

TERAPIA BATTERICA: RAZIONALE ED EVIDENZE IN AMBITO ALLERGOLOGICO

Francesco Di Piero

Velleja Research, Direttore Scientifico e Ricerche, Milano

PREMESSA

Si è soliti definire “reazione di ipersensibilità” una risposta immunitaria eccessiva e dannosa per l’ospite, in grado di provocare danni tissutali e patologie gravi. Frutto della risposta umorale e/o cellulo-mediata dell’organismo ad un determinato antigene, esogeno o endogeno, le reazioni da ipersensibilità vengono raggruppate in: ipersensibilità di tipo I (anafilattoide); ipersensibilità di tipo II (citotossica); ipersensibilità di tipo III (da immunocomplessi) e ipersensibilità di tipo IV (ritardata) (1). In senso stretto, le reazioni atopiche come asma bronchiale, rinite allergica e dermatite atopica, corrispondono a reazioni di ipersensibilità di tipo I e risultano tutte essere T *helper* 2 (Th2)-mediate (2). I linfociti T *helper* (CD3⁺/CD4⁺) *naive*, presentano sulla carta quattro diversi possibili destini. Possono cioè evolvere a Th1, Th2, Th17 e Treg. Tra i quattro diversi *subset* (Fig. 1), le popolazioni CD3⁺/CD4⁺ di tipo 1 e 2 sono sicuramente le più note ed investigate. In termini funzionali, la risposta Th1 è ritenuta idonea a contrastare i microrganismi intracellulari, la risposta Th2 appare invece fondamentalmente costituita per contrastare patogeni extra-cellulari come i metazoi (3, 4). Pur essendo stati scoperti in tempi più recenti, i Th17 sembrerebbero invece principalmente coinvolti nella risposta immunitaria rivolta a contrastare batteri extra-cellulari e funghi (5). Risposte anormali di tipo Th1 sono sicuramente causa di patologie autoimmuni, così come quelle di tipo Th2 sono responsabili delle manifestazioni atopiche. Allo stesso modo si ritiene che Th17 siano almeno concausa in alcune reazioni autoimmunitarie di tipo sperimentale e nelle malattie croniche infiammatorie intestinali. I Treg risultano invece essere il *subset* foriero di tolleranza e omeostasi immunitaria (6). Per evolvere a Treg infatti un T *naive* deve essere sottoposto, in assenza totale di segnali pro-infiammatori, alla sola presenza di TGF- β (7). Al contrario, la concomitanza di messaggi pro-

infiammatori, come ad esempio la presenza di IL-6, associati a TGF- β , determina l'evoluzione a Th17. Se la risposta avviene in presenza di IFN- γ , la cellula evolve a Th1. In presenza di IL-4, il destino dei naive è invece quello di diventare dei Th2. L'evoluzione nei quattro diversi *subset* appare, *in vitro*, assolutamente polarizzata. Quindi, ad esempio, l'evoluzione di una risposta immunitaria verso una forte componente di tipo Th1 impedisce una concomitante risposta di tipo Th2. Lo stesso tipo di polarizzazione della risposta appare evidente anche nell'uomo (8).

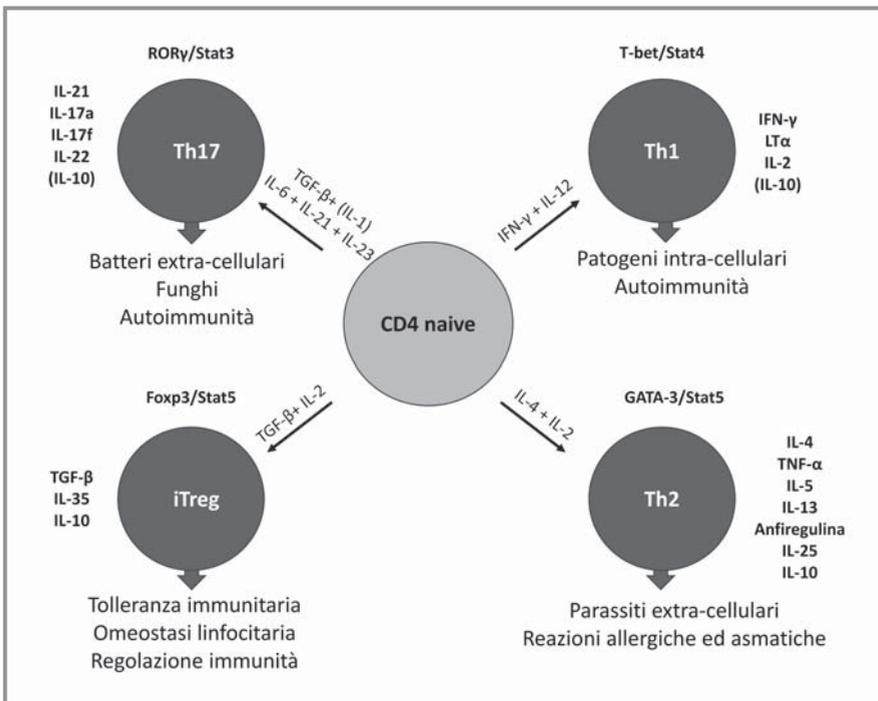


Figura 1: I principali *subset* di T helper (2).

