuin bakteeriviljely. Viljelyyn perustuvaan lajitunnistukseen verrattuna näillä menetelmillä saavutetaan kuitenkin parempi tieto bakteerien elinympäristöstä ja suolistoflooran merkityksestä terveydelle (23). Ravinnon vaikutusta suolistoflooran selvittävät tutkijat havaitsivat, ettei viljelyyn ja lajitunnistukseen perustuvilla menetelmillä saada merkittäviä tuloksia aikaan. Täten bakteerien metabolisen aktiivisuuden tutkiminen nousi tutkijoiden kiinnostuksen kohteeksi (24). Viljelytutkimusten epäonnistuttua yrityksessään metabolisilla menetelmillä onnistuttiin osoittamaan ruokavalion vaikutus bakteeriflooran koostumukseen. Reddy ym. tutkivat, miten länsimaisen, runsaasti lihaa sisältävän, ruokavalion ja lihattoman ruokavalion noudattaminen vaikuttivat suoliston bakteerien β -glukuronidaasiaktiivisuuteen (25). Runsaasti lihaa nauttivien bakteeriflooran β -glukuronidaasiaktiivisuus oli huomattavasti suurempi kuin lihatonta ruokavaliota noudattavilla. β -glukuronidaasin aktiivisuutta käytettiin indikaattorina, sillä se oli aikaisemmin yhdistetty useisiin suoliston aerobisiin ja anaerobisiin mikrobeihin. Myös Goldin ym. tutkivat bakteerientsyymejä ja ruokavalion vaikutusta niiden määriin (26). He kohdistivat tutkimuksensa entsyymeihin, joiden ajateltiin osallistuvan karsinogeenien aktivoitumiseen. Entsyymimääritykset perustuivat näytteiden sentrifugointiin sekä ohjattuihin entsyymireaktioihin. β -glukuronidaasi-, nitroreduktaasi- ja 7- α -dehydroksylaasiaktiivisuudet olivat kaikki matalampia kasvisruokavaliota noudattavilla verrattuna lihaa syöviin. Ryhmä totesi myös, että *Lactobacillus acidophilus*- maitohappobakteerien syöminen vähensi bakteerien β -glukuronidaasi- ja nitroreduktaasiaktiivisuutta. Entsyymitutkimusten avulla tutkijat löysivät mahdollisen syy-yhteyden ruokavalion ja suolistosyövän välille (27).

2.1.3. Rasvahappomääritys

1970-luvun lopussa laboratorioissa otettiin käyttöön menetelmiä, joita voidaan käyttää tehokkaasti anaerobibakteerien tunnistamiseen (28,29). Nämä menetelmät perustuvat bakteerien tunnistamiseen bakteerisoluista löytyvien kemiallisten yhdisteiden avulla. Tunnistamiseen käytettyjä yhdisteitä voivat olla erilaiset entsyymit, DNA, lipopolysakkaridit,

hiilihydraatit, proteiinit sekä rasvahapot. Aikaisempiin menetelmiin verrattuna nämä menetelmät ovat nopeita eivätkä vaadi pitkiä viljelyitä. Lisäksi niiden avulla pysytään tunnistamaan bakteereita, jotka eivät ole elinkelpoisia (30). Rasvahappoihin perustuvat analyysimenetelmät nousivat suosituiksi johtuen niiden nopeudesta, yksinkertaisuudesta ja lajitunnistustehokkuudesta (29,30). Tehokkuus perustuu suureen vaihteluun rasvahappojen määrissä lajien välillä. Rasvahappoja etsitään näytteistä neste- tai kaasukromatografian avulla. Tällä tavalla voidaan tutkia suoliston suurta bakteeripopulaatiota tehokkaasti (30).

Eerola ja Lehtonen havaitsivat ongelman rasvahappoanalyysien ja bakteerien lajitunnistuksen välillä. Heidän mukaansa kromatografiasta saatavan tiedon käsittelyn tuli tapahtua automaattisesti, jotta laboratoriot voisivat soveltaa menetelmää bakteerien lajitunnistukseen. He tutkivat menetelmiä, joissa lajitunnistus tapahtui laskemalla yhtäläisyyskertoimet bakteerikantojen välille. Tuntemattoman kannan rasvahappoprofiilia verrattiin parhaiten vastaavaan referenssiprofiiliin. Puutokset vertailumenetelmissä saattoivat Eerolan ja Lehtosen mukaan johtaa joskus virheelliseen lajitunnistukseen. Heidän suosittlemassaan menetelmässä kromatografi lähettää analysoitavan bakteerikannan rasvahappoprofiilit tietokoneelle verrattavaksi referensseihin. Tietokone laatii analyysista dendrogrammin, jossa näkyvät testattavaa kantaa lähimpänä olevat referenssikannat. Tutkittavan kannan sijainti dendrogrammissa kuvaa kannan ja referenssien välisiä sekä referenssien keskinäisiä samankaltaisuuksia. Nämä yhdessä kertovat lajitunnistuksen luotettavuuden tason. Mikäli testattava kanta ei ole referenssikantojen joukossa, dendrogrammi näyttää lähimpänä olevat referenssit ja kertoo, kuinka lähellä näitä tutkittava kanta on (30).

Ahtonen ryhmineen tutki kaasu-neste-kromatografian avulla ulosteen erilaisten rasvahappomäärien ja mahasuolikanavan häiriöiden yhteyttä vastasyntyneillä ensimmäisten kolmen elinkuukauden aikana. Erot rasvahappojen suhteellisissa määrissä olivat yhdistettävissä mahasuolikanavan ongelmiin, kuten vatsan turvotukseen ja ripuliin. Tutkijat havaitsivat, että erot vastasyntyneiden rasvahappoprofiileissa johtuivat bakteerifloorien eroavaisuuksista. Muutoksia rasvahappoprofiileihin aiheuttivat muun muassa keisarinleikkaus, matala syntymäpaino sekä synnytyksen aikaiset tai vastasyntyneenä saadut antibioottihoidot. Näin tutkijat saivat tukea hypoteesilleen, jonka mukaan suoliston varhainen kolonisaatio vaikuttaa vastasyntyneiden mahasuolikanavan sairastavuuteen (31).

Tapiainen ym. tutkivat kymmenen terveen lapsen ulostetta käyttäen apunaan rasvahappoanalyysiä. Saatuja rasvahappoprofiileja vertailtiin yhtäläisyyskertoimien avulla. Erot yhtäläisyyskertoimissa kertoivat erosta bakteerikoostumusten välillä (5). Tämä perustui aikaisempaan oletukseen, että samanlaiset bakteerit tuottavat samanlaisia rasvahappoprofiileja (18). Rasvahappoprofiilit kuvasivat suoliston bakteeriston koostumusta ja monimuotoisuutta. Menetelmän avulla tutkijat saivat käyttöönsä tiedon kaikista bakteerilajeista samanaikaisesti. Näin he pystyivät kuvaamaan vastasyntyneiden suolistoflooran muodostumisen vaiheita sekä suoliston bakteerilähteitä. Rasvahappomäärityksen avulla ei kuitenkaan pystytty tunnistamaan yksittäisiä bakteerikantoja eikä määrittämään bakteerien kokonaismäärää näytteessä. Täten suolistossa tapahtuvia muutoksia ei pystytty osoittamaan tietyistä bakteerilajeista johtuviksi (5). Myös mikrobiflooran koostumuksen ja koliikin yhteyttä tutkiva ryhmä havaitsi rasvahappoprofiilien analysoinnin rajallisuuden. Tietokoneanalyysien avulla pystytään tutkimaan rasvahappoprofiilien erojen merkittävyyttä, mutta erot rasvahappoprofiilien välillä eivät suoraan kerro, mitkä bakteerilajit saavat aikaan tutkitut muutokset (32).

2.2. Uudenaikaiset menetelmät

Klassisten menetelmien rajallisuuden paljastuttua tutkijoille suolistoflooran tutkimiseen alettiin kehittää uudenaikaisempia ja parempaan suorituskykyyn pystyviä menetelmiä (kuvio 1). Tämän mahdollisti nopeasti kehittynyt sekä vähitellen myös edullisemmaksi tullut bakteerien genomien tunnistamiseen perustuva laboratoriotekniikka. Aluksi uusien menetelmien tarkoituksena oli pyrkiä tehokkaaseen ja tarkkaan lajitunnistukseen eli fylogeneetiikkaan. Pian kiinnostus suolistoflooran vaihtelevuudesta eri sairauksien ja hoitojen aikana lisääntyi, mikä vaati dynamiikkaa tutkivien menetelmien kehittämistä. Suoliston mikrobiomitutkimusten pyrkimyksenä on selvittää mikrobiyhteisöjen rakenne ja dynamiikka, mikrobien keskinäiset suhteet, vuorovaikutus isännän ja mikrobiston välillä sekä sairauksien vaikutus mikrobiomiin.

