



Analisi della risposta in vitro alla β -lattoglobulina in bambini allergici alle proteine del latte vaccino con diverso outcome clinico

Loredana Chini¹
Stefania Corrente^{1,2}
Simona Graziani¹
Elisabetta Del Duca¹
Viola Giovinazzo¹
Valeria Avarino¹
Viviana Moschese¹

¹ U.O.S.D Immunopatologia ed Allergologia Pediatrica, Policlinico Tor Vergata, Università degli Studi di Roma Tor Vergata; ² UOC Pediatria Azienda Ospedaliera San Camillo Forlanini, Roma

Parole chiave: *allergia alle proteine del latte vaccino, β -lattoglobulina, proliferazione T cellulare*

Abstract

L'allergia alle proteine del latte vaccino (APLV) è una delle più comuni allergie alimentari nell'infanzia. Le più importanti proteine coinvolte nell'APLV in età pediatrica sono α -caseina, α -lattoalbumina e β -lattoglobulina. L'80% dei bambini diventa tollerante entro il sesto anno di vita; tuttavia nel 15% dei bambini l'allergia persiste. I meccanismi responsabili della risposta immune nei bambini con APLV, soprattutto in quelli affetti da forme non IgE mediata ed in quelli che non raggiungono la tolleranza, al momento attuale, non sono completamente noti. Nel nostro studio abbiamo valutato la risposta immunologica T mediata agli allergeni maggiori delle PLV (caseina, α -lattoalbumina e β -lattoglobulina) in un gruppo di 22 bambini affetti da APLV con diverse condizioni cliniche e diverso outcome di malattia e, in 3 bambini selezionati con un lungo follow up, abbiamo correlato l'outcome clinico con quello immunologico. Dei 22 bambini con APLV, 13/22 sono tuttora allergici e 9/22, con storia pregressa di APLV, sono attualmente tolleranti. Il 73% dei bambini, sia quelli allergici alle PLV (RA) sia quelli che hanno acquisito la tolleranza (RR), è risultato responder (R), ovvero ha mostrato proliferazione specifica delle cellule T verso la BLG, con indice di proliferazione maggiore nei bambini RA rispetto a quelli RR. La proliferazione, molto elevata al momento della diagnosi, mostra un trend di riduzione in concomitanza con l'acquisizione della tolleranza clinica mentre i valori restano alti con il persistere della sintomatologia allergica. Questi dati, seppur limitati ad un numero esiguo di pazienti, suggeriscono che la proliferazione T cellulare allergene specifica potrebbe rappresentare un marker per valutare l'acquisizione della tolleranza, soprattutto nei bambini a rischio di reazioni anafilattiche. I nostri dati mostrano, inoltre, che l'indice di proliferazione è significativamente maggiore nei pazienti allergici con forma di tipo non IgE mediata suggerendo che, in assenza di altri criteri diagnostici (prick test e IgE specifiche), nei bambini con forma non IgE mediata, la presenza di un alto indice di proliferazione cellulare-allergene specifico potrebbe essere, in associazione alla storia clinica, un parametro utile per una conferma diagnostica.

Introduzione

L'allergia alle proteine del latte vaccino (APLV) è una delle più comuni allergie alimentari nell'infanzia. La sua prevalenza varia a seconda dell'età, tra l'1,8% e il 7,5%, con maggiore frequenza nei primi anni di vita¹. Clinicamente può manifestarsi con sintomi quali eczema, costipazione, diarrea, malassorbimento, asma e in soggetti particolarmente sensibili, provocare anche anafilassi. L'80% dei bambini diventa tollerante entro il sesto anno di vita. Tuttavia nel 15% dei pazienti l'allergia persiste^{2,3}.

La diagnosi di APLV si basa sul dato anamnestico di relazione tra assunzione di un particolare alimento e insorgenza di una specifica sintomatologia e su test allergologici (skin prick test e/o dosaggio di IgE specifiche) di sostegno. Il gold standard è rappresentato però da test di scatenamento dopo dieta di eliminazione diagnostica.