I MEDIATORI DELLO SVILUPPO DI UNA RISPOSTA Th2

Come precedentemente anticipato, le cellule Th2, preposte funzionalmente a mediare una risposta efficace contro parassiti ed elminti, si rendono responsabili tanto dell'induzione quanto della persistenza di asma e allergie. Le cellule Th2 producono IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-25 e

anfiregulina. L'IL-4, tra queste, riveste sicuramente un ruolo predominante. Non solo costituisce *feedback* positivo per la stessa differenziazione ed amplificazione in cellule Th2 (9, 10) ma è anche il maggior mediatore coinvolto nello *switch* verso la produzione di IgE nelle cellule B (11). Le IgE, precedentemente prodotte in seguito ad un primo contatto delle cellule con l'allergene, si legano al recettore specifico, FcεRI, posto sulla membrana di basofili e mastociti. In seguito ad un'interazione ligando-recettore di tipo multivalente capace di determinare il *cross-linking* di più recettori FcεRI, mastociti e basofili degranulano (Fig. 2) rilasciando nei tessuti diversi mediatori attivi, come istamina e serotonina, e conducendo alla produzione di diverse citochine pro-infiammatorie quali IL-4, IL-13, e TNF-α (*Tumor Necrosis Factor α*). In numerose reazioni atopiche, come ad esempio in quella asmatica, anche gli eosinofili giocano un ruolo certamente rilevante. Nella risposta Th2 il reclutamento degli eosinofili avviene attraverso il rilascio di IL-5 (12). Anche l'IL-9 è coinvolta nel processo. Oltre ad avere effetto su mastociti e sugli stessi linfociti Th2, l'IL-9 induce la produzione di mucina nelle cellule epiteliali durante lo svolgersi della reazione allergica (13). L'IL-10, prodotta dalle cellule Th2, sopprime invece la risposta Th1 polarizzando la reazione immunitaria verso uno sviluppo di tipo Th2 (14) e abrogando le funzioni delle cellule dendritiche (15). L'IL-13, che funzionalmente parlando dovrebbe essere il reale effettore del processo di espulsione degli elminti, nel corso di una risposta allergica

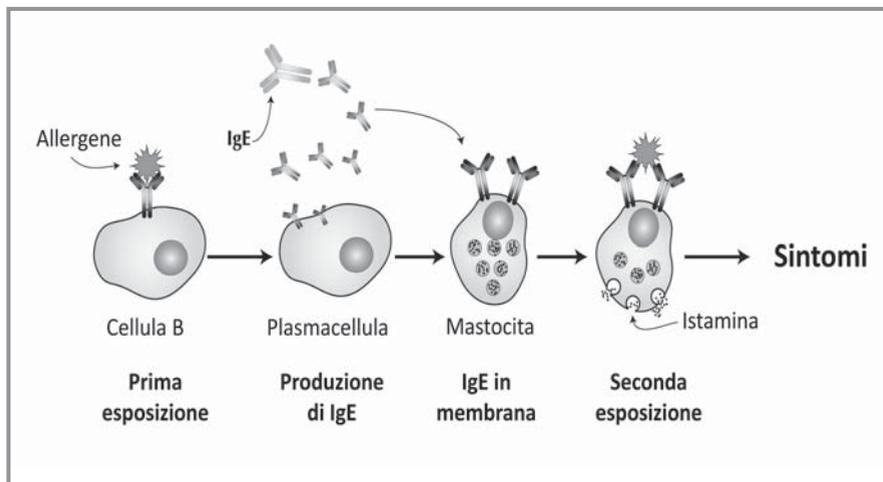


Figura 2: Sviluppo della risposta allergica.

diventa invece il principale mediatore dell'ipersensibilità delle vie aeree (16, 17). L'anfiregulina è invece una sostanza che fa parte della famiglia degli EGF (*Epidermal Growth Factor*) ed è ritenuta essere un normale mediatore di proliferazione cellulare. In sua assenza però l'espulsione dei nematodi è gravemente ritardata (18) e in sua presenza, almeno nel corso di una reazione allergica, si induce, e ne viene aggravata, l'ipersensibilità delle vie aeree. Infine, l'IL-25. È una citochina coinvolta nello sviluppo della risposta allergica dove ha un ruolo sia come fattore d'iniziazione che come fattore di amplificazione della risposta Th2 (19-21).

