

# Flora Microbiana, Sistema Imunitário e Atopia

Anabela Mota Pinto, Ana Todo-Bom

*Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra*

## Resumo

A microflora, particularmente a intestinal, pode representar (como se entende dos vários estudos realizados), um dos estímulos principais para uma maturação "normal" das funções imunológicas.

A atopia é considerada uma patologia do foro imunitário com um predomínio Th2. O aumento da produção de IgE associada a antigénios do meio ambiente pode conduzir ao aparecimento de manifestações clínicas.

Estudos recentes confirmam um aumento das doenças alérgicas (em que a resposta imunitária apresenta um domínio Th2) e das doenças auto imunes (em que a resposta imunitária apresenta um domínio Th1), sendo que, a ocorrência destas patologias é maior nos países industrializados.

A hipótese da higiene propõe que este rápido aumento da atopia esteja relacionado com uma redução da exposição a infecções cedo na vida. Esta hipótese assenta em trabalhos que demonstram que a resposta imunitária a antigénios de microrganismos se acompanha da expressão preferencial de citocinas tipo Th1, contrabalançando a produção de citocinas Th2 característica dos recém-nascidos. A polarização Th2 aumenta a produção de IgE, atopia e doenças alérgicas.

Por se saber que a estimulação microbiana primária, major, ocorre no ser humano com o estabelecimento da flora intestinal, tem-se sugerido que a exposição à microflora comensal possa representar uma chave moduladora do sistema imunitário contra a patologia atópica.

É esta interface, bactérias intestinais sistema imunitário das mucosas, que permite uma defesa dos microrganismos patogénicos e um estímulo para o sistema imunitário. Necessariamente, o sistema imunitário das mucosas precisa de estar em equilíbrio, sem o qual a maturação do sistema imunitário e a defesa do organismo poderão ser postas em causa.

A relação entre a redução da incidência de doenças infecciosas e o aumento da incidência de patologia alérgica, por um lado, e o aparente efeito protector das infecções em relação a estas patologias mediadas pela resposta imunitária, por outro lado, conduzem à necessidade de comprovar esta evidência epidemiológica e de aumentar os estudos em relação a possíveis meios terapêuticos nesta área.

**Abstract**

*It is now clear from the literature that the principal stimuli of postnatal maturation of the immune functions in mammals are signals from the microbial environmental, particularly the commensal microflora of the gastrointestinal tract.*

*Atopy is considered an immune disorder associated to a dominant TH2 activity. The increased IgE production directed to environmental antigens, as house dust mites, moulds or pollen grains can be associated with many clinical manifestations.*

*Current evidence suggests an increase of both allergic diseases (in which the immune response is dominated by type 2 helper T cells) and autoimmune diseases (in which the immune response is dominated by type 1 helper T cells). The occurrence of these diseases is higher in industrialized countries. One theory proposed to explain this increase in allergic and in autoimmune diseases is that it results from a decrease in the prevalence of childhood infection.*

*Concerning allergic diseases the immunological explanation has been put into the context of the functional T cell subsets known as T helper 1 (TH1) and T helper 2 (TH2) that display polarized cytokine profiles. It has been argued that bacterial and viral infections including respiratory viruses, during early life direct the maturing immune system toward TH1, which counterbalance pro-allergic responses of TH2 cells. Neonates are born with the immune response skewed towards a Th2 profile, which is more pronounced in children with a family history of atopy. A reduction in the overall microbial exposure will result in weak TH1 response and unrestrained TH2 reaction that allow an increase in allergy. The 'hygiene hypothesis' proposes that the relatively sterile environment present in industrialized western countries has contributed to the recent epidemic of asthma and atopy.*

*Whether specific infections are of greater or lesser protective value is an important question if strategies are to be derived to mimic the beneficial effects of childhood infection whilst avoiding morbidity and potential mortality of the natural pathogens. On other works infectious processes in the respiratory tract are associated with increased risk in latter life suggesting that viral infection may promote allergic sensitization.*

*A more accurate analysis showed that the relationship between infection and subsequent development of asthma is strongly influenced by host factors determining the response of the host to that infection. Disturbance of the respiratory mucosal surface during viral infection may allow allergens to access to epithelial layer and interact with antigen presenting cells and other inflammatory cells and leading to allergic sensitization.*

*The exact mechanisms by which microbial flora may affect atopic disease remain speculative. However, there is rapidly increasing evidence that specific input from the faecal flora to the innate immune system is essential for the establishment and maintenance of mucosal immune tolerance.*

A população microbiana que coloniza o corpo humano é numerosa e diversa e o “habitat” destes microrganismos inclui o aparelho respiratório, o aparelho gastrointestinal, a pele e o aparelho genitourinário.

