



Research
Microecology—Review

从农场到微生物工程：微生物与过敏性疾病

Dominique Angèle Vuitton^{a,b,*}, Jean-Charles Dalphin^{a,b}

^a University Bourgogne Franche-Comté, Besançon 25030, France

^b Allergology Network of Franche-Comté, Besançon 25030, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 January 2017

Revised 25 January 2017

Accepted 1 February 2017

Available online 21 February 2017

关键词

过敏

农场

生物多样性

免疫调节

微生物生态

转化研究

摘要

第二次世界大战之后，IgE 依赖性过敏性疾病的发生呈稳步上升趋势，在人类发展史上，这种现象是很罕见的。许多大规模横断面研究、纵向队列研究及基础实验性研究均指出，在生活方式及生活环境的重大演变过程中人类的一些与过敏相关的“保护性因素”正逐渐消失。其中被广泛认可的观点是：肠道微生态在免疫调节方面扮演着重要角色。本文综述了暴露在不同微生物组成的农场环境对过敏性疾病的保护作用。此外，传统生活环境中的微生物如何促进儿童免疫系统的正常发育，以及此种相互作用在现代生活方式下的不可逆性缺失同样被阐明。“农场效应”的保护作用主要包括：母亲怀孕期间或婴儿期接触动物、谷仓、马厩，饮用未加工的牛奶和其他奶制品。除农场环境中的微生物总量之外，微生物的生物多样性似乎对于这种保护也至关重要，这可能归因于农场环境对机体肠道菌群生物多样性的贡献。过敏性疾病专科医生和儿科医生临床应用传统益生菌(如乳杆菌和双歧杆菌)对过敏性疾病的预防作用并未达到满意的预期效果。小鼠呼吸道过敏性疾病模型研究表明，牛棚中存在着对过敏性疾病起重要预防作用的微生物，如鲁氏不动杆菌(*A. lwoffii*) F78、乳酸乳球菌(*L. lactis*) G121 和松鼠葡萄球菌(*S. sciuri*) W620。然而，在对农场环境的卓有成效的研究基础上，研发新一代益生菌仍需要微生物学家、免疫学家和生物工程师以及儿科医生、过敏性疾病专科医生、临床试验专家和伦理委员会之间的密切合作。

© 2017 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of the Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言：生活方式的变化和过敏性/特应性疾病的出现

在20世纪下半叶，IgE依赖性过敏性疾病(也称为“特应性疾病”，包括哮喘、过敏性鼻炎、特应性皮炎/湿疹和食物过敏)的显著增加已成为令人费解的谜团。自20世纪80年代以来，流行病学家和免疫学家一直在着力解决这种由过敏性疾病意想不到的增加所带来的一系列问题。所有的研究表明，在第二次世界大战以后，发达国家的生活方式和环境的改变对这种增加要负很大的责任[1–3]。并不是所有问题都已有答案。然而，现今的许多研究(参见参

考文献[4–8])为我们提供了一个概念和操作框架，以便更好地了解人类历史上的这一独特现象。巧合的是，人们重新对微生态产生了兴趣，数十亿计的微生物构成了微生物群落，并且在哺乳动物肠道中发挥着共生功能。这些微生物被认为是人体动态平衡中的重要参与者；其基因组(微生物组)以不同的方式与宿主的基因组相互作用[9,10]。在促进免疫耐受性方面，环境影响与肠道微生态之间的关联已经被建立，再加上微生物工程的进展，使我们更加期待过敏性疾病的治疗和(或)预防的璀璨未来。尽管现今看来，在许多拥有西化生活方式的国家，过敏性疾病的流行已经到达平稳期，但是考虑到新兴市场经济的国家和城市规模

* Corresponding author.

E-mail address: dominique.vuitton@univ-fcomte.fr

不断扩大的资源短缺国家，它仍是全球公共卫生问题[11]。

在总结了我們目前了解的过敏性疾病与微生态之间的联系后，本文将重点关注20世纪90年代出现的一个令人特别困惑的问题：农业环境对过敏性疾病的保护作用。随着生活方式的改变，过去存在的有利的儿童适当免疫系统发育发生不可逆性损害，微生物工程能否并怎样修复这种微生物与免疫系统的相互作用仍旧是一个问题。大多数研究结果来自欧洲的横断面研究，主要包括关于过敏和内毒素(ALEX)的研究[12]；与农业和人类生活方式相关的儿童过敏风险因素预防(PARSIFAL)的研究[13]；欧洲共同体关于哮喘的遗传与环境因素的多学科研究[14]；以及我们参与了13年的欧洲五国病例专门用来阐明农业与过敏关系的过敏防护的研究——农村环境研究(PASTURE)[7]。我们在世界各地进行的其他研究[15-17]和常规益生菌预防过敏的综合评价中发现了补充数据[18-21]。虽然过去几年我们已经知道上呼吸道、皮肤和肺的微生物群以及长期被认为是无菌的母乳的微生物群参与了过敏性疾病的发生和(或)表现[22-27]，但还不太清楚它们之间的因果关系；因此，在本文将不会探讨这些关系，我们将重点关注肠道微生物组。

2. 过敏性疾病发生的危险因素：基因与环境

2.1. 遗传因素

1923年Coca和Cooke[28]首次提出将包括哮喘、过敏性鼻炎、特应性皮炎、荨麻疹和食物过敏在内的一系列家族性/遗传性疾病命名为“特应性疾病”。现在被人们广泛接受的描述是：特应性疾病是一种结合了遗传和环境因素的多因素相关疾病。常见的遗传因素引起针对环境抗原IgE抗体过度或不适当应答相关的疾病，并导致各种临床表现[29,30]。患有过敏性疾病的儿童中，在考虑到祖父母的情况下，50%有过敏家族史[31]；在同卵双胞胎中有相同类型的临床表现的倾向，这也为特应性疾病的遗传性质提供了证据[32]。最近的全基因组关联研究已经发现了几种可能引发哮喘的新基因，包括*IL18R1*、*IL33*、*SMAD3*、*ORMDL3*(对应于染色体17q21，尤其是儿童期发病疾病)、*HLA-DQ*和*IL2RB*基因位点的单核苷酸的多态性[33]。因为这些基因的流行病学的差异，大多数哮喘/特应性疾病基因不能跨越群体复制，这种现象也可在中国受试者和其他种族的受试者之间观察到[34]。在某种程度上，不同中国人群中的17q21染色体上*ORMDL3*基因多态性研究结果并不一致。尽管最近的研究表明，事实上这些基因多态性与

中国东北地区汉族儿童哮喘的发病有关，正如与白种人儿童中发现的一样[35]。

已经发现控制IgE水平的基因与介导哮喘易感性的基因几乎没有重叠；前者更直接地涉及“特应性”背景[36,37]。特应性或IgE依赖性免疫谱以2型T辅助细胞(Th2)免疫优势应答为免疫学特征，包括白细胞介素(IL)-4、IL-5和IL-13的分泌，也可在蠕虫感染和胎儿期观察到，这与由促炎细胞因子如肿瘤坏死因子(TNF)- α 和干扰素- γ (IFN)的分泌支配的适于抵抗细菌和细胞内感染[38]的1型T辅助细胞(Th1)谱相反[38]。然而，23%的没有任何家族史的儿童也会出现哮喘和(或)过敏[19]，并且在那些过敏性疾病一直呈上升趋势的国家，这个比例可能会随着时间的推移不断变大。

2.2. 个人史和环境因素

现在已经确定，环境因素在过敏性疾病致敏的发展和疾病的临床表现中起主要作用。母亲吸烟是公认的家庭/环境风险因素[39]，并且已经证实子宫内或生命早期的二手烟暴露可与最近确定的哮喘潜在基因相互作用[40]。西欧/北欧和美国的过敏性疾病发病率的增加以及与“发展中国家”观察到的差异最初归因于更好的诊断，以及与过去没有或很少遇到的过敏原物质有关。然而，很快出现的是，过敏性疾病的发病率在医疗水平相似的“发达”区域/国家之间，在城市与农村环境之间和(或)在富裕区域与较不富裕区域/国家之间也可能显著不同。18世纪的英国家庭医生已经做了类似的观察，他们强调，农民的孩子尽管经常与干草接触，但与那些城里的孩子相比，他们极少出现季节性过敏性鼻炎[41]。比较中国(如香港、广州和北京；或香港、北京和乌鲁木齐)不同发展水平地区的过敏性疾病的流行程度，以及第一代和第二代移民人群的过敏性疾病发生率，从发展中国家到发达国家，在不同人群的遗传学背景的条件下，完全支持生活方式对过敏性疾病发生率的改变作用[15-17,42-45]。20世纪80年代和90年代全球流行病学研究排除了空气污染对过敏性疾病发病率增加的责任，并明确了其在呼吸道疾病临床症状严重程度方面的重要作用[46]。在出生后第一年的母乳喂养和(或)食物多样化方面的研究提供了不只是一些非结论性的结果，这些结果总结在综述和Meta分析中[47,48]。

在20世纪80年代和90年代进行的横断面研究强调了一系列环境状况，这些状况可以解释过敏性疾病的“后工业革命流行”现象。例如，大量兄弟姐妹的“保护效应”

是Strachan在1989年提出的流行的“卫生假说”的起源[49]，其他国家的类似研究[50,51]以及早期日托护理和儿童常见病毒感染(如甲型肝炎、麻疹或弓形虫感染)的保护作用[52–55]进一步证实了这一假说。

从那时起，过敏性疾病的免疫模式不断被重新审视，并已从“卫生”和“缺乏感染原的免疫刺激”转移到非致病性微生物接触的免疫调节[56,57](图1)，如过敏性疾病发生风险与剖腹产及母婴进行抗生素治疗之间的联系[58,59]。虽然寄生虫感染与一些过敏性疾病有相似的TH2免疫机制，但是它有意想不到的保护作用，如图1所示，它通过建立和维持免疫耐受而不单是通过TH1细胞反应来抵抗微生物[60,61]。

3. 农业环境和过敏性疾病的保护作用

3.1. 流行病学调查

大多数关于农业环境的欧洲研究始于苏联解体后和德国统一的第一年(即20世纪90年代初)的观察。生活在德国东部地区的儿童的过敏性疾病患病率比生活在西部的儿童低(两地区特异性过敏性疾病发病率分别为18.2%和36.7%；两地区哮喘和过敏性鼻炎发病率分别为3.9%和5.9%)[62]，这种差异在德国统一后便消除了[63]。俄罗斯与芬兰Karelia相比，以及爱沙尼亚和波兰与瑞典相比，儿童特异性疾病的患病率较低[7,64–67]。研究者认为，室内燃木炉具和燃煤炉具的使用与过敏性疾病的减少有关。基