Corrispondenza

Loredana Chini
Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Policlinico Tor Vergata
viale Oxford, 81
00133 Roma
E-mail: chini@med.uniroma2.it



Le più importanti proteine coinvolte nell'APLV in età pediatrica sono α -caseina, α -lattoalbumina e β -lattoglobulina ⁴.

È noto che le risposte allergiche sono in genere caratterizzate da prevalente attivazione di cellule con fenotipo Th2 rispetto a quello Th1 e da una ridotta risposta di cellule T regolatorie (Treg).

In particolar modo, i subsets CD4+CD25+Foxp3+ e T regolatori di tipo 1 (Tr1) sono coinvolti nel controllo della risposta Th2 ⁵. È stato infatti dimostrato che c'è una maggiore frequenza di linfociti Tr1 allergene-specifici, rispetto ai linfociti Th2 allergene-specifici nei soggetti non allergici rispetto ai soggetti allergici ⁶. Le cellule mononucleate di bambini con allergia alle PLV, se stimolate da proteine del latte vaccino, producono inoltre un livello maggiore di citochine infiammatorie (TNF- α , IL-10 e IL-12) rispetto ai soggetti non allergici ⁷ e pazienti con o senza persistente allergia al latte differiscono per la presenza di linfociti T regolatorie ⁸. Questi risultati indicano chiaramente che il bilancio T regolatori/Th2 è un elemento chiave dello sviluppo delle risposte allergiche, anche nelle APLV.

Al momento attuale, non sono tuttavia completamente noti tutti i meccanismi della risposta immune nei bambini con APLV, soprattutto in quelli affetti da forme non IgE mediata ed in quelli che non raggiungono la tolleranza ⁹.

Obiettivi dello studio

Nel nostro studio abbiamo valutato la risposta immunologica T mediata agli allergeni maggiori delle PLV (caseina, α -lattoalbumina e β -lattoglobulina), in un gruppo di bambini affetti da APLV con diverse condizioni cliniche e diverso outcome di malattia. Inoltre, in alcuni bambini affetti da APLV con prolungato follow up (maggiore di 5 anni), è stato correlato l'outcome clinico con quello immunologico.

Pazienti

Abbiamo reclutato 22 bambini con storia di APLV, 11 maschi e 11 femmine con età tra 11 e 164 mesi (età media 53 mesi), 13/22 tuttora allergici e 9/22 con una storia pregressa di APLV, attualmente tolleranti.

Sono stati esclusi dallo studio bambini con: - immunodeficienza, tumore, malattia infiammatoria cronica intestinale, malattia autoimmune o metabolica.

I pazienti dei 2 gruppi sono stati poi suddivisi in base al tipo di reazione allergica, IgE mediate e non IgE mediate.

Si definisce reazione IgE mediata quella caratterizzata da uno skin prick test positivo (> 3 mm) o valore di IgE (> 0,35 UI/ml), per almeno una proteina delle PLV.

9/13 bambini con APLV hanno una forma IgE mediata, mentre 4/13 non IgE mediata. 4/9 bambini attualmente tolleranti per APLV avevano avuto una forma IgE mediata e 5/9 non IgE mediata.

In tutti i 22 pazienti è stata valutata la risposta proliferativa T cellulare all' α -lattoalbumina, β -lattoglobulina e caseina. La risposta proliferativa è stata inoltre analizzata in relazione alla presenza o meno di IgE specifiche.

Le principali caratteristiche demografiche cliniche e di laboratorio dei bambini studiati sono riportati in Tabella I.

Infine, in 3/22 pazienti (P3, P9, P10), affetti da APLV, con diversi outcome di malattia e con un lungo follow up (superiore ai 5 anni), abbiamo correlato l'andamento clinico con i dati immunologici.

In sintesi i 3 pazienti: P3(LR), bambina di 8 anni, con pregressa allergia alle PLV non IgE mediata, insorta al 7° mese di vita e migliorata con dieta di eliminazione. Dopo un anno di dieta, ha acquisito una tolleranza parziale (latte cotto) ed infine la tolleranza completa.

P9 (FV), ragazza attualmente di 13 anni, con pregressa allergia IgE mediata comparsa all'età di 4 mesi, migliorata con dieta di eliminazione. Dopo alcuni anni ha raggiunto una tolleranza parziale (parmigiano e latte cotto) ed infine la tolleranza completa.