As funções da flora microbiana normal são várias podendo destacar-se a sua interferência no metabolismo do hospedeiro e nos produtos alimentares, desenvolvimento do epitélio intesti-

nal, fornecimento de factores de crescimento, estimulação da resposta imunitária, alimentação de células por produtos metabólicos de bactérias, possibilitando ainda, a defesa contra potenciais microrganismos patogénicos mas impedindo a resposta imunitária contra bactérias comensais residentes e não patogénicas, tornando-se necessário que a imunidade das mucosas esteja em equilíbrio.<sup>16, 20</sup>

Na ausência destes organismos a vida tal como a conhecemos seria impossível.

A informação bibliográfica nesta área aponta para que o principal estímulo pós-natal de maturação do sistema imunitário se encontra no meio ambiente microbiano, particularmente no trato gastrointestinal.

Na altura do nascimento, a mucosa gastrointestinal é estéril, mas nos primeiros meses e anos de vida verifica-se uma colonização sequencial através da mãe e do meio ambiente, até que uma microflora se estabeleça. Concomitantemente ocorre o desenvolvimento a nível intestinal do GALT "Gut-associated Lymphoid Tissue", considerado um dos órgãos importantes do sistema imunitário, requerendo a sua maturação um estímulo microbiano procedente da microflora intestinal. Vários estudos experimentais têm demonstrado que a falta ou um estímulo inadequado resulta numa área superficial intestinal diminuída, padrão enzimático da mucosa alterado, resposta inflamatória diminuída, diminuição do sistema imunitário secretor das mucosas (IgA), e rotura da tolerância a antigénios não patogénicos previamente situados na superfície da mucosa<sup>6</sup>.

A microflora do organismo humano, embora de base estável, mantém ao longo da vida de um indivíduo, um contínuo fluxo determinado por uma variedade de factores (idade, dieta, alterações hormonais, saúde e higiene pessoal), que contribuem para alterar quantitativamente e qualitativamente a microflora<sup>16</sup>.

A prevalência de doenças atópicas tem vindo a aumentar nos países ocidentais. A hipótese da higiene propõe que este rápido aumento da atopia esteja relacionado com uma redução da exposição a infecções cedo na vida<sup>6</sup>. Esta hipótese assenta em trabalhos que demonstram que a resposta imunitária a antigénios de microrganismos se acompanha da expressão preferencial de citocinas Th1, contrabalançando a produção de citocinas Th2 característica dos recém-nascidos. A

polarização Th2 aumenta a produção de IgE, atopia e doenças alérgicas.

Por se saber que a estimulação microbiana primária, major, ocorre no ser humano com o estabelecimento da flora intestinal, tem-se sugerido que a exposição à microflora comensal possa representar uma chave moduladora do sistema imunitário contra a atopia e doenças alérgicas.

As variações geográficas no que diz respeito à flora intestinal foram recentemente sumariadas<sup>18</sup>, e deste estudo os autores verificaram que nos países ocidentais a flora intestinal tem mais bactérias anaeróbias (bifidobactérias, bacterióides) e significativamente menos estreptococos, enterococos e lactobacilos do que a flora intestinal no Uganda, Japão e Índia oriental.

Estas diferenças podem estar associadas a modificações da dieta (maior consumo de carne *versus* maior consumo de vegetais) e a diferentes padrões culturais relacionados com a localização geográfica do indivíduo<sup>1</sup>.

Os recém-nascidos alimentados por leite materno colonizam com um número maior de bifidobactérias, lactobacilos e estafilococos enquanto que aqueles que são alimentados com leite artificial apresentam maior número de clostrídios, enterococos e enterobactéria<sup>19</sup>.

