



Impatto del microbioma (polmonare e intestinale) sull'asma

a cura della Commissione
Asma della SIAIP

Maria Elisa Di Cicco¹

Amelia Licari²

Maddalena Leone³

Sara Bozzetto⁴

Iolanda Chinellato⁵

Carlo Capristo⁶

Valentina De Vittori⁷

Nadia Severini⁸

Maria Angela Tosca⁹

(coordinatore)

¹ Allergologia Pediatrica, Sezione di Pneumologia e Allergologia Pediatrica, U.O. Pediatria, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa; ² Immuno-Allergologia Pediatrica e Malattie dell'Apparato Respiratorio, S.C. Pediatria, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia;

³ Allergologia Pediatrica, Ospedale Niguarda, Milano; ⁴ UOSD Pneumologia Pediatrica, Università degli Studi di Padova; ⁵ S.C. Pediatra, P.O.C. SS. Annunziata, Taranto; ⁶ Clinica Pediatrica, Il

Università degli Studi di Napoli; ⁷ Servizio di Immunologia ed Allergologia Pediatrica, Policlinico Umberto I, Università Sapienza, Roma; ⁸ U.O. Pediatra, Università "Magna Graecia", Catanzaro;

⁹ UOSD Allergologia, Dipartimento di Scienze Pediatriche, Ist. G. Gaslini, Genova

Parole chiave:

**asma, microbioma
intestinale, microbioma
polmonare**

Corrispondenza

Maria Angela Tosca
UOSD Allergologia
Dipartimento di Scienze Pediatriche
Ist. G. Gaslini, Genova
E-mail: mariangelatosca@gaslini.org

Abstract

L'asma è una delle patologie croniche più diffuse e rappresenta la malattia respiratoria cronica più frequente nell'età pediatrica. Sono sempre più numerosi gli studi volti a individuare delle strategie preventive per ridurne l'incidenza: negli ultimi decenni è stato dimostrato che esiste una "finestra" temporale che si apre già durante la vita intrauterina e nella quale vari fattori ambientali possono interagire con il substrato genetico per favorire l'insorgenza dell'asma e, più in generale, delle malattie allergiche. Negli ultimi anni è stato ampiamente studiato il ruolo del microbioma intestinale dimostrandone la capacità di modulare la risposta immunitaria. Una disbiosi intestinale in epoca precoce, con sbilanciamento della composizione del microbioma a favore di *Escherichia coli* e *Clostridium difficile* e a discapito dei *Bifidobacteria*, può predisporre allo sviluppo delle allergopatie. Più recentemente è stato dimostrato che esiste un microbioma anche a livello delle vie aeree inferiori, la cui composizione può essere influenzata dalle infezioni virali e che, nei soggetti asmatici, è caratterizzata dalla prevalenza del phylum *Proteobacteria*. Non è stato ancora dimostrato se sia possibile ridurre l'insorgenza dell'asma agendo sul microbioma, mentre è necessario tenere a mente la necessità di ridurre l'impiego degli antibiotici per limitare le interferenze sul microbioma, soprattutto nei neonati e nei lattanti.