于德国巴伐利亚南部农村社区供暖方式所带来的影响的补充研究，一个位于德国慕尼黑的研究团队认为，室内燃木炉具和燃煤炉具或可成为更传统的生活方式及农民父母务农的替代品[68]。农村和非农村家庭的生活方式的比较充分证实了这个建议的可行性[69]。根据这些结果，以及20世纪90年代末在奥地利、瑞士、芬兰和加拿大开展的研究结果[4,70–75]，显然在较少开发的农村环境下，保护性因素会起作用[1]。ALEX研究的结果证实，当传统农业和生活方式得到保护时，这种保护因素才会更加明显[12]。最近的研究[76,77]以及专门的PARSIFAL和GABRIEL横断面研究和PASTURE队列研究[7,13,66,67]，都证实了农业环境的独特作用。关于农业环境与过敏性疾病之间关系的研究，直到2010年在 von Mutius和Vercelli的综述中才出现[70]。农民和非农民之间的生活方式可能存在差异，如孕产妇吸烟史、母乳喂养的持续时间和其他饮食习惯、日托、是否养宠物、家庭规模、家长受教育水平和家族过敏史，在所有混杂因素都排除后进行统计分析，发现这种差异不足以解释这种保护性“农业效应”[70]。通过对比各种研究，一致认为儿童过敏发生的独立保护因素包括：①留在谷仓和马厩，以及动物暴露；②饮用未经杀菌的牛奶。母亲怀孕期间暴露或儿童生活早期暴露都有可能起到保护作用(图1)。

3.2. 谷仓/牛棚环境及动物暴露的作用

在以乳制品生产为主且农业没有工业化的欧洲地区，即在阿尔卑斯山和Jura山山腰奶酪生产区，人们已

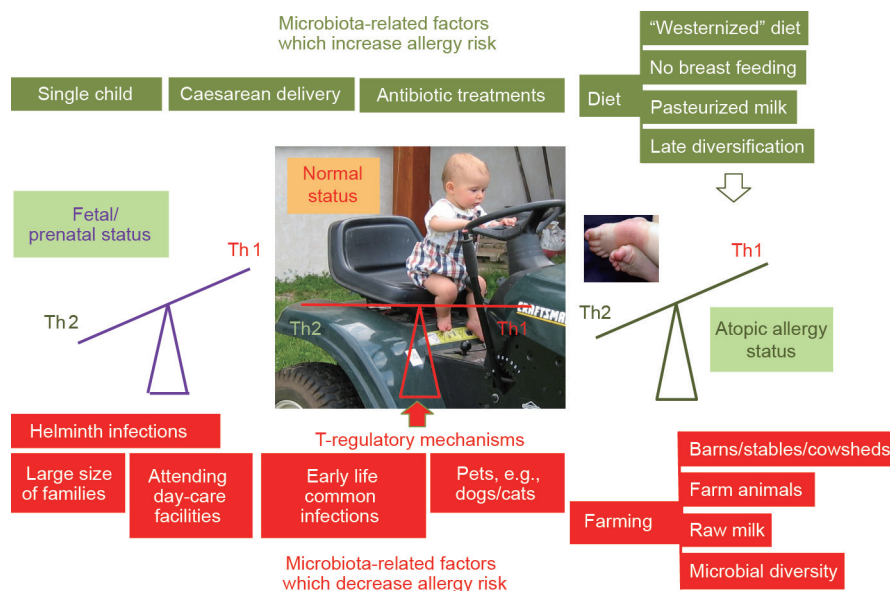


图1.可能增加或降低儿童过敏性疾病的发生风险的微生态相关因素。免疫平衡的原理被自动简化。T细胞调节机制包括：通过先天性免疫，特别是通过Toll样受体(TLR)、树突细胞和相关细胞因子(IL-12、TNF- α 等)的干预来塑造适应性免疫；Th2细胞和细胞因子(IL-4、IL-5、IL-13)的抑制；以及诱导不同调节性T细胞群和调节细胞因子[IL-10、肿瘤生长因子(TGF)- β 等]。

经开展了广泛的研究,旨在解释这种来自于农业的预防过敏的因素,如ALEX、GABRIEL高级调查和PASTURE[78,79]。研究者仔细记录农业活动各方面以及农场及其环境的特征,并在马厩、谷仓和家中包括室内灰尘以及母亲和婴儿/儿童床上的床垫灰尘中收集特定的环境样品(内毒素、过敏原、革兰阳性菌和革兰阴性菌、霉菌和真菌)。人们还进行了特定的嵌套研究,以根据农场的建筑和地理特征以及农业活动更好地识别农场的微生物环境,并且确定农场牛奶的微生物和化学组成[7,14,80]。

与农业生活方式相关的暴露包括在谷仓和(或)马厩中的逗留时间,以及与农场动物(主要是牛、猪和家禽)接触的时间(偶尔会接触猫和狗)[54]。ALEX研究中,1岁以下儿童暴露于马厩,与1~5岁儿童相比,哮喘发生率(1%对11%)、过敏性鼻炎发生率(3%对13%)和特异性致敏发生率(12%对29%)较低;这种对哮喘的保护作用独立于特异性致敏的保护作用[12]。在同一研究中,狗接触与哮喘和过敏性疾病之间的反比关系可通过同时暴露于特定动物来解释或仅限于农场的儿童[81]。母亲在怀孕期间暴露于谷仓和马厩和(或)农场动物也被证明有至关重要的作用[82]。在德国的另一项研究中,与拥有兼职农业活动的家庭相比,家庭全职经营一个农场的儿童的患病风险下降更明显[69]。在GABRIEL高级调查第二阶段8419名儿童的分层随机抽样样本中,与非农场儿童相比,生活在农场里的儿童患哮喘、过敏性鼻炎、特应性皮炎和特异性致敏的风险显著降低;整体的“农场效应”可通过特定暴露于奶牛和接触秸秆的哮喘,及暴露于饲料储存室和粪便的特应性皮炎来解释[83]。

妊娠期到1岁是婴儿各类过敏性疾病的患病窗口期,然而,在5岁之前连续长期暴露于畜舍环境当中的儿童的哮喘、过敏性鼻炎、特异性致敏的患病率最低[11]。另外也有研究表明长期微生物暴露也可能对人体健康有益,一个对超过2500个家庭进行的横断面研究显示,与仅在儿童时期的微生物暴露或者成年后的微生物暴露相比,在儿童和成年时期都接受微生物暴露的组合与气短、哮喘、哮喘药物的使用存在很强的负相关。而且上述症状发生的概率与儿童和成年时期接受微生物暴露的时间呈负相关[84]。美国最近的一项研究也表明,在成年人中仍然可以观察到母亲和婴幼儿早期微生物暴露对其健康的影响[85]。

PASTURE及其相关的研究结果提出了全新的观

点,即母亲妊娠期间暴露于农场环境后会影响到其过敏状态及其后代过敏性疾病的遗传易感性[33],这与调节性T细胞(Treg细胞)的免疫状态受损有关[86]。有研究发现新生儿脐带血中IgE抗体水平和季节性过敏原水平与母亲妊娠期暴露于农场环境呈负相关[66],而脐带血中Th1细胞因子(过敏的保护性免疫因子)水平与母亲接触各种动物有直接关系[67]。母亲妊娠期暴露于农场环境可以上调新生儿脐带血中Treg细胞的数量及功能,这与淋巴细胞增殖及下调Th2细胞因子分泌有关。母亲暴露于农场环境与新生儿脐带血中的Th17细胞相关转录因子表达水平和FOXP3 mRNA(Treg细胞亚群的标记)表达水平之间呈正相关[87]。从4.5岁到6岁,Treg细胞数量、FOXP3 mRNA以及Th1/Th2/Th17相关标志物的mRNA表达水平降低,这可能与暴露于农场环境的频率降低、环境中微生物的内毒素(LPS)刺激减少有关[88]。

研究发现儿童时期暴露于环境当中的内毒素水平在过敏性疾病的发生发展过程中起到重要保护作用[89]。在ALEX研究中发现,与居住在非农场环境的家庭相比,居住于农场的家庭的厨房地板及儿童床垫粉尘中的内毒素浓度更高,其中畜舍中内毒素浓度最高。经常接触农场动物的儿童家庭中床垫和厨房地板粉尘中的内毒素水平也显著升高[5,80,90]。而其他研究结果表明,暴露于包括各种细菌、放线菌、霉菌及其他真菌在内的环境微生物的多样性,比暴露于单一的细菌组分或农场微生物数量的多少更重要[70,89]。

有研究指出接触干草、麦秆、饲料及青贮饲料也是过敏性疾病的保护性因素。PARSIFAL研究结果表明,儿童帮助父母割干草作为与农场环境相关的唯一变量,与其当前的临床症状和医生诊断其为特应性皮炎的诊断呈负相关[91]。PARSIFAL项目当中的一项巢式研究表明,冬季谷仓和畜舍内的花粉水平明显高于夏季,并且远远超过了花粉季节室外的花粉水平[78],因此表明儿童在免疫系统发育成熟的过程中吸入大量的花粉有助于建立免疫耐受。真菌、放线菌以及青贮饲料当中的细菌是微生物暴露的重要组成部分,它们共同参与了“农场效应”[92]。微生物从谷仓、畜舍等传播到住宅,从而增加了微生物的暴露水平[79]。

儿童暴露于农场环境的保护效应不只限于奶牛养殖场或欧洲农场;一些研究还显示,儿童在1岁之前生活在作物种植家庭与哮喘保护作用之间呈正相关。在中国广东进行的一项研究显示,室内粉尘中的内毒素水平与预防哮喘相关[93]。然而,目前支持“农场效应”的生