2.2.1. *Fylogeneettiset menetelmät*

2.2.1.1. 16S-rRNA- sekvensointi

Suolistoflooran mikrobiyhteisön lajikoostumusta sekä sukulaisuussuhteita päästään tutkimaan tarkasti sekvensoimalla fylogeneettisesti tärkeitä markkereita. Käytetyin näistä on mikrobin ribosomaalinen RNA-(16S-rRNA) geeni (16,33). 16S-rRNA- geeni on kooltaan noin 1500 emäsparia, mikä tekee siitä sopivan sekvensoitavaksi (16). Lisäksi kyseinen geeni löytyy ribosomeista eli käytännössä kaikista elävistä organismeista, joten sen käyttö kattaa kaikki mikrobilajit. 16S-rRNA-geenin käytettävyyttä lisää siitä olemassa olevat tietopankit, jotka sisältävät valtavasti referenssisekvenssejä sekä lajitietoutta (33).

Fylogeneettisissa menetelmissä bakteerinäytteestä eristetään 16S-rRNA- geeniä tai sitä koodaavaa 16S-rDNA:ta. Näistä saadaan 16S-rDNA-klooneja PCR-monistuksen avulla. Monistuksessa käytetään apuna PCR-alukkeita, joista sopivin valitaan tutkimuksen tarkoituksen mukaan (33). Klooneja sekvensoidaan käyttämällä erilaisia kaupallisia sekvensointimenetelmiä (33,34). Saaduissa DNA-sekvensseissä on usein sekvensointiartefaktaa, jonka vaikutus pyritään minimoimaan kohinanpoisto- ja suodatusalgoritmeilla. Suodatetut sekvenssit niputetaan operatiivisiksi lajitunnistussyksiköiksi (engl. operational taxonomic unit, OTU), jotka edustavat samankaltaisia organismeja. Yksiköiden avulla päätellään, mistä fylytyypistä eli 16S-rRNA:n perusteella tehdystä lajitason luokasta, näytteessä on kysymys vertaamalla yksiköitä valmiiden tietopankkien sisältöön (33). Samoiksi fylytyypeiksi tulkitaan sellaiset geenisekvenssien ryhmät, joilla on riittävä samankaltaisuus. Kynnysarvona sekvenssien samankaltaisuudessa pidetään yleensä 97–99 prosentin yhtäläisyyttä (16).

Ensimmäisiä 16S-rRNA-menetelmään perustuvia mikrobi tutkimuksia alettiin kehittää 1980-luvulla. Tästä lähtien niitä on pidetty kultaisena standardina tutkittaessa monimuotoisia mikrobiympäristöjä (35). Zoetendal, Akkermans ja De Vos tutkivat ensimmäisinä suoliston mikrobiflooran koostumusta 16S-rRNA:n perustuvalla menetelmällä 1990-luvun lopussa. He analysoivat 16S-rDNA:ta geelielektroforeesin (TGGE) avulla. Heidän tutkimansa 16 ihmisen suolistofloorat olivat kaikki erilaisia osoittaen ihmisen suolistoflooran yksilöllisyyden. He

myös ehdottivat menetelmää käytettäväksi laajasti tutkittaessa eri tekijöiden vaikutusta suolistoflooraan (36). Toisaalla Suau ryhmineen käytti 16S-rRNA-menetelmää havaiten, että suoliston mikrobilajien monimuotoisuus on paljon runsaampaa, mitä viljelyyn perustuvilla menetelmillä oli osattu olettaa. Aikuisen miehen ulosteesta löydettyistä bakteerilajeista vain 24 % oli kyetty tunnistamaan aikaisemmin muilla menetelmillä (37).

Yksi fylogeneettisen tutkimuksen heikkouksista on epätietoisuus siitä, kuinka korkealle DNA-sekvenssien samankaltaisuuden kynnyсарvo tulisi tutkimuksissa asettaa. Mitä korkeampi kynnyсарvo tutkimuksessa asetetaan, sitä suurempi määrä erillisiä fylotyyppejä löydetään (16). Tämä voi vääristää suuresti tuloksia mikrobiston monimuotoisuutta tutkittaessa. Absoluuttiseen tarkkuuteen päästäisiin vasta silloin, kun kaikki saadut fylotyypit kyettäisiin todentamaan itsenäisiksi lajeiksi viljelemällä (38). Eckburg ryhmineen halusi erotella lähes identtisetkin 16S-rDNA- sekvenssit, jotta lajitunnistuksesta tulisi mahdollisimman tarkka. Tämän takia he käyttivät 99 % kynnyсарvoa (17). Gill ym. kokeili kahta eri kynnyсарvoa, saaden molemmilla erilaiset määrät fylotyyppejä samasta näytteestä (39). Yksittäisten tutkimusten huono läpinäkyvyys aiheuttaa sen, että eri tutkimuksia ei voida yhdistää luotettavasti ilman tulosten uudelleenanalysointia. Tämä johtaa päällekkäisten sekvenssien suureen määrään julkisissa tietopankeissa. Tutkimusten yhdistelemistä hankaloittaa myös käytettävien lukupituuksien ja – alueiden erilaisuudet (38). Erilaiset PCR-alukkeet tunnistavat tiettyjä lajeja herkemmin kuin toiset (33,37). Yleisesti käytetyistä alukkeista osa jättää tunnistamatta hyvin merkittäviäkin suoliston bakteerilajeja. Jotta PCR-monistuksessa tapahtuvia vääristymiä saataisiin minimoitua, on pyrittävä valitsemaan alue, joka monistaa tutkimuksen kannalta mahdollisimman informatiivista DNA-aluetta. Tämä edellyttää, että alukkeen sopivuus tietyn ympäristön tutkimiseen tunnetaan etukäteen. DNA-kloonin sekvensointiin käytettävän menetelmän valinnassa joudutaan usein kompromisseihin, kun puntaroidaan parasta tasapainoa lukupituuden, lukusyvyuden, sekvensoinnin tarkkuuden, menetelmän käytettävyyden ja kustannusten välillä (33). 16S-rRNA- menetelmät ovat tehokkaita kuvattaessa suolistoflooran mikrobiston monimuotoisuutta sekä yhteyksiä tiettyjen mikrobien ja esimerkiksi sairauksien välillä. Näillä menetelmillä ei voida kuitenkaan tehdä johtopäätöksiä syy-seuraussuhteista, sillä 16S-rRNA ei sisällä tietoa mikrobien toiminnallisuudesta. Mikäli esimerkiksi halutaan selvittää, aiheutuuko tietyn bakteerin olemassaolo sairaudesta vai päinvastoin, tarvitaan mikrobiston toiminnallista aktivaatiota kuvaavia tutkimusmenetelmiä (16).