Introduzione

L'asma è una delle patologie croniche più diffuse nel mondo, con un numero di soggetti affetti pari a circa 300 milioni e una prevalenza in continua crescita¹. Si tratta anche della malattia respiratoria cronica più frequente in età pediatrica, interessando il 10% dei bambini a livello mondiale. In considerazione di ciò, è necessario investire sempre di più nello studio di eventuali strategie preventive da attuare nei primi anni di vita: infatti, nell'ultimo decennio studi di coorte effettuati su bambini seguiti dalla nascita hanno suggerito che l'insorgenza dell'asma e, più in generale, dell'atopia, sia da imputare a fattori che agiscono in uno stadio molto precoce della vita di un individuo. Tra questi, hanno assunto importanza rilevante l'esposizione ad antibiotici durante il periodo perinatale e in gravidanza, il parto cesareo, l'allattamento con latte di formula e la mancanza di contatto da parte della gravida con animali domestici. I meccanismi con cui tali fattori predispongono allo sviluppo dell'asma sono molteplici, ma è sempre maggiore l'interesse rivolto dalla comunità scientifica alle interazioni con il microbioma. Gli studi relativi al microbioma intestinale e al suo ruolo nella patogenesi delle allergopatie sono ormai numerosi per la facilità con cui si possono reperire i campioni biologici da analizzare, ma da alcuni anni si è iniziato a studiare anche il microbioma polmonare, in particolare in seguito al riscontro, mediante le tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS), della presenza di materiale genetico di origine batterica nelle vie aeree sia dei soggetti sani che dei soggetti asmatici².

Ruolo del microbioma polmonare

La teoria della sterilità delle vie aeree inferiori in condizioni di benessere rappresenta uno dei dogmi più longevi della Storia della Medicina: tuttavia, con il diffondersi delle tecniche NGS e della loro applicazione in microbiologia, a partire dal 2010 essa è stata superata dal riscontro, nelle vie aeree inferiori dei soggetti sani, di comunità batteriche non rilevabili mediante le classiche tecniche colturali¹. Le nuove tecniche di sequenziamento applicate alla batteriologia prevedono l'amplificazione e il sequenziamento del gene che codifica per l'*RNA ribosomiale 16S*, ovvero un piccolo tratto di genoma batterico che codifica per la subunità *minore* dei ribosomi, altamente conservato nelle cellule procariote: tale gene viene utilizzato come un codice a barre, la cui analisi mediante database specifici permette l'identificazione delle comunità batteriche descrivendone la composizione tassonomica (in particolare per phyla e generi)¹. Tali metodiche sono state utilizzate per la prima volta su campioni bronchiali di soggetti sani da Hilty et al., studiando 24 adulti (5 con BPCO, 11 asmatici e 8 controlli) e 20 bambini (13 con asma grave e 7 controlli), tutti clinicamente stabili². In tutti i soggetti sono stati eseguiti tamponi nasali e faringei, mentre in 23 soggetti è stata eseguita anche la broncoscopia con brushing bronchiale e/o BAL: i risultati dimostrano che nelle vie aeree dei soggetti sani sono presenti, anche se in quantità modesta, germi appartenenti al phylum *Bacteroidetes* e, in particolare, al genere *Prevotella*, ovvero germi Gram negativi anaerobi, che fanno parte della normale flora orale e vaginale e che si riescono a dimostrare con difficoltà mediante esame colturale. Nei soggetti con asma e BPCO, invece, il phylum prevalente è quello dei *Proteobacteria*, di cui fanno parte i generi *Haemophilus*, *Moraxella* e *Neisseria*. Per la prima volta veniva, quindi, dimostrato che l'albero bronchiale dei soggetti sani possiede una propria flora batterica: studi successivi hanno confermato tale ipotesi, chiarendo che nei soggetti sani è molto rappresentato anche il phylum *Firmicutes* (soprattutto il genere *Veilonella*, ma anche *Streptococcus*)³ e dimostrando che il microbioma polmonare risulta del tutto analogo al microbioma delle vie aeree superiori, che rappresenterebbero, quindi, la fonte principale della colonizzazione delle vie aeree inferiori³. Uno studio recente, inoltre, ha dimostrato che il microbioma dell'orofaringe è sovrapponibile a quello rilevabile nel lobo polmonare superiore