As diferenças na composição das microfloras intestinais começaram por ser comparativamente estudadas em crianças de países diferentes no processo de industrialização e desenvolvimento sócio-económico e só recentemente foram avaliadas entre países europeus, nomeadamente, geograficamente vizinhos.

É o caso do trabalho de Bengt Björkstén e colaboradores<sup>19</sup> que compara a microflora de crianças da Estónia e da Suécia, com uma semana e um mês de vida, depois de os mesmos autores terem feito um estudo semelhante em crianças com um ano de idade.

A razão destes trabalhos prende-se com as

diferenças importantes nas condições de vida entre os dois países, geograficamente vizinhos, podendo esperar-se que o tipo e intensidade da colonização intestinal tenham influências na estimulação do sistema imunitário.

Assim, nas crianças com uma semana de idade, a prevalência de colonização intestinal por aeróbios totais era de 100%, quer na Estónia, quer na Suécia (Fig. 1-A). Ao mês de vida, as crianças mantinham-se todas colonizadas (100%), independentemente do país. No entanto, dentro dos aeróbios, os lactobacilos estavam presentes em 20% das crianças Estonianas com uma semana e em apenas 5% das crianças Suecas. Uma diferença ainda mais evidente e estatisticamente significativa existia ao mês de vida (80% nas crianças Estonianas contra 30% nas Suecas) (Fig. 1-B).

É, portanto, evidente que a prevalência da colonização intestinal por lactobacilos é progressiva nos dois países (aumenta entre a semana e o mês de vida), mas muito mais abrangente na Estónia do que na Suécia.

Quanto ao total de anaeróbios, apenas ao mês de idade se verificava 100% de prevalência de colonização, igual nos dois países, com valores de 80 e 90%, respectivamente na Estónia e na Suécia, nas crianças com uma semana (Fig. 1-C). Dentro dos anaeróbios, as bifidobactérias estavam presentes em 45% das crianças Estonianas com uma semana e em 40% das Suecas, e em 65% e 50%, respectivamente, ao mês de idade (Fig. 1-D).

Embora esta prevalência de bifidobactérias seja em parte semelhante ao anteriormente referido para os lactobacilos (aumento da prevalência com a idade e maior prevalência de colonização nas crianças Estonianas) ela contrasta com o observado para o total de anaeróbios, no qual as crianças Suecas com uma semana se apresentavam mais colonizadas do que as Estonianas.

A leitura destes dados sugere que, em relação aos anaeróbios, as crianças Suecas tinham mais oportunidades de colonizarem, de forma mais precoce, o tubo digestivo, apesar de não ser por bifidobactérias, ou por clostrídios. No entanto, se apreciarmos a mediana das unidades formadoras de colónias (counts-log CFU/g) verificamos que, quer à semana quer ao mês de vida, nas crianças Suecas ela era sempre inferior à das Estonianas, parecendo não ser relevante a informação prestada pela prevalência de colonização por total de anaeróbios.

No caso das microfloras intestinais serem analisadas ainda na Estónia e na Suécia, mas em crianças com dois anos de idade, alérgicas e não alérgicas, Bjorksten e col. demonstraram que as crianças alérgicas estavam menos frequentemente colonizadas por lactobacilos e bifidobactérias, de forma significativa, apenas nos primeiros em qualquer dos países. Pelo contrário, as crianças alérgicas apresentavam, nalguns casos, contagens mais elevadas de aeróbios (Fig. 2).

Apesar da exiguidade da amostra, nota-se que os desvios entre crianças alérgicas e não alérgicas são muito semelhantes na Estónia e na Suécia, apesar das diferenças já apontadas nas condições de vida entre os dois países. Pelo contrário, as baixas contagens de lactobacilos encontradas na Suécia contrastam com as altas contagens em crianças de países em desenvolvimento, como a Etiópia<sup>2</sup>.

A redução da colonização por aeróbios, especialmente bifidobactérias e clostrídios, parece associar-se à alergia, embora sem relação com o tratamento por antibióticos (frequência e tipo de antibiótico). Mas, por outro lado, os lactobacilos (aeróbios), que se encontravam reduzidos nas alergias podem por diminuição da produção de IFN $\gamma$ , levar a uma globalização Th2 mais eficaz e, consequentemente, à alergia. No entanto (Fig. 2) a análise por países (Estónia e Suécia) não apresenta diferenças de grande significado.