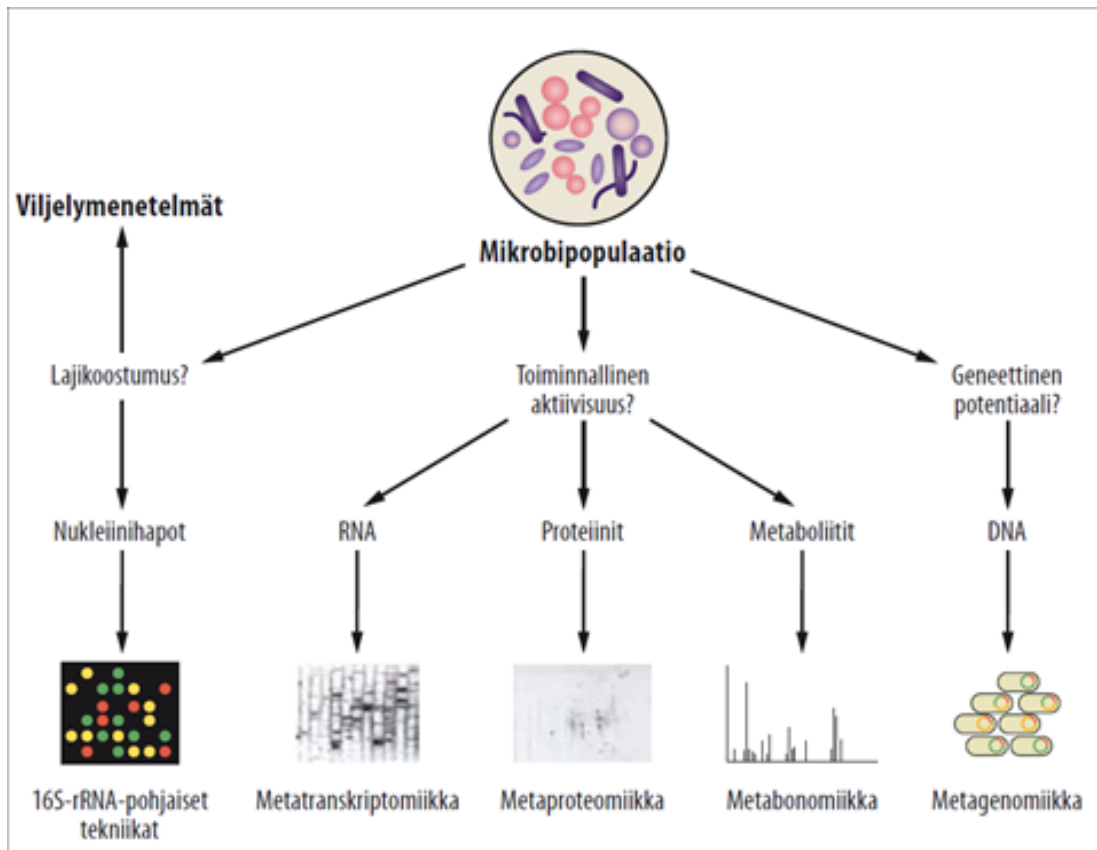
2.2.1.2. Leimausmenetelmät

Sekvensoinnin sijaan fylogeneettisessä tutkimuksessa voidaan käyttää myös niin kutsuttuja leimausmenetelmiä (engl. fingerprinting). Leimausmenetelmässä tietty geeni, yleensä 16S-rRNA, monistetaan ja geenin erilaiset variantit eritellään elektroforeesin avulla (40). Menetelmiä on useita erilaisia, ja kaikki näistä pyrkivät samankaltaiseen lopputulokseen kukin omalla lähestymistavallaan. DNA:n erittely voi tapahtua esimerkiksi lämpögradienttien (TGGE = Temperature Gradient Gel Electrophoresis) tai kemiallisten denaturaatioyhdisteiden (DGGE = Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) avulla (41). Favier ym. käyttivät DGGE-leimausmenetelmää menestyksekkäästi tutkiessaan kahden vastasyntyneen ennalta tuntematonta mikrobistoa (42). Leimausmenetelmät soveltuvat 16S-rDNA-sekvensointia paremmin suolistoflooran muutosten analysointiin. Leimauksesta saatuja rDNA-profiileja voidaan analysoida klusterianalyyseilla sekä muodostamalla yhdenkaltaisuusindeksejä. Näin pystytään seuraamaan suolistoflooran muutoksia tietyllä aikavälillä sekä esimerkiksi ruokavalion vaikutusta mikrobiston koostumukseen (34). Leimausmenetelmät ovat huomattavasti sekvensointimenetelmiä halvempia ja nopeampia, mutta niiden dynamiikka on huonompi ja niistä saatu tieto rajallisempi. Tiedon vertailu yksittäisten tutkimusten välillä on lisäksi mahdotonta (40).

2.2.1.3. DNA-mikrosiru

Yksi käytetyimmistä korkean suorituskyvyn tutkimusmenetelmistä on DNA-mikrosiru. Mikrosiru on mikroskooppilevyn kokoinen lasipinta, joka sisältää tuhansia kovalenttisesti sitoutuneita DNA-koettimia. Mikrosiru voidaan hybridisoida DNA:lla tai RNA:lla (16). DNA-mikrosiru on menetelmänä 16S-rRNA-sekvensoinnin ja leimausmenetelmän välimuoto; sillä voidaan tutkia suuria määriä näytteitä, kuten leimausmenetelmissä, mutta sen avulla saadaan lajitason tarkkuus (40). Palmer ym. tutkivat 14 vastasyntyneen suolistobakteeriston koostumuksia sekä suolistoflooran muodostumista käyttämällä tähän optimoitua DNA-mikrosirua sekä sekvensointimenetelmää. Menetelmiä verrattaessa mikrosirun avulla ja sekvensoimalla saadut tiedot olivat hyvin samankaltaisia sekä laadullisesti että määrällisesti (43). DNA-mikrosirulla voidaan esittää yhteyksiä tiettyjen mikrobipopulaatioiden ja isäntäriippuvaisten tekijöiden välillä. Sirumenetelmät eivät kuitenkaan kykene selvittämään

näiden yhteyksien syytä ja niiden takana olevia mekanismeja. Tällaisten vastausten saaminen edellyttää bakteeriston toiminnallisuuden tutkimusta (16).



Kuvio 1. Suolistoflooran tutkimiseen käytettävät uudenaikaiset menetelmät suhteessa viljelymenetelmään (22). Julkaistu Duodecim:n luvalla.

2.2.2. Geneettinen potentiaali: metagenomiikka

Metagenomiikka on tutkimusmenetelmä, jolla selvitetään fylogeniikan lisäksi mikrobiyhteisöjen geneettistä potentiaalia sekä toiminnallisia ominaisuuksia (16). Metagenomisella analyysillä voidaan tutkia monimutkaista mikrobiympäristöämme ja sitä, miten se myötävaikuttaa terveytemme ja sairauksiimme (39). Menetelmä perustuu DNA:n, joka eristetään mikrobiyhteisöstä. DNA-fragmentit kloonataan vektorien avulla sopivassa bakteeri-isännässä. Saatu data kootaan metagenomiseen kirjastoon analysointia varten. Kirjastoa analysoidaan joko sekvenssi-ohjatun tai toiminta-ohjatun lähestymistavan kautta.

Sekvenssi-ohjattu analyysi kertoo näytteen senhetkisen geneettisen monimuotoisuuden. Toiminta-ohjatun lähestymistavan tavoitteena on etsiä tiettyjä kiinnostavia toimintoja (16).

Sekvenssi-ohjatun metagenomiikan avulla saadaan listaus senhetkisestä geneettisestä potentiaalista tutkitussa ekosysteemissä. Tätä voidaan hyödyntää suoliston mikrobiyhteisön toiminnallisuuden ymmärtämisessä (16). Gill ryhmineen tutki kahden aikuisen suolistomikrobistoa metagenomisella menetelmällä havaiten, että mikrobiston koko genomi-informaatio eli mikrobiomi sisältää luultua enemmän toimintoja, jotka osallistuvat välttämättömien aminohappojen sekä vitamiinien synteesiin (39). Laajentaakseen ymmärrystä suoliston mikrobiyhteisön toiminnasta ja rakenteesta, Kurokawa ym. analysoivat mittavan sekvenssiaineiston 13 terveen eri-ikäisen ulostemikrobeista. Tutkimus osoitti, että rintaruokittujen lasten suolistomikrobisto sisältää vähemmän ja yksinkertaisempia bakteerilajeja kuin rintamaidosta vieroitettujen ja aikuisten mikrobisto. Toisaalta rintaruokittujen yksilöiden mikrobiston koostumus vaihteli suuresti, kun taas vanhemmilla lapsilla ja aikuisilla sekvenssikoostumukset olivat hyvin yhteneviä. Kurokawan ryhmän ja Gill ym. (39) tutkimusten välillä aikuisten suoliston bakteerikoostumukset olivat kuitenkin erilaisia, johtuen luultavasti geneettisistä ja dietaarista tekijöistä sekä tutkimusolosuhteista. Toiminnallisuutta tarkasteltaessa aikuisten mikrobiomeista löytyi 237 yhteistä yliedustettua proteiinia koodaavaa geeniklusteria, kun taas vastasyntyneillä näitä oli vain 136. Erilaiset toiminnot olivat yliedustettuina vastasyntyneiden ja aikuisten mikrobiomeissa. Vastasyntyneillä oli huomattavaa yliedustusta erilaisissa kuljetusmekanismeissa, kun taas puolustusmekanismit ja DNA:n korjaus olivat aikuisiin nähden vähemmän edustettuja. Tutkijat totesivat, että vastasyntyneen mikrobisto on epästabiliimpi, dynaamisempi ja mukautuvampi, kuin aikuisen. Lähes kaikista mikrobinäytteistä löytyi rikastuneisuutta geneeissä, jotka vaikuttavat muun muassa vankomysiini-resistenssin kehittymiseen. Suolistomikrobistolla näyttäisikin olevan suuri rooli antibioottiresistenssiä ylläpitävien geenien varastoisissa. Tämän perustella tutkijat kyseenalaistivat runsaan antibioottien käytön tulevaisuudessa. Kurokawa ryhmineen piti metagenomista tutkimustapaa tulevaisuuden menetelmänä tutkittaessa suolistomikrobiston roolia sairauksien etiologiassa sekä selvittäessä esimerkiksi probioottien vaikutuksia mikrobistoon ja terveyteen (44). Qin ym. tutkivat suoliston metagenomia sekvensoiden 124 ihmisen ulostenäytteet. Näytteistä saatiin 576.7 gigatavua DNA-sekvenssejä ja 3.3 miljoonaa mikrobigeeniä. Näin muodostettu katalogi sisältäneen suurimman osan ihmisen mikrobiomista. Yli 70 % aikaisempien

tutkimusten tuloksista, mukaan lukien Gill ym. (39) ja Kurokawa ym. (44) tutkimukset, sisältyi saatuun dataan. Tutkimuksessa käytetyllä sekvensointisyvyydellä havaittiin, että lähes 40 % jokaisen tutkittavan geeneistä löytyi vähintään puolelta muista tutkituista. Tämä viittaa vahvasti siihen, että ihmisten suolistoissa on yksi yhteinen mikrobiomi, jonka he jakavat (1).