P10 (CS), bambina di 8 anni che, dall'età di 4 mesi, ha presentato sintomi di allergia alle PLV IgE mediata, migliorata con dieta di eliminazione. Non ha ancora raggiunto la tolleranza. Sia un test di provocazione orale con latte cotto che un'assunzione occasionale di parmigiano hanno provocato anafilassi.

In tutti e 3 i pazienti, la risposta proliferativa alle PLV è stata valutata durante la fase di allergia (T1). Per P9 e P3 i dati relativi al tempo 2 (T2) e tempo 3 (T3) corrispondono ai momenti di parziale e completa remissione; per P10, T2 corrisponde al momento della reazione anafilattica durante il challenge e T3 subito dopo la reazione anafilattica per ingestione accidentale di PLV.

Tabella I. Caratteristiche della coorte totale dei 22 pazienti al momento dell'arruolamento: pazienti con APLV (da P1 a P13) e pazienti con pregressa APLV (da P14 a P22).

Paziente	Sesso	Età (mesi)	Familiarità per atopìa	Ige-mediata	Sintomi	Responder a PLV*
P1	F	11	Si	No	Dermatite, Orticaria	No
P2	M	15	Si	Si	Dermatite, Diarrea	No
P3**	F	19	Si	No	Scarso accrescimento, Diarrea	Si
P4	M	28	No	No	Diarrea	Si
P5	F	46	Si	Si	Orticaria, Anafilassi, Asma	Si
P6	F	50	Si	Si	Orticaria, Vomito	Si
P7	F	46	Si	Si	Dermatite	Si
P8	M	133	Si	Si	Dermatite, Asma	Si
P9**	M	91	Si	Si	Anafilassi, Asma, Orticaria	Si
P10**	F	125	Si	Si	Dermatite, Asma	Si
P11	M	88	Si	No	Dermatite	No
P12	M	164	No	Si	Angioedema, Asma	No
P13	F	89	No	Si	Dermatite, Scarso accrescimento	Si
P14	M	22	Si	No	Dermatite	Si
P15	M	19	Si	Si	Dermatite	Si
P16	F	26	No	Si	Vomito	Si
P17	M	67	No	Si	Dermatite, Angioedema	Si
P18	M	48	No	No	Dermatite, Angioedema	Si
P19	F	56	Si	No	Diarrea, Scarsa crescita	Si
P20	F	57	Si	No	Dermatite, Dolore addominale	No
P21	F	71	Si	No	Orticaria, Vomito	No
P22	M	73	Si	Si	Dermatite, Asma	No

*Responder: sono definiti tutti i pazienti con un valore di Indice di Stimolazione > media+2SD

**Pazienti selezionati: P3 e P9 divenuti tolleranti durante il Follow Up. P10 tuttora con APLV.

Nei pazienti, P9 e P10, abbiamo poi valutato anche la produzione di citochine da parte dei PBMC stimolati dalle PLV a T1 e nel follow-up. Come controlli sono stati reclutati 13 bambini sani *age-matched*.

Materiali e metodi

Preparazione cellulare e risposta proliferativa

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) dei bambini selezionati, sono state separate dal sangue periferico attraverso il metodo di centrifugazione Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

Nei 22 pazienti arruolati è stata valutata la risposta proliferativa T dopo stimolazione dei PBMC alle PLV estrattive α -lattoalbumina (ALA), β -lattoglobulina (BLG) e α -caseina (ACA). I PBMC dei pazienti sono stati stimolati con gli estratti delle tre proteine, utilizzate ad una concentrazione finale di 10-50 μ g/ml, e messi in coltura per 7 giorni. Dopo 7 giorni di coltura, la proliferazione dei PBMC è stata valutata tramite incorporazione di 3 H-Timidina. La concentrazione ottimale delle PLV è stata stabilita sulla base della curva dose-risposta effettuata in 3 esperimenti preliminari nei quali i PBMC dei pazienti sono stati stimolati con dosi crescenti delle PLV estrattive (1-1000 μ g/ml). Per escludere che tali risposte fossero dovute ad una contaminazione dei