物及非生物保护因素的相关证据仍较少。

3.3. 摄入生牛奶与过敏性疾病的关系

欧洲大陆、英国、希腊克里特岛和新西兰的流行病学研究表明,在母亲妊娠期间及婴幼儿1岁之前摄入生牛奶对过敏性疾病具有保护效应[72,94,95]。ALEX研究表明,母亲妊娠期间及婴幼儿1岁之前摄入生牛奶可以降低哮喘(0.8% vs.11.8%)、过敏性鼻炎(0.8% vs.16.0%)和特异性致敏(8.2% vs.32.9%)的患病率。摄入生牛奶对过敏的保护效应是独立的且与暴露于谷仓、畜舍或农场动物等因素具有协同效应,并且在调整了潜在的混杂因素后仍然具有显著的保护效应。PARSIFAL和GABRIEL研究对环境和饮食对机体的影响进行了详细分析,结果表明,摄入生牛奶对过敏性疾病具有特异且独立的保护效应[96,97]。在以前的研究中已经发现摄入生牛奶的保护效应与家族过敏史无关,而且对非农场环境成长的儿童仍然有效[96,98,99]。在PASTURE研究当中,脐带血中Th1细胞因子水平升高也与母亲妊娠期间的生牛奶摄入独立相关,而且与生牛奶摄入量之间具有累加效应[67]。研究发现脐带血中的Treg数量也与母亲在妊娠期间生牛奶摄入相关;母亲妊娠期间摄入生牛奶的后代当中FOXP3去甲基化水平增加,提示机体通过表观遗传学修饰调节了Treg细胞介导的免疫耐受[100]。除此之外,儿童在4.5岁之前生牛奶的摄入与Treg细胞数量的增加和FOXP3去甲基化水平的升高独立相关[87]。临床研究显示,与摄入巴氏灭菌牛奶相比,儿童在6岁以前摄入生牛奶可以降低哮喘风险[101]。

如上所述,来自革兰阴性菌的内毒素是保护过敏性疾病的首选;而在PASTURE研究中从农业家庭收集的牛奶的内毒素水平并不高于非农业家庭[102]。近期的研究表明,来自霉菌和革兰阳性菌的 β -(1 \rightarrow 3)-葡聚糖、胞外多糖和胞壁酸可以降低农村和城市人群过敏和哮喘的发病风险[94]。实验研究还证实,畜舍当中粉尘提取物的抗过敏生物活性不单是由内毒素介导的[103]。一般而言,微生物暴露的多样性,包括真菌和细菌,与降低农场儿童过敏风险相关[104]。这里的生物多样性主要是指生牛奶和生牛奶相关产品中存在的微生物的多样性[105]。包括犁头霉属(*Absidia* spp.)、欧洲霉属(*Eurotium* spp.)、枝孢属(*Cladosporium* spp.)、青霉属(*Penicillium* spp.)在内的多种真菌以及嗜温放线菌,不仅可能从畜舍和谷仓转移到住宅,而且还可能存在于牛奶之中[79,92]。虽然GABRIEL研究在生牛奶中发现了多种微生物,但是嗜冷菌、农场牛奶中的总活菌数或细菌

亚群与哮喘没有显著相关[97]。该研究表明,非活菌组分可能参与免疫调节效应,非细菌微生物及非微生物组分也可能参与其中。巴氏灭菌牛奶和生牛奶当中存在不同的非微生物组分,非微生物组分可以作为天然的“益生元”在过敏性疾病的发展过程中调节免疫应答,这些非微生物组分是目前的研究热点。

在PASTURE研究中观察到6岁儿童摄入的生牛奶中含有更高水平的 ω -3多不饱和脂肪酸,可能是降低其患哮喘的风险的部分原因[101]。而通过给予小鼠富含共轭亚油酸的饲料后,尽管共轭亚油酸水平在血浆和红细胞膜中升高,但是这种饮食既没有改善卵清蛋白致敏小鼠的过敏性气道炎症,也没有影响到小鼠支气管肺泡灌洗液中的类花生酸通路水平[106]。另外,血清当中乳清蛋白、牛血清白蛋白、 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白增加的水平与哮喘呈负相关,但与遗传性过敏性疾病无相关性[97]。另外维生素D也可能参与其中,PASTURE研究表明,在妊娠期间母体补充维生素D增加了与诱导免疫耐受相关的ILT3和ILT4的表达水平[107]。目前生牛奶奶酪是否具有类似效应尚未得到验证。然而,生牛奶奶酪中的微生物菌群的多样性以及奶酪加工过程中微生物组分含量的变化可能是生牛奶奶酪可以在维持良好的免疫平衡方面发挥作用的原因[105]。无论生牛奶中的何种成分可能与其保护作用有关,它们的作用机制都尚待进一步研究。

4. 微生态与过敏性疾病

4.1. 肠道菌群诱导免疫耐受

早在20世纪70年代,随着无菌小鼠和悉生小鼠动物模型的发展,免疫学家通过对无菌动物进行粪菌移植实现肠道黏膜免疫重建的研究,发现肠道菌群[108,109]在诱导肠道相关淋巴组织的免疫应答以及调节对微生物和外源性蛋白质的免疫反应中发挥了重要作用[110–113]。在经历了近30年的瓶颈期后,由于21世纪基因组技术在微生态研究领域的迅猛发展,微生物组作为机体“宏基因组”的重要作用被研究人员揭示。研究发现肠道菌群不但参与了免疫反应,而且通过调节代谢和机体相互作用来建立和维持机体自稳态。随着基于16S rRNA高通量测序技术的高速发展,研究人员规避了需要用传统微生物培养方法来研究微生物的局限性及偏差。人肠道中至少存在100万亿个微生物,主要包括了拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteo-

bacteria)和疣微菌门(Verrucomicrobia)等五个门的细菌,肠道微生态与机体存在共生关系和协同进化关系,可以促进宿主免疫系统的发育及调节机体免疫系统平衡。近年来越来越多的研究表明肠道微生态与健康 and 疾病之间有密切的关系[10,58,59,114]。

在免疫系统的发育过程中,微生物群的参与早已为人所知,并且长期以来人们一直猜疑它是否在免疫耐受方面起作用[111,113]。微生物信号对肠道孤立淋巴滤泡的发生和发展,以及对通过上皮细胞成熟和血管再生建立肠道屏障起着决定性的作用;这些过程包含多种模式识别受体(PRRS),这些受体能够检测微生物相关分子模式(MAMPS),包括Toll样受体、NOD样受体和RIG样受体[115]。控制机体与病原体首次接触的因素也包括黏膜层与抗菌肽,这两者都由微生态严格调控着;微生物群来源产物与PRRS的结合引起多种抗微生物多肽的表达,这些多肽能够防止细菌通过宿主组织空隙迁移。这些多肽包括RegIII γ lectin,它在无菌小鼠出生或者在微生物定植后表达,并且对革兰阳性菌有杀菌作用。以及 α -防御素和隐窝素,它们由潘氏细胞在PRR NOD2的调控下产生。

微生物群可以调控宿主对摄入微生物/抗原的耐受性,这个方法和微生物群通过肠道固有下层间隔来源的树突细胞调控腔内容物抗原样本有关。最近的报告显示,肠道微生态可以直接促进固有层常驻CX3CR1巨噬细胞的浸润,其与局部Treg细胞的浸润有关;然而,微生态对M细胞的影响还需要进一步的研究,该细胞对抗原转移和黏膜抗原呈递细胞功能特异[118]。微生态对分泌型IgA(sIgA)的发育和抗原表位识别也是至关重要的,sIgA是由肠道相关淋巴样组织(GALT)中B细胞产生的免疫球蛋白的主要类型,在肠腔分泌并穿过黏膜上皮。sIgA涉及在黏膜层捕获细菌和机体非必需氨基酸,这样就能防止变应原的系统性吸收和特异性致敏。sIgA在其与肠道上皮细胞基底膜上的多聚免疫球蛋白受体(PIgR)结合之前,还可以通过阻止变应原接近结合在黏膜肥大细胞上的特异性IgE,从而预防食物过敏[119]。

肠道黏膜是哺乳动物与环境微生物、威胁生命的非生物组分接触的第一道防线[120]。为了防止对其他无害外来成分(如膳食和其他环境蛋白质)产生有害反应,微生态通过严格调节细胞因子的合成来控制由T细胞调控的炎症和调节应答之间的微妙平衡。无菌小鼠体内微生物群缺乏、基础细胞因子广泛缺失,使得CD4⁺T细胞群的分化簇减少,这将不成比例地影响Th1和Th17细胞。无菌小鼠肠道复杂微生物群的定植使得Th1、Th17和Treg细胞恢复

广谱的应答[121,122]。口腔耐受的存在已经被人所知数十年了;然而,得益于对Treg细胞和细胞因子更好地理解,它的机制和对肠道微生物的依赖最近才被部分阐释[123]。事实上,耐受诱导是肠道的默认免疫途径。耐受诱导的类型与饲喂的抗原剂量有关——无反应性/缺失抗原对应高剂量,Treg细胞诱导对应低剂量。用细菌LPS饲喂无菌小鼠可以有效地恢复口腔耐受的进程[109];此外,微生物群的存在与抗原喂养后IgE和Th2应答的抑制相关[22]。然而,口服耐受现象中内毒素及其与TLR4的相互作用,以及微生物来源信号靶点的精确分子机制,仍然没有被完全理解[110]。内毒素实验中一些无法解释的差异和早期儿童过敏发展中内毒素产生的不明确作用是相一致的[89]。肠道上皮细胞和肠道微生物对肠道树突状细胞的调节诱导产生CD103⁺维甲酸依赖树突状细胞,反过来该细胞诱导Treg细胞及其在黏膜表面的各种细胞因子的分泌。在口服耐受中发现Th3型Treg细胞是肿瘤坏死因子(TNF)- β 依赖性的,并在其表面表达LAP。1型Treg细胞(Tr1)由鼻部抗原诱导,并且是IL-10依赖性的;此外,FOXP3⁺-诱导的Treg通过口服抗原和口服芳基羟受体配体诱导[123]。维甲酸现在似乎是Treg系统的主要调节剂。然而,控制维甲酸代谢涉及的酶的活化以及微生物群或者病原微生物修饰维甲酸代谢的过程的精确因素还很难理解。通过TLR2与微生物产物相互作用可以促进维甲酸的代谢;维甲酸缺失导致微生物群显著的改变进一步支持了微生物群和维甲酸代谢之间存在相互调节作用这一假设[124,125]。

4.2. 肠道微生态和过敏的发生/预防

得益于肠道微生态的免疫学作用,过敏性/特应性疾病相关的免疫反应类型,以及先天性免疫(尤其是TLR)、Treg细胞和细胞因子相关的调节机制参与预防特应性致敏和反应,强调产前和产后环境影响可能由肠道微生态改变来调节。存在于其他部位(针对过敏性疾病临床表现)的微生态,比如上呼吸道、肺或者皮肤微生态,也可以发挥很重要的作用[24,126]。如上所述,进行流行病学研究需非常谨慎以排除偏移和混杂因素,但仍有几个研究强调了在农场环境和(或)乳业养殖生活方式中存在着几种保护性因素的叠加或者协同效应,这包括了针对农场动物、原奶和(或)原奶产品的农场特应性暴露与下述因素的结合,如分娩方式、同胞数、母亲和儿童感染史、抗生素治疗、暴露于宠物或者室内变应原(包括住处的尘螨和谷仓中的花粉)以及食物成分[比如母乳喂养、早期食物多样化和发酵食品的定期摄入(图1)][54,81,127,128]。