Toiminta-ohjattu metagenomiikka mahdollistaa tiettyjä toimintoja sisältävien geenien etsimisen. Tämä vaatii bakteeri-isännässä olevien metagenomikloonien toiminnallista translaatiota ja transkriptiota. Menetelmän avulla voidaan tunnistaa suolistomikrobien vuorovaikutusten taustalla olevia mekanismeja. Tätä voidaan hyödyntää mikrobiston haitallisten ja hyödyllisten toimintojen kuvaamiseen. Tietyn toiminnon aiheuttavan geenin ilmentymistä voidaan myöhemmin monitoroida ja käyttää biomarkkerina interventiotutkimuksissa. Toiminta-ohjattu tutkimus vaatii kuitenkin runsaasti laboratoriotyötä, mikä rajoittaa sen käyttöä. Menetelmän avulla on tutkittu hiiren sekä lehmän ruoansulatuskanavan toimintoja sekä suontelon antibioottiresistenssiä (16).

Metagenomiikan merkittävin rajoitus on suoliston ekosysteemin valtava geneettinen monimuotoisuus. Sekvenssi-ohjatut tutkimukset tuottavat suunnattoman määrän hajanaisia sekvenssin osia, mikä tekee erikoisanalysointimenetelmistä välttämättömiä. Vaikka uudet tekniikat ovatkin tulleet edullisimmiksi, on niillä vielä mahdotonta saada tarvittavan hyvä sekvenssikattavuus koko suoliston mikrobiympäristön metagenomiseen tutkimiseen. On myös huomattava, että geenin sijaitseminen metagenomisessa kirjastossa ei automaattisesti tarkoita sen olevan toiminnan kannalta tärkeä. Metagenomiikan onkin ajateltu toimivan katalogina, jota voidaan hyödyntää edelleen vielä kehittyneemmissä meta-”omisissa” tutkimuksissa (16).

2.2.3. Toiminnallinen aktiivisuus: metatranskriptomiikka, -proteomiikka ja -bolomiikka

2.2.3.1. Metatranskriptomiikka

Metagenominen sekvensointi kertoo tutkittavan ympäristön geneettisen potentiaalin, mutta vain osa geneistä on aktiivisia tietyllä ajanhetkellä. Jotkut bakteereista esiintyvät vähemmistönä suolistofloorassa, mutta niiden geenit ovat tietyllä hetkellä ja tietyn vaikutuksen alaisena kaikkein aktiivisimpia. Metatranskriptomiikan avulla voidaan tunnistaa nämä aktiiviset geenit mikrobistosta. Transkriptomiikassa mitataan geenien ilmentymistä lähetti-RNA:n tasolla. Yhdistämällä metagenominen ja metatranskriptominen tutkimusmenetelmä, voidaan saada tarkka kuva ympäristön vaikutuksesta mikrobiyhteisöön. (45). McNulty ryhmineen tutki probiootteja sisältävän fermentoidun maidon vaikutusta suoliston bakteerikoostumukseen ja geeniekspressioon. 16S-rRNA-sekvensoinnilla ei havaittu huomattavia eroavaisuuksia bakteeripopulaatiossa seuranta-aikana, mutta metatranskriptomiikka paljasti merkittäviä muutoksia hiilihydraatti- ja polysakkaridimetaboliaan liittyvien geenien ilmentymisessä (46). Metatranskriptomiikan heikkoutena on RNA:n epästabiilisuus DNA:n verrattuna. Lähetti-RNA:n eristäminen näytteestä on myös työlästä, sillä vain 2 % koko RNA:sta on lähetti-RNA:ta (45).

2.2.3.2. Metaproteomiikka

Suoliston mikrobipopulaatiota voidaan tutkia myös proteiinitason analytiikalla. Metaproteomisessa tutkimuksessa näytteestä eristetyt proteiinit eritellään kromatografian avulla. Tämän jälkeen peptidit tunnistetaan massan ja varauksen perusteella massaspektrometrillä (45). Tuottaakseen proteiinituotteita geenien on oltava aktiivisia. Proteiineja tutkimalla voidaankin olla varmoja, että tutkittavat geenit ovat aktiivisia, mikä on suuri etu metagenomisiin tutkimuksiin verrattuna. Verberkmoes ym. löysivät metaproteomiikan avulla tuhansia proteiineja monotsygoottisten kaksosten ulostenäytteistä. Löydetyt proteiinit viittasivat siihen, että suolistossa on aikaisempien metagenomisten tutkimusten tuloksiin verrattuna enemmän energiantuottoon, hiilihydraattimetaboliaan ja translaatioon liittyviä toimintoja. Löydetyistä proteiineista vajaa kolmannes oli ihmistyyppisiä, ja näistä merkittävä osa kuului elimistön immuunivasteproteiineihin (47). Metaproteomiikkatutkimuksia rajoittaa edelleen haasteet proteiinien eristämisessä sekä peptidien tunnistamisessa (45).

2.2.3.3. Metabolomiikka

Suoliston metabolomisissa tutkimuksissa näytteestä etsitään erilaisia mikrobien metaboliitteja, kuten koliinia, sappihappoja, fenoleita ja lyhytketjuisia rasvahappoja. Analyysimenetelmät perustuvat ydinmagneettiseen resonanssiin ja massaspektrometriaan. Tietyissä tautitiloissa, kuten diabeteksessa, sydän ja verisuonitaudeissa, kroonisissa munuaistaudeissa, autismissa ja lihavuudessa, voidaan havaita muutoksia suolistomikrobien metaboliiteissa. Metabolomiikan avulla voidaan tutkia hoitojen vaikutuksia potilaan metaboliseen profiiliin ja sairauksiin (48). Wang ryhmineen havaitsi metabolomisessa koe-eläintutkimuksessa, että ravinnosta saatavan fosfatidylikoliinin metaboliitit, kuten koliini, liittyivät kohonneeseen ateroskleroosiriskiin. Tutkijat päättelivätkin, että lipidien säännöstelyn ohella ateroskleroosia voitaisiin ehkäistä muokkaamalla suoliston mikrobikoostumusta (49).

3. VASTASYNTYNEEN SUOLISTOFLOORA

3.1. Onko sikiöllä suolistofloora?

1900-luvulta aina 2000-luvulle asti on pidetty yleisenä totuutena sitä, että sikiö on kohdussa steriili, ja suoliston bakteerikolonisaatio käynnistyy vasta, kun lapsi altistuu synnytyskanavassa äidin ulosteen ja vaginan bakteeristolle. Lapsiveden ja korioamnionin mikrobiympäristöjä on tutkittu perinteisesti epäherkällä viljelymenetelmällä, ja bakteerien tunnistus on osoittautunut haastavaksi (50). Bearfield ym. tutkivat 2000-luvun alussa raskaana olevien naisten suun mikrobiflooran vaikutusta lapsiveden bakteeristoon käyttäen 16S-rRNA-menetelmää. He havaitsivat, että 71%:lla 48:sta terveestä odottajasta oli kyseistä suun bakteeristoa lapsivedessään. Syntyneet lapset olivat terveitä ja viitteitä mahdollisista kohdunsisäisistä bakteeritulehduksista ei havaittu (51). Jimnezin tutkijaryhmä löysi kolme vuotta myöhemmin terveiden sektoitujen vastasyntyneiden napaverinäytteistä 45%:lta *Enterococcus*-, *Stroptococcus*-, *Stafylococcus*- ja *Propionibacter* -lajeihin kuuluvia bakteereita (50). Ryhmä tutki myöhemmin 21 terveen vastasyntyneen mekoniumnäytteet PCR-menetelmällä. Kaikki näytteet sisälsivät yhdestä viiteen eri bakteerilajia, joista yleisimmät olivat *Enterococcus*-, *Stafylococcus*-, *Escherichia Coli*- ja *Enterobacter*- lajit (2). Jimnezin ryhmä tutki myös raskaana olevia hiiriä syöttämällä näille leimattua maitoa, johon oli lisätty rintamaidosta eristettyä *Enterococcus faeciumia*. Kyseistä bakteeria löytyi leimattua maitoa saaneiden hiirten lapsivedestä, kun taas tavallista maitoa saaneilla verrokeilla bakteeria ei havaittu (50). Ryhmä toisti kyseisen tutkimuksen sektoitujen hiirten mekoniumilla, ja tulokset olivat samanlaiset. Leimattua bakteeria löytyi kaikkien niiden hiirten mekoniumista, joiden äidit saivat leimattua maitoa odotusaikanaan. Ihmistutkimusten perusteella ryhmä päätteli, ettei sikiö olekaan steriili, ja hiiritutkimusten myötä he otaksuivat, että bakteerit pääsevät mahdollisen ulosvirtausmekanismin avulla äidistä sikiöön jo odotusaikana (2). Gosalbes ryhmä tutki 20 täysaikaisen vastasyntyneen mekoniumien mikrobikoostumukset 16S-rRNA-menetelmällä verraten niitä raskaana olevien äitien uloste-, iho- ja vaginanäytteiden mikrobiomeihin. Sekä sektoitujen että alateitse syntyneiden lasten ensiulosteen bakteerikoostumus poikkesi huomattavasti äitien ulosteen, ihon ja vaginan

bakteerikoostumuksesta. Tämän johdosta ryhmä päätteli, ettei vastasyntyneen suolistofloora kolonisoidu syntymähetkellä, vaan floora alkaa muodostua jo kohdun sisällä (52).

