

Identificación de colonizadores bacterianos precoces en recién nacidos muy bajo peso: primer reporte de dinámicas de microbiota en América del Sur

Identification of early bacterial colonizers in very low birth weight infants: first report of microbiota dynamics in South America

Identificação de colonizadores bacterianos precoces em recém-nascidos de muito baixo peso: primeiro relato de dinâmicas de microbiota na América do Sul

Catalina Vaz Ferreira¹, Josefina Vera², Nadia Riera³, Mario Moraes⁴

Resumen

La mortalidad en los recién nacidos muy bajo peso (RNMBP) representa hasta el 50%-70% de la mortalidad neonatal y hasta el 25%-30% de la mortalidad infantil. A pesar del aumento global en las tasas de supervivencia, esta población sigue presentando un riesgo elevado de desarrollar retrasos en el neurodesarrollo a largo plazo, enfermedad pulmonar crónica, desnutrición, discapacidades visuales y auditivas. La composición microbiana intestinal de los RNMBP difiere de la de los recién nacidos a término y está típicamente dominada por patobiontes. En este estudio, caracterizamos la composición bacteriana de la microbiota intestinal de los RNMBP nacidos en una maternidad pública, de referencia y terciaria en Montevideo, Uruguay, mediante la secuenciación del gen 16S rRNA de longitud completa utilizando tecnologías Oxford Nanopore. Describimos una alta predominancia de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* en estos recién nacidos. Al secuenciar muestras de materia fecal en dos tiempos diferentes de la hospitalización, mostramos que la diversidad de la comunidad microbiana aumenta con el tiempo, con una mayor abundancia relativa de *Bacteroides* y *Veillonella*. Asimismo, describimos el efecto de la exposición prolongada a antibióticos en la composición microbiana. Se observaron diferentes especies del género *Klebsiella* junto con *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* y *Veillonella parvula* en una mayor abundancia relativa en pacientes tratados con antibióticos durante más de cinco días. En conjunto, nuestros hallazgos arrojan luz sobre el desarrollo y establecimiento de comunidades microbianas en los primeros años de vida en América del Sur. Nuestros resultados señalan a los antibióticos posnatales como un factor principal que orquesta este proceso. La integración de consideraciones sobre la salud de la comunidad microbiana en la atención clínica de los prematuros es crucial para mejorar el desarrollo a largo plazo.

Palabras clave: Microbioma Gastrointestinal
Recién Nacido de Muy Bajo Peso

1. Neonatóloga. Servicio Recién Nacidos. ASSE.

2. Ing. Estudiante de Maestría. Institut Pasteur Montevideo.

3. Dra. Investigadora Adj. Senior. Institut Pasteur Montevideo.

4. Prof. Dr. Unidad Académica Neonatología. CHPR. Facultad de Medicina. UDELAR.

Unidad Académica Neonatología. CHPR. Facultad de Medicina. UDELAR. Institut Pasteur Montevideo.

Trabajo inédito.

Declaramos no tener conflictos de intereses.

Este trabajo ha sido aprobado unánimemente por el Comité Editorial.

Summary

Mortality in very low birth weight (VLBW) infants accounts for up to 50%-70% of neonatal mortality and up to 25%-30% of infant mortality. Despite the global increase in survival rates, this population continues to present an elevated risk of developing long-term neurodevelopmental delays, chronic lung disease, malnutrition, and visual and hearing impairments. The intestinal microbial composition of VLBW infants differs from that of full-term newborns and is typically dominated by pathobionts. In this study, we characterized the bacterial composition of the gut microbiota of VLBW infants born in a public, tertiary referral maternity hospital in Montevideo, Uruguay, through full-length 16S rRNA gene sequencing using Oxford Nanopore technologies. We described a high predominance of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in these newborns. By sequencing stool samples at two different times during hospitalization, we showed that the diversity of the microbial community increases over time, with a higher relative abundance of *Bacteroides* and *Veillonella*. Furthermore, we described the effect of prolonged antibiotic exposure on the microbial composition. Different species of the genus *Klebsiella*, along with *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Veillonella parvula*, were observed in higher relative abundance in patients treated with antibiotics for more than five days. Collectively, our findings shed light on the development and establishment of microbial communities in early life in South America. Our results point to postnatal antibiotics as a primary factor orchestrating this process. Integrating considerations of microbial community health into the clinical care of preterm infants is crucial to improving long-term development.

Key words: Gastrointestinal Microbiome
Infant Very Low Birth Weight

Resumo

A mortalidade em recém-nascidos de muito

baixo peso (RNMBP) representa até 50%-70% da mortalidade neonatal e até 25%-30% da mortalidade infantil. Apesar do aumento global nas taxas de sobrevivência, esta população continua apresentando um risco elevado de desenvolver atrasos no neurodesenvolvimento a longo prazo, doença pulmonar crônica, desnutrição, deficiências visuais e auditivas. A composição microbiana intestinal dos RNMBP difere daquela dos recém-nascidos a termo e é tipicamente dominada por patobiontes. Neste estudo, caracterizamos a composição bacteriana da microbiota intestinal dos RNMBP nascidos num hospital pediátrico público de referência e terciária em Montevideo, Uruguai, mediante o sequenciamento do gene 16S rRNA de comprimento total utilizando tecnologias Oxford Nanopore. Descrevemos uma alta predominância de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* nesses recém-nascidos. Ao sequenciar amostras de matéria fecal em dois momentos diferentes da hospitalização, mostramos que a diversidade da comunidade microbiana aumenta com o tempo, com uma maior abundância relativa de *Bacteroides* e *Veillonella*. Além disso, descrevemos o efeito da exposição prolongada a antibióticos na composição. Diferentes espécies do gênero *Klebsiella* foram observadas juntamente com *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* e *Veillonella parvula* em maior abundância relativa em pacientes tratados com antibióticos por mais de cinco dias. Em conjunto, nossas descobertas lançam luz sobre o desenvolvimento e o estabelecimento de comunidades microbianas nos primeiros anos de vida na América do Sul. Nossos resultados apontam para o uso de antibióticos pós-natais como um fator importante que orquestra esse processo. Integrar considerações sobre a saúde da comunidade microbiana no cuidado clínico de bebês prematuros é crucial para melhorar o desenvolvimento a longo prazo.

Palavras chave: Microbioma Gastrointestinal
Recém-Nascido de muito
Baixo Peso

Introducción

En los últimos años ha habido un creciente interés científico en la composición y desarrollo del microbioma en etapas precoces de la vida. La investigación se ha centrado principalmente en comprender las comunidades microbianas en grandes grupos de recién nacidos a término⁽¹⁻³⁾. El establecimiento y la maduración de la microbiota intestinal de un recién nacido son cruciales en su crecimiento, desarrollo, capacidad de absorción de nutrientes, metabolismo y para prevenir enfermedades a corto y largo plazo⁽⁴⁾. El período alrededor del nacimiento y en la primera infancia es el momento más crítico para el establecimiento del microbioma, siendo la microbiota materna la fuente principal de colonización⁽⁵⁾. Varios factores pueden influir en este proceso, incluidos la edad gestacional, la vía de nacimiento (vaginal o por cesárea), el entorno, la higiene, las prácticas de alimentación y el uso de antibióticos. Las interrupciones de estos patrones de colonización precoz pueden llevar a un desequilibrio en la comunidad microbiana en la vida temprana con consecuencias a largo plazo⁽²⁻⁸⁾.

El nacimiento prematuro (menor de 37 semanas de gestación) está aumentando a nivel mundial como consecuencia de la mayor edad materna concepcional y el aumento de los tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad. La relevancia de los resultados de los recién nacidos muy bajo al nacer (RNMBP) es que, aunque representan el 1,5%-2% del total de nacimientos, sus resultados contribuyen significativamente a la tasa de mortalidad neonatal e infantil. Las tasas de mortalidad neonatal varían de 4,2 a 18,6 por mil en Sudamérica^(9,10). La mortalidad en los RNMBP representa hasta el 50%-70% de la mortalidad neonatal y hasta el 25%-30% de la mortalidad infantil. La tasa de supervivencia de los RNMBP ha aumentado mundialmente como resultado de la mejora en la calidad de los cuidados perinatales. A pesar de la mayor tasa de supervivencia, las complicaciones asociadas al parto prematuro son la principal causa de muerte entre los niños menores de 5 años en todo el mundo^(6,10,11). Asimismo, los recién nacidos que sobreviven tienen un riesgo significativo de secuelas a largo plazo, que incluyen retrasos neurocognitivos, alteraciones del desarrollo neurológico, enfermedad pulmonar crónica, desnutrición y discapacidad visual y auditiva^(6,10,11).

La hospitalización en una unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN) ha demostrado alterar severamente la colonización microbiana en la microbiota de los recién nacidos prematuros⁽⁶⁾. La alteración en la interacción de la microbiota intestinal con una respuesta inmunológica intestinal inmadura desencadena una respuesta de citoquinas proinflamatorias y antiin-

flamatorias⁽⁶⁾. La estadía en una UCIN y las intervenciones médicas asociadas, incluido el uso de antibióticos de amplio espectro y las prácticas de alimentación alteradas que difieren del entorno doméstico, pueden cambiar drásticamente el microbioma intestinal en desarrollo⁽¹²⁾. Los recién nacidos prematuros típicamente desarrollan una comunidad microbiana intestinal con baja diversidad de especies y alta variación interindividual⁽¹³⁾. Los patrones de microbiota en prematuros difieren de sus contrapartes nacidos a término, que adquieren rápidamente anaerobios comensales. En cambio, los prematuros son inicialmente colonizados por patobiontes nosocomiales como estafilococo, enterococos y *Enterobacteriaceae*, inclinando la balanza hacia un mayor riesgo de infecciones en el torrente sanguíneo, enterocolitis necrotizante (NEC), entre otras morbilidades, y secuelas a largo plazo^(5,7,14).

La administración de antibióticos tiene un impacto profundo en la composición de la comunidad microbiana intestinal de los RNMBP^(7,15-17). La mayoría de los prematuros recibe períodos prolongados de terapia con antibióticos desde el inicio, siendo la combinación de vancomicina y gentamicina los regímenes más comunes⁽¹⁸⁾. La exposición a antibióticos generalmente resulta en una marcada disminución de la población de bifidobacterias y una composición de comunidad gobernada por proteobacterias⁽¹⁹⁾. Adicionalmente, la administración de antibióticos se ha vinculado con un aumento en la abundancia de genes de resistencia antimicrobiana y una disminución de diez veces en la carga total de especies bacterianas⁽²⁰⁾.