### Microflora Intestinal de Crianças da Estónia e Suécia

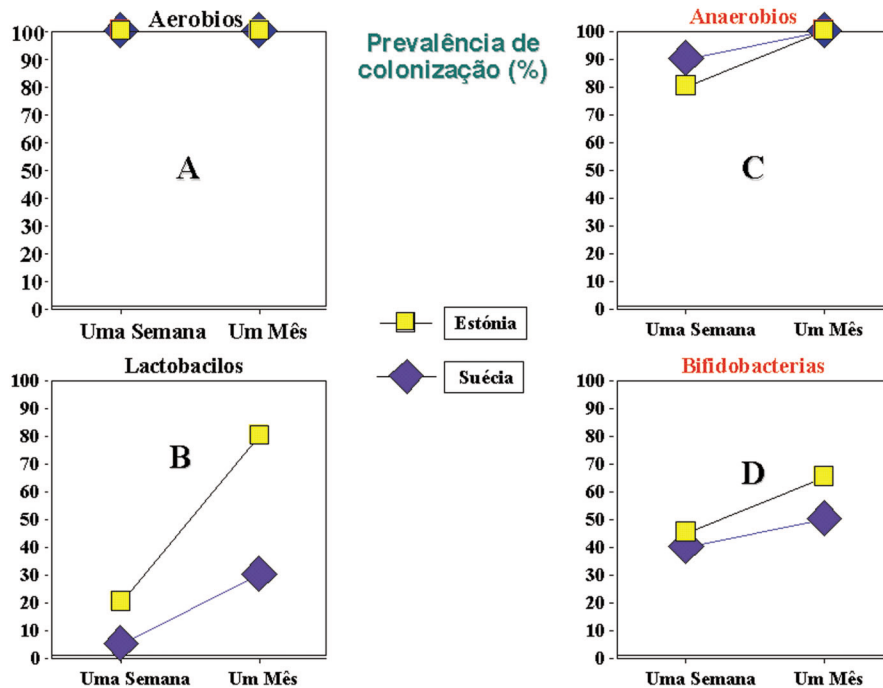


Fig. 1

Trabalhos anteriores baseiam-se em amostras biológicas colhidas num único momento da vida da criança, ou em intervalos relativamente curtos (uma semana, um mês), enquanto que o de Bergt Bjorkstén<sup>3</sup> desenvolve um estudo ao longo de doze meses com determinações analíticas à primeira semana, ao primeiro mês, aos três, seis e doze meses de vida, em crianças alérgicas e não alérgicas da Estónia e da Suécia.

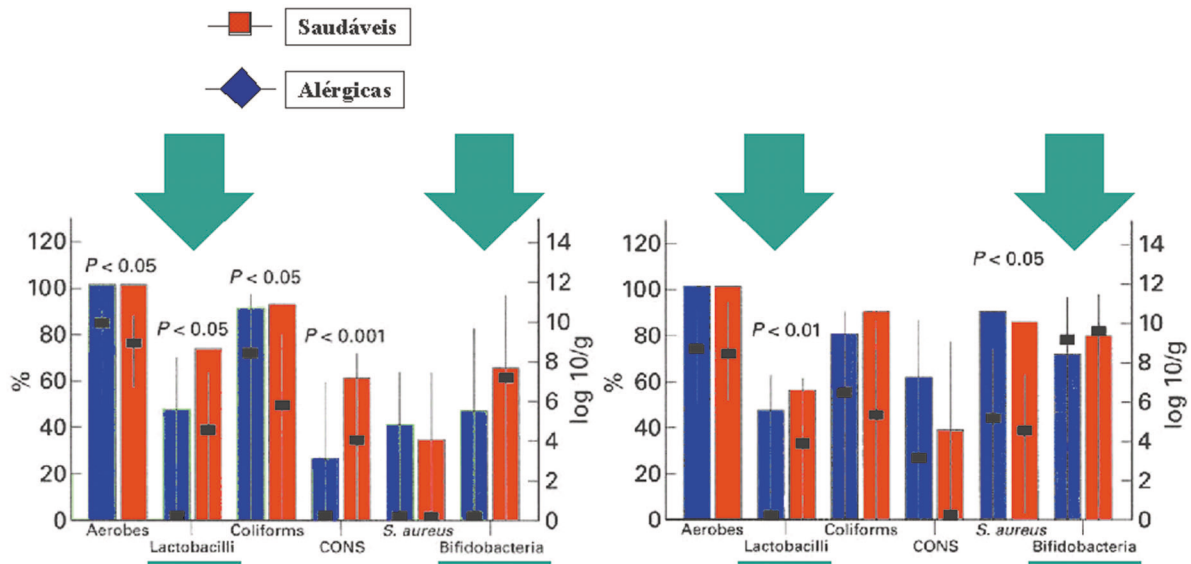
Os resultados expressos nas figuras 3 para alguns componentes da microflora intestinal, revelam uma diferença de informação, consoante se utilize a prevalência de colonização (%), ou a intensidade de colonização (contagens em CPU log/g). Na verdade, há uma maior prevalência de crianças alérgicas colonizadas pelos lactobacilos,