3.2. Vastasyntyneen suolistofloora ja sen muotoutuminen

Suolistoflooran muodostuminen vastasyntyneisyyskaudella sekä varhaislapsuudessa voidaan Orrhagen ja Nordin mukaan jakaa neljään vaiheeseen. Ensimmäinen vaihe on mikrobiston varhainen hankkiminen syntymässä, jolloin synnytyskanavan ja äidin ulosteen bakteerit siirtyvät lapseen. Toinen vaihe alkaa, kun lapselle aloitetaan rinta- tai korvikeruokinta. Kuukauden ikäisillä lapsilla suoliston bakteerikoostumus poikkeaa jo merkittävästi viikon ikäisiin verrattuna. Kolmanteen vaiheeseen siirtyminen alkaa, kun rinta- tai korvikeruokinnan rinnalle aloitetaan kiinteät ravinnot. Neljäs ja viimeinen vaihe käynnistyy, kun lapsi vieroitetaan rintamaidosta ja ruokavalio alkaa muistuttaa aikuisen ruokavaliota. Lapsilla, jolla vieroitus tapahtuu myöhemmin, mikrobifloora mukautuu hitaammin kohti aikuisen mikrobiflooraa (53).

Vastasyntyneen suolistofloora on dynaaminen ja epästabiili sekä koostumukseltaan vaihtelevampi kuin aikuisen. Flooran koostumusta on tutkittu paljon sekä klassisilla että uusilla tutkimusmenetelmillä. Tulokset ovat kuitenkin hyvin erilaisia ja osin ristiriitaisiakin. Muun muassa rinta- ja korvikeruokinnan vaikutuksesta flooran koostumukseen on saatu päinvastaisia tuloksia eri tutkimuksissa. Palmer ym. tutkivat 14 terveen vastasyntyneen ulosteita DNA-mikrosirun avulla. He kuvasivat suolistobakteerien määrän kasvua tutkimalla rRNA-geenikopioiden lukumäärää grammassa ulostetta ajan funktiona. Kopioiden määrä vaihteli kaikilla tutkituilla suuresti ensimmäisen elinviikon aikana. Useimmilla geenikopioiden määrä nousi ensimmäisten 2-4 päivän aikana tasosta 10^4 tasolle 10^8 kopiota/g. Ensimmäisen viikon jälkeen määrä asettui pääosin välille 10^9 - 10^{10} kopiota/g. Ensimmäisenä suoliston kolonisoivat aerobibakteerit, kuten *Stafylococcus*, *Streptococcus* ja enterobakteerit. Myöhemmin suolistoon kolonisoitui lähes yksinomaan anaerobeja, kuten eubakteereihin ja klostrideihin kuuluvia bakteereita. Vuoden seuranta-aikana useat bakteerilajit näyttäytyivät suolistofloorassa vain hetkittäin. Tutkijat havaitsivat, että ensimmäisten elinkuukausien aikana vastasyntyneiden suolistofloorissa esiintyi suurta yksilöiden välistä vaihtelua. Tämän

jälkeen mikrobifloorat alkoivat kuitenkin muistuttaa yhä enemmän toisiaan lähentyen samalla aikuisten suolistoflooran koostumusta. Suurimman edustuksen suolistofloorassa ottivat proteobakteeri-, firmikuutti-, aktinobakteeri- ja verrukomikrobi- fyylat sekä Bacteroides-suku (43). Laajassa, yli 1000 vastasyntyntä sisältävässä, tutkimuksessa Penders kumppaneineen havaitsi bifidobakteerien hallitsevan suolistoflooraa kuukauden ikäisillä rintaruokituilla lapsilla. Valtaosalla lapsista floorasta löytyi myös *Escherichia colia* ja Bacteroides fragilis-ryhmän bakteereita (4). Palmerin ym. tutkimuksessa bifidobakteerit näyttäytyivät suolistofloorassa vasta useita kuukausia syntymän jälkeen ja tuolloinkin vain selvänä vähemmistönä (43). Ristiriitaisiin tuloksiin bifidobakteerien esiintyvyydessä on mahdollisesti syynä erot tutkimispopulaatioiden ympäristöjen ja geneettisten taustojen välillä (54).

Tapiainen ym. seurasivat kymmenen terveen lapsen suolistofloorien muodostumista rasvahappoanalyysin ja yhtäläisyyskertoimien avulla. Seurannassa saatuja ulosteita verrattiin vastasyntyneen ensimmäiseen ulosteeseen. Viidellä lapsista flooran koostumus muuttui nopeasti, noin 10-20 tuntia syntymän jälkeen, kauemmas ensimmäisen ulosteen koostumuksesta. Kolmella lapsella muutos tapahtui hitaammin, noin 50-60 tunnin kohdalla, ja kahdella lapsella suoliston koostumus vaihteli epäsäännöllisesti. Suolistoflooran koostumus alkoi seurannan aikana muistuttaa yhä enemmän äidin ja hoitohenkilökunnan flooraa (5). Koenig ym. tutkivat vastasyntyneen lapsen suolistobakteeriston monimuotoisuutta metagenomisella menetelmällä. Fylogeneettinen monimuotoisuus oli pienintä mekoniumulosteessa ja kasvoi tasaisesti ajan funktiona. Kahden ja puolen vuoden ikään mennessä tutkittavan suolistofloorassa oli havaittavissa useita aikuisen mikrobiomin toimintoja. Ravinnolla sekä saaduilla antibioottihoidoilla havaittiin merkittävä vaikutus suoliston mikrobikoostumukseen (55).

4. VASTASYNTYNEEN SUOLISTOFLOORAN MUOTOUTUMISEEN VAIKUTTAVAT TEKIJÄT

4.1. Synnytystapa

Jo ennen syntymää alkunsa saanut sikiön suolistofloora joutuu suureen murrokseen heti syntymähetkellä. Syntymässä suolistofloora altistuu joko synnytyskanavan tai ihon bakteeristolle, mikä osaltaan ohjaa sen kehittymistä. Esimerkiksi Yhdysvalloissa jo yli 30 % lapsista syntyy sektiolla eikä täten altistu synnytyskanavan bakteeristolle (3). Sektiolasten suolistofloora kehittyy alateitse syntyviä hitaammin ja vaikutus voi kestää pitkäänkin. Grönlund ryhmineen tutki synnytystavan vaikutusta vastasyntyneen suolistoflooran koostumukseen seuraamalla 64 lasta kuuden kuukauden ajan. Sektiolla syntyneiden lasten floorat kolonisoituivat alateitse syntyviin verrattuna hitaammin bifidobakteereilla ja laktobasilleilla, mutta erot tasoittuivat ensimmäisen elinkuukauden aikana. *Bacteroides fragilis*- bakteeri ilmaantui sektiolasten suolistoon vasta kahden kuukauden iässä ja sitä löytyi alateitse syntyneisiin verrattuna vähemmän vielä seurannan lopullakin. Suolistoflooran eroavaisuudet eivät kuitenkaan vaikuttaneet tutkittujen suolisto-oirehdintaan (56). Penders ym. havaitsivat sektiolla syntyneiden suolistossa olevan 100 kertaa vähemmän *Bacteroides fragilista* ja 100 kertaa enemmän *Clostridium difficileä* verrattuna alateitse syntyneisiin. Tutkijat havaitsivat myös pitkän sairaalahoidon lisäävän *Clostridium difficilen* määrää suolistofloorassa. He totesivatkin, että suolistoflooraan vaikuttavilla tekijöillä on tapana kasaantua. Esimerkiksi sektiolla syntyneet lapset ovat usein pidempään sairaalassa ja saavat useimmin antibiootteja, kuin alateitse syntyneet. Tämän takia huomio pitäisi kohdistaa kerrallaan useampaan muuttujaan tutkittaessa mikrobiflooran muodostumista (4). Dominguez-Bello ryhmineen tutki neljän alateitse ja kuuden keisarinleikkauksella syntyneen vastasyntyneen suolistoflooraa 16S-rRNA- menetelmällä. Kuten oletettiin, alateitse syntyneiden lasten suolistoflooraa hallitsi äidin vaginan bakteeristo, kun taas keisarinleikkauksella syntyneiden floora muistutti lähinnä äidin ihon bakteeristoa. Alateitse syntyneiden lasten suolistofloorassa enemmistönä olivat *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Atopobium* sekä *Sneathia*, ja sektiolasten floora hallitsivat *Stafylococcus*, *Acinetobacter*, *Bacillales* ja *Propionibacterineae*. Alateitse synnyttäneen naisen vaginan mikrobifloora muistutti