La leche materna propia (LMP), definida como la leche de la madre del prematuro, constituye una combinación compleja de nutrientes, prebióticos, microorganismos vivos y componentes con propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras que desempeñan un papel crucial como factor de apoyo e influencia en la colonización temprana de la microbiota intestinal neonatal y en la maduración del sistema inmunológico^(5,6,14,21). Se ha encontrado que la dieta con LMP es un contribuyente importante relacionado con el aumento de la riqueza de especies en el tiempo en recién nacidos prematuros⁽²⁰⁾. Los oligosacáridos de la leche humana (HMO) son componentes funcionales únicos en la leche materna y son un factor importante en la colonización y en el desarrollo de la microbiota intestinal en prematuros, actuando como prebióticos^(14,21). Estudios recientes muestran diferencias en la microbiota intestinal entre recién nacidos alimentados con leche materna y aquellos alimentados con preparado para lactante (PPL), con una mayor abundancia relativa de *Bifidobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* en los infantes alimentados con leche

materna, mientras que los alimentados con PPL mostraron una mayor abundancia relativa de *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* y *Lachnospiraceae*^(5,14). Para los fines de este estudio, nos referiremos al término LMP con el fin de arrojar luz sobre su contribución específica en la formación del microbioma intestinal de los RNMBP. La leche materna, por otra parte, se refiere a la leche humana, ya sea leche pasteurizada/donada o LMP. La evidencia sugiere que los perfiles microbianos intestinales de recién nacidos alimentados con LMP y leche de donación son diferentes, mostrando un mayor predominio de *Bifidobacteriaceae* y una menor presencia de *Staphylococcaceae*⁽¹²⁾.

La mejora en los cuidados perinatales debe tener como objetivo fomentar estrategias enfocadas no solo en disminuir el nacimiento prematuro, sino también en aumentar la supervivencia libre de morbilidades mayores. Actualmente, el desarrollo de nuevas intervenciones terapéuticas dirigidas a modificar la microbiota intestinal de los recién nacidos prematuros está ganando rápidamente terreno en la comunidad científica, aunque se acepta generalmente que se necesitan más ensayos clínicos y preclínicos⁽²²⁾. Comprender los mecanismos que rigen la formación y desarrollo de la microbiota intestinal en recién nacidos prematuros es crucial para mitigar su morbilidad y fomentar un crecimiento saludable. Hasta la fecha, no hay en la región estudios sobre la microbiota intestinal en esta población vulnerable, y la mayor parte del conocimiento emergente proviene de países del norte y desarrollados.

El objetivo de este estudio fue caracterizar la microbiota intestinal en RNMBP y evaluar el efecto de la LMP, así como la exposición a antibióticos, en el establecimiento y desarrollo de la microbiota intestinal en este grupo. Para ello, exploramos el ensamblaje de la microbiota intestinal en recién nacidos con un peso menor de 1500 g en una maternidad de referencia de tercer nivel en Montevideo, Uruguay. Utilizamos secuenciación de longitud completa de 16S rRNA (V1-V9) utilizando tecnologías Oxford Nanopore para explorar la composición bacteriana a nivel de especie. Implementamos Porefile, una herramienta independiente de Nextflow, para clasificar las lecturas largas de 16S rRNA mapeándolas a la base de datos SILVA.

Metodología

Diseño de estudio

Este es un estudio observacional, prospectivo, de cohortes, de RNMBP entre 24 y 35 semanas de gestación y ≤ 1500 gramos, nacidos en una maternidad pública de referencia nacional en Montevideo, Uruguay, entre abril y octubre de 2024. Los recién nacidos con cual-

quier anomalía congénita mayor fueron excluidos del estudio.

La cohorte se categorizó en dos tiempos, primero al alcanzar 150 ml/kg/día (T1) y una segunda muestra a las 36 semanas de gestación o al alta del hospital (T2). Los recién nacidos se asignaron a dos grupos diferentes: aquellos que recibieron $> 70\%$ de LMP y aquellos alimentados con menos de 70% de LMP y otras formas de alimentación. Esta categorización se realizó para elucidar el impacto de la alimentación con LMP en la conformación de la microbiota intestinal de los recién nacidos en comparación con los alimentados predominantemente con leche de donación (T1) o preparado para lactante (T2).

Se recolectaron prospectivamente datos demográficos y clínicos de las madres y los recién nacidos para ambos grupos (alimentados con LMP o alimentados con leche de donación/PPL). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito antes de la recolección de muestras, éstas fueron codificadas y se garantizó la confidencialidad de los datos. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética y la Junta de Revisión Institucional del Centro Hospitalario, número de protocolo 8283982. El estudio se realizó de acuerdo con la declaración de Helsinki.

Consumo de leche materna propia en la UCIN

La LMP se considera la estrategia de alimentación estándar oro para todos los recién nacidos prematuros y a término; sin embargo, las barreras para la iniciación y el mantenimiento de la lactancia representan desafíos significativos para la implementación de este estándar de atención. Las estrategias de mejora de calidad colaborativas han demostrado ser una herramienta efectiva para mejorar los resultados en neonatología, aplicando en forma sistemática un paquete de intervenciones basado en evidencia. En forma paralela al estudio, se desarrolló una iniciativa de mejora de calidad de la lactancia materna para promover el consumo de LMP en la UCIN. Las iniciativas de mejora de calidad revelan que la implementación sistemática de prácticas para apoyar el consumo de LMP a lo largo del tiempo se relaciona con una mayor supervivencia sin morbilidades mayores. El protocolo consistió en fomentar el inicio de la expresión de calostro precoz después del nacimiento (6-12 horas) de acuerdo con su estado de salud materno. Adicionalmente, se estimuló el cuidado piel con piel poco después del nacimiento como una medida complementaria para mejorar la lactancia. Se facilitó el acceso temprano a consultores de lactancia y se desarrollaron programas educativos sistemáticos dirigidos a proveedores de atención médica y familias. Se actualizaron los proto-

colos de alimentación en la UCIN para homogeneizar las prácticas. Finalmente, se desarrolló una lista de verificación de lactancia para documentar la adherencia al protocolo. Las medidas registradas fueron: tiempo hasta la primera extracción de calostro, tiempo desde la extracción del calostro hasta la administración, número promedio de visitas de las madres a la sala de lactancia durante las primeras dos semanas, porcentaje y volumen de consumo de LMP a los 7, 14 y 28 días de vida y al alta hospitalaria.

Cuando la LMP no estaba disponible o no cumplía con el volumen diario requerido, se administró leche de donación pasteurizada (leche madura de madres de recién nacidos a término) como estrategia de alimentación de segunda línea durante los primeros 30 días de vida (T1). La fortificación se inició a un volumen de 100 ml/kg/día de alimentación enteral. Más allá del primer mes de vida, se administró PPL de pretérmino como una opción de alimentación de segunda línea cuando no había LMP disponible (T2). Ninguno de los recién nacidos recibió probióticos. Se suplementaron con vitamina D y hierro desde los días de vida 8 y 14, respectivamente, cuando se recibía alimentación enteral completa.

La proporción de consumo diario de LMP se definió como el volumen de ingesta de leche materna en relación con el volumen total de aporte enteral durante el período anterior a la recolección de muestras. Se logró un registro preciso del consumo de LMP en los registros diarios como resultado de un trabajo colaborativo entre las enfermeras de la UCIN y el equipo médico.

Recolección de muestras fecales

La recolección de muestras de materia fecal se realizó en dos momentos durante la hospitalización. La primera muestra se obtuvo en el momento de alcanzar 150 ml/kg/día (T1), y la segunda muestra a las 36 semanas de gestación o al alta del hospital (lo que ocurriera primero) (T2). La técnica de recolección consistió en que los investigadores lavaran bien sus manos y usaran guantes de higiene. Se utilizó un hisopo estéril para recoger aproximadamente 2-5 gramos de heces del pañal y se transfirió a un tubo de muestreo. Posteriormente, la muestra se almacenó en un refrigerador a 4 °C durante un máximo de 24 horas antes de su transporte al Laboratorio de Genómica Microbiana, donde fue procesada inicialmente y preservada a -80 °C.

Purificación de ácidos nucleicos y amplificación del gen 16S rRNA

Se extrajo y purificó ADN bacteriano usando el QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen), siguiendo

do un protocolo modificado optimizado en el laboratorio para estas muestras. Brevemente, aproximadamente 220 mg de cada muestra se mezclaron con 1 mL de InhibitEX Buffer y se sometieron a un fuerte vortex durante 30 minutos, seguido de tres ciclos de tratamiento de congelación-descongelación alternando entre -20 °C y temperatura ambiente. Las muestras se incubaron a 70 °C durante 5 minutos, se vortexearon y se centrifugaron. Se transfirió un volumen de 600 µL del sobrenadante resultante a un nuevo tubo que contenía 25 µL de proteinasa K y se añadieron 600 µL de Buffer AL, tras lo cual se siguieron las instrucciones del fabricante para los pasos restantes del protocolo. El mismo protocolo se realizó para el control negativo (1 mL de InhibitEX Buffer solamente) y el control positivo (75 µL de ZymoBIOMICS Microbial Community Standard).

La amplificación del gen 16S rRNA se realizó utilizando Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs), con los primers 27F (5' TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCAGAGTTTGATCMTG-GCTCAG 3') y 1492R (5' ACTTGCCTGTCGCTC-TATCTTCGGTTACCTTGTTACGACTT 3'), ambos conteniendo adaptadores compatibles con Oxford Nanopore. Se utilizó un total de 2-10 ng de ADN como plantilla por reacción. La amplificación del gen se realizó con el siguiente ciclo: un paso inicial de desnaturalización de diez minutos a 95 °C, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos, anclaje a 55 °C durante 15 segundos y extensión a 72 °C durante 30 segundos.

Preparación de bibliotecas y secuenciación

La preparación de la biblioteca se realizó con el kit de secuenciación por ligadura SQK-LSK109 (Oxford Nanopore Technologies) y el kit de etiquetado por PCR (EXP-PBC096) (Oxford Nanopore Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada paso, se purificó el ADN utilizando perlas AMPure XP Reagent y se evaluaron la calidad y la concentración utilizando el fluorómetro Qubit® 2.0 (Thermo Fisher Scientific) y la electroforesis en gel de agarosa al 1%. La secuenciación se realizó en una plataforma GridION x5 (Oxford Nanopore Technologies) utilizando el flujo R9.4.1 FLO-MIN106D. La identificación de bases se realizó utilizando el llamado de bases súper exacto (SUP) v3.3.

Análisis de datos y estadísticos

La asignación taxonómica se llevó a cabo utilizando el software de acceso abierto Porefile (<https://github.com/microgenlab/porefile>) con la base de datos de referencia SILVA (Silva Release 138.2). El análisis de

datos posterior se realizó en RStudio (v4.4.3), utilizando los paquetes phyloseq, microbiome, microbial, vegan, readxl y LEfSe(r) para el perfilado de comunidades microbianas, estimación de abundancia relativa y prueba de abundancia diferencial entre grupos. La diversidad alfa de las comunidades microbianas se calculó en función de cuatro métricas diferentes (índice de Shannon, Chao1, invSimpson y riqueza observada) utilizando el paquete R phyloseq.