mais notória à primeira semana e que se esbate ao sexto e décimo segundo mês. Mas se utilizarmos a informação obtida por contagens, as alérgicas têm menos lactobacilos à primeira semana, mais ao primeiro e ao terceiro mês, semelhante ao sexto e muito mais ao décimo segundo mês.

Quanto às bifidobactérias, a prevalência da colonização é muito inferior nos alérgicos, para todas as idades estudadas (salvo ao sexto mês em que é mais próxima), em contraste com as contagens, sempre muito semelhantes, mas também sempre superiores nos alérgicos.

Da mesma forma, quanto aos clostrídios, é evidente a discrepância de resultados, por exemplo, à primeira semana (nos alérgicos maior

## Microflora Intestinal de Crianças da Estónia e Suécia



De BJÖRKSTÉN, B. et al. - Clin Exp Allergy 1999; 29:342-346.

Os resultados estão apresentados por média de colonização (%; colunas) e contagens (log CFU/g, média e mediana).

Fig. 2

prevalência e menor contagem), aos três meses (menor prevalência e maior contagem) e aos doze meses (maior prevalência e menor contagem).

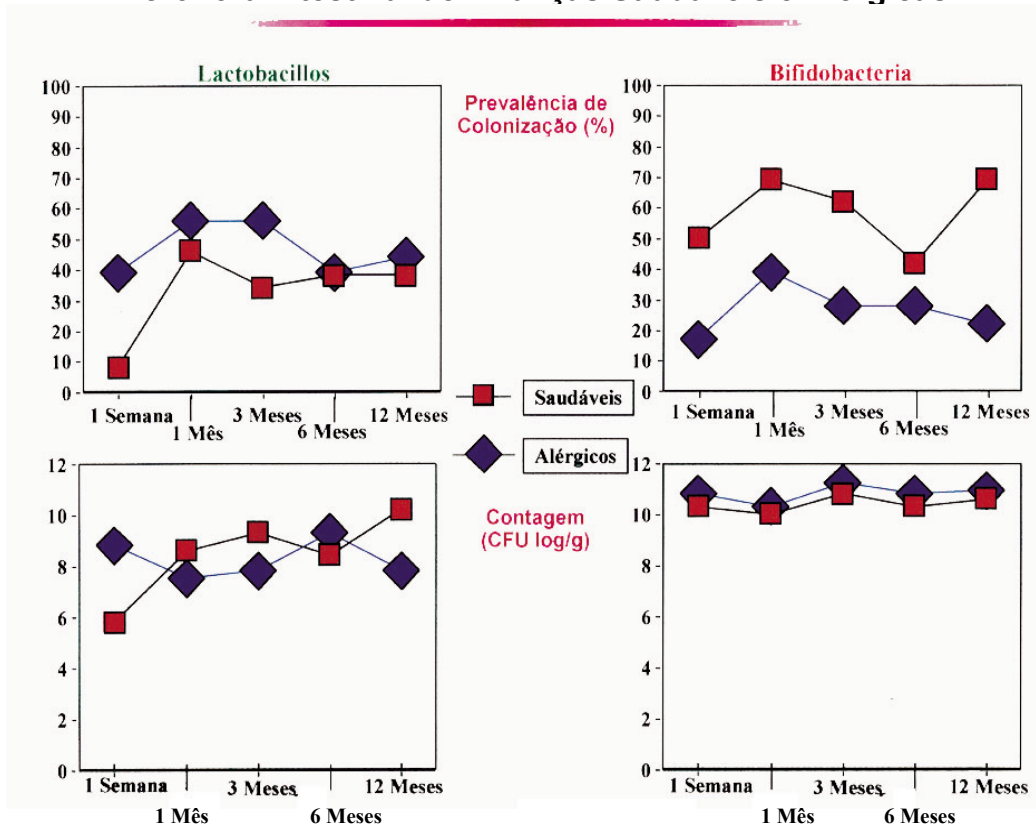
Como interpretar esta diversidade de informação?