enemmän oman lapsen kuin muiden alateitse syntyneiden lasten suolistoflooraa. Keisarinleikkauksella synnyttäneen äidin ihon bakteeristo sitä vastoin oli yhtä samanlainen sekä oman että muiden sektiolasten suolistoflooran kanssa. Tämä viittaa siihen, että oheisaltistus ihon bakteereille sairaalaolosuhteissa saattaa vaikuttaa keisarinleikkauksella syntyneiden lasten suolistoflooran muodostumiseen (3).

4.2. Äidin ja muiden kontaktien suolistofloora

Tannock ryhmineen havaitsi tutkimuksessaan yhteyden äidin ja vastasyntyneen ulostemikrobiston koostumuksen välillä. Neljällä viidestä äiti-lapsi-parista havaittiin bakteeriston siirtymistä äidistä lapseen (57). Suomalaisessa 60 äiti-lapsi-paria sisältävässä tutkimuksessa havaittiin selvä yhtäläisyys äidin ja lapsen suolistoflooran bifidobakteerikannassa. Mikäli äidin suolistossa esiintyi *Bifidobacterium bifidumia*, sitä löytyi lapsen suolistosta 19-kertaa todennäköisemmin yhden kuukauden iässä, kuin niillä lapsilla, joiden äideillä ei havaittu kyseistä bakteeria. Vastaava todennäköisyys puolen vuoden ikäisillä lapsilla oli 23-kertainen. Kyseinen yhtäläisyys pystyttiin osoittamaan myös *Bifidobacterium brevella*. Kyseisten äidistä peräisin olevien lajien ajateltiin vaikuttavan merkittävästi vastasyntyneen suoliston kolonisoitumiseen (54). Tapiainen ym. tutkivat äidin ja synnytysvuodeosaston hoitajien bakteeriflooran vaikutusta vastasyntyneen flooran muodostumiseen. Vastasyntyneiden ulostenäytteiden rasvahappoprofiilit alkoivat muistuttaa seurannan aikana sekä äidin että hoitajan rasvahappoprofiileja. Puolen vuoden seurannan aikana yhtäläisyys lapsen ja äidin suolistofloorien koostumusten välillä väheni. Tutkimuksen perusteella äidin suolistoflooran vaikutus vastasyntyneen flooran muodostumiseen oli vähäisempää, mitä aikaisemmin oli ajateltu (5).

4.3. Antibioottihoito

4.3.1. Äidin saama antibioottihoito

Ranskalainen tutkimus selvitti ensimmäistä kertaa äidin synnytyksen aikana saaman antibioottihoidon vaikutusta vastasyntyneen suolistobakteeriston kehitykseen. Streptokokki-infektioita ehkäisevän antibioottihoidon oli aikaisemmin ajateltu suosivan antibioottiresistenttien bakteerien kolonisoitumista suolistoon. Antibioottiprofylaksilla ei havaittu olevan vaikutusta syntyneen lapsen suoliston kolonisaatioasteeseen. Antibioottiresistenttien enterobakteerien määrä ei myöskään lisääntynyt antibioottia saaneiden äitien lapsilla. Antibiootille altistuneiden vastasyntyneiden suolistossa tavattiin verrokkiryhmää harvemmin bifidobakteereita ja klostrideja, kun taas Bacteroides-suvun bakteereita tavattiin useammin. Kuitenkin vain klostridien määrä muuttui merkittävästi (7). Pendersin ym. laajassa kohorttitutkimuksessa äidin raskaudenaikaisella antibioottihoidolla ei havaittu olevan vaikutusta vastasyntyneen ulosteen mikrobiomiin (4). Tuoreessa tutkimuksessa selvitettiin perinataalisen antibioottihoidon vaikutusta ennenaikaisesti syntyneiden lapsien suolistoflooraan. Antibioottihoidolla havaittiin olevan merkittävä vaikutus vastasyntyneen suoliston bakteerikoostumukseen. Kuukauden päästä syntymästä antibioottiprofylaksin saaneiden äitien lapsilla oli suolistossaan vähemmän bifidobakteereita, streptokokkeja, aktinobakteereita ja laktobasilleja sekä enemmän enterobakteereita kuin lapsilla, jotka eivät altistuneet antibiooteille. Kolmen kuukauden kohdalla erot olivat jo lähes täysin hävinneet. Tutkittavat ryhmät eivät poikenneet toisistaan raskauden keston, syntymäpainon tai sairaalakäynnin pituuden suhteen (58).

4.3.2. Vastasyntyneen saama antibioottihoito

Bennet, Eriksson ja Nord tutkivat kahdeksan oraalisen antibiootin vaikutuksia 1-3 kuukauden ikäisten lasten suolistofloorien koostumukseen. Penisilliini vähensi *Escherichia colin* määrää vastasyntyneen floorassa, kun taas Klebsiella-suvun bakteerien määrä lisääntyi. Kefalosporiinihoito vähensi sekä Bacteroides-suvun bakteerien että bifidobakteerien määrää suolistossa (59). Myös muissa tutkimuksissa on havaittu bifidobakteerien ja Bacteroides fragilis-ryhmän bakteerien määrän väheneminen lapsilla, jotka saivat antibioottihoitoa ensimmäisen elinkuukauden aikana (4). Hussey ryhmineen tutki parenteraalisen ampicilliinin ja gentamysiinin vaikutusta bifidobakteerien kolonisoitumiseen vastasyntyneillä. Vain kuudella yhdeksästä antibioottihoidetusta lapsesta esiintyi bifidobakteereita suolistossaan neljän viikon kohdalla. Kahdeksan viikon iässä bifidobakteereita havaittiin kahdeksalla

lapsella. Kontrollilapsilla, jotka eivät saaneet antibioottia, bifidobakteerien diversiteetti oli antibioottiryhmää suurempaa. Antibioottia saaneista lapsista yli puolet syntyi sektiolla, mikä saattoi osaltaan vaikuttaa bifidobakteerien määrään vähentävästi (60). Palmer ym. havaitsivat tutkimuksessaan osalla antibioottia saaneista lapsista merkittäviä muutoksia flooran koostumuksessa. He eivät kuitenkaan päässeet johdonmukaiseen tulokseen antibioottihoidon vaikutuksesta (43).

4.4. Vastasyntyneen ravitseminen

Vastasyntyneen varhainen suolistofloora alkaa muuttua nopeasti ravitsemuksen myötä. Rintamaito ja korvikeruoka muokkaavat flooran koostumusta, kumpikin omaan suuntaansa. Siirtyminen kiinteisiin ruokiin aikaansaa mikrobiflooran muotoutumisen kohti aikuisen flooraa. Harmsenin ym. fylogeneettisen tutkimuksen mukaan bifidobakteerit nousevat 20 ensimmäisen elinpäivän aikana dominanteiksi rintaruokittujen lasten suolistossa. Korvikeruokittujen lasten suolistossa tavataan yhtä paljon sekä *Bacteroides*-suvun bakteereita että bifidobakteereita (8). Klaassens ym. vertailivat rinta- ja korvikeruokittujen lasten suolistofloorien bifidobakteeripopulaatioita metatranskriptomisella menetelmällä. Rintaruokittujen lasten suolistoflooran koostumus oli stabiili, kun taas korvikeruokittujen lasten floora vaihteli ja bifidobakteerien lajiversiteetti oli suurempi. Bifidobakteerien kokonaismäärä suolistossa oli pienempi korvikeruokituilla lapsilla, mutta korvikkeen oligosakkaridilisä tasoitti eron 7 viikon seuranta-aikana (61). Favier ryhmineen vertaili leimausmenetelmällä rintaruokituksen ja korvikeruokituksen lapsen suolistoflooran stabiliteettia ja koostumusta. Rintaruokituksen flooraa hallitsivat kolmen kuukauden iässä bifidobakteerit, ja muita valtapopulaatioita olivat klostridit, enterobakteerit ja ruminokokit. Toisella lapsella rintaruokinnan vaihtaminen korvikeruokintaan muutti bakteeristoa ja vähensi bifidobakteerien suhteellista määrää. Korvikeruokinta nosti *Ruminococcus* suoliston dominantiksi bakteeriksi. Rintaruokinnasta vieroittamisen aloitus muutti suoliston bakteeristoa epästabiilimmaksi. Rintaruokinnan lopettamisen jälkeen bifidobakteerien määrä äkillisesti romahti. Seuraavien kuukausien aikana bakteeristo kuitenkin hiljalleen stabiloitui ja muuttui jälleen rikkaammaksi (42). Kurokawa ryhmineen osoitti metagenomisella tutkimuksella rintaruokituksen lapsen suoliston mikrobiomin poikkeavan selvästi aikuisen ja vieroitetun lapsen mikrobiomeista. Rintaruokituilla lapsilla yksilöiden välinen vaihtelu mikrobiomissa oli myös

suurempaa. Vieroitetuilla lapsilla *Bacteroides*-suvun lajit, klostridit, firmikuutit ja bifidobakteerit olivat suolistossa vallalla. Rintaruokituilla suoliston bakteerikoostumus oli yksinkertaisempi; bifidobakteerit ja enterobakteerit olivat suurimmat populaatiot (44).