Los gráficos de ordenación se calcularon basándose en la matriz de distancia de Bray-Curtis utilizando el método de escalado multidimensional no métrico. Las diferencias estadísticas entre grupos se calcularon con un análisis de varianza multivariado por permutaciones (PERMANOVA) usando el paquete vegan (permutaciones = 999). La expresión diferencial de especies se realizó utilizando el paquete R microbio con un valor p ajustado de 0,001 y un cambio de pliegue log2 de 5. La identificación de biomarcadores se calculó utilizando el paquete R microbio. Se realizó un análisis multivariado utilizando MaAsLin para ajustar por factores de confusión como vía de nacimiento y tipo de alimentación.

Resultados

Características generales de la población en estudio

Se incluyeron un total de 20 RNMBP. En cuanto a las características prenatales, la edad materna y el índice de masa corporal medio fueron de $26,9 \pm 1,9$ años y $22,3 \pm 5,5$ kg/m², respectivamente. La diabetes gestacional y los trastornos hipertensivos del embarazo estuvieron presentes en el 25% y el 40% de los casos. El 75% de los embarazos recibió esteroides antenatales, el 37% antibióticos intraparto y el 40% de los nacimientos fueron vaginales. Considerando las características neonatales de la cohorte, el peso al nacer y la edad gestacional media fueron de 1210 ± 238 gramos y $29,9 \pm 1,9$ semanas, respectivamente. El 60% de los RNMBP eran del sexo femenino. La media de días de T1 fue de 14 ± 11 días. En cuanto a las prácticas de alimentación, el 75% de los recién nacidos recibieron calostro de sus madres en las primeras 72 horas de vida. Al momento de la primera muestra (T1), el 25% de ellos estaba alimentándose con más del 70% de LMP, y el 75% recibió principalmente leche de donación. En el momento de la segunda muestra (T2), el 15% se alimentaba con más del 70% de LMP y el 85% se alimentó predominantemente con preparado para lactante de prematuro. La cohorte recibió antibióticos posnatales en el 85% de los casos, con una media de $7,9 \pm 10,2$ días de exposición. En cuanto a las morbilidades neonatales, el 5% presentó sepsis de inicio tardío, 0%

Tabla 1. Características generales de la población (n=20)

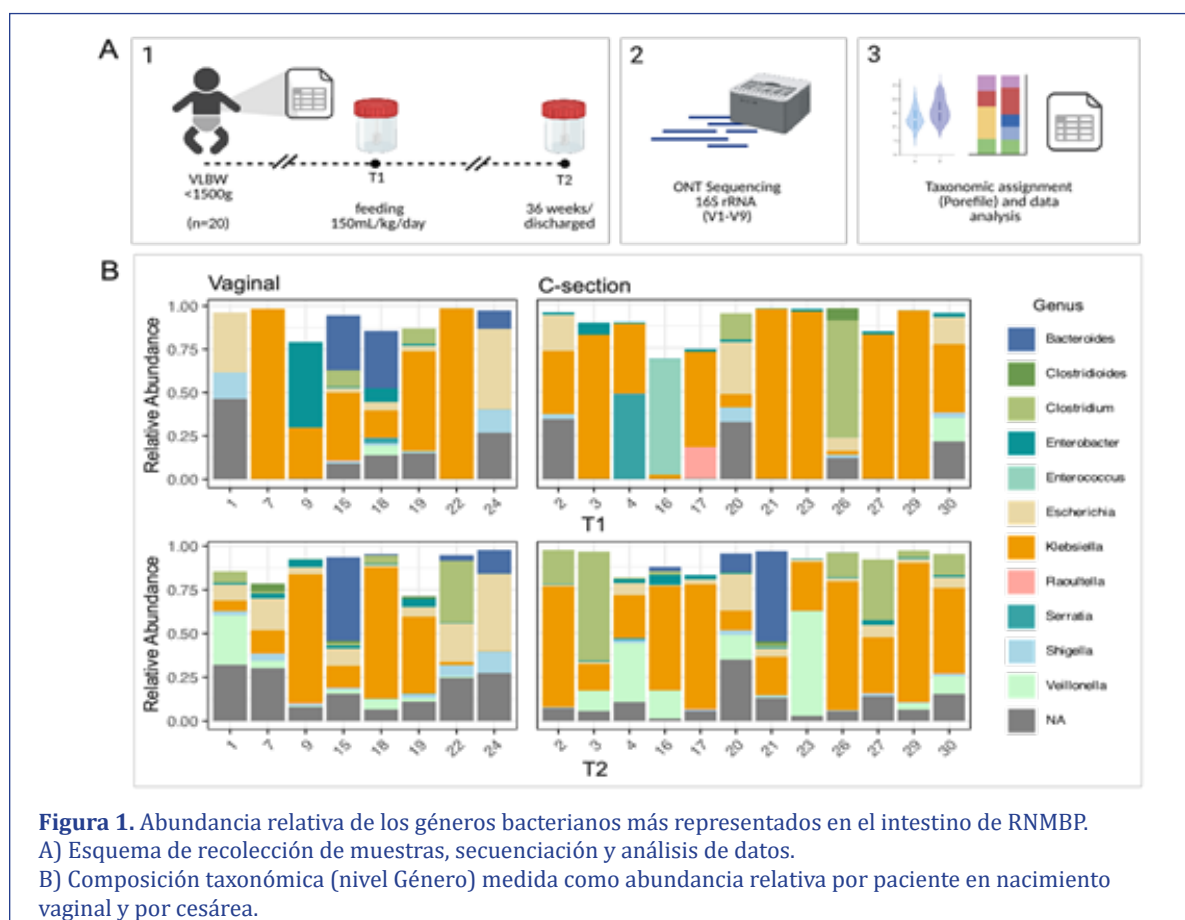
Características prenatales	
Edad materna (años); media +/- DE	26,9 +/- 1,9
Primigesta %	50
Índice de masa corporal; media +/- DE	22,3 +/- 5,5
Diabetes gestacional %	25
Corioamnionitis %	0
Estados hipertensivos del embarazo %	40
PEG %	35
Corticoides antenatales %	75
Parto vaginal %	40
Antibióticos intraparto %	37
Características neonatales	
Peso al nacer (g); (media +/- DE)	1210 +/- 238
EG (semanas); (media +/- DE)	29,9 +/- 1,9
Días a T1 (media +/- DE)	14 +/- 11
Sexo femenino %	60
Colostro en primeras 72 hs %	75
> 70% LMP en T1 %	25
> 70% LMP en T2 %	15
Exposición a antibióticos (días) (media +/- DE)	7,9 +/- 10,2
Exposición posnatal a antibióticos %	85
NEC %	0
Sepsis tardía %	5
DBP %	20
HIV grado III-IV %	0
ROP %	20
Estadía hospitalaria (días) (media +/- DE)	62,6 +/- 28,1

EG: edad gestacional; T1: tiempo 1; PEG: pequeño para la edad gestacional; LMP: leche materna propia; NEC: enterocolitis necrotizante; BDP: broncodisplasia pulmonar; HIV: hemorragia intraventricular; ROP: retinopatía de la prematuridad.

enterocolitis necrotizante y hemorragia intraventricular severa (grado III-IV), 20% displasia broncopulmonar y retinopatía del prematuro. La estadía hospitalaria media fue de $62,6 \pm 28,1$ días (Tabla 1).

Klebsiella pneumoniae y *Escherichia coli* dominan la composición microbiana intestinal en RNMBP

Los recientes avances en las tecnologías de secuenciación y la creciente cantidad de secuencias almacenadas en bases de datos del gen 16S rRNA ahora permiten una resolución precisa de la taxonomía de secuencias a nivel de especie. Para estudiar el perfil de diversidad microbiana, se procesaron las muestras, se extrajo ADN y se amplificó y secuenció el 16S de longitud completa utilizando la plataforma de secuenciación Oxford Nanopore. La clasificación taxonómica de las lecturas de 16S de secuenciación de Oxford Nanopore (ONT) se realizó utilizando Porefile, un pipeline de Nextflow de acceso abierto para el perfilado taxonómico de 16S. Porefile realiza una clasificación taxonómica lectura por lectura de datos de secuenciación de 16S usando una estrategia de mapeo contra la base de datos SILVA y el algoritmo del ancestro común más bajo (LCA) implementado en MEGAN6. El uso de secuencias completas de 16S (V1-V9) de tecnologías de



lectura larga a menudo permite una resolución a nivel de especie. Utilizando la preparación de muestras y el análisis de datos, se comparó el perfil microbiano de cada RNMBP en T1 y a las 36 semanas de EG/alta (T2) (Figura 1). Observamos que, independientemente del modo de parto, una fuerte dominancia del género *Klebsiella* (Figura 1. A) estuvo presente en la mayoría de los recién nacidos de la cohorte (Figura 1. B). Además, en casi la mitad de la población del estudio también se observó una alta abundancia relativa del género *Escherichia*. En casi todas las muestras (18/20) en T1, la abundancia relativa de *Klebsiella* y *Escherichia* explicaba más del 50% de la población. A nivel de especie, el complejo de especies *Klebsiella pneumoniae* (*Klebsiella variicola*, *Klebsiella quasivariicola*, *Klebsiella quasipneumoniae*) y el complejo de especies *Klebsiella oxytoca* (*Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella michiganensis*), junto con *Escherichia coli*, explicaron más del 50% de la composición total de microbiota de los RNMBP (Figura 2). Solo dos recién nacidos presentaron una alta abundancia relativa de *Enterococcus* (caso 16) o *Clostridium* (caso 26), lo cual explicó el 70% de la población bacteriana.