Podemos pensar que, por exemplo, aos três meses, os alérgicos associam-se à menor oportunidade de serem colonizados por clostrídios, embora as crianças colonizadas tenham uma alta contagem destes microrganismos. Sendo assim, é mais importante estimular a oportunidade de colonização, ou a quantidade de colónias presentes individualmente?

Tratando-se de um grupo misto (Estónia e Suécia), não poderão ser as diferenças geográficas que tenham ditado a diferença na prevalência (por exemplo, terem sido colonizadas as crianças Estonianas e não as Suecas?)

Dos vários estudos realizados nesta área e considerando os distintos padrões de microflora intestinal encontrados em recém-nascidos, com atopia e sem atopia, um grupo de autores concluiu que os métodos de cultura bacteriológicos provaram ser insensíveis no estudo das modificações da microflora, sendo por isso, novas metodologias necessárias para aumentar o

### Microflora Intestinal de Crianças Saudáveis e Alérgicas



Adaptado de BJÖRKSTÉN, B. et al *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108 (4): 516-520

Fig. 3

conhecimento sobre a diversidade microbiana a nível do intestino<sup>6</sup>.

Os ácidos gordos celulares, por exemplo, representam componentes estruturais das membranas celulares bacterianas, e quando analisada uma amostra fecal, por cromatografia de gás líquido é avaliado o perfil de todas as bactérias presentes na amostra permitindo uma comparação sensível entre as diferentes amostras. Este tipo de avaliação permitiu, a alguns autores verificarem que recém-nascidos (com 3 semanas) atópicos e não-atópicos, apresentam diferenças estatisticamente significativas no perfil de ácidos

gordos, o que não foi detectado pelo método clássico de cultura de bactérias. Para detectar a bactéria responsável por esta discrepância foi aplicado outro método recente, quantitativo, designado por FISH (“Fluorescente in situ Hybridization”), verificando os autores que a relação bifidobacteria/clostridia se encontrava reduzida nos indivíduos atópicos quando comparados com os não atópicos. Esta diferença era à custa de uma baixa contagem de bifidobactérias e maior número de clostrídios<sup>6</sup>.

Este estudo demonstrou o possível papel da microflora intestinal na regulação e desenvol-

vimento dos mecanismos protectores da atopia. Em relação à hipótese da higiene é possível considerar que os comensais presentes no recém-nascido proporcionam o despoletar dos primeiros sinais de defesa relativamente ao estabelecimento de atopia, sendo estes, mais tarde, fortalecidos pelo estímulo dos microrganismos do ambiente com os quais se contacta ao longo da vida. Este mecanismo promove uma resposta imunitária polarizada para Th1, diminuindo as respostas Th2. Este tipo de desvio poderá ser mediado parcialmente por duas estruturas das bactérias, os lipopolissacarídeos e o motivo CpG do DNA bacteriano<sup>6</sup>, que promovem uma resposta predominantemente Th1. Paralelamente, o papel protector das infecções no desenvolvimento de alergias surge pelos efeitos de restrição das células Th2, através das citocinas sintetizadas durante a resposta à infecção<sup>3</sup>.