4.5. Probiotit

Bakteerien on todettu siirtyvän äidiltä vastasyntyneeseen syntymähetkellä sekä rintamaidon kautta. Tämä muokkaa vastasyntyneen suolistoflooraa mahdollisin terveystaivaikutuksin. Täten joitakin sairauksia voidaan mahdollisesti ehkäistä muokkaamalla äidin suolistoflooraa pre- tai postnataalisin probiootein eli maitohappobakteerein, jotka sisältävät mikrobiflooralle hyödyllisiä bakteereita. Gueimonde ym. havaitsivat prenataalisesti annettavan *Lactobacillus rhamnosus*- probiootin lisäävän vastasyntyneen suoliston bifidobakteerien lajiversiteettiä. Lapsilla, joiden äidit saivat probioottia raskausaikanaan, hyödyllisen *Bifidobacterium breven* pitoisuus suolistossa kasvoi ja allergia-alttiuteen yhdistetyn *Bifidobacterium adolescentiksen* määrä väheni verrokkiryhmään nähden. Probioottien käyttö muutti lapsen ja äidin mikrobiston koostumusta kauemmas toisistaan. Äidin probioottien käytön osoitettiin vaikuttavan bifidobakteerien siirtymiseen äidin ja lapsen välillä sekä bifidobakteeriston muotoutumiseen vastasyntyneellä (62). Toinen suomalainen tutkijaryhmä antoi samaista probioottia odottaville äideille 2-4 viikon ajan ennen synnytystä, rintaruokinnan ajan sekä myöhemmin lapsille veteen liuotettuna puolen vuoden ajan. Kahden vuoden iässä 46:lla 132 tutkitusta havaittiin atooppinen ekseema. Probiootteja saaneilla lapsilla oli puolet vähemmän atooppista ekseemaa verrattuna lumehoitoa saaneisiin lapsiin. Tutkijat päättelivät, että suolistossa on immunomodulatorisia ominaisuuksia, joihin probiootit vaikuttavat, ja suolistomikrobit ovat tärkeässä roolissa atooppisten tautien ehkäisyssä (9).

Rinne ym. tutkivat probioottien pitkäaikaisvaikutuksia vastasyntyneen suolistoflooran koostumukseen. Kuuden kuukauden kuluttua ei havaittu merkittäviä eroja dominanttien suolistobakteerien esiintyvyyksissä probiootti- ja plaseboryhmien välillä. Kahden vuoden iässä plaseboryhmässä havaittiin probioottiryhmää korkeampia määriä ulosteen laktobasilleja, enterokokkeja ja klostrideita. Bifidobakteerien, *Bacteroides*-suvun bakteerien sekä bakteerien kokonaismäärän välillä ei havaittu eroa. Probiootti-intervention ei katsottu aiheuttavan

merkittäviä pysyväismuutoksia suoliston bakteerikoostumukseen (63). Tuoreessa pilottitutkimuksessa Simeone ym. tutkivat *Bifidobacterium breve* B632- probiootin vaikutusta vastasyntyneen koliikkiin yhdistettyjen enterobakteerien määrään. Probioottia saaneella koliikkivauvalla bifidobakteerien määrä kasvoi ja enterobakteerien määrä väheni jatkuvassa bakteeriviljelyssä. Tämän pohjalta voitaisiin tulevaisuudessa tehdä kohorttitutkimuksia, joissa tutkittaisiin probioottien mahdollinen koliikkia hoitava vaikutus (10).

5. LOPUKSI

Vastasyntyneen suolistoflooran muodostuminen on hyvin haastava, mielenkiintoinen ja ajankohtainen tutkimuskohde. Suomalaistutkijoiden panos on ollut kansainvälisesti merkittävää etenkin suoliston probioottitutkimuksissa. Suoliston bakteeristolla on osoitettu olevan merkittäviä vaikutuksia yksilön terveyteen. On kiehtovaa ajatella, että suolistoflooraan vaikuttamalla voidaan tulevaisuudessa ehkäistä kansanterveydellisesti merkittäviä sairauksia, kuten liikalihavuutta ja diabetesta. Myös lukuisia lapsiperheitä rasittavaa imeväisen koliikkia voitaneen jatkossa hoitaa vastasyntyneen suolistoflooraa muokkaamalla. Edelleen on kuitenkin epäselvää, minkälaisia ovat esimerkiksi antibiootti- ja probioottihoitojen pitkäaikaisvaikutukset kehittyvälle lapselle, ja mikä on vaikutusten kliininen merkitys. Aihe edellyttää entistä pidemmän aikavälin seurantatutkimuksia. Vastasyntyneen suolistoflooraan vaikuttavien tekijöiden tarkempi tunteminen tulee muuttamaan hoitosuosituksia muun muassa synnytystavan valinnan, antibiootihoidon sekä vastasyntyneen ja odottavan äidin ravitsemuksen suhteen.

Suolistoflooran tutkimiseen käytettävät menetelmät ovat kehittyneet valtavasti 1980-luvulta nykypäivään. Uudet tutkimusmenetelmät mahdollistavat suoliston mikrobiston koostumuksen ja sen muutosten tarkan analysoinnin tehokkaasti. Täten erilaisten interventioiden vaikutuksia voidaan tutkia entistä luotettavammin. Uudenaikaiset menetelmät ovat edellytys vastasyntyneen muuntuvan suolistomikrobiston tutkimiselle. Kustannusten lasku on tuonut korkean suorituskyvyn menetelmät lähes jokaisen tutkijan ulottuville, mikä tulee näkymään edelleen lisääntyvänä kiinnostuksena suolistoflooran tutkimiseen tulevaisuudessa. Suolistoflooran yksilöllinen ja monimutkainen koostumus haastaa myös uudet tutkimusmenetelmät. Mikäli menetelmien kehitys säilyy edelleen yhtä nopeana, kuuluu potilaan bakteeriflooran koostumuksen määrittäminen ja sen mukainen yksilöllinen hoito lääkärin perustyökaluihin tulevaisuudessa. Jatkossa vaaditaan suolistotutkimusten parempaa läpinäkyvyyttä, jotta turhaa päällekkäisyyttä voitaisiin välttää. Myös tutkimusmenetelmien vakiointiin tulisi kiinnittää enemmän huomiota, jotta eri menetelmistä johtuvaa ristiriitaisuutta voitaisiin välttää tutkimusten välillä. Luonteva yhteistyön muoto voisi olla erilaiset yhteistyöprojektit, joita on käytetty menestyksekkäästi kansainvälisissä mikrobiomitutkimuksissa. Tehokkaiden menetelmien mahdollistamana tulisi jatkossa käyttää aiempaa laajempia tutkimuspopulaatioita tulosten yleistettävyyden parantamiseksi.