Cambios en la composición microbiana con el tiempo en el microbioma de RNMBP con un aumento en la riqueza de especies

Para estudiar la dinámica de la composición microbiana de VLBW, caracterizamos el perfil taxonómico y la abundancia relativa de los taxa más prevalentes. Al comparar el microbioma intestinal en el punto temporal inicial (T1) con las 36 semanas de EG/alta (T2), identificamos cambios bacterianos en la estructura de la comunidad. Primero, calculamos los taxa principales como aquellas especies (Figura 3) bacterianas presentes en más del 50% de las muestras con una abundancia relativa de al menos 0,01%, y observamos cambios en la composición bacteriana en T1 y T2 (Figura 3. A). Basado en estos parámetros, identificamos *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* como los taxa principales con mayor abundancia relativa en nuestra cohorte. En segundo lugar, buscamos explorar la dinámica de los taxa accesorios de estos prematuros para los dos puntos temporales. Definimos los taxa accesorios como aquellos con una prevalencia superior al 20% pero inferior al 50% y con un umbral de abundancia relativa de 0,01%. Obtuvimos un total

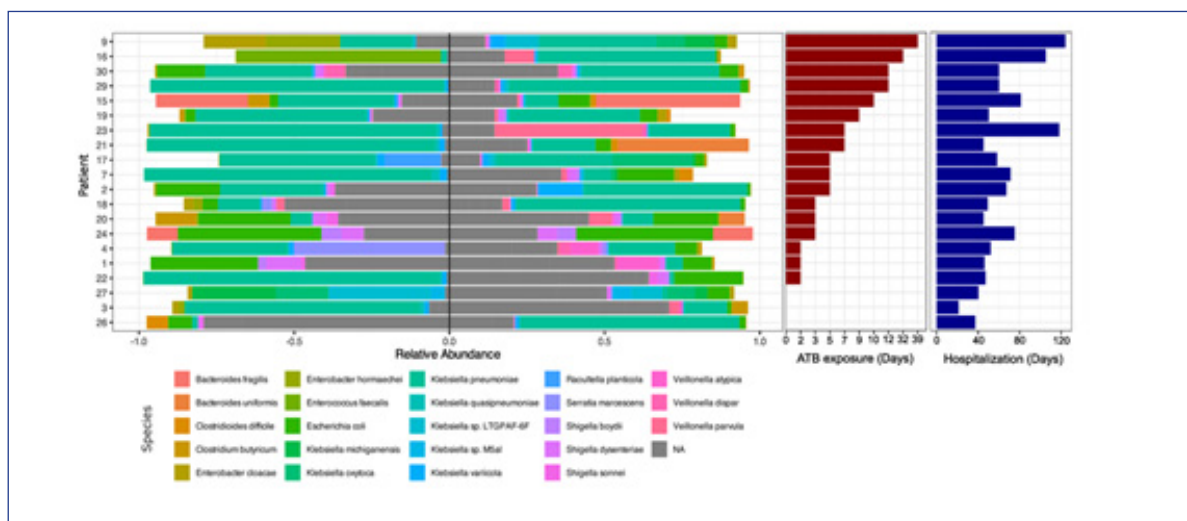


Figura 2. Relative abundance of the top 30 most prevalent species in the cohort ordered by days of antibiotic exposure at the NICU. Negative values indicate T1 and positive abundances T2. Days of hospitalization and antibiotic exposure were recorded for VLBW infants and are represented on the side.

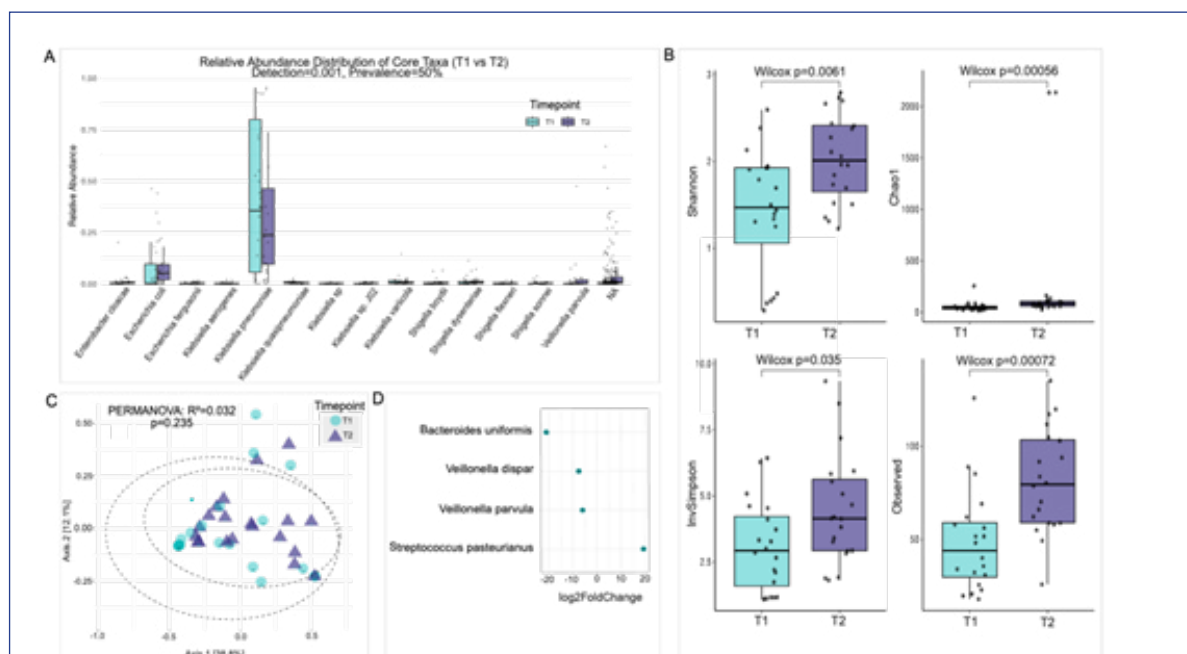


Figura 3. Cambios en la composición de la comunidad bacteriana en el tiempo en microbiota intestinal de RNMBP.

- A) Abundancia relativa de la taxa principal presente en T1 y T2 de RNMBP.
- B) Aumento en la diversidad bacteriana medida como diversidad alfa.
- C) Composición microbiana a través de matriz Bray-Curtis en T1 y T2.
- D) Expresión diferencial de diversidad microbiana y sus cambios temporales a través de log2.

de 42 taxa que cumplían con estos requisitos, de los cuales 10 fueron clasificados como diferentes especies de *Klebsiella* sp., apoyando más la fuerte dominancia de este género como colonizadores tempranos de RNMBP (Figura 3. B). Aunque no fueron generaliza-

dos, se observaron taxa de especies patógenas como *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter* sp., *Salmonella enterica* y *Burkholderia pseudomallei* como colonizadores tempranos frecuentes en esta población vulnerable (Figura 3. C). Como era de espe-

rar, la medida de diversidad bacteriana, en términos de diversidad alfa, aumentó consistentemente en el segundo tiempo. Sin embargo, no pudimos observar cambios significativos en la composición microbiana basados en la matriz de distancia de Bray-Curtis (PERMANOVA, $p = 0,235$) para la variable tiempo (T1 vs T2) (Figura 3. D). De manera similar, no se observaron cambios composicionales significativos a través de otras variables clínicas exploradas (Figura 4). A continuación, calculamos la expresión diferen-

cial de los taxa bacterianos en las muestras y medimos el cambio \log_2 entre los puntos temporales. Observamos que *Bacteroides uniformis*, *Veillonella dispar* y el género *Veillonella* estaban sobrerrepresentados en T2, mientras que *Streptococcus pasteurianus* se encontró diferencialmente en T1 ($p_{adj} = 0,001$ y $\log_2 FC = 7$). En conjunto, después de ajustar por el modo de nacimiento y las prácticas de alimentación, nuestros datos muestran un aumento en la diversidad microbiana a lo largo del tiempo con un aumento de la abundancia

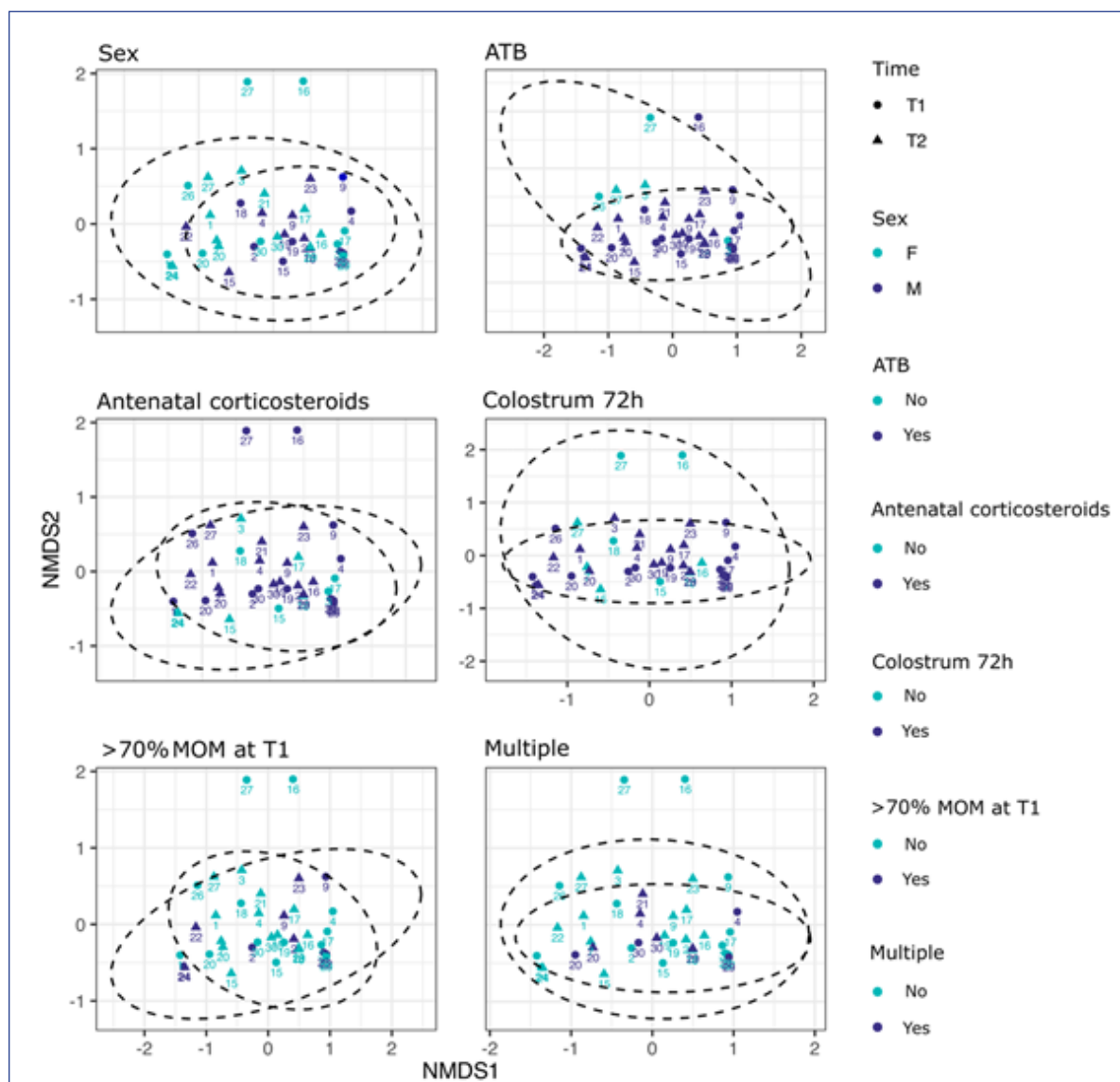


Figura 4. Ordination plot based on Bray Curtis distance matrix for some of the clinical variables collected in this study.

No significant differences were observed in the microbial composition according to these variables.