destro, mentre si discosta da quello degli altri lobi⁴: ciò si spiega considerando che tale lobo è, per motivi anatomici, il più soggetto alle microaspirazioni, fenomeno molto comune anche nei soggetti sani in forma subclinica. È ragionevole supporre, quindi, che i batteri giungano alle vie aeree inferiori tramite microaspirazioni ripetute di secrezioni dell'orofaringe e, solo in misura minore, per diffusione diretta tramite la mucosa o per inalazione. Eventuali bias legati al passaggio del broncoscopio attraverso le alte vie aeree, invece, sono stati esclusi dimostrando che il rischio di contaminazione non è significativo⁴. Cosa accade una volta che i batteri dell'orofaringe raggiungono le vie aeree inferiori? Il gruppo di Dickson ha elaborato un modello secondo il quale la composizione del microbioma polmonare sarebbe determinato da: 1) immigrazione di germi provenienti dalle vie aeree superiori; 2) eliminazione dei batteri tramite clearance muco-ciliare, tosse e difese dell'ospite; 3) tasso di replicazione batterica legato alle condizioni locali, quali pH, disponibilità di nutrienti, tensione di ossigeno, presenza di cellule immunitarie⁵. Nel soggetto sano i fattori locali rendono l'ambiente polmonare inospitale, per cui la carica batterica e i tassi di replicazione sono ridotti, mentre in caso di patologia respiratoria, le condizioni locali diventano determinanti, modificandosi al punto da creare nicchie che possono favorire la replicazione batterica fino a giungere, nelle patologie più gravi e negli stadi più avanzati, a colonizzazioni croniche spesso difficili da eradicare⁵ (Fig. 1).

Il ruolo del microbioma polmonare nella patogenesi, nelle esacerbazioni e, più in generale, nella storia naturale delle malattie respiratorie non è ancora chiaro, ma esistono alcune evidenze di un suo ruolo nel mantenimento dell'omeostasi della risposta immunitaria, per cui è logico aspettarsi che una disbiosi possa facilitare l'insorgenza di malattia, così come è verosimile che allo stesso tempo la risposta immunitaria sia in grado di influenzare la composizione del microbioma polmonare⁶. Inoltre, è stato ampiamente dimostrato che l'esposizione continua e diversificata a batteri in epoca infantile è in grado di ridurre il successivo sviluppo di asma e atopia ed è verosimile che tale meccanismo si realizzi anche attraverso le vie aeree, che rappresentano la superficie più ampia del corpo umano ad essere esposta al mondo esterno. Di recente è stato anche dimostrato su modelli murini che esiste uno stretto rapporto tra microbioma polmonare e intestinale: l'asse