preparati con endotossine (potenti attivatori delle cellule presentanti l'antigene), le 3 PLV sono state precedentemente testate per la presenza di LPS tramite LAL-test e sono risultate contenere un livello di endotossine inferiore a 10 EU/ml, valore che ci ha permesso di escludere che le risposte osservate fossero aspecifiche. Sulla base della risposta proliferativa, sono stati definiti "responders" tutti i pazienti con un valore di Indice di Stimolazione (SI: cpm PBMC stimolati con PLV/cpm PBMC non stimolati) \geq media + 2SD di quello ottenuto per i controlli sani (SI = 1,5). Su tale base sono stati stabiliti i seguenti cut off: 2,5; 2,4; 1,7 rispettivamente per α -lattoalbumina, β -lattoglobulina e α -caseina.

Produzione delle citochine

Nei pazienti P9 e P10, sono stati determinati dai soprannatanti raccolti dalla coltura dei PBMC, utilizzando la tecnica BIOPLEX (BioRad, Hercules, CA, USA), i livelli di citochine IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IFN- γ , TNF- α IL-17. Tale valutazione nei due pazienti (P9 e P10), è stata correlata al dato clinico-anamnestico e al follow up.

Risultati

Risposta proliferativa T cellulare

15/22 pazienti (68%) presentano una risposta proliferativa alle 3 principali proteine del latte: α -lattoalbumina (ALA), β -lattoglobulina (BLG) e caseina (ACA) e sono stati pertanto definiti Responders (R).

Il 73% dei R (11/15) risulta soprattutto responsivo alla BLG (Fig. 1).

La stimolazione dei PBMC dei controlli sani non ha evidenziato alcuna risposta proliferativa alle PLV estrattive. I 15 pazienti R sono stati poi suddivisi in due gruppi: pazienti tuttora allergici (RA) e pazienti in remissione (RR). L'analisi ha evidenziato che il 60% (9/15) dei R alle PLV sono bambini RA, mentre il restante 40% (6/15), pur presentando una risposta proliferativa verso le PLV, è rappresentato da pazienti con pregressa PLV cioè RR.

La comparazione tra i due gruppi, mostra che l'indice di proliferazione verso tutte e tre le PLV (ALA, BLG e ACA), pur essendo maggiore nei pazienti RA rispetto a RR, non presenta una differenza significativa (RA vr RR per ALA media 7,5 p = 0,17; RA vr RR per BLG

media 10,65 p = 0,12; RA vr RR per ACA media 1,8 p = 0,44) (Fig. 2).

Tutti i 15 pazienti R sono stati poi analizzati sulla base della positività o meno delle IgE specifiche verso le PLV. Sono stati quindi suddivisi, rispettivamente, in R IgE e R non-IgE.

Tutti i bambini R non-IgE, indipendentemente dalla condizione di RA o di RR, mostrano una proliferazione T linfocitaria maggiore verso le PLV rispetto a quelli R IgE. La differenza è significativa solo per la proteina ALA (R IgE vr R non-IgE per ALA media 10,7 p = 0,013; R IgE vr R non-IgE per BLG media 14,2 p = 0,08; R IgE vr R non-IgE per ACA media 1,6 p = 0,16) (Fig. 3).

Infine, nell'ambito dei R, abbiamo analizzato la risposta T proliferativa, separando gli RA dagli RR e, creando così 4 gruppi: responders allergici IgE e non IgE mediata (RA IgE e RA non-IgE rispettivamente) e responders in remissione IgE e non IgE mediata (RR IgE e RR non-IgE rispettivamente). Nei bambini RA non-IgE, la differenza di proliferazione è significativamente maggiore rispetto a quella degli RA IgE sia per BLG che per ALA (p = 0,0038 per BLG e p = 0,0023 per ALA). Invece, tale differenza non è significativa tra i pazienti RR non-IgE e quelli RR IgE (Fig. 4).

In tre pazienti selezionati, con un lungo follow up (P3, P9, P10), la risposta proliferativa T cellulare alla β -lattoglobulina, è stata inoltre analizzata e correlata all'andamento clinico.