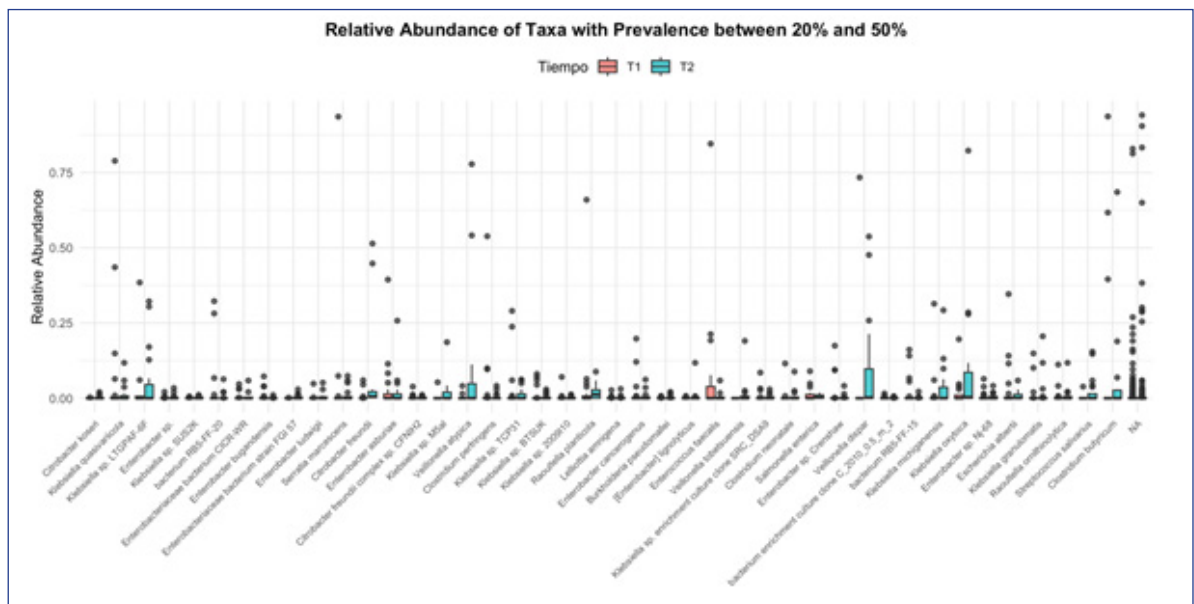


Figura 5. Abundancia relativa de la taxa accesoria.

Tabla 2. Uso de antibióticos y días de hospitalización.

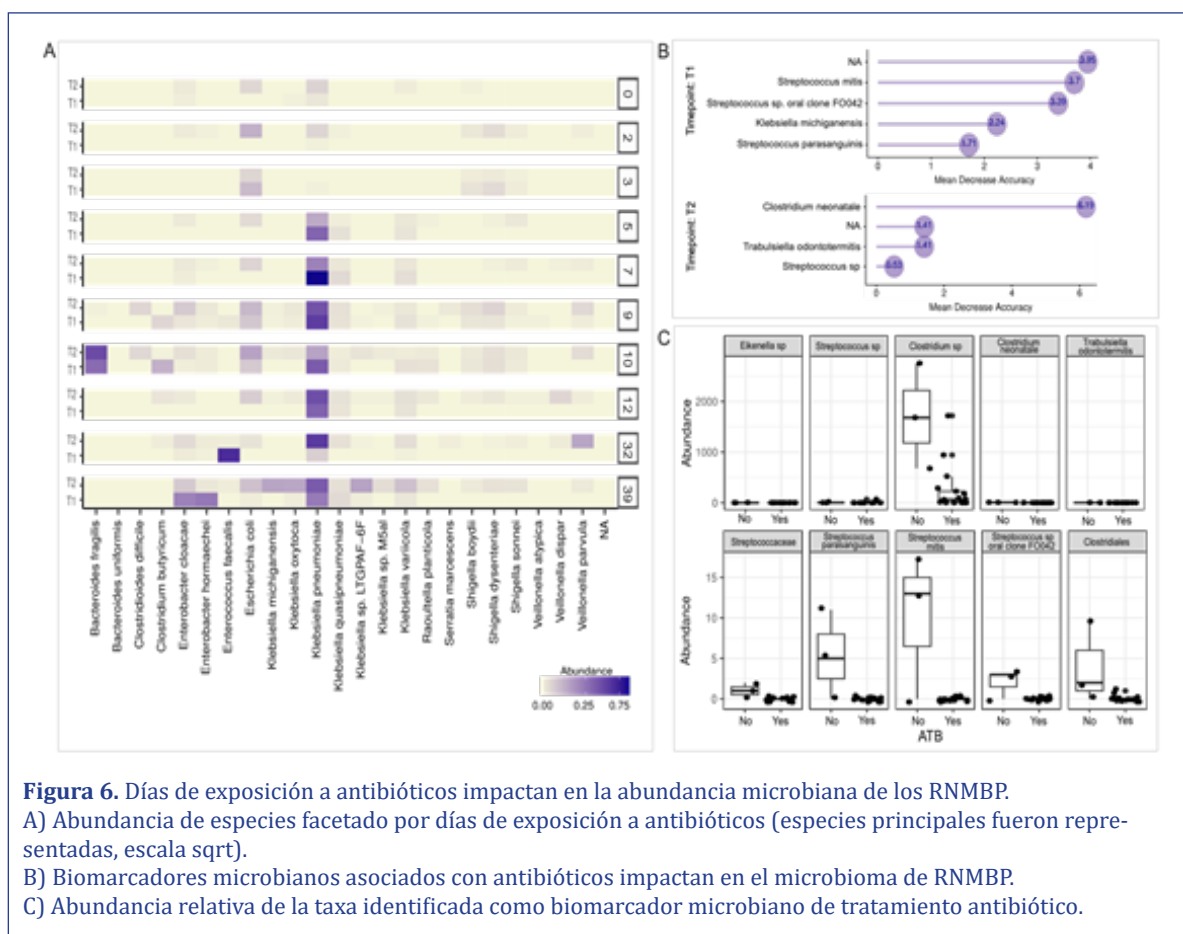
Patient	Hospitalization (days)	Antibiotic exposure (days)	Antibiotics administered
1	46	2	Ampicillin-Gentamicin
2	67	5	Ampicillin-Gentamicin
3	21	0	NA
4	52	2	Ampicillin-Gentamicin
7	71	5	Ampicillin-Gentamicin. Vancomycin-Amikacin
9	124	39	Meropenem-Vancomycin-Cefoperazone
15	81	10	Meropenem-Vancomycin
16	105	32	Vancomycin-Meropenem- Cefazolin
17	58	5	Vancomycin-Meropenem
18	49	3	Ampicillin-Gentamicin
19	50	9	Ampicillin-Gentamicin-Amikacin
20	45	3	Ampicillin-Gentamicin
21	45	7	Ampicillin-Gentamicin
22	47	2	Ampicillin-Gentamicin
23	118	7	Vancomycin-Amikacin
24	75	3	Ampicillin-Gentamicin
26	37	0	NA
27	40	0	NA
29	60	12	Ampicillin-Gentamicin
30	60	12	Ampicillin-Gentamicin

relativa de los géneros *Veillonella* y *Bacteroides* (Figura 5).

La duración de exposición a antibióticos afecta significativamente la diversidad microbiana en RNMBP

Los RNMBP a menudo pasan períodos prolongados de hospitalización y están sobreexponidos a intervenciones clínicas en comparación con sus contrapartes,

los recién nacidos de término. Durante esta ventana de extrema vulnerabilidad, el tratamiento antibiótico se administra con frecuencia durante períodos prolongados con el fin de mitigar infecciones y evitar complicaciones adicionales. Los antibióticos administrados en esta cohorte fueron antibióticos de amplio espectro (Tabla 2). Observamos un fuerte impacto de los días de tratamiento con antibióticos en la composición microbiana de los recién nacidos. Se encontró una fuerte