A microflora, particularmente a intestinal, pode representar (como se entende dos vários estudos realizados), uma das principais forças para uma maturação “normal” das funções imunológicas<sup>19</sup>. É assim necessário que se realizem estudos nesta área para se clarificar, por exemplo, a idade em que ocorre a colonização intestinal e a prevalência das infecções intestinais. No entanto a contribuição dos factores genéticos e da dieta, podem condicionar a activação da mucosa intestinal e no caso concreto dos indivíduos alérgicos aumentar ou pelo contrário restringir a atopia<sup>13</sup>.

Como é que a mucosa intestinal se torna tão importante na correcta maturação do sistema imunitário?

Pelo contacto permanente com antígenos presentes na alimentação, por exemplo, e também com a microflora intestinal. Estes antígenos estimulam o sistema imunitário através de células especializadas presentes no epitélio intestinal, as células M. As células M, transportam os antígenos do lúmen intestinal para o interior da mucosa e apresentam, na sua estrutura, uma

invaginação profunda, ou bolso, que se encontra preenchido por células do sistema imunoinflamatório com as quais os antígenos entram em contacto: Linfócitos T (LT), Linfócitos B (LB) e Macrófagos. Assim, o tecido linfóide presente ao longo do trato intestinal contacta com os microrganismos que se encontram neste compartimento, não só pelos LT e LB mas também através das células dendríticas, que produzem em resposta à flora microbiana IL-23, que por sua vez tem um papel importante na defesa do hospedeiro contra bactérias invasivas, pela sua capacidade de manter uma resposta por células Th1 de memória, actuando directamente nos linfócitos CD4+ de memória.

Para além do balanço Th1/Th2, outros mecanismos têm sido responsabilizados por este efeito. É o caso das células CD4+ que expressam a cadeia a do receptor da IL-2 (CD25). O mecanismo pelo qual actuam parece envolver a produção de TGF- $\beta$ , que à semelhança da produção da IL-10 sintetizada por células reguladoras, monócitos e macrófagos, diminui a progressão de patologia alérgica em modelos experimentais. A produção destas citocinas aumenta nas doenças infecciosas e possivelmente contribuem para diminuir as complicações destas infecções. Em suma, os resultados sugerem que os agentes infecciosos estimulam a produção de células reguladoras, cujos efeitos se estendem para além da resposta aos microrganismos, regulando a resposta Th1/Th2<sup>1</sup>.

Outro mecanismo com relevância na influência da infecção na alergia é a competição antigénica, em que a resposta imunitária em relação a um antígeno diminui por uma resposta imunitária concomitante contra um outro antígeno não relacionado com a primeira resposta. A competição antigénica pode afectar a produção de anticorpos (incluindo a IgE) e as respostas imunes mediadas por células<sup>1</sup>.

Finalmente, ainda um outro mecanismo



possível neste binómio infecção/alergia está relacionado com os TLRs ("Toll-like Receptors"), que são receptores para vários componentes bacterianos, entre os quais o motivo CpG do DNA bacteriano. Quando os TLRs se ligam aos ligandos bacterianos estimulam as células mononucleares a produzir citocinas da vertente Th1, através de um processo dependente do factor nuclear-kB (NF-kB) o que pode diminuir a resposta alérgica<sup>15, 21</sup>.

É esta interface, bactérias intestinais sistema imunitário das mucosas, que permite uma defesa dos microrganismos patogénicos e um estímulo para o sistema imunitário. Necessariamente, o sistema imunitário das mucosas precisa de estar em equilíbrio, sem o que a maturação do sistema imunitário e a defesa do organismo poderão ser postas em causa<sup>20</sup>.

A relação entre a redução da incidência de doenças infecciosas e o aumento da incidência de patologia alérgica, por um lado, e o aparente efeito protector das infecções em relação a estas patologias mediadas pela resposta imunitária, por outro lado, conduzem à necessidade de comprovar esta evidência epidemiológica e de aumentar os estudos em relação a possíveis meios terapêuticos nesta área.

O ecossistema intestinal pode ser modulado não só por antibióticos mas também por extractos bacterianos, e particularmente por probióticos (microrganismos ingeridos vivos e capazes de influenciar a fisiologia do hospedeiro)<sup>11, 12</sup>, assim como por derivados moleculares de micobactérias e lipopolissacarídeos. Os probióticos podem ser tomados em formulações farmacêuticas ou na própria alimentação, e os dados dos diferentes trabalhos realizados fortalecem a promessa de uma aproximação terapêutica, que deve no entanto ainda ser considerada numa base experimental.