In P3 e P10, con forma IgE mediata, abbiamo rilevato un alto indice di proliferazione al momento della diagnosi (T1), rispettivamente SI = 10,3 e SI = 15,7. In P9 c'è stata una graduale riduzione parallelamente alla

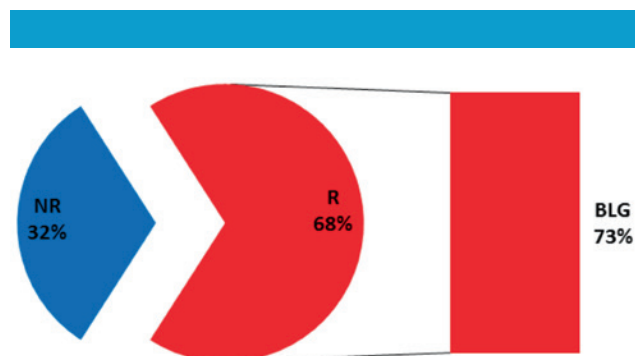


Figura 1. 15/22 (68%) pazienti con storia di APLV mostrano una proliferazione alle PLV (responders). Tra questi il 73% risulta responsivo alla β -lattoglobulina.

graduale acquisizione della tolleranza (SI = 2,5 a T2 e SI = 1,1 a T3). In P10, invece, i valori della proliferazione sono rimasti elevati nei diversi tempi (SI = 13,9 a T2 e SI = 18,7 a T3), in accordo con la sua persistente sintomatologia allergica. Nel paziente P3, affetto da una forma non IgE mediata, si è evidenziato un indice di proliferazione, al momento della diagnosi, ancora più elevato (SI = 25) che è gradualmente diminuito durante l'acquisizione della tolleranza parziale (SI = 1,9 a T2) e totale (SI = 1,1 a T3).

Analisi del profilo citochinico verso le PLV estrattive nei pazienti P9 e P10

Nei pazienti, P9 e P10, abbiamo studiato la risposta Th1, Th2 e Th17 e la produzione di citochine infiammatorie e regolatorie sui sopranatanti dei T stimolati con BLG nei diversi tempi del follow up. In P9, abbiamo osservato un decremento dei valori di IL-10, TNF- α , INF- γ e IL-17 durante la progressione nell'acquisizione della tolleranza. In P10 invece IL-10 non si è modificata, IFN- γ e TNF- α sono molto aumentati e IL-5, IL-9, IL-13 e IL-17 sono lievemente diminuiti (Fig. 6 A e B).

Discussione

La β -lattoglobulina (BLG) è la proteina del latte, non presente nel latte umano, considerata tra tutte le PLV quella con la maggiore allergenicità^{10 11}.

Il 73% dei nostri pazienti, sia quelli allergici alle PLV (RA) sia quelli che hanno acquisito la tolleranza (RR),

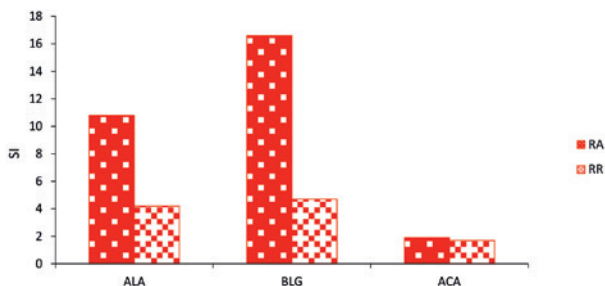


Figura 2. Risposta T proliferativa alle PLV dei 9/15 pazienti responders allergici (RA) e dei 6/15 in remissione (RR). La differenza non è significativa.

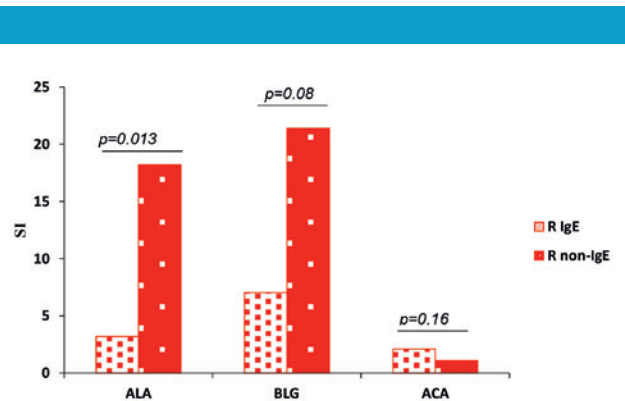


Figura 3. Indice di proliferazione alle PLV dei 15 pazienti responders con forma IgE (R IgE) e non IgE (R non-IgE). La differenza è significativa solo per la proteina ALA.