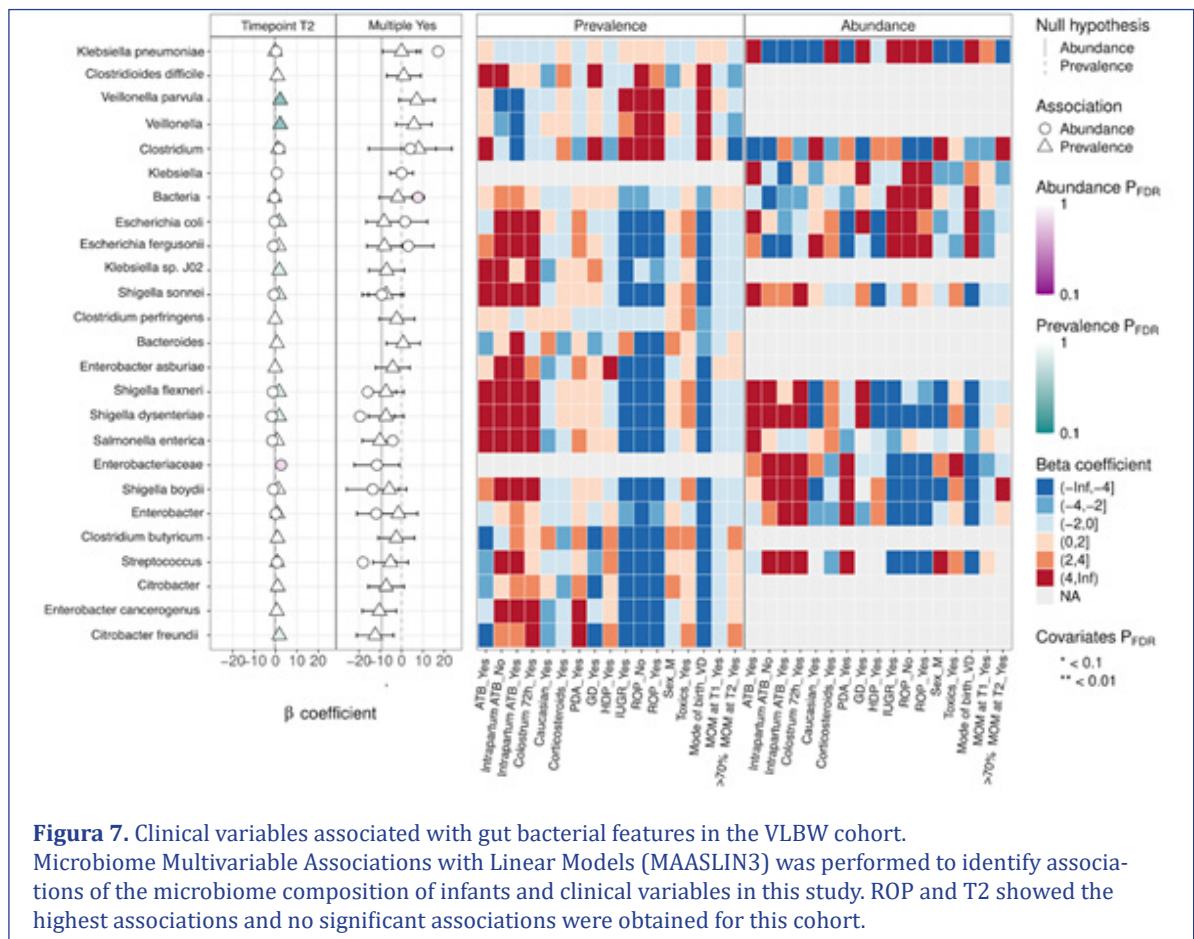


señal en la abundancia relativa de *Klebsiella pneumoniae* en el microbioma intestinal (Figura 6) en recién nacidos con más de cinco días de tratamiento con antibióticos (Figura 6. A). Además de *K. pneumoniae*, la abundancia relativa de *Klebsiella quasipneumoniae* y *K. variicola*, miembros del Complejo de Especies de *Klebsiella pneumoniae*, también aumentó después de cinco días de tratamiento antibiótico sucesivo y no antes. De manera interesante, la abundancia relativa de *Escherichia coli* se mantuvo relativamente constante incluso durante períodos prolongados de tratamiento con antibióticos (12, 32 y 39 días). *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* y *Veillonella parvula* también se observaron con una mayor abundancia relativa en pacientes con más de cinco días de tratamiento antibiótico. Buscamos identificar qué biomarcadores microbianos podrían servir como característicos para discriminar entre recién nacidos tratados con antibióticos y no tratados. Identificamos *Clostridium*, *Trabulsella* y *Streptococcus* como biomarcadores potenciales basados en la estimación de Random Forest en T2 y *Streptococcus* y *Klebsiella* en T1 (Figura 6. B y C).

La disminución media predice esos marcadores bacterianos como las características más relevantes que discriminan un grupo u otro para T1 y T2, respectivamente. A continuación, comparamos la composición microbiana entre pacientes tratados con antibióticos y no tratados. Como se esperaba, la comunidad bacteriana era significativamente diferente entre grupos, basándose en la matriz de distancia de Bray-Curtis (PERMANOVA, $R^2 = 0,078$ y $p = 0,005$) (Figura 7). En conjunto, estos resultados muestran que la exposición a antibióticos causa una fuerte perturbación de la comunidad microbiana en el microbioma intestinal de los recién nacidos prematuros⁽²³⁻²⁸⁾.

Efecto de la dieta con LMP en RNMBP

Para estudiar el impacto de la dieta con LMP en la formación del microbioma se implementó un programa de mejoría de calidad en lactancia materna. Las prácticas detalladas del programa, que incluyen la administración temprana de calostro, la LMP, el fomento de la extracción mantenida de leche materna y los programas de fortificación temprana (80-100 ml/kg/



día), están documentadas en Materiales y Métodos. Es importante señalar que cuando la LMP no estaba disponible o no cumplía con el volumen diario requerido, se administró leche de donación pasteurizada como estrategia de alimentación de segunda línea durante los primeros 30 días de vida (T1). En nuestra cohorte, cinco infantes fueron alimentados principalmente con LMP (>70%) en el tiempo T1, mientras que 15 fueron alimentados predominantemente con leche de donante en el tiempo T1. Solo tres mantuvieron esta alta proporción de dieta materna en T2; los restantes 17 fueron alimentados predominantemente con preparado para lactante. No encontramos diferencias significativas en la diversidad alfa entre recién nacidos alimentados predominantemente con LMP en comparación con los alimentados con leche de donación en T1 y los alimentados con preparado para lactantes en T2 (Figura 8).

Discusión

Los datos presentados ofrecen nuevas perspectivas so-

bre la estructura de la comunidad microbiana en el intestino del RNMBP en un hospital de referencia público de tercer nivel en América del Sur. Realizamos un estudio longitudinal de 20 RNMBP para caracterizar y evaluar la ingesta de LMP durante la hospitalización, así como otras variables, en la composición y desarrollo de la microbiota intestinal. Muchos estudios previos sobre la composición microbiana en recién nacidos prematuros analizaron una porción del gen 16S rRNA y tecnologías de secuenciación de segunda generación que típicamente no logran resolver la estructura de la comunidad a nivel de especie^(29,30). En este estudio, utilizando amplicones de longitud completa de secuencias de 16S (regiones V1-V9) en combinación con tecnologías de Oxford Nanopore, pudimos describir la composición de la comunidad de RNMBP con alta resolución y observamos una alta predominancia de *Klebsiella pneumoniae* dominando el microbioma intestinal, independientemente del modo de nacimiento. En contraste con los recién nacidos a término, que suelen presentar patrones diferenciales en el parto vaginal y por cesárea^(3,31), el microbioma de

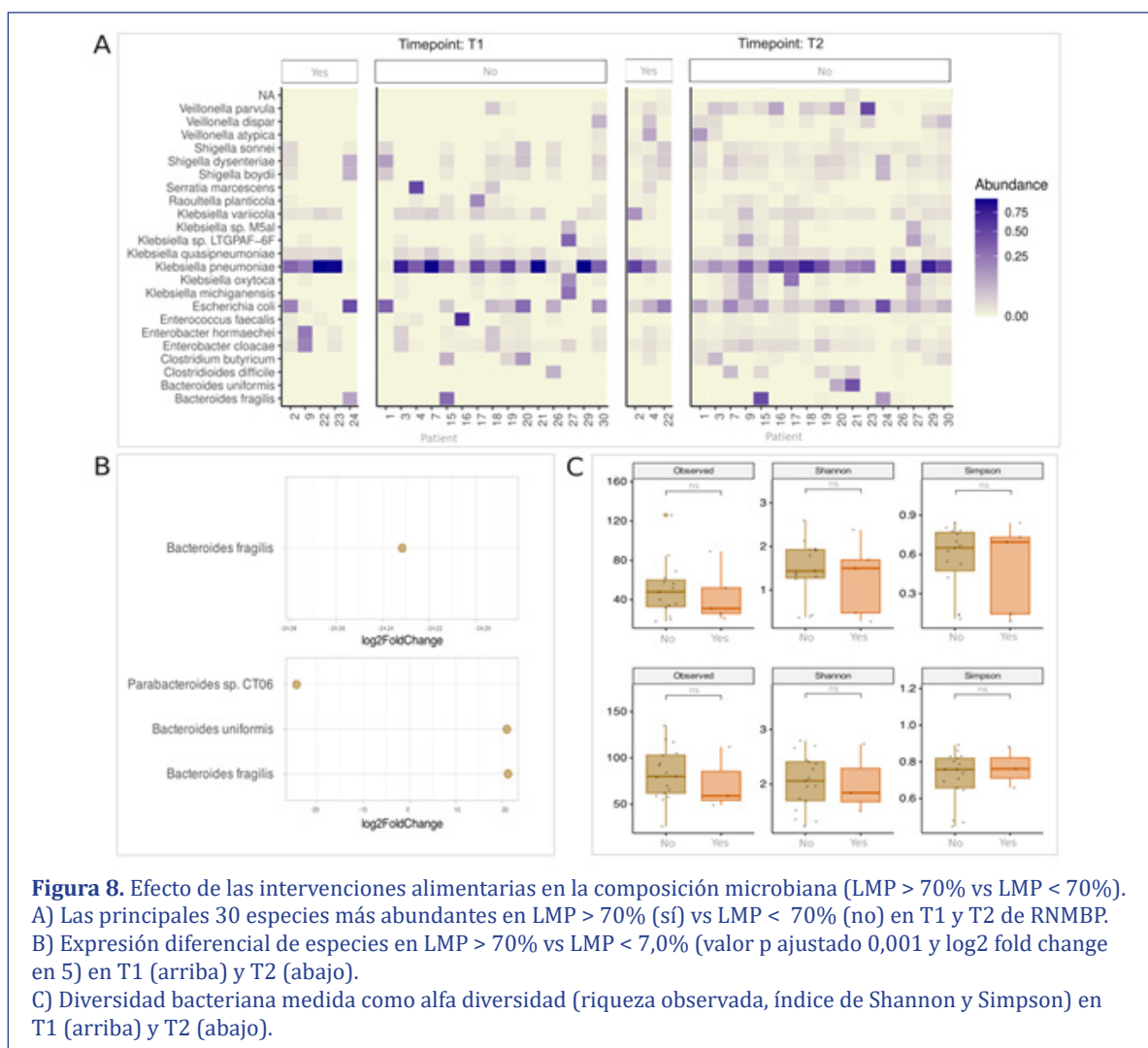


Figura 8. Efecto de las intervenciones alimentarias en la composición microbiana (LMP > 70% vs LMP < 70%). A) Las principales 30 especies más abundantes en LMP > 70% (sí) vs LMP < 70% (no) en T1 y T2 de RNMBP. B) Expresión diferencial de especies en LMP > 70% vs LMP < 7,0% (valor p ajustado 0,001 y log2 fold change en 5) en T1 (arriba) y T2 (abajo). C) Diversidad bacteriana medida como alfa diversidad (riqueza observada, índice de Shannon y Simpson) en T1 (arriba) y T2 (abajo).

los prematuros se ha asociado con una menor colonización bacteriana y un establecimiento independiente del modo de nacimiento⁽²⁰⁾. La alta prevalencia del género *Klebsiella* en el microbioma intestinal prematuro ha sido explorada previamente^(32,33), y muchos de estos estudios se han centrado en RNMBP afectados por NEC^(29,30,34). En un estudio de 60 RNMBP, los autores informaron un aumento en el tiempo de la abundancia relativa de *Escherichia-Shigella* tanto en recién nacidos alimentados con leche humana como en los alimentados con preparado para lactante⁽²¹⁾.

En cuanto a los dos casos con una alta abundancia relativa de *Enterococcus* (caso 16) y *Clostridium* (caso 26), que explicaron el 70% (Figura 8. A) de la población bacteriana, creemos que ciertas características clínicas podrían -en parte- explicar su diferencia del resto de la cohorte. El caso 16 presentó enferme-

dad severa desde los primeros días de vida, recibió múltiples y prolongados tratamientos antibióticos, se mantuvo en alimentación enteral mínima durante el primer mes y desarrolló síntomas similares a la enterocolitis necrotizante, aunque no fue diagnosticado con esta condición. El caso 26 tenía una madre obesa, sin embargo, no se identificó ninguna otra característica clínica particular que pudiera explicar su alta abundancia relativa de *Clostridium*.

Una colonización microbiana alterada puede actuar como un contribuyente importante al desarrollo de una función de barrera intestinal comprometida, enfermedades metabólicas e inflamatorias, así como un aumento en el riesgo de desarrollar enfermedades neurológicas⁽³⁵⁻³⁷⁾. Por lo tanto, comprender la composición microbiana en prematuros y sus características clínicas es una prioridad para incorporar tratamientos

basados en el microbioma en el futuro.