O mecanismo exacto pelo qual actuam os probióticos mantém-se em especulação. Parece

provável que os probióticos actuem na prevenção primária da atopia pela sua capacidade de inverterem o aumento da permeabilidade intestinal que as crianças atópicas apresentam, aumentando também a resposta específica por IgA, habitualmente diminuída na atopia. Os probióticos reestruturam ainda a microecologia do intestino normal, assim como aumentam a síntese de TGFβ (Transforming Growth Factor β) e de IL-10 *in vivo*. Estas citocinas anti-inflamatórias têm um papel crucial na prevenção do aparecimento de patologia atópica e no tratamento da doença estabelecida, sendo que as modificações induzidas pelas estirpes específicas presentes nos probióticos modificam a fisiologia e a imunologia do hospedeiro<sup>7</sup>.

O segredo da imunoterapia pode estar no tempo de administração<sup>15</sup>, mas nem todos os organismos probióticos têm efeitos similares e nem todas as alergias partilham a mesma patogenia. Outras perguntas que precisam de resposta são a dose e a duração dos tratamentos e, ainda, se um único ou diversos microrganismos, darão a melhor resposta.

A importância da microflora na maturação do sistema imunitário, o potencial efeito benéfico da microflora em particular da intestinal no controlo da atopia, têm conduzido à necessidade de tentar reproduzir as doenças infecciosas contra as quais temos vindo a lutar eficazmente nas últimas décadas.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med.* 2002; 347(12):911-31.
2. 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.
3. 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;108:516-20.
4. Holgate ST, Arshad SH, editors. *The Year in Allergy – 2003.* Ox-

- ford: Clinical Publishing Services; 2003.
5. Holt PG, Jones CA. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy*. 2000;55:688-97.
  6. 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;107:129-34.
  7. 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; 357:1076-79.
  8. Linneberg A, Nielsen NH, Madsen F, Frølund L, Dirksen A, Jørgensen T. Pets in the home and the development of pet allergy in adulthood. The Copenhagen Allergy Study. *Allergy* 2003;58:21-6.
  9. Liu AH, Murphy JR. Hygiene hypothesis: Fact or fiction? *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:471-8.
  10. Mallia P, Johnston SL. Respiratory Viruses: do they protect from or induce asthma? *Allergy*. 2002;57:1118-29.
  11. Marteau P. Role of the intestinal flora in gastrointestinal diseases. *Lancet*. 356(Suppl 1).
  12. Matricardi PM, Björkstén B, Bonini S, Bousquet J, Djukanovic R, Dreborg S, et al. Microbial products in allergy prevention and therapy. *Allergy*. 2003;58:461-71.
  13. Matricardi PM, Rosmini F, Rioldino S, Fortini M, Ferrigno L, Rapicetta M, Bonini S. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *Br Med J*. 2000; 320:412-7.
  14. Maziak W. Endotoxin and Asthma. *N Engl J Med*. 2003; 348(2):171-2.
  15. Murch SH. Toll of allergy reduced by probiotics. *Lancet*. 2001; 357:1057-9.
  16. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA, editors. *Medical Microbiology*. 4th ed. St. Louis, Missouri: Mosby; 2002. p. 78-81.
  17. Perzanowski MS. Endotoxin and Asthma. *N Engl J Med*. 2003; 348(2):172.
  18. Sepp E, Julge K, Vasar M, Naaber P, Björkstén B, Mikelsaar M. Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants. *Acta Paediatr*. 1997;88:956-61.
  19. Sepp E, Naaber P, Voor T, Mikelsaar M, Björkstén B. Development of intestinal microflora during the first month of life in Estonian and Swedish infants. *Microbial Ecol Health Dis*. 2000;12:22-6.
  20. Uhlig HH, Powrie F. Dendritic cells and the intestinal bacterial flora: a role for localized mucosal immune responses. *J Clin Invest*. 2003;112:648-51.
  21. Zasloff M. Antimicrobial peptides in health and disease. *N Engl J Med*. 2002; 347(15):1199-200.