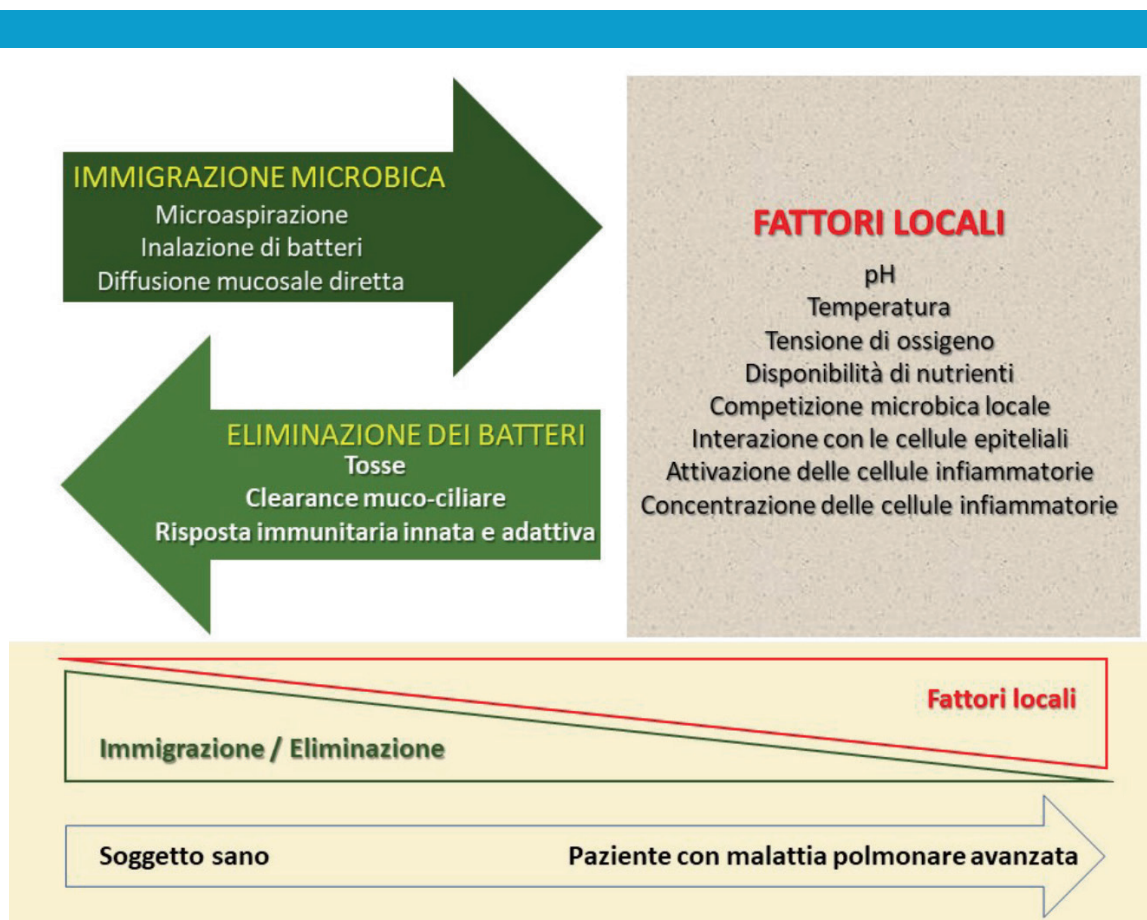


Figura 1. Fattori determinanti la composizione del microbioma polmonare (da Dickson et al., 2014⁵, mod.).

intestino-polmone prevede una continua comunicazione per via ematica tra i due distretti che, in tal modo, sarebbero in grado di modulare a vicenda la risposta immunitaria locale e la composizione del rispettivo microbioma.

Per quanto riguarda l'asma, già nel lavoro di Hilty et al.² veniva suggerito che negli asmatici la netta prevalenza del phylum *Proteobacteria* potrebbe avere un qualche ruolo nella genesi e nel mantenimento dell'infiammazione cronica delle vie aeree. Nel 2007, eseguendo l'esame colturale sull'aspirato faringeo di 321 neonati sani a rischio per asma in quanto figli di madri asmatiche, seguiti nel tempo (coorte del *COP-SAC study*)⁷, il 21% dei neonati è risultato positivo per *Moraxella catharralis*, *Haemophilus influenzae* (ovvero membri del phylum *Proteobacteria*) o *Streptococcus pneumoniae*, da soli o in combinazione, e tale positi-

vità si associava ad un aumentato rischio di wheezing episodico o asma all'età di 5 anni. Nel 2015, poi, è stato pubblicato il primo studio volto a caratterizzare il microbioma nasofaringeo nel primo anno di vita: in particolare, sono stati analizzati campioni di aspirato nasofaringeo raccolti più volte, sia in benessere che durante un'infezione acuta, in 234 bambini ad elevato rischio di asma/allergia seguiti dalla nascita (coorte del *Childhood Asthma Study*). Lo studio rivela che il microbioma nasofaringeo nel primo anno di vita è caratterizzato dai phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria* e da sei generi, ovvero *Haemophilus*, *Streptococcus* e *Moraxella* (più comuni durante le infezioni) e *Staphylococcus*, *Alloiococcus* e *Corynebacterium* (più comuni in benessere). Il follow-up ha dimostrato che la comparsa dello *Streptococcus* entro i 2 mesi di vita è più comune nei bambini che svilupperanno una sensi-

bilizzazione ad aeroallergeni ed è un forte predittore di asma all'età di 5 anni ⁸.