很明显, 这些因素无论单独还是一起都可能会影响肠道微生物的构成[129,130]。在自然分娩中, 产道是婴儿与微生物群第一次接触的部位, 这些微生物群将定植于新生儿肠道以确保其具有免疫功能[131]。由于抗生物可能会显著减少任何部位的总微生物群, 并且可能会持久地改变肠道微生物群组成的比例, 在母亲怀孕期间和新生儿时期, 特别是住院早产儿, 使用抗生素治疗会改变肠道微生物生态并以某种方式阻止免疫耐受的建立[134]。微生物的组成从新生儿到成年发生了显著的改变, 并且变得依赖于吸入或者摄入的环境微生物组分以及非微生物饮食组分, 这些可能影响微生物群基因的种类[58,59,114,118]。在PASTURE研究中观察到, 除了原奶摄入的影响外, 在出生后第一年补充多样性辅食可以降低其后发生特应性皮炎的风险, 而且出生后第一年摄入牛奶也可以降低特应性皮炎的风险。遗憾的是, 这些儿童的肠道菌群组成没有报道[135]。

在高通量DNA测序技术出现之前, 使用粪便培养和(或)特定微生物代谢组的研究显示, 过敏性疾病患病率不同的国家的儿童的肠道微生物群存在差异[136]。并且差异也存在于发生过敏的儿童、没有发生过敏的儿童和两种情况都有的儿童之间[141]。造成差异的原因有: 儿童不同的饮食, 尤其是很多传统食物(包括原奶和发酵乳、奶酪和其他发酵食品)的摄入; 暴露于内毒素; 在大家庭中生活; 非过敏儿童更少地使用抗生素; 和(或)在低风险国家的儿童和(或)其母亲很少使用抗生素[138,142-144]。这些研究强调了微生物组成多样性的重要性, 并且该重要性会随着时间改变。一项研究将1周龄、1月龄和12个月龄的IgE相关过敏儿童或者直到2岁都没有过敏临床表现的儿童的粪便样品进行16S rDNA焦磷酸测序, 也证实了上述结果[145]。在哮喘儿童中也进行了相似的研究; 然而, 在有过敏儿童之间, 细菌门和属的相对丰度没有显著差异[146]。同一团队的另一研究发现, 婴儿期肠道微生物多样性的减少和特应性致敏、过敏性鼻炎和外周血嗜酸性粒细胞增多的风险增加有关, 但在儿童6岁前, 与哮喘或特应性皮炎无相关性[147]。在一项国际性合作研究中, 在斯坦纳学校(以人智学的理念为基础运作)的儿童粪便中的微生物多样性显著高于农场儿童, 而农场儿童的多样性高于对照组[148]。在样品组中发现乳酸菌(LAB)亚群存在着巨大的差异; 在一些儿童中, LAB亚群以尚未被培养出的物种为主。暴露的多样性, 而不是摄入或者吸入的总微生物量, 对适当塑造微生物群来说是必要的, 在这方面, 农业环境暴露代表了生物多样性形成的一个模式[22,104,149]。

4.3. 理解微生态与过敏免疫决定因素之间交互作用的免疫机制

尽管有很多关联农场环境和微生态的理论依据, 以及来自设计严谨的流行病学调查和免疫学研究的可信成果, 但是很显然, 在各种研究中使用不同的技术方法和研究设计, 是目前阻止我们发现“好的”微生物群以保护婴儿或者儿童、预防过敏性疾病的进一步进展的原因。此外, 过敏性倾向与微生态之间更多地是交互联系作用, 而不是可以证明的因果关系, 关于介导暴露事件顺序的分子机制、微生物群的组成改变及其免疫结果, 我们所知甚少。

第一组证据来自经常观察到的TLR的定性或定量变化和通过农业环境暴露保护儿童先天性免疫相关受体, 以及微生态与先天性免疫之间的密切联系。ALEX研究首先指出了农场环境与先天性免疫受体(特别是TLR2、TLR4和CD14)的定量(表达水平)和定性(多态性)之间的关系[150,151]。2006年的一项关于半胱天冬酶激活和募集域4(CARD4)/NOD1的研究结果表明, 农场环境对过敏有着强大的保护作用, 但只存在于拥有*CARD4*/-21596 T等位基因纯合的儿童, 携带次要等位基因(C)的儿童则没有。在前者中, 生活在农场环境中的孩子对花粉的敏感性、发生过敏性鼻炎和特应性哮喘的概率要显著低于生活在非农场环境中的儿童[152]。相反, 在*CARD4*/-21596中具有等位基因C的孩子中, 没有发现不同环境暴露状态所致的这些表型的流行病学差异。过敏敏感性和*TLR2*、*TLR4*以及*CD14*基因的表达由母亲怀孕期间的暴露决定, 而当前的暴露作用很少或者基本没有作用。在这些基因上调程度和PARSIFAL招募的母亲在怀孕期间遇到的不同农业环境动物的数量之间发现了剂量-反应关系[153]。携带*CD14*/-1721 A等位基因的儿童在过敏性疾病中牛奶摄入的保护作用要强于G等位基因纯合子[154]。在PASTURE的研究中, 脐带血中先天性免疫受体的表达在农村的新生儿中较高, *TLR7*和*TLR8*的差异尤其显著, 出生后第一年非煮沸牛奶的摄入与*TLR4*、*TLR5*和*TLR6* mRNA表达有着强相关性。然而, 并没有发现之前描述的通过单核酸多态性*CD14*/C-1721T的*CD14*基因表达与农场牛奶摄入之间有关联修饰[155]。母亲怀孕期间接触三个或更多农场动物物种的儿童发生特应性皮炎的风险要降低超过一半, 并且*TLR5*和*TLR9*在脐带血中表达升高和特应性皮炎医生诊断的减少有关。此外, 特应性皮炎观察到*TLR2*多态性和产前猫接触有显著关系[135,156]。最后, 参与PASTURE研究队列的母亲母乳中的sIgA水平与微生物载量相关的环境因素有关, 如它们与母亲怀孕期间的农场动物或者猫接触

有关,但是与原奶的摄入无关。此外,sIgA水平与直至2岁儿童的特应性皮炎呈负相关[157]。总而言之,这些研究结果强烈提示农场环境暴露(包括动物暴露和原奶摄入)与早年个体先天性或者sIgA免疫应答之间有着微妙的相互作用,而肠道微生态被认为起着核心作用[158,159]。

第二组证据来自早期建立的免疫调节机制,包括树突状细胞、Treg细胞和调节性细胞因子,以及暴露于农场环境儿童的Th1反应[8]。大部分免疫研究观察到的结果已经在前文有所叙述[56,86–88,100]。PASTURE中芬兰人群的流行病学调查证实了另一研究结果,在农场环境生活儿童的未激活单核细胞与非农场生活儿童相比,产生更多的IL-10、IL-12和IFN- γ ,并且特定的农场环境暴露与较多的细胞因子自发性产生相关[160]。特定农场环境暴露的数量倾向于和更高的IFN- γ 自发性产生、更低的LPS诱导TNF产生呈剂量依赖性相关。来自同一儿童亚组的观察结果表明,先天性与获得性免疫之间存在联系,通过鉴定农场与非农场环境生活的儿童的树突状细胞所得以上结论。在4.5岁时,哮喘与体外骨髓树突状细胞(mDC)CD86表达呈正相关,与LPS刺激后的mDC的IL-6产物呈负相关。LPS刺激导致来自农场环境生活儿童细胞培养物中mDC的百分比以具有免疫学效应[161]。同一批儿童在6岁时,BDCA3⁺高2型mDC(mDC2)的百分比在农场环境生活儿童中较低;mDC2百分比与产前和终生农场牛奶、马厩暴露有类似的关联,虽然这些关联在农场环境中并非独立存在[162]。在PASTURE研究中获得的结果也提示了饮食的互补和独立效应:在出生后第一年,辅食多样性增加与剂量-反应效应的哮喘呈负相关,并且在食物过敏食物致敏中观察到类似的结果。此外,食物多样性的增加和FOXP3表达增加与Ce种系转录物(编码LgE的重链)表达降低呈显著相关[163]。已经进行了共生细菌[如产气荚膜梭菌(*C. perfringens*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、鼠李糖乳杆菌、大肠杆菌(*E. coli*)和脆弱类杆菌]干预新生儿脐带血单核细胞与树突状细胞的能力的体外实验。革兰阳性菌如产气荚膜梭菌和金黄色葡萄球菌诱导了可溶性CD14(Scd14)从单核细胞的释放,而革兰阴性菌则不能。然而,革兰阳性菌和革兰阴性菌均诱导树突细胞sCDS的释放。反过来,sCD14和sCD83通过抑制IL-13的产生来抑制桦树花粉过敏原诱导的Th2的分化[159]。另一项使用青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)、粪球肠菌(*Enterococcus faecalis*)、植物乳杆菌(*L. plantarum*)、缓症链球菌(*Streptococcus*

mitis)、极小棒杆菌(*Corynebacterium minutissimum*)、产气荚膜梭菌、普通拟杆菌(*Bacteroides vulgatus*)、大肠杆菌、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、极小韦永氏球菌(*Veillonella parvula*)和干燥奈瑟菌(*Neisseria sicca*)的体外实验表明,不同的菌株对婴儿免疫系统的成熟产生不同的影响[158]。在脐带细胞和成人细胞中,革兰阳性菌产生的IL-12和TNF α 比革兰阴性菌产生的水平高,但是脐带细胞中革兰阴性菌产生的IL-6和IL-10水平与革兰阳性菌相似。植物乳杆菌通过CD14、TLR2和TLR4信号传导,而大肠杆菌主要通过CD14和TLR4传导[158]。已知的早期诱导和维持调节机制受肠道微生态强烈影响,提示在农场环境中肠道微生态的干预对免疫系统成熟具有促进作用。

5. 微生物工程在过敏性疾病的预防及治疗中的应用

5.1. 寻找“农业替代品”: 益生菌的应用

应用对宿主起有益作用的益生菌制剂调节肠道菌群的生态平衡,是目前孕期及婴幼儿出生以后第一个月预防过敏性疾病发生的主要措施。2001年Kalliomäki等[164]在研究发现过敏与非过敏儿童的肠道菌群组成不同之后进行了一项运用益生菌LGG对妊娠母亲和过敏风险高的婴幼儿进行干预的前瞻性双盲随机试验[140]。本文的目的并不是要对40多个益生菌临床试验进行详细论述,并且Forsberg等[20]、Zuccotti等[165]、Cuello-Garcia等[166]、Zhang等[167]的综述及Meta分析已经对益生菌临床试验的细节有过详细描述。各种乳杆菌或乳杆菌与双歧杆菌联合使用的结果表明,其对呼吸道过敏性疾病没有显著的保护作用;然而与安慰剂对照组相比,益生菌可以显著降低特应性皮炎的相对风险,当益生菌联合使用或者围产期联合干预时这种保护效应最为显著[20]。世界过敏组织(WAO)-麦克马斯特大学过敏性疾病防治指南也参考了这个结论——使用益生菌干预可能对于湿疹的预防有一定的益处[19];然而该指南也指出,这些指南推荐都是有条件的,并且证据质量和证据级别都比较低。因为证据级别非常低,考克兰协作组并不推荐使用益生菌预防过敏性疾病[168]。

