



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE**  
**XXVI CICLO DEL DOTTORATO IN**

**Scienze della Riproduzione e dello Sviluppo**  
**Indirizzo di Medicina Materno-Infantile e Perinatologia**

**TESI DI DOTTORATO**

**IMMUNOTERAPIA ORALE (OIT) NEI LATTANTI:  
POTENZIALITA' TERAPEUTICHE  
E DI PREVENZIONE  
NELL'ALLERGIA ALIMENTARE IgE-MEDIATA**

Dottorando:  
Dott.ssa Laura Badina

Coordinatore:  
prof. Giuliana Decorti

Supervisore di tesi:  
Dott. G. Longo

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

<b>1. L'ALLERGIA ALIMENTARE</b>	
<b>1.1 Definizione</b>	5
<b>1.2 Prevalenza</b>	6
<b>1.3 Storia naturale</b>	7
<b>1.4 Allergeni alimentari</b>	9
<b>1.5 Diagnosi</b>	10
<b>1.6 Terapia</b>	12
<b>2. LA TOLLERANZA ORALE</b>	
<b>2.1 Definizione</b>	15
<b>2.2 Come si acquisisce la tolleranza orale</b>	16
<b>2.3 Uptake dell'antigene nei diversi siti di entrata</b>	17
<b>2.4 Meccanismi immunologici della tolleranza</b>	19
<b>3. AGLI ALBORI DELL'ALLERGIA</b>	24
<b>3.1 Fattori "agli albori" che influenzano tolleranza o sensibilizzazione</b>	25
<b>4. LA RIVOLUZIONE "COPERNICANA": DALL' "AVOIDANCE" ALL' INTRODUZIONE PRECOCE DEGLI ALLERGENI ALIMENTARI</b>	34
<b>5. LA DESENSIBILIZZAZIONE ORALE COME STIMOLAZIONE DI TOLLERANZA</b>	38
<b>6. STUDIO "LATTANTI AL BIVIO": TRA PREVENZIONE E TERAPIA</b>	
6.1 Presupposti	41
6.2 Obiettivi	41
6.3 Materiali e Metodi	
6.4 Risultati	42
6.5 Discussione	46
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	63

## **ABSTRACT**

**Background:** International guidelines recommend elimination of offending food from the diet in case of IgE-mediated reactions and performance of an oral food challenge (OFC) after almost 9 months for assessment of tolerance onset. Nevertheless sensitization to food like cow's milk and egg usually starts during the first year of life and reaches its height during the 2nd or 3rd half-year period; thereafter a decrease is seen in most children. Therefore infants with IgE-mediated allergy to cow's milk (CM) and egg usually remain on the elimination diet for some years and in a considerable number of case food allergy became persistent. On the other hand recent evidences suggest that a prerequisite for the development of tolerance is repeated exposure to antigen.

**Aim:** to verify the hypothesis that low-dose controlled offending food intake started soon after the diagnosis of food allergy could accelerate tolerance development.

**Methods:** we performed a low-dose OFC (maximum of 10 ml of milk or 2 ml of raw egg) in 211 infants (119 male, age < 18 months) with a history of recent immediate reaction to CM or egg and resulted sensitized to milk by a positive skin-prick test (SPT) or at high-risk for CM or egg (atopic dermatitis and SPT or sIgE > PPV 95%) The tolerate dose was maintained daily at home with periodical increasing in dosage up to free milk or egg diet.

**Results:** Twenty infants (10%) were highly responsive to low-dose OFC and were excluded from the study. The study has been currently completed in 146 infants and 91% underwent a successful desensitization program and achieved a free milk or egg diet in a median time respectively of 155 days (range IQ: 123-217) and 181 days (range IQ: 136-275). An average of 1,1 adverse reaction for child occurred during desensitization program, but all were mild-moderate (grade  $\leq$  3 on the scoring scale). Increases in level of milk and egg-specific IgG4 antibody and decreases in level of milk and egg-specific IgE antibody occurred predominantly at the end of oral immunotherapy program (OIT).

**Conclusions:** OTI started at the onset of IgE-mediated CM allergy seems to be a promising approach, able to modify the natural increasing pattern of sensitization to CM and egg during the 2nd-3rd half-year period. Furthermore it seems to be easier, faster and safer to perform in infant age in respect to other analogue experiences in older children.

## **RIASSUNTO**

**Introduzione:** A fronte della diagnosi di allergia alimentare IgE-mediata le Linee Guida internazionali International raccomandano una scrupolosa dieta di eliminazione dell'alimento in causa e l'esecuzione di un test di provocazione orale (TPO) non prima dei 9-12 mesi dalla diagnosi, volto a verificare l'eventuale risoluzione spontanea dell'allergia. La sensibilizzazione allergica ad alimenti come il latte e l'uovo inizia nel primo anno di vita e raggiunge il suo massimo nel secondo anno di vita; in seguito in molti soggetti si verifica una riduzione dei livelli di IgE specifiche. Di fatti un elevato numero di bambini rimane a dieta per diversi anni e un numero sempre crescente di allergie alimentari divengono persistenti. D'altro canto numerose evidenze della letteratura evidenziano come il prerequisito fondamentale per l'acquisizione della tolleranza orale sia la persistente e ripetuta esposizione all'allergene.

**Obiettivo:** verificare l'ipotesi che l'assunzione graduale controllata dell'alimento offendente iniziata subito dopo la diagnosi di allergia alimentare possa accelerare lo sviluppo della tolleranza orale.