Un ulteriore studio sul microbioma nasofaringeo di 33 lattanti sani e 99 lattanti visitati durante un'infezione respiratoria e sottoposti anche alla ricerca del VRS ⁹, ha messo in evidenza che in corso di infezione da VRS si verifica un netto incremento dei *Proteobacteria* (*Moraxella* e *Haemophilus*), ma anche dei generi *Streptococcus* e *Corynebacterium*: gli Autori di questo studio concludono che il noto aumento del rischio di asma dopo un'infezione da VRS potrebbe essere legato alle alterazioni che il virus induce nel microbioma.

Le evidenze emerse fino ad oggi suggeriscono, quindi, che lo sbilanciamento del microbioma respiratorio nei primi anni di vita verso il phylum *Proteobacteria* e il genere *Streptococcus* potrebbe avere un ruolo nella patogenesi dell'asma, sia per i suoi effetti diretti sulla risposta immunitaria che per quelli indiretti legati alle interazioni con i virus.

Al di là della patogenesi, è verosimile che il microbioma polmonare possa anche influenzare l'andamento clinico della malattia: molti studi hanno confermato negli asmatici (sia in trattamento con steroidi inalatori che con il solo broncodilatatore) la prevalenza dei *Proteobacteria* insieme a una maggiore diversità della composizione batterica rispetto ai soggetti sani ¹⁰. Inoltre, Huang et al. hanno dimostrato, su campioni di brushing protetto prelevati da 65 adulti con asma lieve con controllo sub-ottimale, che la prevalenza di *Proteobacteria* e la diversità della composizione batterica correlano con l'iperreattività bronchiale. Nello stesso studio, in 16 pazienti la somministrazione di claritromicina ha permesso di ridurre significativamente l'iperreattività bronchiale nei soggetti con elevata diversità batterica. Ciò fa supporre che l'effetto benefico dei macrolidi in alcuni asmatici non sia dovuto esclusivamente al loro tipico effetto antinfiammatorio, bensì anche all'effetto antibiotico sul microbioma polmonare ¹¹.

Ad oggi, invece, non sono ancora disponibili evidenze relative alle alterazioni del microbioma polmonare durante gli accessi d'asma. Tuttavia, è stato proposto un modello, denominato "ciclo disbiosi - infiammazione", secondo il quale esiste un rapporto bidirezionale tra microbioma polmonare e risposta immunitaria, per il quale ogni trigger infiammatorio (ad es. le infezioni virali) darebbe vita a una cascata di eventi nell'ambito della risposta immunitaria in grado di alterare le condizioni di crescita microbica favorendo la crescita

di alcuni batteri, provocando ulteriore infiammazione e dando vita a un circolo vizioso che scatenerrebbe l'esacerbazione. Durante le crisi quindi, non si verificherebbe un'infezione da parte di un batterio emergente nell'ambito del microbioma, ma una disbiosi con alterazione dei tre fattori che regolano il microbioma precedentemente illustrati. Ciò spiegherebbe perché le infezioni batteriche acute rispondono prontamente agli antibiotici, mentre lo stesso non avviene nel caso delle crisi d'asma ⁵.

Ulteriori studi saranno necessari per definire l'impatto degli antibiotici sul microbioma polmonare, dal momento che, se, come detto, da un lato alcuni studi dimostrano un certo effetto benefico dei macrolidi ¹¹, altri dimostrano un ruolo patogenetico degli antibiotici nell'asma infantile. Gli antibiotici potrebbero, infatti, alterare il microbioma interferendo nella sua azione immunomodulante: i medici dovrebbero essere consapevoli di questi potenziali rischi, prescrivendo tali farmaci solo se necessari, soprattutto nel caso di neonati e lattanti. Inoltre, non è stato ancora chiarito se sia possibile intervenire sul microbioma polmonare mediante la dieta oppure con probiotici e prebiotici ¹².