Informes previos indican una competencia exclusiva en la que *Klebsiella* supera a *E. coli* en el microbioma intestinal de recién nacidos afectados por NEC⁽³²⁾. La etiología de esta patología, aunque no completamente comprendida, presumiblemente involucra la activación de la vía de señalización del receptor 4 de tipo toll (TLR4) por lipopolisacáridos bacterianos (LPS)^(38,39). Nuestra cohorte mostró notablemente que la mayoría de los recién nacidos pudieron albergar de manera concurrente tanto *E. coli* como *Klebsiella* en sus microbiomas intestinales. Esta ocurrencia se alinea con la baja incidencia de NEC observada en esta cohorte, ya que ninguno de estos infantes desarrolló esta condición. De hecho, la incidencia de NEC en el Centro Hospitalario Pereira Rossell fue del 5% en 2024, inferior a la media en la región (9%). Se necesitan más estudios para entender la compleja interacción entre *Klebsiella* y *E. coli* y su papel en el establecimiento del microbioma intestinal en el intestino inmaduro de los RNMBP (Figura 8. B).

El ambiente intestinal del prematuro, a menudo sometido a una prolongada exposición a antibióticos, presenta un desafío significativo para el establecimiento del microbioma⁽¹⁸⁾. Buscamos entender el impacto del tratamiento antibiótico prolongado en nuestra cohorte. Como era de esperar, observamos un cambio significativo en la composición microbiana en pacientes tratados y no tratados con antibióticos. Específicamente, los prematuros expuestos a al menos cinco días de tratamiento antibiótico presentan un fuerte cambio en la abundancia relativa de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, *Klebsiella aerogenes* y *Klebsiella michiganensis*. Nuestros hallazgos son consistentes con estudios recientes que muestran efectos antibióticos mínimos en lo inmediato, sin embargo, sugieren cambios más pronunciados que surgen durante períodos prolongados de exposición a antibióticos⁽¹²⁾.

En una maduración típica del microbioma intestinal en recién nacidos a término, los anaerobios facultativos pueden aparecer como los primeros colonizadores y los anaerobios estrictos comienzan a proliferar a medida que disminuyen las concentraciones de oxígeno. Los antibióticos no solo impactan la composición microbiana debido a su actividad antimicrobiana directa, sino que también pueden aumentar los niveles de oxígeno en el lumen intestinal por difusión desde el torrente sanguíneo del huésped⁽⁴⁰⁾. En nuestra cohorte, observamos un aumento en la abundancia relativa del género *Bacteroides* y *Veillonella* en T2, ambos estrictamente anaerobios (Figura 8. C). Esto sugiere una dinámica y ensamblaje complejos en los neonatos prematuros, donde, a pesar de los cambios tempranos

que favorecen a los anaerobios facultativos, algunos grupos anaerobios aún pueden proliferar y colonizar en etapas posteriores de la colonización. Esta compleja interacción debería ser estudiada más a fondo en RNMBP, que tienen que someterse al desafío crítico de aumentar el crecimiento y desarrollo cerebral fuera del entorno protector materno. De hecho, el tercer trimestre del embarazo es crítico para el crecimiento y la función cerebral, y las implicaciones de navegar esta etapa del neurodesarrollo con un microbioma severamente comprometido deben ser consideradas en el contexto de la comunicación bidireccional intestino-cerebro.

Recientemente, se ha propuesto una baja diversidad bacteriana como un biomarcador predictivo de NEC⁽⁷⁾. Hipotetizamos que la LMP y la leche de donación del banco de leche materna disponible en el hospital podrían actuar como un factor prebiótico que podría explicar, al menos en parte, el efecto microbioma protector observado en nuestra población. La evidencia actual muestra que los HMO de la leche de donación permanecen mayormente sin cambios después de la pasteurización. La dieta con leche de donación en RNMBP puede actuar como un prebiótico y ejercer una variedad de efectos tales como actividad antimicrobiana, modulación de la respuesta inmune de las células epiteliales intestinales y promoción del crecimiento de bacterias comensales⁽⁴¹⁻⁴⁴⁾. La leche humana ha demostrado reducir la incidencia de NEC, así como la sepsis de inicio tardío, promoviendo un desarrollo cerebral más saludable⁽⁴⁵⁾. Hipotetizamos que no haber encontrado diferencias estadísticamente significativas en las prácticas de alimentación puede explicarse por el hecho de que en T1 el 25% de la cohorte recibió una dieta predominantemente de LMP, en comparación con el 75% alimentado predominantemente con leche de donante, ambas leche humana. Por otro lado, en T2 solo el 15% de los infantes recibió una dieta predominantemente de LMP. Creemos que el pequeño número de infantes incluidos en la cohorte de LMP puede estar enmascarando las diferencias potenciales.

Este estudio tiene limitaciones que los autores reconocen. En primer lugar, el tamaño de la muestra del estudio de RNMBP es pequeño, lo que puede llevar a un sesgo potencial en el poder estadístico. Esto probablemente contribuyó a nuestra incapacidad para encontrar diferencias estadísticamente significativas en la diversidad en relación con la dieta de LMP. En segundo lugar, ni realizamos pruebas microbianas para la leche materna o el preparado para lactantes, ni realizamos pruebas con hisopos vaginales antes del parto prematuro. Por último, en este trabajo solo se estudió el componente bacteriano de la comunidad microbiana. Se necesitan más estudios para comprender

el papel de la compleja comunidad de levaduras, arqueas y componentes virales en la colonización y establecimiento de la comunidad microbiana. Creemos que la principal fortaleza de este estudio radica en ser el primer trabajo de caracterización del microbioma intestinal de RNMBP en la región, explorando tanto el impacto de la dieta de LMP en su desarrollo como fomentando una iniciativa de mejora de calidad para mejorar el uso de MOM en esta población vulnerable.

Conclusiones

Colectivamente, estos hallazgos apoyan la idea de que el desarrollo y la evolución de las comunidades microbianas en la vida temprana en el intestino de los RNMBP es un proceso continuo y no aleatorio, y que la leche materna, los antibióticos posnatales y el entorno de la UCI neonatal influyen en este proceso. Los esfuerzos por incorporar la salud de la estructura de la comunidad microbiana en la atención clínica de los prematuros pueden tener un impacto protector a largo plazo en el desarrollo de los recién nacidos. Estamos reconociendo cada vez más el papel de la colonización microbiana en la salud a largo plazo, incluyendo la función de barrera intestinal, la modulación inmune, así como los trastornos metabólicos y neurodesarrollos mentales (incluyendo parálisis cerebral, trastornos del espectro autista, ansiedad y discapacidades de aprendizaje). De esta manera, los esfuerzos deben dirigirse hacia la comprensión de qué prácticas clínicas e intervenciones basadas en el microbioma pueden mitigar el efecto perjudicial sobre la estructura de la comunidad microbiana de las hospitalizaciones prolongadas en la UCI neonatal. En este estudio, mostramos cómo la secuenciación completa de 16S mediante Oxford Nanopore puede utilizarse para describir la composición bacteriana a nivel de especie para esta población vulnerable en Montevideo, Uruguay.

En este proyecto proponemos obtener datos de metagenómica shotgun de muestras adicionales ($n = 65$) al nacer y al alcanzar la edad gestacional de 36 semanas de gestación y obtener así información no solo de las comunidades bacterianas, sino que también de las comunidades de virus, arqueas y eucariotas que dominan el tracto intestinal de los RNMBP. Mediante cultivo microbiológico en cámara de anaerobiosis de materia fecal de 30 recién nacidos a término alimentados con leche materna proponemos armar una colección de bacterias con potencial probiótico a futuro. Esta cohorte será comparada como “control sano”, sumando un total de 160 muestras de metagenómica shotgun. Las muestras de esta cohorte ya fueron recolectadas.

A la fecha, no existen publicados en nuestro país ni en Latinoamérica estudios de caracterización de los

perfiles de microbiota en recién nacidos prematuros y los efectos de la exposición a factores perinatales. El desarrollo de esta línea de investigación posiciona al país y a la academia en la vanguardia de la investigación aplicada. Asimismo, constituye un pilar fundamental de la protección de las infancias desde las etapas más precoces aportando al conocimiento en factores moduladores de microbiota, con un impacto en el potencial de neurodesarrollo a largo plazo de los individuos a través del eje intestino-cerebro. Es de alto valor para nuestro equipo de estudio poder ampliar la información obtenida hasta el momento y consolidar el trabajo realizado con nuevas herramientas para mejorar la práctica clínica en esta población de alta complejidad y vulnerabilidad.

Referencias bibliográficas

- Jokela R, Ponsoero A, Dikareva E, Wei X, Kolho K, Korpela K, et al. Sources of gut microbiota variation in a large longitudinal Finnish infant cohort. *EBioMedicine* 2023; 94:104695. doi: 10.1016/j.ebiom.2023.104695.
- Mitchell C, Mazzoni C, Hogstrom L, Bryant A, Bergerat A, Cher A, et al. Delivery mode affects stability of early infant gut microbiota. *Cell Rep Med* 2020; 1(9):100156. doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100156.
- Browne H, Shao Y, Lawley T. Mother-infant transmission of human microbiota. *Curr Opin Microbiol* 2022; 69:102173. doi: 10.1016/j.mib.2022.102173.
- Wu X, Guo R, Fan Y, Chen S, Zheng W, Shu X, et al. Dynamic impact of delivery modes on gut microbiota in preterm infants hospitalized during the initial 4 weeks of life. *Int J Med Microbiol* 2024; 315:151621. doi: 10.1016/j.ijmm.2024.151621.
- Zimmermann P, Curtis N. Breast milk microbiota: a review of the factors that influence composition. *J Infect* 2020; 81(1):17-47. doi: 10.1016/j.jinf.2020.01.023.
- Collado M, Cernada M, Neu J, Pérez G, Gormaz M, Vento M. Factors influencing gastrointestinal tract and microbiota immune interaction in preterm infants. *Pediatr Res* 2015; 77(6):726-31. doi: 10.1038/pr.2015.54.
- Thänert R, Schwartz D, Keen E, Hall C, Wang B, Shaikh N, et al. Clinical sequelae of gut microbiome development and disruption in hospitalized preterm infants. *Cell Host Microbe* 2024; 32(10):1822-1837.e5. doi: 10.1016/j.chom.2024.07.027.
- Arbolea S, Sánchez B, Milani C, Duranti S, Solís G, Fernández N, et al. Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics. *J Pediatr* 2015; 166(3):538-44. doi: 10.1016/j.jpeds.2014.09.041.
- Tapia J, Toso A, Vaz Ferreira C, Fabres J, Musante G, Mariani G, et al. The unfinished work of neonatal very low birthweight infants quality improvement: Improving outcomes at a continental level in South America. *Semin Fetal Neonatal Med* 2021; 26(1):101193. doi: 10.1016/j.siny.2021.101193.
- D'Apremont I, Marshall G, Musalem C, Mariani G, Musante G, Bancalari A, et al. Trends in perinatal practices and neona-