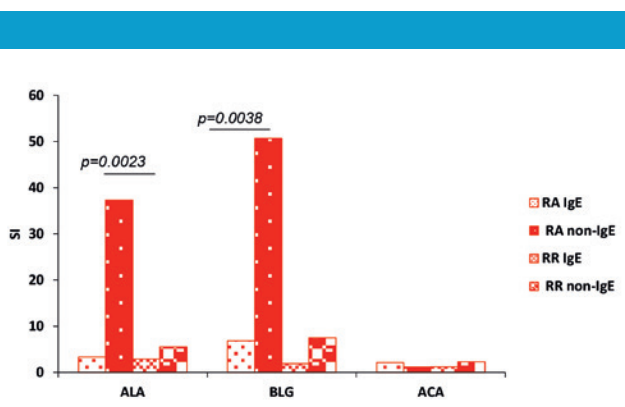


Figura 4. Correlazione tra l'indice di proliferazione alle PLV dei pazienti responders allergici (RA) e quelli in remissione (RR) e la presenza o meno di IgE specifiche. Nei RA non-IgE, la differenza di proliferazione è significativamente maggiore rispetto a quella dei RA IgE sia per BLG che per ALA.

è risultato responder (R), ovvero ha mostrato proliferazione specifica delle cellule T verso la BLG.

I pazienti RA tuttavia, hanno un indice di proliferazione maggiore rispetto a quelli RR. Tale dato è confermato anche nello studio di follow-up sui 3 pazienti selezionati. La proliferazione, molto elevata al momento della diagnosi, mostra un trend di riduzione in concomitanza con l'acquisizione della tolleranza clinica mentre si mantiene elevata con il persistere della sintomatologia allergica.

Questi dati, seppur limitati ad un numero esiguo di pazienti, suggeriscono che la proliferazione T cellulare

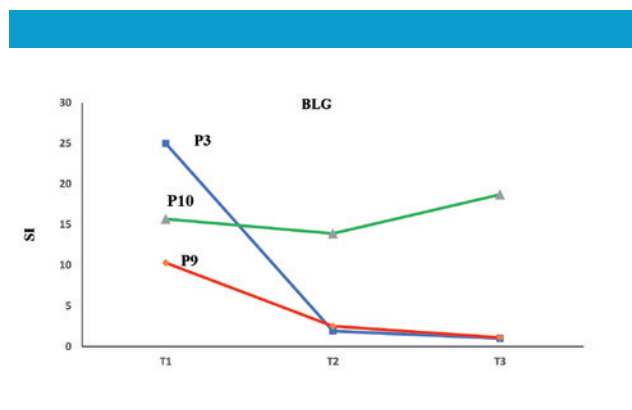


Figura 5. Risposta proliferativa specifica alla β -lattoglobulina (BLG) nei pazienti P3, P10 e P9. Durante il follow up P3 e P9 hanno acquisito una tolleranza parziale (T2) e poi completa (T3). P10 è tuttora allergico.

allergene specifica potrebbe rappresentare un marker per valutare l'acquisizione della tolleranza, soprattutto nei pazienti a rischio di reazioni anafilattiche.

Le manifestazioni allergiche possono essere IgE e non IgE mediate. In entrambe le forme, un ruolo cardine è svolto dalle cellule T, la cui attivazione rappresenta lo step iniziale per determinare il tipo di risposta immune¹². È stato riportato che l'ingestione di latte, in pazienti allergici con APLV IgE mediate, può indurre un aumento della proliferazione cellulare verso la BLG⁹.