Un altro punto che dovrà essere chiarito è relativo al fatto che le tecniche NGS non stabiliscono se i genomi batterici rilevati appartengano o meno a batteri vivi: tuttavia, anche se si trattasse di genomi appartenenti a germi non più presenti nelle vie aeree, ciò non riduce l'importanza della determinazione di tutti i genomi batterici rilevabili in questo distretto, con lo scopo di interpretare gli effetti del loro passaggio.

Ruolo del microbioma intestinale

Mentre il ruolo delle infezioni respiratorie è già da tempo al centro degli studi sull'asma, un numero sempre maggiore di studi epidemiologici e di microbiologia supportano l'ipotesi che la genesi delle malattie allergiche possa risiedere almeno in parte nelle comunità di microbi presenti nel tratto gastrointestinale e alle loro modificazioni legate a fattori quali la precoce esposizione agli antibiotici ¹³, il parto cesareo ¹⁴, l'utilizzo del latte di formula, l'esposizione materna ad un ambiente agricolo e l'uso di prebiotici ¹⁵, il consumo materno di antibiotici durante la gravidanza. Questi fattori di rischio hanno la capacità di influenzare la

composizione del microbioma, come è stato chiaramente dimostrato per la somministrazione di antibiotici, che riducono rapidamente la diversità del microbioma intestinale, e per l'utilizzo del latte di formula, che altera le popolazioni dei *Bifidobacteria* commensali nell'intestino del lattante¹⁶. I fattori di rischio identificati si concentrano nel periodo prenatale e postnatale, suggerendo che lo sviluppo di asma allergico possa essere legato, almeno in parte, alle alterazioni del microbioma nei primi mesi di vita, considerati critici per lo sviluppo microbiologico ed immunologico. A supporto di questa ipotesi, uno studio ha dimostrato che neonati di 3 settimane di vita che avevano una carica sufficientemente alta di *Clostridium difficile* ed un elevato rapporto tra *Clostridium difficile* e *Bifidobacteria*, possedevano un rischio maggiore di sviluppare atopia¹⁷. In un altro studio, lattanti con un'elevata carica fecale di *Escherichia coli*, sviluppavano eczema associato ad aumento delle IgE (Fig. 2).

Per capire in che modo questi fattori di rischio sono correlati allo sviluppo della malattia, è necessario considerare lo sviluppo del microbioma nella prima infanzia. Il momento della nascita sembra avere una forte influenza sul microbioma del neonato: i bambini nati con parto spontaneo vengono colonizzati in vari di-

stretti (cute, bocca, intestino) da un microbioma ricco di *Snethia* e *Lactobacillus spp.*, flora che è molto simile a quella rilevabile nel tratto vaginale della madre. In confronto, i bambini nati con il parto cesareo, che hanno un rischio significativamente più elevato di sviluppare malattie allergiche, hanno un microbioma ricco di *Staphylococcus* e *Streptococcus spp.* ed in generale più simile a quello che si riscontra sulla cute della madre. Lo sviluppo del microbioma intestinale segue la regola della successione primaria, secondo una serie di eventi che avviene durante la colonizzazione di un ambiente precedentemente sterile. Le specie pioniere, cioè quelle che inizialmente colonizzano il tratto intestinale, definiscono le condizioni dell'ecosistema e stabiliscono il tipo di microrganismi che colonizzeranno in seguito. Questo processo aumenta la possibilità che una iniziale colonizzazione microbica aberrante nell'intestino, come descritto da Penders et al.¹⁸ possa portare ad una disbiosi, con carenza di specie commensali necessarie per lo sviluppo fisiologico e il mantenimento del sistema immunitario.