益生菌能够选择性地刺激肠道菌群的活性或生长繁殖,从而增进宿主健康,但其临床应用价值比较有限。七项关于低聚半乳糖和低聚果糖的元分析结果并不一致,因此不作任何推荐[20]。

5.2. “农场药物”或“农场疫苗”的研发

在过去10年中,受到流行病学研究的启发,研究人员已经对从农场粉尘当中提取的可用于预防过敏的微生物及其组分进行了大量的实验研究。为了进一步探讨其作用机制,气道过敏小鼠模型已用于研究这些微生物及其组分的抗过敏性质。卵清蛋白致敏的小鼠吸入粉尘提取物之后,可以抑制小鼠的气道高反应性和嗜酸性粒细胞增多,同时降低具有抗原特异的IgG-1、IgE及脾细胞分泌的IL-5的水平。体外实验证实其同样可以抑制人树突状细胞的生成[103]。长期暴露于牛棚粉尘提取物可以诱导树突状细胞分泌IL-10,从而降低其诱导过敏反应的能力[169]。牛棚粉尘中黄粉虫幼虫的中肠的丝氨酸蛋白酶可以诱导在呼吸道过敏性疾病中起调节作用的配体即补体因子C5a的释放[170]。

在所有的非细菌组分当中,阿拉伯半乳聚糖是一种从牛棚粉尘和植物中分离到的多糖,并且在饲料中尤其是在牧草狐尾草(*Alopecurus pratensis*)中含量特别丰富,该物质是通过色谱法和特定试剂沉淀分离得到后,再通过核磁共振光谱法进行分析鉴定的[171]。从牧草中提取的阿拉伯半乳聚糖对小鼠特异性致敏、过敏性气道炎症和气道高反应性具有保护作用。此外,用提取自牧草的阿拉伯半乳聚糖处理后可诱导鼠树突状细胞分泌IL-10,从而抑制其诱导过敏性免疫应答的能力。这种从牧草中提取的阿拉伯半乳聚糖对过敏的保护作用似乎具有一定的特异性;用从树脂中提取的阿拉伯半乳聚糖和从落叶松中提取的阿拉伯半乳聚糖进行对照实验发现它们对过敏并没有保护作用,利用核磁共振光谱发现它们与从牧草中提取的阿拉伯半乳聚糖的结构不同[171]。最近有研究表明口服来自益生菌的D-色氨酸具有抗过敏和免疫调节效应。补充D-色氨酸也增加了患气道过敏性疾病小鼠的肠细菌群的多样性[172]。但据我们所知,这些研究成果目前还没有应用于预防过敏性疾病。

从农场分离到的细菌中被广泛研究的细菌主要有鲁氏不动杆菌(*A. lwoffii*) F78、乳酸乳球菌(*L. lactis*) G121和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)。ALEX研究基于这些细菌在牛棚微生物中的相对丰度以及生活于农场环境的儿童血清中存在的特异性血清抗体,从来自农场的100多种不同的菌株中筛选出上述菌株[173]。研究表明地衣芽孢杆菌孢子可以减少哮喘小鼠肺组织中的嗜酸性粒细胞数量及杯状细胞增生,但可以引起中性粒细胞聚集,因此不太可能应用于临床治疗[174]。鲁氏不动杆菌F78和乳酸乳球菌G121能够降低小鼠的过敏反应,在

树突状细胞中可以诱导Th1细胞极化[175]。鲁氏不动杆菌F78可以诱导Th1/Th2细胞转录因子TBet/GATA3的表达,而且是由革兰阴性菌中的内毒素所诱导的[176]。由乳酸乳球菌G121介导的过敏保护效应依赖于树突状细胞中的内体酸化,乳酸乳球菌G121诱导小鼠单核细胞分泌细胞因子可能是通过活化TLR13信号通路介导的[177]。乳酸乳球菌细胞膜上的脂磷壁酸可能是其发挥抗过敏效应的主要成分,但其并不诱导TLR2和TLR4的表达[178]。母亲对后代抗过敏效应的遗传性同样被证实,TLR2/3/4/7/9敲除的纯合子母鼠经过鲁氏不动杆菌F78处理后,益生菌对哮喘的预防作用在其杂合子代小鼠体内完全丧失[179]。母亲摄入益生菌鲁氏不动杆菌F78后,可通过促进组蛋白(H4)乙酰化的表观遗传学机制来提高CD4⁺ T细胞的IFN- γ 表达水平,从而对其子代起到保护效应[180]。

在PARSIFAL研究中,松鼠葡萄球菌(*S. sciuri*) W620是使用了PCR-SSCP方法以及电泳技术从农场床垫收集的灰尘当中筛选出来的[173]。将具有特定条带的凝胶割胶回收并测序以鉴定细菌的种属,用PCR-SSCP方法证实了鲁氏不动杆菌与其抗过敏效应的相关性。该研究还证实了地衣芽孢杆菌属、乳杆菌属与儿童哮喘呈显著负相关[173]。在由Th2介导的卵清蛋白致敏小鼠模型和Th1、Th2共同介导的尘螨动物模型中证明了松鼠葡萄球菌W620对哮喘的保护效应。在尘螨动物模型中,淋巴细胞分泌Th1和Th2细胞因子的水平平行降低。松鼠葡萄球菌W620与树突状细胞共培养后,激活了TLR2和NOD2受体,启动树突状细胞分化成熟。尽管IL-12p53 mRNA转录的缺失导致IL-12的产量不足,但是暴露于松鼠葡萄球菌W620的树突状细胞仍可选择性地促进共培养的T细胞释放Th1细胞因子,并且这其中也有IL-23的贡献[181]。

从人体内实验和动物实验的结果得出人类的实际预防措施是一次令人振奋但困难的努力。根据上述临床前动物试验以及使用益生菌干预的人体临床试验所得到的症状缓解结果,我们可以从中获得一些值得探讨的要点。首先,显然从体外结果转到动物体内试验结果,再推测得到人类的临床结果是很困难的。其次,要考虑的是给药途径,这可能是如何将流行病学观察结果转化为人类治疗或预防措施的关键因素:为了更好地进行临床前动物模型研究和探索树突状细胞的保护作用,应该运用鼻内给药[173]。然而,农场粉尘来源的细菌对肠道微生态的影响及其鼻道途径还没有被研究。再次,要考虑细菌多样性对“农场环

境”的整体影响，以及每种物种或菌株通过多种受体和通路类型来发挥抗过敏效应：研究细菌的混合物和(或)它们的成分是非常吸引人的，测试它们的用途和研究其可能的相互作用的实验方法一直在发展[173]。然而，这项工作仍面临一些阻碍，包括如何以工业规模生产每种成分；分析工具的可能性与准确性，这些分析工具用来控制和确保最后混合物每个成分的质量和稳定性；以及因为不同的成分的相互作用和不同成分与不同细胞以级联方式产生相互作用，而增加副作用的风险。这种风险对于治疗严重疾病是可接受的，但其对于健康儿童的预防性治疗是不可接受的。此外，如果使用有机生命体，由于宿主的免疫抑制状态，非病原体试剂转变成对其有害病原体的风险还是存在的。这些阻碍的综合随即引起了工业和伦理方面的争议[173]。为了未来保护远离农场环境的儿童免受过敏性疾病的侵害，我们应该联合微生物学家、免疫学家、生物工程师、儿科医生、过敏症专家、临床试验专家以及伦理委员会的专长共同应对挑战。

致谢

衷心感谢参与欧洲PASTURE研究及其法国分支研究的所有医生、研究员和技术人员的不断奉献和支持，特别感谢Erika von Mutius的倾心帮助。

Compliance with ethics guidelines

The maintenance of the PASTURE cohort is funded by public agencies; for France, the research programs are the Program for Clinical Research in Hospitals (funded by the French Ministry of Health and Social Affairs) and the PRISMAL grant (funded by the French National Health Insurance for Agriculture Workers, MSA).

Dominique Angèle Vuitton and Jean-Charles Dalphin declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