Nel nostro studio, tutti i pazienti Responders, sia allergici che in remissione, con forme non IgE mediate hanno un indice di proliferazione verso BLG maggiore di quelli dei pazienti con forma IgE mediate. La differenza di proliferazione tra forme non IgE mediate e quelle IgE mediate diventa statisticamente significativa nel gruppo dei pazienti tuttora allergici.

Questi risultati suggeriscono che, in assenza di altri parametri quali prick test e IgE specifiche, nei bambini con forma non IgE mediate, la presenza di un alto indice di proliferazione cellulare-allergene specifico potrebbe essere, in associazione alla storia clinica, un parametro utile per una conferma diagnostica.

In questo senso potrebbero essere interpretati gli alti valori di indice di proliferazione riscontrabili nel paziente P3 al momento della diagnosi.

Inoltre l'analisi dei dati eseguita sui tre pazienti selezionati, affetti da forma severa di allergia e di cui abbiamo un lungo follow-up, conferma lo stretto legame tra andamento clinico della manifestazione allergica e

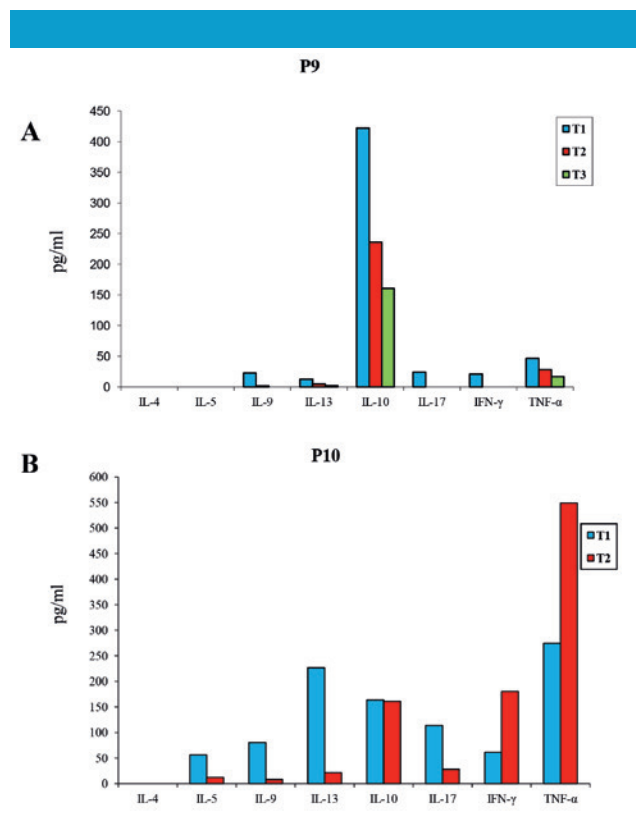


Figura 6. Produzione di citochine nei pazienti P9 e P10 durante il follow up.

risposta T proliferativa alle PLV durante le diverse fasi di malattia. Nello specifico, P9 e P3 mostrano una progressiva riduzione nella proliferazione T cellulare nei confronti della BLG, in parallelo con l'acquisizione della tolleranza; P10 invece, tuttora allergico, ha mantenuto negli anni un alto indice di proliferazione T verso PLV. Riguardo il profilo citochinico, come precedentemente descritto¹³, abbiamo trovato nel sopranatante delle colture T cellulari un più alto livello di citochine Th2 in P10 rispetto a P9. Solo la citochina IL-4 è risultata indosabile, in entrambi i pazienti. Ciò potrebbe essere dovuto al suo consumo durante il lungo periodo di coltura necessario alla procedura sperimentale.

In P9 abbiamo riscontrato, a T1, alti valori di IL-10 verosimilmente correlati ad una iniziale e imminente tolleranza. Nei controlli successivi, il declino graduale di IL-10 è andato in parallelo con la riduzione dei sintomi e con l'acquisizione della completa tolleranza. Questo dato è in accordo con precedenti studi che hanno dimostrato che IL-10 e le cellule T che producono IL-10

sono indotte precocemente durante l'induzione di tolleranza^{12,14}. In P10, invece, che tuttora non ha acquisito la tolleranza verso PLV, i livelli di IL-10 non sono cambiati durante il follow up.