EPIDEMIOLOGIA DEL FENOMENO ATOPICO

Nel 2005, nell'ambito dello studio SIDRIA-2, si decise di valutare la prevalenza di asma bronchiale, rinite allergica ed eczema atopico nei bambini (6-7 anni) e negli adolescenti (13-14 anni) italiani (22). La tabella 1 illustra la distribuzione della prevalenza percentuale di asma, rinite ed eczema nei bambini e negli adolescenti. I dati dello studio dimostravano una prevalenza di manifestazioni patologiche Th2-mediate compresa tra il 9 e il 21%. Oltre ad essere notevolmente frequenti, le sindromi allergiche sono, se si considerano gli ultimi decenni, in continuo aumento. Le cause di tale aumento sono però più probabilmente di ordine ambientale che non genetico in quanto, un incremento così notevole in un così breve arco di tempo non può essere sospinto da mutazioni del materiale nucleare. Basti pensare che nel giro di un secolo la prevalenza di atopia è aumentata di oltre 20 volte! Addirittura nei soli USA tra il 1999 e il 2009, una sola decade, l'incidenza di asma nella popolazione generale è salita del 15% (23). I fattori ambientali più importanti e potenzialmente coinvolti

Tabella 1

Prevalenza (%) di asma, rinite allergica ed eczema atopico nei bambini (6-7 anni) e negli adolescenti (13-14 anni) italiani

Diagnosi	6-7 anni	13-14 anni
Asma bronchiale	9,3	10,3
Rinite allergica	12,3	20,9
Eczema atopico	15,9	11,9

Studio SIDRIA-2 (22).

nel fenomeno sembrano essere principalmente quelli *outdoor* (polluzione ambientale, ozono, traffico veicolare ed esposizione all'allergene) e quelli *indoor* (fumo di tabacco, polluzione domestica, allergeni domestici e stile di vita) ma quelli di tipo "personale" hanno sollevato recentemente i maggiori interrogativi. Recenti studi, ad esempio, hanno dimostrato che i bambini che abitano in ambienti rurali, dove vengono allevati animali, sono meno soggetti ad allergie (24). Nelle famiglie numerose è inoltre evidente un minore tasso di allergici. In particolare gli ultimogeniti sono più protetti, probabilmente per il ruolo svolto dalle infezioni acquisite dai fratelli maggiori (25). Abbastanza certamente quindi, questi aspetti, di natura in qualche modo "infettiva", giocano un ruolo rilevante come possibile fattore causale responsabile dell'incremento della prevalenza e dell'incidenza di asma e allergie. Il concetto di minor esposizione microbica, tipico delle società moderne, è oggetto, da tempo, di studio per molti Autori. Tra questi un certo David Strachan alla fine degli anni 80 cercò di studiare in particolare il rapporto tra la dimensione della famiglia e lo sviluppo del disturbo atopico. I suoi risultati lo portarono a sviluppare la famosa "teoria dell'igiene" nel 1989 (26). Oggi, "l'ipotesi del microbiota" estende la più semplice "teoria dell'igiene" e punta maggiormente il dito sul ruolo dei microbi, un tempo ritenuti semplici commensali, che risiedono dentro e sopra il corpo umano (27). Effettivamente studi sperimentali, eseguiti principalmente sul topo, ma anche alcune osservazioni cliniche indicano, nel loro insieme, come l'assenza di alcune tipologie di batteri commensali, principalmente bifidobatteri, come anche la somministrazione di alcuni specifici probiotici, più spesso bifidobatteri, influenzi le manifestazioni allergiche e come tale fenomeno sia tanto più evidente quanto più precocemente tali modifiche prendano luogo. Si parla infatti di un cosiddetto "periodo finestra" corrispondente a circa 21 giorni nel topo e a circa 100 giorni nell'uomo (28).

IL RUOLO DOMINANTE ED ANTINFIAMMATORIO DEI BIFIDOBATTERI

Pur restando assolutamente valida l'ipotesi della finestra temporale nella quale le modifiche del microbiota determinano le conseguenze maggiori, un ruolo apparentemente dominante espresso dai bifidobatteri sembrerebbe esprimersi anche in situazioni, su base allergica, dove il malato è invece un adulto. Un recente lavoro ha chiaramente dimostrato una ridotta presenza di bifidobatteri nel microbiota intestinale di soggetti