Una conferma di questa ipotesi deriva da uno studio eseguito su topi, colonizzati alla nascita con un cocktail di 46 specie di *Clostridium IV* e *XIV* formanti spore¹⁹: nel topo adulto è stata, infatti, dimostrata una

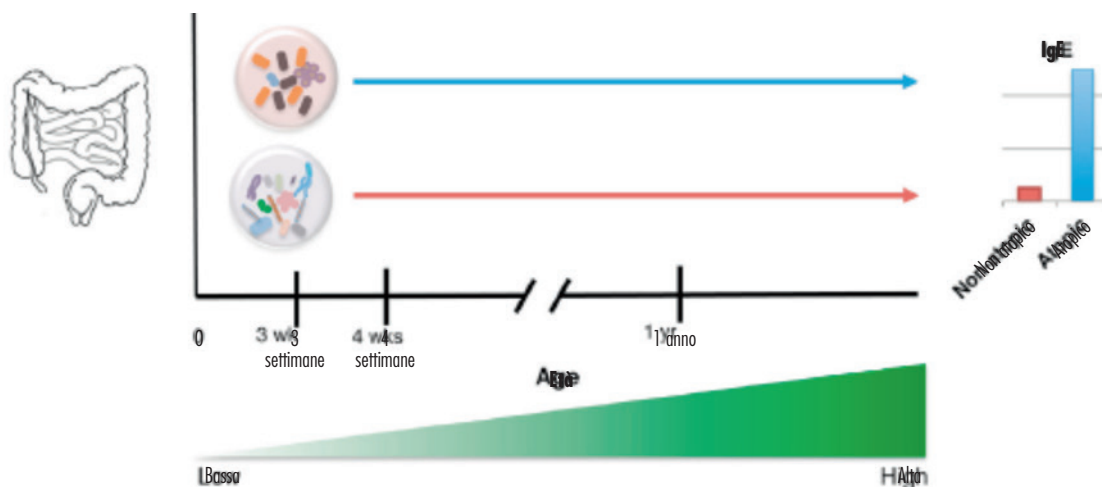


Figura 2. Neonati con disbiosi del microbioma intestinale, ricco di *Escherichia coli* o *Clostridium difficile*, hanno un rischio significativamente più elevato di sviluppo di atopia negli anni successivi, tipicamente caratterizzato da elevati livelli sierici di IgE.

significativa riduzione della concentrazione delle IgE circolanti, mentre la somministrazione dello stesso cocktail di batteri negli animali adulti non portava allo stesso risultato. Inoltre, i linfociti T CD4+ che esprimono cellule Treg, rappresentano un importante sottogruppo di cellule T helper in relazione all'asma allergico, per la loro capacità di mitigare la risposta immunitaria adattativa pro-infiammatoria con la produzione di IL-10. Oltre a dimostrare la riduzione della risposta IgE, *Atarashi et al.* dimostrarono che la supplementazione nel topo con *Clostridium IV* and *XIV* promuoveva la proliferazione dei Treg nel colon e riduceva la concentrazione di IL-4 nelle vie aeree in risposta al challenge con ovalbumina¹⁹. Questi risultati sul modello animale indicano che un'appropriate colonizzazione microbica gastrointestinale nelle prime fasi della vita può indurre immunotolleranza.

I linfociti Treg prodotti in periferia (non a livello del timo) sono noti come Treg indotti (iTreg) e sono principalmente stimolati nei linfonodi mesenterici, nelle placche di Peyer e nella LP del piccolo e del grande intestino: i topi con livelli insufficienti di iTreg sviluppano spontaneamente patologie di tipo Th2, caratterizzate da un'elevata percentuale di linfociti T CD4+ che producono citochine infiammatorie come IL-4, IL-13 ed

IL-5 nei linfonodi mesenterici, IL-4 nella LP del grande intestino ed IL-13 e IL-5 nella LP del piccolo intestino.