- [1] von Mutius E. The rising trends in asthma and allergic disease. *Clin Exp Allergy* 1998;28(Suppl 5):45–9; discussion 50–1.
- [2] Williams H, Robertson C, Stewart A, Ait-Khaled N, Anabwani G, Anderson R, et al. Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103(1):125–38.
- [3] Strachan D, Sibbald B, Weiland S, Ait-Khaled N, Anabwani G, Anderson HR, et al. Worldwide variations in prevalence of symptoms of allergic rhinoconjunctivitis in children: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Pediatr Allergy Immunol* 1997;8(4):161–8.
- [4] Braun-Fahrlander C, Gassner M, Grize L, Neu U, Sennhauser FH, Varonier HS, et al. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. *Clin Exp Allergy* 1999;29(1):28–34.
- [5] Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002;347(12):869–77.
- [6] Vrijheid M, Casas M, Bergström A, Carmichael A, Corder S, Eggesbø M, et al. European birth cohorts for environmental health research. *Environ Health Perspect* 2012;120(1):29–37.
- [7] von Mutius E, Schmid S; the PASTURE Study Group. The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe. *Allergy* 2006;61(4):407–13.
- [8] Schaub B, Vercelli D. Environmental protection from allergic diseases: from humans to mice and back. *Curr Opin Immunol* 2015;36:88–93.
- [9] Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005;307(5717):1915–20.
- [10] Gao J, Wu H, Liu J. Importance of gut microbiota in health and diseases of new born infants. *Exp Ther Med* 2016;12(1):28–32.
- [11] Ring J, Akdis C, Behrendt H, Lauener RP, Schäppi G, Akdis M, et al. Davos declaration: allergy as a global problem. *Allergy* 2012;67(2):141–3. Erratum in: *Allergy* 2012;67(5):712.
- [12] Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, et al. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 2001;358(9288):1129–33.
- [13] Alfvén T, Braun-Fahrlander C, Brunekreef B, von Mutius E, Riedler J, Scheynius A, et al. Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle—the PARSIFAL study. *Allergy* 2006;61(4):414–21.
- [14] Genuneit J, Büchele G, Waser M, Kovacs K, Debinska A, Boznanski A, et al. The GABRIEL advanced surveys: study design, participation and evaluation of bias. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2011;25(5):436–47.
- [15] Wong GWK, Ko FWS, Hui DSC, Fok TF, Carr D, von Mutius E, et al. Factors associated with difference in prevalence of asthma in children from three cities in China: multicentre epidemiological survey. *BMJ* 2004;329(7464):486.
- [16] Schröder PC, Li J, Wong GWK, Schaub B. The rural-urban enigma of allergy: what can we learn from studies around the world? *Pediatr Allergy Immunol* 2015;26(2):95–102.
- [17] Wong GWK, von Mutius E, Douwes J, Pearce N. Environmental determinants associated with the development of asthma in childhood. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10(3):242–51.
- [18] Osborn DA, Sinn JKH. Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(4):CD006475.
- [19] Fiocchi A, Pawankar R, Cuello-García C, Ahn K, Al-Hammadi S, Agarwal A, et al. World allergy organization—McMaster University guidelines for allergic disease prevention (GLAD-P): probiotics. *World Allergy Organ J* 2015;8(1):4.
- [20] Forsberg A, West CE, Prescott SL, Jenmalm MC. Pre- and probiotics for allergy prevention: time to revisit recommendations? *Clin Exp Allergy* 2016;46(12):1506–21.
- [21] West CE. Probiotics for allergy prevention. *Benef Microbes* 2016;7(2):171–9.
- [22] Legatzki A, Rösler B, von Mutius E. Microbiome diversity and asthma and allergy risk. *Curr Allergy Asthma Rep* 2014;14(10):466.
- [23] Depner M, Ege MJ, Cox MJ, Dwyer S, Walker AW, Birzele LT, et al. Bacterial microbiota of the upper respiratory tract and childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. Epub 2016 Jul 27.
- [24] Cui L, Morris A, Huang L, Beck JM, Twigg HL III, von Mutius E, et al. The microbiome and the lung. *Ann Am Thorac Soc* 2014;11(Suppl 4):S227–32.
- [25] Kong HH, Oh J, Deming C, Conlan S, Grice EA, Beatson MA, et al. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Res* 2012;22(5):850–9.
- [26] Findley K, Oh J, Yang J, Conlan S, Deming C, Meyer JA, et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature* 2013;498(7454):367–70.
- [27] McGuiere MK, McGuiere MA. Got bacteria? The astounding, yet not-so-surprising, microbiome of human milk. *Curr Opin Biotechnol* 2017;44:63–8.
- [28] Coca A, Cooke RA. On the classification of the phenomena of hypersensitivity. *J Immunol Baltim Md* 1923;8(3):163–71.
- [29] Blumenthal MN, Amos DB. Genetic and immunologic basis of atopic responses. *Chest* 1987;91(6):1765–84S.
- [30] Cookson WO. Genetic aspects of atopic allergy. *Allergy* 1998;53(s45):9–14.
- [31] Dold S, Wjst M, von Mutius E, Reitmeir P, Stiepel E. Genetic risk for asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis. *Arch Dis Child* 1992;67(8):1018–22.
- [32] Edfors-Lubs ML. Allergy in 7000 twin pairs. *Acta Allergol* 1971;26(4):249–85.
- [33] Lluís A, Schedel M, Liu J, Illi S, Depner M, von Mutius E, et al. Asthma-associated polymorphisms in 17q21 influence cord blood *ORMDL3* and *GSDMA* gene expression and IL-17 secretion. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127(6):1587–94.e6.
- [34] Leung TF, Ko FWS, Sy HY, Tsui SKW, Wong GWK. Differences in asthma genetics between Chinese and other populations. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133(1):42–8.
- [35] Yu X, Yu C, Ren Z, Deng Y, Song J, Zhang H, et al. Genetic variants of 17q21 are associated with childhood-onset asthma and related phenotypes in a northeastern Han Chinese population: a case-control study. *Tissue Antigens* 2014;83(5):330–6.
- [36] Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N*

- Engl J Med 2010;363(13):1211–21.
- [37] Zhang Y, Moffatt MF, Cookson WOC. Genetic and genomic approaches to asthma: new insights for the origins. *Curr Opin Pulm Med* 2012;18(1):6–13.
- [38] Nakayama T, Hirahara K, Onodera A, Endo Y, Hosokawa H, Shinoda K, et al. Th2 cells in health and disease. *Annu Rev Immunol*. Epub 2016 Nov 28.
- [39] von Mutius E. Environmental factors influencing the development and progression of pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109(6):S525–32.
- [40] Scholtens S, Postma D, Moffatt M, Panasevich S, Granell R, Henderson A, et al. Novel childhood asthma genes interact with *in utero* and early-life tobacco smoke exposure. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133(3):885–8.
- [41] Estelle F, Simons R, editors. *Ancestors of allergy*. New York: Global Medical Communications; 1994.
- [42] Kabesch M, Schaal W, Nicolai T, von Mutius E. Lower prevalence of asthma and atopy in Turkish children living in Germany. *Eur Respir J* 1999;13(3):577–82.
- [43] Leung R. Asthma and migration. *Respirology* 1996;1(2):123–6.
- [44] Leung RC, Carlin JB, Burdon JG, Czarny D. Asthma, allergy and atopy in Asian immigrants in Melbourne. *Med J Aust* 1994;161(7):418–25.
- [45] Zhao T, Wang A, Chen Y, Xiao M, Duo L, Liu G, et al. Prevalence of childhood asthma, allergic rhinitis and eczema in Urumqi and Beijing. *J Paediatr Child Health* 2000;36(2):128–33.
- [46] von Mutius E. The environmental predictors of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105(1):9–19.
- [47] Greer FR, Sicherer SH, Burks AW; American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition, American Academy of Pediatrics Section on Allergy and Immunology. Effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and children: the role of maternal dietary restriction, breastfeeding, timing of introduction of complementary foods, and hydrolyzed formulas. *Pediatrics* 2008;121(1):183–91.
- [48] Dogaru CM, Nyffenegger D, Pescatore AM, Spycher BD, Kuehni CE. Breastfeeding and childhood asthma: systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2014;179(10):1153–67.
- [49] Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989;299(6710):1259–60.
- [50] Matricardi PM, Franzinelli F, Franco A, Caprio G, Murru F, Cioffi D, et al. Sibship size, birth order, and atopy in 11,371 Italian young men. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101(4):439–44.
- [51] von Mutius E, Martinez FD, Fritzsche C, Nicolai T, Reitmeir P, Thiemann HH. Skin test reactivity and number of siblings. *BMJ* 1994;308(6930):692–5.
- [52] Matricardi PM, Rosmini F, Ferrigno L, Nisini R, Rapicetta M, Chionne P, et al. Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis A virus. *BMJ* 1997;314(7086):999–1003.
- [53] Rosenlund H, Bergström A, Alm JS, Swartz J, Scheynius A, van Hage M, et al. Allergic disease and atopic sensitization in children in relation to measles vaccination and measles infection. *Pediatrics* 2009;123(3):771–8.
- [54] Radon K, Windstetter D, Eckart J, Dressel H, Leitritz L, Reichert J, et al. Farming exposure in childhood, exposure to markers of infections and the development of atopy in rural subjects. *Clin Exp Allergy* 2004;34(8):1178–83.
- [55] von Mutius E. Infection: friend or foe in the development of atopy and asthma? The epidemiological evidence. *Eur Respir J* 2001;18(5):872–81.
- [56] Schaub B, Lauener R, von Mutius E. The many faces of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(5):969–77.
- [57] Okada H, Kuhn C, Feillet H, Bach JF. The “hygiene hypothesis” for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol* 2010;160(1):1–9.
- [58] Logan AC, Jacka FN, Craig JM, Prescott SL. The microbiome and mental health: looking back, moving forward with lessons from allergic diseases. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 2016;14(2):131–47.
- [59] Prince BT, Mandel MJ, Nadeau K, Singh AM. Gut microbiome and the development of food allergy and allergic disease. *Pediatr Clin North Am* 2015;62(6):1479–92.
- [60] Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 2002;296(5567):490–4.
- [61] Yazdanbakhsh M, van den Biggelaar A, Maizels RM. Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Trends Immunol* 2001;22(7):372–7.
- [62] von Mutius E, Sherrill DL, Fritzsche C, Martinez FD, Lebowitz MD. Air pollution and upper respiratory symptoms in children from East Germany. *Eur Respir J* 1995;8(5):723–8.
- [63] von Mutius E, Weiland SK, Fritzsche C, Duhme H, Keil U. Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet* 1998;351(9106):862–6.
- [64] Vartiainen E, Petäys T, Hahtela T, Jousilahti P, Pekkanen J. Allergic diseases, skin prick test responses, and IgE levels in North Karelia, Finland, and the Republic of Karelia, Russia. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109(4):643–8.
- [65] Bråbäck L, Breborowicz A, Julge K, Knutsson A, Riiikjær MA, Vasar M, et al. Risk factors for respiratory symptoms and atopic sensitization in the Baltic area. *Arch Dis Child* 1995;72(6):487–93.
- [66] Ege MJ, Herzum I, Büchele G, Krauss-Etschmann S, Lauener RP, Roponen M, et al. Prenatal exposure to a farm environment modifies atopic sensitization at birth. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122(2):407–12.e4.
- [67] Pfefferle PI, Büchele G, Blüner N, Roponen M, Ege MJ, Krauss-Etschmann S, et al. Cord blood cytokines are modulated by maternal farming activities and consumption of farm dairy products during pregnancy: the PASTURE study. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(1):108–15.e3.
- [68] von Mutius E, Illi S, Nicolai T, Martinez FD. Relation of indoor heating with asthma, allergic sensitization, and bronchial responsiveness: survey of children in South Bavaria. *BMJ* 1996;312(7044):1448–50.
- [69] von Ehrenstein OS, von Mutius E, Illi S, Baumann L, Böhm O, von Kries R. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy* 2000;30(2):187–93.
- [70] von Mutius E, Vercelli D. Farm living: effects on childhood asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* 2010;10(12):861–8.
- [71] von Mutius E. [A traditional farming environment—a prophylactic factor against allergies]. *Dtsch Med Wochenschr* 2000;125(31–32):923. German.
- [72] Vuitton DA, Dalphin JC. Hygiene and allergy: are farm microorganisms protective? *J Mycol Med* 2006;16(4):220–38.
- [73] Braun-Fahrlander CH. Allergic diseases in farmers' children. *Pediatr Allergy Immunol* 2000;11(Suppl 13):19–22.
- [74] Kipelaäinen M, Terho EO, Helenius H, Koskenvuo M. Farm environment in childhood prevents the development of allergies. *Clin Exp Allergy* 2000;30(2):201–8.
- [75] Braun-Fahrlander C. The role of the farm environment and animal contact for the development of asthma and allergies. *Clin Exp Allergy* 2001;31(12):1799–803.
- [76] Campbell B, Raheison C, Lodge CJ, Lowe AJ, Gislason T, Heinrich J, et al. The effects of growing up on a farm on adult lung function and allergic phenotypes: an international population-based study. *Thorax*. Epub 2016 Sep 26.
- [77] Christensen SH, Timm S, Janson C, Benediktsdóttir B, Forsberg B, Holm M, et al. A clear urban-rural gradient of allergic rhinitis in a population-based study in Northern Europe. *Eur Clin Respir J* 2016;3(1):33463.
- [78] Sudre B, Vacheyrou M, Braun-Fahrlander C, Normand AC, Waser M, Reboux G, et al. High levels of grass pollen inside European dairy farms: a role for the allergy-protective effects of environment? *Allergy* 2009;64(7):1068–73.
- [79] Normand AC, Sudre B, Vacheyrou M, Depner M, Wouters IM, Noss I, et al. Airborne cultivable microflora and microbial transfer in farm buildings and rural dwellings. *Occup Environ Med* 2011;68(11):849–55.
- [80] Waser M, Schierl R, von Mutius E, Maisch S, Carr D, Riedler J, et al. Determinants of endotoxin levels in living environments of farmers' children and their peers from rural areas. *Clin Exp Allergy* 2004;34(3):389–97.
- [81] Waser M, von Mutius E, Riedler J, Nowak D, Maisch S, Carr D, et al. Exposure to pets, and the association with hay fever, asthma, and atopic sensitization in rural children. *Allergy* 2005;60(2):177–84.
- [82] Douwes J, Cheng S, Travier N, Cohet C, Niesink A, McKenzie J, et al. Farm exposure *in utero* may protect against asthma, hay fever and eczema. *Eur Respir J* 2008;32(3):603–11.
- [83] Illi S, Depner M, Genuneit J, Horak E, Loss G, Strunz-Lehner C, et al. Protection from childhood asthma and allergy in Alpine farm environments—the GABRIEL advanced studies. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129(6):1470–7.e6.
- [84] Douwes J, Travier N, Huang K, Cheng S, McKenzie J, Le Gros G, et al. Lifelong farm exposure may strongly reduce the risk of asthma in adults. *Allergy* 2007;62(10):1158–65.
- [85] House JS, Wyss AB, Hoppin JA, Richards M, Long S, Umbach DM, et al. Early-life farm exposures and adult asthma and atopy in the Agricultural Lung Health Study. *J Allergy Clin Immunol*. Epub 2016 Nov 11.
- [86] Schaub B, Liu J, Höppler S, Haug S, Sattler C, Lluís A, et al. Impairment of T-regulatory cells in cord blood of atopic mothers. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121(6):1491–9.e13.
- [87] Lluís A, Ballenberger N, Illi S, Schieck M, Kabesch M, Illig T, et al. Regulation of T_H17 markers early in life through maternal farm exposure. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133(3):864–71.
- [88] Schröder PC, Illi S, Casaca VI, Lluís A, Böck A, Roduit C, et al. A switch in regulatory T cells through farm exposure during immune maturation in childhood. *Allergy*. Epub 2016 Nov 17.
- [89] Eder W, von Mutius E. Hygiene hypothesis and endotoxin: what is the evidence? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4(2):113–7.
- [90] von Mutius E, Braun-Fahrlander C, Schierl R, Riedler J, Ehlermann S, Maisch S, et al. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin Exp Allergy* 2000;30(9):1230–4.
- [91] Karadag B, Ege MJ, Scheynius A, Waser M, Schram-Bijkerk D, van Hage M, et al. Environmental determinants of atopic eczema phenotypes in relation to asthma and atopic sensitization. *Allergy* 2007;62(12):1387–93.
- [92] Roussel S, Sudre B, Reboux G, Waser M, Buchele G, Vacheyrou M, et al. Exposure to moulds and actinomycetes in Alpine farms: a nested environmental study of the PASTURE cohort. *Environ Res* 2011;111(6):744–50.
- [93] Feng M, Yang Z, Pan L, Lai X, Xian M, Huang X, et al. Associations of early life exposures and environmental factors with asthma among children in rural and urban areas of Guangdong, China. *Chest* 2016;149(4):1030–41.
- [94] von Mutius E. Maternal farm exposure/ingestion of unpasteurized cow's milk and allergic disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2012;28(6):570–6.
- [95] Braun-Fahrlander C, von Mutius E. Can farm milk consumption prevent allergic diseases? *Clin Exp Allergy* 2011;41(1):29–35.
- [96] Waser M, Michels KB, Bieli C, Flöistrup H, Pershagen G, von Mutius E, et al. Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe. *Clin Exp Allergy* 2007;37(5):661–70.
- [97] Loss G, Apprich S, Waser M, Kneifel W, Genuneit J, Büchele G, et al. The protective effect of farm milk consumption on childhood asthma and atopy: the GABRIELA study. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128(4):766–73.e4.
- [98] Barnes M, Cullinan P, Athanasaki P, MacNeill S, Hole AM, Harris J, et al. Crete:

- does farming explain urban and rural differences in atopy? *Clin Exp Allergy* 2001;31(12):1822–8.
- [99] Wickens K, Lane JM, Fitzharris P, Siebers R, Riley G, Douwes J, et al. Farm residence and exposures and the risk of allergic diseases in New Zealand children. *Allergy* 2002;57(12):1171–9.
- [100] Schaub B, Liu J, Höppler S, Schleich I, Huehn J, Olek S, et al. Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123(4):774–82.e5.
- [101] Brick T, Schober Y, Böcking C, Pekkanen J, Genuneit J, Loss G, et al. ω -3 fatty acids contribute to the asthma-protective effect of unprocessed cow's milk. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137(6):1699–706.e13.
- [102] Gehring U, Spithoven J, Schmid S, Bitter S, Braun-Fahrlander C, Dalphin JC, et al. Endotoxin levels in cow's milk samples from farming and non-farming families—the PASTURE study. *Environ Int* 2008;34(8):1132–6.
- [103] Peters M, Kauth M, Schwarze J, Körner-Rettberg C, Riedler J, Nowak D, et al. Inhalation of stable dust extract prevents allergen induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Thorax* 2006;61(2):134–9.
- [104] Karvonen AM, Hyvärinen A, Rintala H, Korppi M, Täubel M, Doekes G, et al. Quantity and diversity of environmental microbial exposure and development of asthma: a birth cohort study. *Allergy* 2014;69(8):1092–101.
- [105] Montel MC, Buchin S, Mallet A, Delbes-Paus C, Vuitton DA, Desmasures N, et al. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int J Food Microbiol* 2014;177:136–54.
- [106] Böcking C, Harb H, Ege MJ, Zehethofer N, Fischer K, Krauß J, et al. Bioavailability and allergoprotective capacity of milk-associated conjugated linoleic acid in a murine model of allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 2014;163(3):234–42.
- [107] Rochat MK, Ege MJ, Plabst D, Steinle J, Bitter S, Braun-Fahrlander C, et al. Maternal vitamin D intake during pregnancy increases gene expression of *ILT3* and *ILT4* in cord blood. *Clin Exp Allergy* 2010;40(5):786–94.
- [108] Podoprigrora GI. [The gnotobiologic approach to the study of the body's non-specific resistance to infection]. *Arkh Patol* 1976;38(3):77–85. Russian.
- [109] Dubos RJ, Schaedler RW. The effect of the intestinal flora on the growth rate of mice, and on their susceptibility to experimental infections. *J Exp Med* 1960;111(3):407–17.
- [110] Hanna MG, Nettesheim P, Richter CB, Tennant RW. The variable influence of host microflora and intercurrent infections on immunological competence and carcinogenesis. *Isr J Med Sci* 1973;9(3):229–38.
- [111] Glaister JR. Factors affecting the lymphoid cells in the small intestinal epithelium of the mouse. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1973;45(5):719–30.
- [112] Ferguson A, Parrott DMV. The effect of antigen deprivation on thymus-dependent and thymus-independent lymphocytes in the small intestine of the mouse. *Clin Exp Immunol* 1972;12(4):477–88.
- [113] Eloy R, Vuitton D, Garaud JC, Vaultier JP, Klein M, Grenier JF. [Peyer's patches and cellular immunity]. *Biol Gastroenterol (Paris)* 1975;8(1):73–86. French.
- [114] Molloy J, Allen K, Collier F, Tang MLK, Ward AC, Vuillermin P. The potential link between gut microbiota and IgE-mediated food allergy in early life. *Int J Environ Res Public Health* 2013;10(12):7235–56.
- [115] Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001;291(5505):881–4.
- [116] Kobayashi KS, Chamailard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005;307(5710):731–4.
- [117] Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 2006;313(5790):1126–30.
- [118] Molloy MJ, Bouladoux N, Belkaid Y. Intestinal microbiota: shaping local and systemic immune responses. *Semin Immunol* 2012;24(1):58–66.
- [119] Mantis NJ, Rol N, Corthésy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol* 2011;4(6):603–11.
- [120] Palm NW, Rosenstein RK, Medzhitov R. Allergic host defences. *Nature* 2012;484(7395):465–72.
- [121] Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004;4(6):478–85.
- [122] Gaboriau-Routhiau V, Lécuyer E, Cerf-Bensussan N. Role of microbiota in postnatal maturation of intestinal T-cell responses. *Curr Opin Gastroenterol* 2011;27(6):502–8.
- [123] Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H. Oral tolerance. *Immunol Rev* 2011; 241(1):241–59.
- [124] Cassani B, Villablanca EJ, De Calisto J, Wang S, Mora JR. Vitamin A and immune regulation: role of retinoic acid in gut-associated dendritic cell education, immune protection and tolerance. *Mol Aspects Med* 2012;33(1):63–76.
- [125] Hall JA, Grainger JR, Spencer SP, Belkaid Y. The role of retinoic acid in tolerance and immunity. *Immunity* 2011;35(1):13–22.
- [126] Smits HH, van der Vlugt LE, von Mutius E, Hiemstra PS. Childhood allergies and asthma: new insights on environmental exposures and local immunity at the lung barrier. *Curr Opin Immunol* 2016;42:41–7.
- [127] Genuneit J, Strachan DP, Büchele G, Weber J, Loss G, Sozanska B, et al. The combined effects of family size and farm exposure on childhood hay fever and atopy. *Pediatr Allergy Immunol* 2013;24(3):293–8.
- [128] Ege MJ, Herzum I, Büchele G, Krauss-Etschmann S, Lauener RP, Bitter S, et al. Specific IgE to allergens in cord blood is associated with maternal immunity to *Toxoplasma gondii* and rubella virus. *Allergy* 2008;63(11):1505–11.
- [129] 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;118(2):511–21.
- [130] Björkstén B. The intrauterine and postnatal environments. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104(6):1119–27.
- [131] Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut* 2014;63(4):559–66.
- [132] Bertrand X, Dufour V, Millon L, Beuvier E, Gbaguidi-Haore H, Piarroux R, et al. Effect of cheese consumption on emergence of antimicrobial resistance in the intestinal microflora induced by a short course of amoxicillin-clavulanic acid. *J Appl Microbiol* 2007;102(4):1052–9.
- [133] Mangin I, Lévêque C, Magne F, Suau A, Pochart P. Long-term changes in human colonic *Bifidobacterium* populations induced by a 5-day oral amoxicillin-clavulanic acid treatment. *PLoS One* 2012;7(11):e50257.
- [134] Stokholm J, Schjørring S, Eskildsen CE, Pedersen L, Bischoff AL, Følsgaard N, et al. Antibiotic use during pregnancy alters the commensal vaginal microbiota. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(7):629–35.
- [135] Roduit C, Frei R, Loss G, Büchele G, Weber J, Depner M, et al. Development of atopic dermatitis according to age of onset and association with early-life exposures. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130(1):130–6.e5.
- [136] Sepp E, Julge K, Vasar M, Naaber P, Björkstén B, Mikelsaar M. Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants. *Acta Paediatr* 1997;86(9):956–61.
- [137] Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108(4):516–20.
- [138] Sjögen YM, Jenmalm MC, Böttcher MF, Björkstén B, Sverremark-Ekström E. Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. *Clin Exp Allergy* 2009;39(4):518–26.
- [139] Böttcher MF, Nordin EK, Sandin A, Midtvedt T, Björkstén B. Microflora-associated characteristics in faeces from allergic and nonallergic infants. *Clin Exp Allergy* 2000;30(11):1591–6.
- [140] Kalliomäki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107(1):129–34.
- [141] Björkstén B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy* 1999;29(3):342–6.
- [142] Kirjavainen PV, Gibson GR. Healthy gut microflora and allergy: factors influencing development of the microbiota. *Ann Med* 1999;31(4):288–92.
- [143] Böttcher MF, Björkstén B, Gustafson S, Voor T, Jenmalm MC. Endotoxin levels in Estonian and Swedish house dust and atopy in infancy. *Clin Exp Allergy* 2003;33(3):295–300.
- [144] Björkstén B. Environment and infant immunity. *Proc Nutr Soc* 1999;58(3):729–32.
- [145] Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Björkstén B, Engstrand L, Jenmalm MC. Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129(2):434–40.e2.
- [146] Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Björkstén B, Engstrand L, Jenmalm MC. Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. *Clin Exp Allergy* 2014;44(6):842–50.
- [147] Bisgaard H, Li N, Bonnelykke K, Chawes BLK, Skov T, Paludan-Müller G, et al. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128(3):646–52.e5.
- [148] Dicksved J, Flöistrup H, Bergström A, Rosenquist M, Pershagen G, Scheynius A, et al. Molecular fingerprinting of the fecal microbiota of children raised according to different lifestyles. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(7):2284–9.
- [149] Heederik D, von Mutius E. Does diversity of environmental microbial exposure matter for the occurrence of allergy and asthma? *J Allergy Clin Immunol* 2012;130(1):44–50.
- [150] Lauener RP, Birchler T, Adamski J, Braun-Fahrlander C, Bufer A, Herz U, et al. Expression of *CD14* and toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children. *Lancet* 2002;360(9331):465–6.
- [151] Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C, et al. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(3):482–8.
- [152] Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C, et al. Association between exposure to farming, allergies and genetic variation in *CARD4/NOD1*. *Allergy* 2006;61(9):1117–24.
- [153] Ege MJ, Bieli C, Frei R, van Strien RT, Riedler J, Ublagger E, et al. Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(4):817–23.
- [154] Bieli C, Eder W, Frei R, Braun-Fahrlander C, Klimecki W, Waser M, et al. A polymorphism in *CD14* modifies the effect of farm milk consumption on allergic diseases and *CD14* gene expression. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120(6):1308–15.
- [155] Loss G, Bitter S, Wohlgensinger J, Frei R, Roduit C, Genuneit J, et al. Prenatal and early-life exposures alter expression of innate immunity genes: the PASTURE cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130(2):523–30.e9.
- [156] Roduit C, Wohlgensinger J, Frei R, Bitter S, Bieli C, Loeliger S, et al. Prenatal animal contact and gene expression of innate immunity receptors at birth are associated with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127(1):179–85. e1.