con una diagnosi di asma di vecchia data (29). I bifidobatteri, secondo numerosi Autori, costituirebbero quindi per certi versi l'ago della bilancia utile a distinguere situazioni di salubrità da situazioni di malattia (30). In particolare, oltre alla già lungamente discussa e dimostrata atopia, una disbiosi centrata sui bifidobatteri predisporrebbe o potrebbe essere causa di sindrome del colon irritabile (31), malattia infiammatoria cronica intestinale (32), celiachia (33) ed obesità (34). Per quanto possa sembrare banale dirlo, tali patologie dimostrano sicuramente tutte, a mo' di comun denominatore, una componente infiammatoria. La stessa obesità, ma anche situazioni di sindrome metabolica o di steatosi epatica non alcolica, vengono infatti oggi descritte come patologie sostenute da stati di infiammazione subclinica o di basso grado (35). Da cosa, in patologie in fondo così diverse tra loro come atopia e obesità, potrebbe essere causato il comune "rumore di fondo" pro-infiammatorio? E soprattutto, che relazione sussisterebbe tra il tono infiammatorio sub-clinico e i bifidobatteri presenti nel microbiota intestinale? Se in un modello di microbiota colonico vengono aggiunti vari tipi di batteri probiotici, si osserva come, soprattutto nel caso dei bifidobatteri, la presenza dei ceppi esogeni riduca la permeazione intestinale di lipolisaccaride (LPS) e la conseguente presenza periferica di TNF- α (36). È come se la presenza dei bifidobatteri avesse il potere di ridurre il tono pro-infiammatorio generato naturalmente nel sistema. In effetti l'uso di ceppi di bifidobatteri isolati dalle feci di bambini sani ha dimostrato di poter ridurre l'infiammazione TNF- α -mediata e LPS-indotta (37). Come è noto l'LPS è una sostanza di rivestimento esterno presente nei batteri Gram-negativi. Questi, nell'intestino, corrispondono soprattutto al gruppo dei *Bacteroidetes* e dei *Proteobacteria*. Sono anche presenti però come *Negativicutes* (*Dialister* ad esempio) all'interno del phylum dei *Firmicutes*. L'LPS liberato dai batteri morti, come qualunque altra sostanza presente nel lume, può potenzialmente permeare l'intestino e raggiungere la circolazione. Più è importante il fenomeno, la permeazione, e maggiore sarà l'infiammazione indotta. Una volta permeato, l'LPS si coniuga con la proteina LBP. Il complesso LPS/LBP si lega quindi al recettore CD14 presente sulla membrana dei macrofagi. In seguito a tale contatto il macrofago si attiva e comincia a rilasciare TNF- α (Fig. 3). Forse vale la pena interrogarsi sul come i bifidobatteri possano disinnescare tale processo. Possiamo fare almeno due diverse ipotesi. Primo. Un microbiota con un numero consistente di bifidobatteri necessariamente presenterà altri phylum a numerosità ridotta. Se la numerosità dei bifidobatteri impatta ed è a discapito di *Bacteroidetes* e/o dei *Proteobacteria* e/o dei *Negativicutes*,

allora una quantità minore di LPS verrà rilasciata in seguito a morte batterica e si osserverà necessariamente la comparsa di un minor tono infiammatorio TNF- α -mediato. In effetti sappiamo che l'uso di antibiotici in fase neonatale, riduce la diversità batterica nel microbiota, a discapito degli *Actinobacteria* (bifidobatteri) e in favore di specie Gram-negative, e a questo segue la comparsa di infiammazione sub-clinica e fenotipo obeso (Fig. 4).

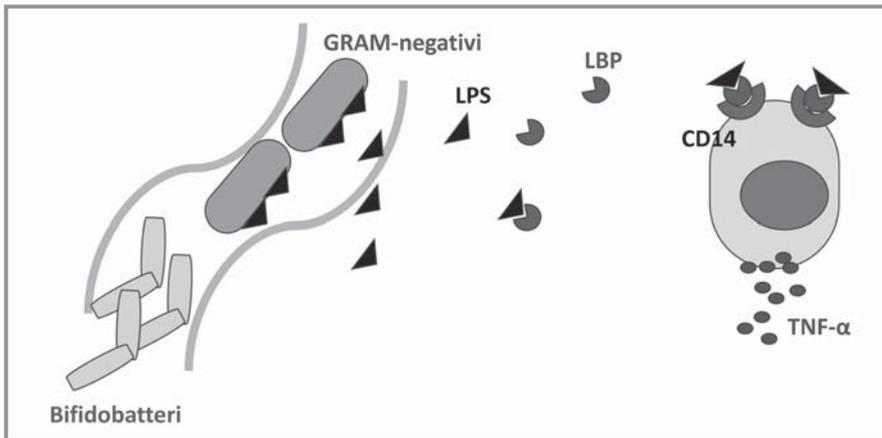


Figura 3: Permeazione di LPS; interazione LPS/LBP/macrofago e rilascio di TNF- α .

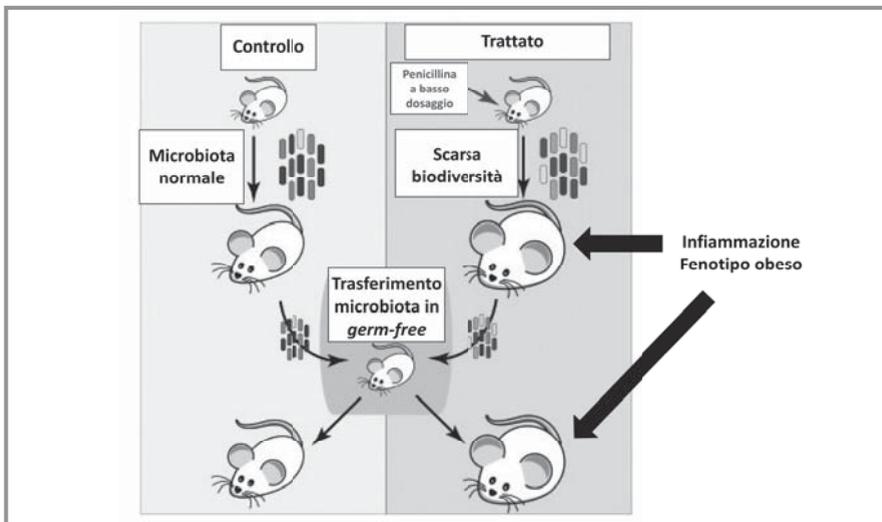


Figura 4: Riduzione della biodiversità, infiammazione di basso grado ed obesità.