- tal outcomes of very low birth weight infants during a 16-year period at NEOCOSUR Centers. *J Pediatr* 2020; 225:44-50.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2020.05.040.
11. Tapia J, Toso A, Vaz Ferreira C, Fabres J, Musante G, Mariani G, et al. The unfinished work of neonatal very low birthweight infants quality improvement: Improving outcomes at a continental level in South America. *Semin Fetal Neonatal Med* 2021; 26(1):101193. doi: 10.1016/j.siny.2021.101193.
 12. Kiu R, Darby E, Alcon C, Acuna A, Camargo A, Lamberte L, et al. Impact of early life antibiotic and probiotic treatment on gut microbiome and resistome of very-low-birth-weight preterm infants. *Nat Commun* 2025; 16(1):7569. doi: 10.1038/s41467-025-62584-2.
 13. La Rosa P, Warner B, Zhou Y, Weinstock G, Sodergren E, Hall C, et al. Patterned progression of bacterial populations in the premature infant gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(34):12522-7.
 14. Masi A, Beck L, Perry J, Granger C, Hiorns A, Young G, et al. Human milk microbiota, oligosaccharide profiles, and infant gut microbiome in preterm infants diagnosed with necrotizing enterocolitis. *Cell Rep Med* 2024; 5(9):101708. doi: 10.1016/j.xcrm.2024.101708.
 15. Wang S, Egan M, Ryan C, Boyaval P, Dempsey E, Ross R, et al. A good start in life is important-perinatal factors dictate early microbiota development and longer term maturation. *FEMS Microbiol Rev* 2020; 44(6):763-81. doi: 10.1093/femsre/uaa030.
 16. Tapiainen T, Koivusaari P, Brinkac L, Lorenzi H, Salo J, Renko M, et al. Impact of intrapartum and postnatal antibiotics on the gut microbiome and emergence of antimicrobial resistance in infants. *Sci Rep* 2019; 9(1):10635. doi: 10.1038/s41598-019-46964-5.
 17. Zeissig S, Blumberg R. Life at the beginning: perturbation of the microbiota by antibiotics in early life and its role in health and disease. *Nat Immunol* 2014; 15(4):307-10. doi: 10.1038/ni.2847.
 18. Stark A, Smith P, Hornik C, Zimmerman K, Hornik C, Pradeep S, et al. Medication Use in the Neonatal Intensive Care Unit and changes from 2010 to 2018. *J Pediatr* 2022; 240:66-71.e4. doi: 10.1016/j.jpeds.2021.08.075.
 19. Foulhy F, Guinane C, Hussey S, Wall R, Ryan C, Dempsey E, et al. High-throughput sequencing reveals the incomplete, short-term recovery of infant gut microbiota following parenteral antibiotic treatment with ampicillin and gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(11):5811-20. doi: 10.1128/AAC.00789-12.
 20. Gibson M, Wang B, Ahmadi S, Burnham C, Tarr P, Warner B, et al. Developmental dynamics of the preterm infant gut microbiota and antibiotic resistome. *Nat Microbiol* 2016; 1:16024. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.24.
 21. Yang R, Wang H, Chen D, Cai Q, Zhu J, Yuan S, et al. The effect of in-hospital breast milk intake on the gut microbiota of preterm infants. *Clin Nutr ESPEN* 2024; 60:146-55. doi: 10.1016/j.clnesp.2024.01.020.
 22. Wroot E, Chapman J, Young G, Berrington J, Stewart C. Opportunities for microbiome-based therapeutics in preterm infants. *Nat Microbiol* 2025; 10(6):1263-6. doi: 10.1038/s41564-025-02010-x.
 23. Fleiss N, Morrison C, Nascimento A, Stone D, Myers E. Improving early colostrum administration to very low birth weight infants in a level 3 neonatal intensive care unit: a quality improvement initiative. *J Pediatr* 2023; 260:113421. doi: 10.1016/j.jpeds.2023.113421.
 24. Vaz Ferreira C, Silvera F. Estrategias de mejora de calidad en lactancia en recién nacidos muy bajo peso: revisión el tema. *Arch Pediatr Urug* 2023; 94(1):e401. doi: 31134/AP.94.1.8.
 25. Gephart S, Newnam K. Closing the gap between recommended and actual human milk use for fragile infants: what will it take to overcome disparities? *Clin Perinatol* 2019; 46(1):39-50. doi: 10.1016/j.clp.2018.09.003.
 26. Zhang T, Li H, Ma S, Cao J, Liao H, Huang Q, et al. The newest Oxford Nanopore R10.4.1 full-length 16S rRNA sequencing enables the accurate resolution of species-level microbial community profiling. *Appl Environ Microbiol* 2023; 89(10):e0060523. doi: 10.1128/aem.00605-23.
 27. Huson D, Auch A, Qi J, Schuster S. MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Res* 2007; 17(3):377-86. doi: 10.1101/gr.5969107.
 28. Matsuo Y, Komiya S, Yasumizu Y, Yasuoka Y, Mizushima K, Takagi T, et al. Full-length 16S rRNA gene amplicon analysis of human gut microbiota using MinION™ nanopore sequencing confers species-level resolution. *BMC Microbiol* 2021; 21(1):35. doi: 10.1186/s12866-021-02094-5.
 29. Sim K, Shaw A, Randell P, Cox M, McClure Z, Li M, et al. Dysbiosis anticipating necrotizing enterocolitis in very premature infants. *Clin Infect Dis* 2015; 60(3):389-97. doi: 10.1093/cid/ciu822.
 30. Torrazza R, Neu J. The altered gut microbiome and necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol* 2013; 40(1):93-108. doi: 10.1016/j.clp.2012.12.009.
 31. Shao Y, García C, Clare S, Dawson N, Mu A, Adoum A, et al. Primary succession of Bifidobacteria drives pathogen resistance in neonatal microbiota assembly. *Nat Microbiol* 2024; 9(10):2570-82. doi: 10.1038/s41564-024-01804-9.
 32. Coleman S, Unterhauser K, Rezaul K, Ledala N, Lesmes S, Caimano M, et al. High-resolution microbiome analysis reveals exclusionary *Klebsiella* species competition in preterm infants at risk for necrotizing enterocolitis. *Sci Rep* 2023; 13(1):7893. doi: 10.1038/s41598-023-34735-2.
 33. Mäklin T, Thorpe H, Pöntinen A, Gladstone R, Shao Y, Pesonen M, et al. Strong pathogen competition in neonatal gut colonisation. *Nat Commun* 2022; 13(1):7417. doi: 10.1038/s41467-022-35178-5.
 34. Sim K, Powell E, Cornwell E, Simon J, Shaw A. Development of the gut microbiota during early life in premature and term infants. *Gut Pathog* 2023; 15(1):3. doi: 10.1186/s13099-022-00529-6.
 35. Ghosh S, Wang J, Yannie P, Ghosh S. Intestinal barrier function and metabolic/liver diseases. *Liver Res* 2020; 4(2):81-7. doi: 10.1016/j.livres.2020.03.002.
 36. Ghosh S, Wang J, Yannie P, Ghosh S. Intestinal barrier dysfunction, LPS translocation, and disease development. *J Endocr Soc* 2020; 4(2):bvz039. doi: 10.1210/endo/bvz039.
 37. Vanuytsel T, Bercik P, Boeckxstaens G. Understanding neuroimmune interactions in disorders of gut-brain interaction: from functional to immune-mediated disorders. *Gut* 2023; 72(4):787-98. doi: 10.1136/gutjnl-2020-320633.
 38. Hackam D, Sodhi C. Bench to bedside: new insights into the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2022; 19(7):468-79. doi: 10.1038/s41575-022-00594-x.
 39. Warner B, Deych E, Zhou Y, Hall C, Weinstock G, Sodergren E, et al. Gut bacteria dysbiosis and necrotising enterocolitis in very low birthweight infants: a prospective case-control study. *Lancet* 2016; 387(10031):1928-36. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00081-7.

40. Byndloss M, Bäuml A. The germ-organ theory of non-communicable diseases. *Nat Rev Microbiol* 2018; 16(2):103-10. doi: 10.1038/nrmicro.2017.158.
41. Matthews L, Walsh B, Knutsen C, Neil J, Smyser C, Rogers C, et al. Brain growth in the NICU: critical periods of tissue-specific expansion. *Pediatr Res* 2018; 83(5):976-81. doi: 10.1038/pr.2018.4.
42. Rogers C, Smyser T, Smyser C, Shimony J, Inder T, Neil J. Regional white matter development in very preterm infants: perinatal predictors and early developmental outcomes. *Pediatr Res* 2016; 79(1-1):87-95. doi: 10.1038/pr.2015.172.
43. Wang S, Ryan C, Boyaval P, Dempsey E, Ross R, Stanton C. Maternal vertical transmission affecting early-life microbiota development. *Trends Microbiol* 2020; 28(1):28-45. doi: 10.1016/j.tim.2019.07.010.
44. Hahn W, Kim J, Song S, Park S, Kang N. The human milk oligosaccharides are not affected by pasteurization and freeze-drying. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2019; 32(6):985-91. doi: 10.1080/14767058.2017.1397122.
45. Joosten K, Vermeulen M. Principles of feeding the preterm infant. *Clin Nutr ESPEN* 2024; 59:320-7. doi: 10.1016/j.clnesp.2023.12.016.

Correspondencia: Dra. Catalina Vaz Ferreira.
Correo electrónico: catalinavazferreira@gmail.com

Disponibilidad de datos

El conjunto de datos que apoya los resultados de este estudio NO se encuentra disponible en repositorios de acceso libre.

Contribución de los autores - CRediT

Catalina Vaz Ferreira: Conceptualización; Curación de datos; Análisis formal; Captación de fondos; Investigación; Metodología; Administración del proyecto; Software; Visualización; Redacción - borrador original; Redacción - revisión y edición.

Josefina Vera: Conceptualización; Curación de datos; Análisis formal; Captación de fondos; Investigación; Metodología; Software; Visualización; Redacción - revisión y edición.

Nadia Riera: Conceptualización; Análisis formal; Captación de fondos; Metodología; Supervisión; Redacción - revisión y edición.

Mario Moraes: Conceptualización; Análisis formal; Captación de fondos; Metodología; Software; Supervisión; Redacción - revisión y edición.

Catalina Vaz Ferreira, ORCID 0000-0002-9724-7047.

Josefina Vera, ORCID 0009-0001-3816-070X.

Nadia Riera, ORCID 0000-0001-6295-6452.

Mario Moraes, ORCID 0000-0002-5174-2405.