Altri studi hanno mostrato che l'esposizione batterica materna ad un ambiente agricolo in gravidanza può essere associato ad un aumento del numero e dell'efficienza dei linfociti Treg così come ad un alterato profilo di citochine nel sangue del cordone ombelicale e ad una riduzione dello sviluppo di asma nella prole¹⁵. I miglioramenti delle metodiche di sequenziamento del DNA negli ultimi anni hanno reso più semplice l'analisi del microbioma negli esseri umani, permettendo di confermare la presenza di una "finestra critica" in cui le alterazioni del microbioma possono essere associate allo sviluppo di allergia²⁰.

In conclusione, la dimostrazione che la presenza di specifici stimoli batterici sia fondamentale per la proliferazione del sottogruppo di linfociti T helper che esprimono cellule Treg, sottolinea che la mancata colonizzazione del tratto gastrointestinale da parte di questi batteri rappresenta almeno una delle possibili cause dello sviluppo di malattie allergiche. Pertanto gli interventi volti a correggere la disbiosi o a promuovere un'adeguata colonizzazione nel periodo neonatale potrebbero rivelarsi altamente efficaci nel prevenire le malattie allergiche dell'infanzia.

Bibliografia

- Sullivan A, Hunt E, MacSharry J, et al. The microbiome and the pathophysiology of asthma. *Respir Res* 2016;17:163.
- Hilty M, Burke C, Pedro H, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One* 2010;5:e8578.
- Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, et al. Spatial variation in the healthy human lung microbiome and the adapted island model of lung biogeography. *Ann Am Thorac Soc* 2015;12: 821-30.
- Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, et al. Bacterial topography of the healthy human lower respiratory tract. *MBio* 2017;8(1).
- Dickson RP, Martinez FJ, Huffnagle GB. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *Lancet* 2014; 384:691-702.
- Man WH, de Steenhuijsen Piters WA, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol* 2017;15:259-70.
- Bisgaard H, Hermansen MN, Buchvald F, et al. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. *N Engl J Med* 2007;357:1487-95.
- Teo SM, Mok D, Pham K, et al. The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell Host Microbe* 2015;17:704-15.
- Rosas-Salazar C, Shilts MH, Tovchigrechko A, et al. Nasopharyngeal microbiome in respiratory syncytial virus resembles profile associated with increased childhood asthma risk. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;193:1180-3.
- Marri PR, Stern DA, Wright AL, et al. Asthma-associated differences in microbial composition of induced sputum. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:346-52.
- Huang YJ, Nelson CE, Brodie EL, et al.; National Heart, Lung, and Blood Institute's Asthma Clinical Research Network. Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:372-81.
- Ozturk AB, Turturice BA, Perkins DL, et al. The potential for emerging microbiome mediated therapeutics in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2017;17:62.
- Johnson CC, Ownby DR, Alford SH, et al. Antibiotic exposure in early infancy and risk for childhood atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:1218-24.
- Renz-Polster H, David MR, Buist AS, et al. Caesarean section delivery and the risk of allergic disorders in childhood. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1466-72.
- Gray LE, O'Hely M, Ranganathan S, et al. The maternal diet, gut bacteria, and bacterial metabolites during pregnancy influence offspring asthma. *Front Immunol* 2017;8:365.

- ¹⁶ Balmer SE, Wharton BA. Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. *Arch Dis Child* 1989;64:1672-7.
- ¹⁷ Kalliomaki M, Kirjavainen P, Eerola E, et al. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:129-34.
- ¹⁸ Penders J, Stobberingh EE, Thijs C, et al. Molecular fingerprinting of the intestinal microbiota of infants in whom atopic eczema was or was not developing. *Clin Exp Allergy* 2006;36:1602-8.
- ¹⁹ Atarashi K, Tanoue T, Shima T, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 2011;331:337-41.
- ²⁰ Stiemsma LT, Turvey SE. Asthma and the microbiome: defining the critical window in early life. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2017;13:3.