Il fenomeno ampiamente descritto nel topo (38) sembrerebbe rivestire un ruolo potenziale anche nell'uomo (39). Secondo. La presenza cospicua di bifidobatteri nel microbiota potrebbe "irrobustire" le giunzioni serrate e quindi ridurre la permeazione di LPS. Questo aspetto è stato investigato da numerosi Autori ed oggi sappiamo con relativa certezza che l'eubiosi mediata da una corretta presenza di bifidobatteri è in grado di irrobustire effettivamente le giunzioni serrate (40).

TERAPIA BATTERICA CON BIFIDOBATTERI

Se l'assenza di bifidobatteri, attraverso lo svolgersi delle reazioni mediate prima dall'LPS e poi dal TNF- α , incrementa gli stati di infiammazione sub-clinica e se questo a sua volta provoca la comparsa di affezioni come atopia e obesità, la somministrazione di bifidobatteri a soggetti obesi o atopici ne riduce la manifestazione patologica? Per quanto concerne l'obesità, il fenomeno è stato osservato fino ad ora, con successo, solo in modelli sperimentali di tipo murino (41). Gli studi sull'uomo in questo senso sono numericamente molto scarsi ed è davvero troppo presto per giudicarne l'efficacia. Per quanto concerne invece le manifestazioni atopiche, le valutazioni cliniche nelle quali è stata saggiata l'opzione probiotica sono state davvero numerose (42). Sulla base però di tali valutazioni è difficile giungere ad una conclusione. Le preparazioni sembrano mostrare un qualche effetto, ad esempio sulla dermatite atopica, ma questo risulta essere piuttosto variabile in dipendenza di numerosi fattori come ad esempio il ceppo usato, la tempistica della somministrazione, la durata della terapia e il dosaggio scelto per il probiotico.

IL CEPPO BB12 NELLA MANIFESTAZIONE ATOPICA

Nel 2002 un gruppo di ricerca finlandese aveva osservato che la somministrazione di *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB12 (DSM 15954) in neonati con diagnosi precoce di dermatite atopica e familiarità per la manifestazione allergica, aveva modificato il microbiota intestinale. Tale modifica era rappresentata da un'importante azione di contrasto alla crescita, attesa nei soggetti atopici, dei *Bacteroides* (Gram-negativi appartenenti al *phylum* dei *Bacteroidetes*), dalla riduzione di *Escherichia coli* (batterio Gram-negativo appartenente al *phylum* dei *Proteobacteria*)

e dalla crescita della quota di *Enterococcus* e lattobacilli (entrambi Gram-positivi appartenenti al *phylum* dei *Firmicutes*) (43). La somministrazione di BB12 aveva cioè prodotto una situazione in grado di determinare una riduzione del potenziale rilascio di LPS e dello stimolo infiammatorio. Sulla base di queste osservazioni si pensò allora di verificare l'impatto clinico di una somministrazione di BB12 in neonati di circa 4 mesi di vita con diagnosi di dermatite atopica. Il risultato fu davvero rilevante. La somministrazione del ceppo dopo soli due mesi determinò l'azzeramento dello SCORAD (*SCORing Atopic Dermatitis*) (Fig. 5). Al contrario, nel placebo, lo SCORAD non si modificò in alcun modo. Alla riduzione dello SCORAD si accompagnò un'evidente riduzione delle risposte mediate dai CD4 e dagli eosinofili (44). Come già anche ipotizzato in precedenza, diversi sono i possibili meccanismi che è possibile chiamare in causa per spiegare l'effetto clinico, anti-atopia, osservato con il ceppo BB12. Sicuramente la riduzione percentuale di un microbiota foriero di LPS (*Bacteroidetes* e *Proteobacteria*) in favore di popolazioni Gram-positive (*Firmicutes* a *Actinobacteria*) ci aiuta ad ipotizzare una riduzione dello stato d'infiammazione sub-clinica.