LÄHTEET

- (1) Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010 Mar 4;464(7285):59-65.
- (2) Jimenez E, Marin ML, Martin R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol* 2008 Apr;159(3):187-193.
- (3) Dominguez-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 U S A* 2010 Jun 29;107(26):11971-11975.
- (4) Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006 Aug;118(2):511-521.
- (5) Tapiainen T, Ylitalo S, Eerola E, Uhari M. Dynamics of gut colonization and source of intestinal flora in healthy newborn infants. *APMIS* 2006 Nov;114(11):812-817.
- (6) Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009 Jan 22;457(7228):480-484.
- (7) Jauregui F, Carton M, Panel P, Foucaud P, Butel MJ, Doucet-Populaire F. Effects of intrapartum penicillin prophylaxis on intestinal bacterial colonization in infants. *J Clin Microbiol* 2004 Nov;42(11):5184-5188.
- (8) Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijjn N, Bindels JG, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000 Jan;30(1):61-67.
- (9) Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2001 Apr 7;357(9262):1076-1079.
- (10) Simone M, Gozzoli C, Quartieri A, Mazzola G, Di Gioia D, Amaretti A, et al. The probiotic *Bifidobacterium breve* B632 inhibited the growth of *Enterobacteriaceae* within colicky infant microbiota cultures. *Biomed Res Int* 2014;2014:301053.
- (11) Sysi-Aho M, Ermolov A, Gopalacharyulu PV, Tripathi A, Seppanen-Laakso T, Maukonen J, et al. Metabolic regulation in progression to autoimmune diabetes. *PLoS Comput Biol* 2011 Oct;7(10):e1002257.
- (12) Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Oct 28;105(43):16731-16736.
- (13) Berer K, Mues M, Koutrolos M, Rasbi ZA, Boziki M, Johnner C, et al. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 2011 Oct 26;479(7374):538-541.

- (14) Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Aug 2;102(31):11070-11075.
- (15) Huovinen P. Bakteriston merkitys terveydelle avautuu vähitellen. *Suomen lääkirilehti - Finlands läkartidning* 2013;68(9):655-659.
- (16) Zoetendal EG, Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut* 2008 Nov;57(11):1605-1615.
- (17) Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005 Jun 10;308(5728):1635-1638.
- (18) Peltonen R, Eerola E. Direct automatic bacterial analysis of rat stool samples; the effects of diet and medical treatment studied by computerised gas-liquid chromatography of bacterial fatty acids. *Microb Ecol Health Dis* 1992;5(2):93-103.
- (19) Moore WE, Holdeman LV. Special problems associated with the isolation and identification of intestinal bacteria in fecal flora studies. *Am J Clin Nutr* 1974 Dec;27(12):1450-1455.
- (20) Moore WE, Holdeman LV. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol* 1974 May;27(5):961-979.
- (21) Hayashi H, Sakamoto M, Kitahara M, Benno Y. Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA library and T-RFLP. *Microbiol Immunol* 2003;47(8):557-570.
- (22) Palva A. Intestinal microorganisms and their significance for health. *Duodecim* 2009;125(6):685-694.
- (23) Peltonen R, Ling WH, Hanninen O, Eerola E. An uncooked vegan diet shifts the profile of human fecal microflora: computerized analysis of direct stool sample gas-liquid chromatography profiles of bacterial cellular fatty acids. *Appl Environ Microbiol* 1992 Nov;58(11):3660-3666.
- (24) Hentges DJ, Maier BR, Burton GC, Flynn MA, Tsutakawa RK. Effect of a high-beef diet on the fecal bacterial flora of humans. *Cancer Res* 1977 Feb;37(2):568-571.
- (25) Reddy BS, Weisburger JH, Wynder EL. Fecal bacterial beta-glucuronidase: control by diet. *Science* 1974 Feb 1;183(4123):416-417.
- (26) Goldin BR, Swenson L, Dwyer J, Sexton M, Gorbach SL. Effect of diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements on human fecal bacterial enzymes. *J Natl Cancer Inst* 1980 Feb;64(2):255-261.
- (27) Reddy BS, Mangat S, Weisburger JH, Wynder EL. Effect of high-risk diets for colon carcinogenesis on intestinal mucosal and bacterial beta-glucuronidase activity in F344 rats. *Cancer Res* 1977 Oct;37(10):3533-3536.
- (28) Guerrant GO, Lambert MA, Moss CW. Analysis of short-chain acids from anaerobic bacteria by high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 1982 Aug;16(2):355-360.
- (29) Moss CW, Nunez-Montiel OL. Analysis of short-chain acids from bacteria by gas-liquid chromatography with a fused-silica capillary column. *J Clin Microbiol* 1982 Feb;15(2):308-311.

- (30) Eerola E, Lehtonen OP. Optimal data processing procedure for automatic bacterial identification by gas-liquid chromatography of cellular fatty acids. *J Clin Microbiol* 1988 Sep;26(9):1745-1753.
- (31) Ahtonen P, Lehtonen OP, Kero P, Eerola E. Faecal fatty acids and gastrointestinal upset in newborn infants. *Lett Appl Microbiol* 1997 Feb;24(2):91-94.
- (32) Lehtonen L, Korvenranta H, Eerola E. Intestinal microflora in colicky and noncolicky infants: bacterial cultures and gas-liquid chromatography. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994 Oct;19(3):310-314.
- (33) Kuczynski J, Lauber CL, Walters WA, Parfrey LW, Clemente JC, Gevers D, et al. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat Rev Genet* 2011 Dec 16;13(1):47-58.
- (34) Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr* 2004 Feb;134(2):465-472.
- (35) Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 1995 Mar;59(1):143-169.
- (36) Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1998 Oct;64(10):3854-3859.
- (37) Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 1999 Nov;65(11):4799-4807.
- (38) Rajilic-Stojanovic M, Smidt H, de Vos WM. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ Microbiol* 2007 Sep;9(9):2125-2136.
- (39) Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006 Jun 2;312(5778):1355-1359.
- (40) Hamady M, Knight R. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Res* 2009 Jul;19(7):1141-1152.
- (41) Anderson IC, Cairney JW. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ Microbiol* 2004 Aug;6(8):769-779.
- (42) Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans AD. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol* 2002 Jan;68(1):219-226.
- (43) Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007 Jul;5(7):e177.
- (44) Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, Oshima K, Toh H, Toyoda A, et al. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res* 2007 Aug 31;14(4):169-181.
- (45) Morgan XC, Huttenhower C. Meta'omic analytic techniques for studying the intestinal microbiome. *Gastroenterology* 2014 May;146(6):1437-1448.e1.

- (46) McNulty NP, Yatsunenko T, Hsiao A, Faith JJ, Muegge BD, Goodman AL, et al. The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. *Sci Transl Med* 2011 Oct 26;3(106):106ra106.
- (47) Verberkmoes NC, Russell AL, Shah M, Godzik A, Rosenquist M, Halfvarson J, et al. Shotgun metaproteomics of the human distal gut microbiota. *ISME J* 2009 Feb;3(2):179-189.
- (48) Aw W, Fukuda S. Toward the comprehensive understanding of the gut ecosystem via metabolomics-based integrated omics approach. *Semin Immunopathol* 2014 Oct 22.
- (49) Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 2011 Apr 7;472(7341):57-63.
- (50) Jimenez E, Fernandez L, Marin ML, Martin R, Odriozola JM, Nueno-Palop C, et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* 2005 Oct;51(4):270-274.
- (51) Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG* 2002 May;109(5):527-533.
- (52) Gosalbes MJ, Llop S, Valles Y, Moya A, Ballester F, Francino MP. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clin Exp Allergy* 2013 Feb;43(2):198-211.
- (53) Orrhage K, Nord CE. Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. *Acta Paediatr Suppl* 1999 Aug;88(430):47-57.
- (54) Gronlund MM, Grzeskowiak L, Isolauri E, Salminen S. Influence of mother's intestinal microbiota on gut colonization in the infant. *Gut Microbes* 2011 Jul-Aug;2(4):227-233.
- (55) 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 U S A* 2011 Mar 15;108 Suppl 1:4578-4585.
- (56) Gronlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999 Jan;28(1):19-25.
- (57) Tannock GW, Fuller R, Smith SL, Hall MA. Plasmid profiling of members of the family Enterobacteriaceae, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *J Clin Microbiol* 1990 Jun;28(6):1225-1228.
- (58) Arboleya S, Sanchez B, Milani C, Duranti S, Solis G, Fernandez N, et al. Intestinal Microbiota Development in Preterm Neonates and Effect of Perinatal Antibiotics. *J Pediatr* 2014 Oct 25.
- (59) Bennet R, Eriksson M, Nord CE. The fecal microflora of 1-3-month-old infants during treatment with eight oral antibiotics. *Infection* 2002 Jun;30(3):158-160.
- (60) Hussey S, Wall R, Gruffman E, O'Sullivan L, Ryan CA, Murphy B, et al. Parenteral antibiotics reduce bifidobacteria colonization and diversity in neonates. *Int J Microbiol* 2011;2011:10.1155/2011/130574. Epub 2010 Aug 3.

- (61) Klaassens ES, Boesten RJ, Haarman M, Knol J, Schuren FH, Vaughan EE, et al. Mixed-species genomic microarray analysis of fecal samples reveals differential transcriptional responses of bifidobacteria in breast- and formula-fed infants. *Appl Environ Microbiol* 2009 May;75(9):2668-2676.
- (62) 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 Feb;42(2):166-170.
- (63) Rinne M, Kalliomaki M, Salminen S, Isolauri E. Probiotic intervention in the first months of life: short-term effects on gastrointestinal symptoms and long-term effects on gut microbiota. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006 Aug;43(2):200-205.