La graduale riduzione di TNF α in P9 ed il suo aumento in P10 conferma che TNF α è coinvolto nella patogenesi dell'infiammazione allergica.

Il ruolo dei Th17 nell'allergia alimentare non è chiaro^{15,16}. In nostri precedenti studi su bambini allergici alle PLV, abbiamo osservato che la stimolazione di PBMC con PLV aumenta la secrezione di IL-17¹⁷ e che alti livelli di IL-17 al momento della diagnosi sembrano correlati con la persistenza della sintomatologia clinica^{13,17}. In conclusione, i nostri dati dimostrano che la proliferazione T cellulare allergene specifica, soprattutto verso BLG, e il pattern citochinico differiscono tra pazienti allergici e tolleranti.

In particolare, l'indice di proliferazione diminuisce parallelamente all'acquisizione della tolleranza. Inoltre, nei pazienti allergici alle PLV la proliferazione T cellulare è significativamente superiore nelle forme non IgE mediate.

I nostri dati, anche se preliminari, suggeriscono che la valutazione della proliferazione T cellulare BLG specifica, nei bambini allergici alle PLV, potrebbe essere di ausilio sia nella diagnosi, soprattutto nelle forme non IgE mediate, sia nella valutazione del raggiungimento della tolleranza.

Conflitto di interessi

Gli Autori dichiarano di non avere alcun conflitto di interessi rispetto agli argomenti trattati nell'articolo.

Bibliografia

- Mehaudy R, Parisi C, Petriz N, et al. Prevalence of cow's milk protein allergy among children in a university community hospital. *Arch Argent Pediatr* 2018;116:219-223.
- Nwaru BI, Hickstein L, Panesar SS, et al. Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *EAAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group. Allergy* 2014;69:992-1007.
- Skripak JM, Matsui EC, Mudd K, et al. The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:1172-7.
- Tsabori S, Douros K, Priftis KN. Cow's milk allergenicity. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2014;14:16-26.
- Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006;212:28-50. Review. Erratum in: *Immunol Rev* 2006;213:257.
- Akdis M, Verhagen J, Taylor A, et al. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 2004;199:1567-75.
- D'Apolito M, Campanozzi A, Giardino I, et al. Levels of inflammatory cytokines from peripheral blood mononuclear cells of children with cow's milk protein allergy. *Turk Pediatr Ars* 2017;52:208-212.
- Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med* 2004;199:1679-88.
- Vocca I, Canani RB, Camarca A, et al. Peripheral blood immune response elicited by beta-lactoglobulin in childhood cow's milk allergy. *Pediatr Res* 2011;70:549-54.
- Wal JM. Immunochemical and molecular characterization of milk allergens. *Allergy* 1998;53(46 Suppl):114-7.
- Kondo M, Kaneko H, Fukao T, Suzuki K, et al. The response of bovine beta-lactoglobulin-specific T-cell clones to single amino acid substitution of T-cell core epitope. *Pediatr Allergy Immunol* 2008;19:592-8.
- Tiemessen MM, Van Ieperen-Van Dijk AG, Bruijnzeel-Koomen CA, et al. Cow's milk-specific T-cell reactivity of children with and without persistent cow's milk allergy: key role for IL-10. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:932-9.
- Chini L, Pacciani V, Corrente S, et al. Kinetics of in vitro response to β -lactoglobulin in children allergic to and tolerant of cow's milk protein. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2016;26:275-7.
- Fishbein AB, Qamar N, Erickson KA, et al. Cytokine responses to egg protein in previously allergic children who developed tolerance naturally. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2014;113:667-70.
- Herberth G, Daegelmann C, Röder S, et al. IL-17E but not IL-17A is associated with allergic sensitization: results from the LISA study. *Pediatr Allergy Immunol* 2010;21:1086-90.
- Dhuban KB, d'Hennezel E, Ben-Shoshan M, et al. Altered T helper 17 responses in children with food allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2013;162:318.
- Pacciani V, Silenzi R, Corrente S, et al. Induction of Th17 after allergen stimulation in children affected by Cow's milk allergy. XIV Meeting of European Society of Immunodeficiencies (ESID), Istanbul-Turkey. P299;2010:150.