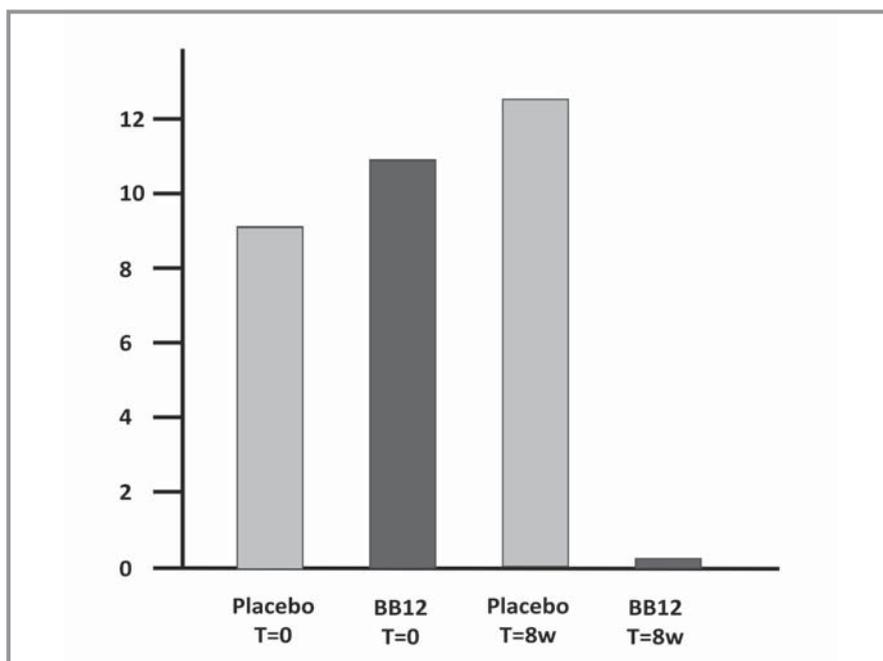


Figura 5: SCORAD in neonati atopici trattati con il ceppo BB12. Adattato da: (44).

Va nella medesima direzione l'osservazione di come la somministrazione di BB12 incrementi in maniera significativa la solidità delle giunzioni serrate. È possibile misurare in questo senso l'azione del BB12 attraverso la lettura della resistenza elettrica transepiteliale colonica che risulta particolarmente aumentata proprio in relazione alla somministrazione del ceppo in questione (45).

Oltre a questi due aspetti però, anche quelli di modulazione immunitaria devono essere presi in forte considerazione. Già nel 2010 era stato osservato come il BB12 promuovesse una risposta di tipo Th1 (46). In seguito, oltre a questa modulazione venne osservata anche la precisa polarizzazione verso un fenotipo anti-Th2 (47). È quindi probabile che l'effetto osservato nei neonati con eczema atopico sia dovuto a due fenomeni principali coesistenti: primo, la riduzione dei fenomeni di infiammazione sub-clinica, a loro volta prodotti da una riduzione percentuale delle popolazioni foriere di LPS e da un irrobustimento delle giunzioni serrate coloniche, e, secondo, la genesi di una polarizzazione della risposta T *helper* in favore di una di tipo Th1 e avversa ad una di tipo Th2.

ENTEROCOCCHI, NATURALI POTENZIANTI L'AZIONE ANTI-ATOPICA DEI BIFIDOBATTERI

Recenti dati sembrano indicare anche negli enterococchi una possibile azione, più indiretta di quella giocata dai bifidobatteri, anti-Th2. I bambini allergici, rispetto ai sani, hanno infatti un microbiota eccessivamente abbondante in termini di *Bacteroides* per i primi 6 mesi di vita; appaiono drammaticamente poveri in bifidobatteri almeno fino al compimento del primo anno di età; risultano infine più modesti rispetto al controllo sano per quanto concerne il genere *Enterococcus*, almeno per il primo mese di vita (48). Esiste quindi una chiara correlazione negativa tra il rischio di atopia e un modesto contenuto intestinale non solo in *Bifidobacterium* ma anche in *Enterococcus*. A rafforzare il dato che correla in un certo senso in maniera biunivoca i bifidobatteri con gli enterococchi, vi è l'osservazione che la somministrazione di enterococchi a neonati, anche pretermine, eleva la presenza intestinale di bifidobatteri.

Questo fenomeno è stato ad esempio osservato somministrando il ceppo *Enterococcus faecium* L3 (LMG P-27496) (49). Sulla base di

questa osservazione è stato recentemente condotto, su soggetti allergici di età pediatrica, uno studio teso ad indagare il ruolo giocato da una somministrazione combinata dei ceppi BB12 e L3. Lo studio osservazionale, terminato nell'estate del 2017 e che ha coinvolto tra trattati e controlli circa 100 bambini, ha dimostrato che la somministrazione profilattica, 90 giorni prima del trimestre compreso tra il 15 di marzo e il 15 di giugno, di un preparato contenente i ceppi BB12 e L3 riduceva manifestazioni quali rinite, lacrimazione, tosse ed eczema rispettivamente del 42%, 48%, 33% e 66%, rispetto all'anno precedente (Tab. 2; dati riferibili agli 11 soggetti sui quali è stata terminata l'analisi statistica). Allo stesso modo (Tab. 3, N=11) una valutazione, eseguita nel medesimo trimestre, relativa all'impiego dei farmaci per il controllo dei sintomi, dimostrava una riduzione mai inferiore al 70% per ciò che concerne antistaminici, cortisonici e agonisti β -2 (50).