- [157] Orivuori L, Loss G, Roduit C, Dalphin JC, Depner M, Genuneit J, et al. Soluble immunoglobulin A in breast milk is inversely associated with atopic dermatitis at early age: the PASTURE cohort study. *Clin Exp Allergy* 2014;44(1):102–12.
- [158] Karlsson H, Hessel C, Rudin A. Innate immune responses of human neonatal cells to bacteria from the normal gastrointestinal flora. *Infect Immun* 2002;70(12):6688–96.
- [159] Lundell AC, Andersson K, Josefsson E, Steinkasserer A, Rudin A. Soluble CD14 and CD83 from human neonatal antigen-presenting cells are inducible by commensal bacteria and suppress allergen-induced human neonatal Th2 differentiation. *Infect Immun* 2007;75(8):4097–104.
- [160] Kääriö H, Huttunen K, Karvonen AM, Schaub B, von Mutius E, Pekkanen J, et al. Exposure to a farm environment is associated with T helper 1 and regulatory cytokines at age 4.5 years. *Clin Exp Allergy* 2016;46(1):71–7.
- [161] Kääriö H, Nieminen JK, Karvonen AM, Huttunen K, Schröder PC, Vaarala O, et al. Circulating dendritic cells, farm exposure and asthma at early age. *Scand J Immunol* 2016;83(1):18–25.
- [162] Martikainen MV, Kääriö H, Karvonen A, Schröder PC, Renz H, Kaulek V, et al. Farm exposures are associated with lower percentage of circulating myeloid dendritic cell subtype 2 at age 6. *Allergy* 2015;70(10):1278–87.
- [163] Roduit C, Frei R, Depner M, Schaub B, Loss G, Genuneit J, et al. Increased food diversity in the first year of life is inversely associated with allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133(4):1056–64.e7.
- [164] Kalliomäki 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;357(9262):1076–9.
- [165] Zuccotti G, Meneghin F, Aceti A, Barone G, Callegari ML, Di Mauro A, et al. Probiotics for prevention of atopic diseases in infants: systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2015;70(11):1356–71.
- [166] Cuello-García CA, Brozek JL, Fiocchi A, Pawankar R, Yepes-Nuñez JJ, Terracciano L, et al. Probiotics for the prevention of allergy: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136(4):952–61.
- [167] Zhang G, Hu H, Liu C, Zhang Q, Shakya S, Li Z. Probiotics for prevention of atopy and food hypersensitivity in early childhood: a PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine* 2016;95(8):e2562.
- [168] Koletzko S. Probiotics and prebiotics for prevention of food allergy: indications and recommendations by societies and institutions. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2016;63(Suppl 1):S9–10.
- [169] Gorelik L, Kauth M, Gehlhar K, Bufe A, Holst O, Peters M. Modulation of dendritic cell function by cowshed dust extract. *Innate Immun* 2008;14(6):345–55.
- [170] Stiehm M, Bufe A, Peters M. Proteolytic activity in cowshed dust extracts induces C5a release in murine bronchoalveolar lavage fluids which may account for its protective properties in allergic airway inflammation. *Thorax* 2013;68(1):31–8.
- [171] Peters M, Kauth M, Scherner O, Gehlhar K, Steffen I, Wentker P, et al. Arabinogalactan isolated from cowshed dust extract protects mice from allergic airway inflammation and sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126(3):648–56.e4.
- [172] Kepert I, Fonseca J, Müller C, Milger K, Hochwind K, Kostric M, et al. D-tryptophan from probiotic bacteria influences the gut microbiome and allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol*. Epub 2016 Sep 23.
- [173] Kauth M, Heine H. Allergy protection by cowshed bacteria—recent findings and future prospects. *Pediatr Allergy Immunol* 2016;27(4):340–7.
- [174] Vogel K, Blümer N, Korthals M, Mittelstädt J, Garn H, Ege M, et al. Animal shed *Bacillus licheniformis* spores possess allergy-protective as well as inflammatory properties. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122(2):307–12.e8.
- [175] Debarry J, Garn H, Hanuszkiewicz A, Dickgreber N, Blümer N, von Mutius E, et al. *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119(6):1514–21.
- [176] Debarry J, Hanuszkiewicz A, Stein K, Holst O, Heine H. The allergy-protective properties of *Acinetobacter lwoffii* F78 are imparted by its lipopolysaccharide. *Allergy* 2010;65(6):690–7.
- [177] Stein K, Brand S, Jenckel A, Sigmund A, Chen ZJ, Kirschning CJ, et al. Endosomal recognition of *Lactococcus lactis* G121 and its RNA by dendritic cells is key to its allergy-protective effects. *J Allergy Clin Immunol* 2017;139(2):667–78.e5.
- [178] Fischer K, Stein K, Ulmer AJ, Lindner B, Heine H, Holst O. Cytokine-inducing lipoteichoic acids of the allergy-protective bacterium *Lactococcus lactis* G121 do not activate via Toll-like receptor 2. *Glycobiology* 2011;21(12):1588–95.
- [179] Conrad ML, Ferstl R, Teich R, Brand S, Blümer N, Yildirim AO, et al. Maternal TLR signaling is required for prenatal asthma protection by the nonpathogenic microbe *Acinetobacter lwoffii* F78. *J Exp Med* 2009;206(13):2869–77.
- [180] Brand S, Teich R, Dicke T, Harb H, Yildirim AO, Tost J, et al. Epigenetic regulation in murine offspring as a novel mechanism for transmaternal asthma protection induced by microbes. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128(3):618–25.e7.
- [181] Hagner S, Harb H, Zhao M, Stein K, Holst O, Ege MJ, et al. Farm-derived Gram-positive bacterium *Staphylococcus sciuri* W620 prevents asthma phenotype in HDM- and OVA-exposed mice. *Allergy* 2013;68(3):322–9.