Tabella 2

Sintomatologia* riferibile al periodo 15 marzo-15 giugno in assenza di profilassi (2016) e nello stesso periodo ma dopo 90 giorni di profilassi con BB12/L3 (2017)

Sintomo	2016	2017	$\Delta\%$	p
Rinite	2,4 \pm 0,9	1,4 \pm 0,8	-42	<0,05
Lacrimazione	1,7 \pm 1,4	0,9 \pm 1,1	-48	<0,05
Tosse	1,8 \pm 0,4	1,2 \pm 1,4	-33	<0,05
Eczema	3	1	-66	n.s.

*Media \pm deviazione standard; n.s. = non significativo.

Tabella 3

Giorni di trattamento* farmacologico riferibile al periodo 15 marzo-15 giugno in assenza di profilassi (2016) e nello stesso periodo ma dopo 90 giorni di profilassi con BB12/L3 (2017)

Farmaco	2016	2017	$\Delta\%$	p
Antistaminico	39,6 \pm 36,5	11,6 \pm 24,4	-71	<0,05
Cortisonico	28,5 \pm 33,7	11,4 \pm 25,3	-60	<0,05
Beta-2	5,2 \pm 8,6	1,7 \pm 3,1	-67	<0,05

*Media \pm deviazione standard.

CONCLUSIONI

Allo stato attuale delle conoscenze possiamo ipotizzare che la perturbazione del microbiota, soprattutto se in una fase precoce della vita, determinante la genesi di un microbiota ricco di specie batteriche "infiammatorie" come quelle appartenenti ai *Proteobacteria* e ai *Bacteroidetes* oppure ricco di specie di *Firmicutes* con caratteristiche più ambientali che intestinali, come stafilococchi e streptococchi, ma anche in cui sono presenti *Firmicutes* Gram-negativi come i *Negativicutes* ed invece povero di specie batteriche appartenete a generi noti per le loro caratteristiche antinfiammatorie, *Bifidobacterium*, possa condurre ad un aumento del rischio di manifestare, anche in età adulta, patologie come l'asma, le allergie e le dermatiti atopiche. La somministrazione di alcuni ceppi di bifidobatteri ha dimostrato di poter contrastare alcune forme di malattia atopica. L'osservazione che un intestino povero di enterococchi, nelle sue fasi iniziali, possa associarsi allo sviluppo di atopia, ha spinto alcuni Autori a valutare la capacità di modulazione del microbiota susseguente alla somministrazione di enterococchi in neonati, anche pretermine. Il dato osservativo dimostra come i neonati trattati con enterococchi aumentino la quota endogena di bifidobatteri. Ceppi clinicamente testati e risultati responsabili di un'azione combinata di tipo anti-atopico sono il *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB12 e l'*Enterococcus faecium* L3.

BIBLIOGRAFIA

1. Wong M. What has happened in the last 50 years in immunology. *J Paediatr Child Health* 2015; 51(2): 135-9.
2. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: Fates, functions, and faults. *Blood*. 2008; 112 (5): 1557-1569.
3. Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-73.
4. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994; 76 (2): 241-51.
5. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006; 24 (6): 677-88.
6. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155 (3):1151-64.
7. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; 198 (12): 1875-86.

8. Milner JD, Brenchley JM, Laurence A et al. Impaired T(h)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature* 2008; 452 (7188): 773-6.
9. Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* 1990; 172 (3): 921-9.
10. Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 1990; 145 (11): 3796-806.
11. Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Köhler G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 1993; 362 (6417): 245-8.
12. Coffman RL, Seymour BW, Hudak S, Jackson J, Rennick D. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 1989; 245 (4915): 308-10.
13. Longphre M, Li D, Gallup M, Drori E et al. Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 1999; 104 (10): 1375-82.
14. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170 (6): 2081-95.
15. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683-765.
16. Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 425-56.
17. Urban JF Jr, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Madden KB, Morris SC, Collins M, Finkelman FD. IL-13, IL-4, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity* 1998; 8 (2): 255-64.
18. Zaiss DM, Yang L, Shah PR, Kobie JJ, Urban JF, Mosmann TR. Amphiregulin, a Th2 cytokine enhancing resistance to nematodes. *Science* 2006; 314 (5806): 1746.
19. Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 2001; 15 (6): 985-95.
20. Angkasekwinai P, Park H, Wang YH et al. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. *J Exp Med* 2007; 204 (7): 1509-17.
21. Fallon PG, Ballantyne SJ, Mangan NE et al. Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *J Exp Med* 2006; 203 (4): 1105-16.
22. Sestini P, De Sario M, Bugiani M et al. Frequency of asthma and allergies in Italian children and adolescents: results from SIDRIA-2. *Epidemiol Prev* 2005; 29 (2): 24-31.
23. Fact sheet: asthma's impact on the nation. CDC: Centres for Disease Control and Prevention. 2015.
24. von Mutius E, Vercelli D. Farm living: effects on childhood asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* 2010; 10 (12): 861-8.
25. Burke W, Fesinmeyer M, Reed K, Hampson L, Carlsten C. Family history as a predictor of asthma risk. *Am J Prev Med* 2003; 24 (2): 160-9.
26. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Br Med J* 1989; 299 (6710): 1259-60.
27. Shreiner A, Huffnagle GB, Noverr MC. The "Microflora Hypothesis" of allergic disease. *Adv Exp Med Biol* 2008; 635: 113-34.
28. Russell SL, Gold MJ, Hartmann M et al. Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *EMBO Rep* 2012; 13 (5): 440-7.

29. Hevia A, Milani C, López P et al. Allergic Patients with Long-Term Asthma Display Low Levels of *Bifidobacterium adolescentis*. *PLoS One* 2016; 11 (2): e0147809.
30. Tojo R, Suárez A, Clemente MG et al. Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J Gastroenterol* 2014; 20 (41): 15163-76.
31. Staudacher HM, Whelan K. Altered gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome and its modification by diet: probiotics, prebiotics and the low FODMAP diet. *Proc Nutr Soc* 2016; 75 (3): 306-18.
32. Maukonen J, Kolho KL, Paasela M et al. Altered Fecal Microbiota in Paediatric Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis* 2015 Dec; 9 (12): 1088-95.
33. Nardone G, Compare D, Rocco A. A microbiota-centric view of diseases of the upper gastrointestinal tract. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017; 2 (4): 298-312.
34. Gao X, Jia R, Xie L, Kuang L, Feng L, Wan C. Obesity in school-aged children and its correlation with gut *E. coli* and *Bifidobacteria*: a case-control study. *BMC Pediatr* 2015; 15: 64.
35. Al Rifai M, Silverman MG, Nasir K et al. The association of nonalcoholic fatty liver disease, obesity, and metabolic syndrome, with systemic inflammation and subclinical atherosclerosis: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* 2015 Apr; 239 (2): 629-33.
36. Rodes L, Khan A, Paul A et al. Effect of probiotics *Bifidobacterium* on gut-derived lipopolysaccharides and inflammatory cytokines: an in vitro study using a human colonic microbiota model. *J Microbiol Biotechnol* 2013; 23 (4): 518-26.
37. Khokhlova EV, Smeianov VV, Efimov BA et al. Anti-inflammatory properties of intestinal *Bifidobacterium* strains isolated from healthy infants. *Microbiol Immunol* 2012; 56 (1): 27-39.
38. Cox LM, Yamanishi S, Sohn J et al. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell* 2014; 158 (4): 705-721.
39. Korpela K, de Vos WM. Antibiotic use in childhood alters the gut microbiota and predisposes to overweight. *Microbial Cell* 2016; 3 (7): 296-298.
40. De Palma G, Kamanova J, Cinova J et al. Modulation of phenotypic and functional maturation of dendritic cells by intestinal bacteria and gliadin: relevance for celiac disease. *J Leukoc Biol* 2012; 92 (5): 1043-54.
41. Nova E, Pérez de Heredia F, Gómez-Martínez S, Marcos A. The Role of Probiotics on the Microbiota: Effect on Obesity. *Nutr Clin Pract* 2016; 31 (3): 387-400.
42. Rather IA, Bajpai VK, Kumar S, Lim J, Paek WK, Park YH. Probiotics and *Atopic Dermatitis*: An Overview. *Front. Microbiol* 2016; 7: 507: 1-7.
43. Kirjavainen PV, Arvola T, Salminen SJ, Isolauri E. Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning? *Gut* 2002; 51: 51-55.
44. Isolauri E, Arvola T, Sutas Y, Moilanen E, Salmine S. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 2000; 30 (11): 1604-10.
45. Commane DM, Shortt CT, Silvi S, Cresci A, Hughes RM, Rowland IR. Effects of fermentation products of pro- and prebiotics on trans-epithelial electrical resistance in an in vitro model of the colon. *Nutr Cancer* 2005; 51 (1): 102-9.
46. Lopez P, Gueimonde M, Margolles A, Suarez A. Distinct *Bifidobacterium* strains drive different immune responses in vitro. *Int J Food Microbiol* 2010; 138: 157-165.
47. Chattha KS, Vlasova AN, Kandasamy S et al. Divergent immunomodulating effects of probiotics on T cell responses to oral attenuated human rotavirus vaccine and virulent

- human rotavirus infection in a neonatal gnotobiotic piglet disease model. *J Immunol* 2013; 191 (5): 2446-56.
48. Björkstén B, Sep 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): 516-520.
 49. Lo Skiavo LA, Gonchar NV, Fedorova MS, Suvorov AN. Dynamics of contamination and persistence of *Clostridium difficile* in intestinal microbiota in newborn infants during antibiotic therapy and use of probiotic strain *Enterococcus faecium* L3. *Antibiot Khimioter.* 2013; 58 (11-12): 13-8.
 50. Di Pierro F, Colombo M. Role of strains BB12 and L3 in controlling symptoms of atopy in children. *Int J Gen Med* 2017; submitted.