**Metodi:** un TPO a basse dosi (10 ml of latte vaccino or 2 ml di emulsione di uovo crudo) è stato effettuato in 211 lattanti (119 maschi; età < 18 mesi) con storia di allergia certa al latte vaccino o all'uovo (reazione immediata da ingestione e provata sensibilizzazione ai test allergometrici) o con allergia potenziale agli stessi alimenti (dermatite atopica and prick-test or IgE sp > VPP 95%). La dose tollerata al TPO è stata assunta giornalmente a domicilio con periodici aumenti di dosaggio fino al raggiungimento della dieta libera per l'alimento in causa.

**Risultati:** Venti lattanti (10%) sono stati esclusi perché già altamente reattivi al primo TPO a basse dosi. Lo studio è stato attualmente completato da 146 bambini e 91% hanno completato il protocollo di desensibilizzazione con successo. In un tempo mediano di 155 giorni (range IQ: 123-217) and 181 giorni (range IQ: 136-275). Nel corso del programma di desensibilizzazione si sono verificate in media 1,1 reazioni avverse per paziente, tutte di grado lieve-moderato. Un aumento significativo delle IgG4 sp e una importante parallela diminuzione delle IgE sp si è verificata alla fine del protocollo di immunoterapia orale (OIT).

**Conclusions:** L'OIT iniziata all'esordio dell'allergia per latte e uovo sembra essere un approccio promettente capace di modificare l'andamento inaggravante della sensibilizzazione allergica nei primi anni di vita. Inoltre appare di più facile e sicura esecuzione rispetto a esperienze analoghe nel bambino più grandicello.

## 1. L'ALLERGIA ALIMENTARE

### 1.1 Definizione

Per allergia alimentare si intende una risposta immunitaria diretta contro un antigene alimentare<sup>1</sup>. Nel 2010 la National Institutes of Allergy and Infectious Disease (NIAID) ha definito l'allergia alimentare come un "effetto avverso sulla salute che deriva da una risposta immunitaria specifica che sia riproducibile con l'esposizione a un dato antigene." La maggior parte delle allergie alimentari in età pediatrica sono IgE-mediate, sebbene esistano forme di reazione cellulo-mediata che si manifestano principalmente con sintomi gastrointestinali<sup>2</sup>.

Le reazioni Ig-E mediate sono caratterizzate dall'insorgenza acuta dei sintomi, di solito entro due ore dall'esposizione o ingestione dell'alimento trigger e possono coinvolgere tutti gli organi e i sistemi, ma più tipicamente interessano la cute, il tratto gastroenterico e respiratorio. La sensibilizzazione allergica si verifica quando le plasmacellule, che si sono differenziate a partire dai linfociti B allergene-specifici, producono degli anticorpi di classe IgE alimento specifici (IgEsp). Le IgEsp si legano alla superficie dei mastociti tissutali e basofili ematici e, in caso di nuova esposizione all'alimento in causa, le IgE sp legate alle cellule effettrici si legano a loro volta agli antigeni proteici innescando il rilascio di mediatori quali leucotrieni e prostaglandine che causano i sintomi. Ci sono soggetti con sensibilizzazione allergica, cioè produzione di IgEsp, in cui però l'esposizione antigenica non è in grado di indurre questa cascata di eventi a livello tale da tradursi in sintomi clinici. La sola sensibilizzazione non è pertanto sufficiente a definire l'allergia alimentare IgE-mediata<sup>2</sup>, benché la probabilità di sviluppare una reazione allergica sia maggiore quanto più elevate sono le IgE sp. La gravità della reazione allergica, variabile da sintomi localizzati a reazioni sistemiche gravi e talora fatali, dipende da molti fattori, oltre alla reattività individuale, quali: quantità dell'allergene ingerito, co-ingestione di più allergeni alimentari, svuotamento gastrico, tipo di preparazione dell'alimento (fresco naturale, cotto o sottoposto ad altri trattamenti). La reattività individuale può essere a sua volta influenzata da molti fattori: età, esercizio fisico, assunzione di farmaci (e.g. FANS, antiacidi), infezioni, stress e, nelle donne, il ciclo mestruale<sup>1</sup>.

Sebbene vi siano differenze geografiche nella distribuzione delle allergie alimentari, i due maggiori allergeni alimentari in età pediatrica e in tutto il mondo rimangono il latte

vaccino e l'uovo<sup>3</sup>, mentre il terzo varia in base all'area geografica: arachidi in USA e Svizzera, frumento in Germania e Giappone, noci in Spagna, sesamo in Israele<sup>4</sup> (Figura 1).

L'incidenza di anafilassi fatale in età pediatrica è di circa 6 casi ogni milione di bambini (fino ai 15 anni di età)<sup>5</sup>. La mortalità dipende dal tipo di allergene (principalmente frutta secca), età (soprattutto adolescenti e giovani adulti), asma di base mal controllato, ritardato ricorso all'adrenalina i.m., tipo di reazione (cardiovascolare o respiratoria specie se in assenza di sintomi cutanei), concomitante assunzione di alcol<sup>2</sup>.

In sintesi l'allergia alimentare, a fronte della sua imprevedibile variabilità e possibile gravità, rappresenta un importante problema di salute per i bambini e le loro famiglie e comporta inevitabilmente una modifica delle abitudini alimentari e delle interazioni sociali<sup>4</sup>.

## **1.2 Prevalenza**

L'allergia alimentare IgE-mediata costituisce un problema molto comune in età infantile che interessa circa il 4-6% dei bambini, in base alle diverse statistiche.<sup>4,6,7</sup>

L'incidenza reale dell'allergia alimentare non è nota ed è difficile da ottenere, in quanto si tratta di un fenomeno spesso sovrastimato. Confrontando la prevalenza di allergia alimentare quando riferita dal paziente con quella determinata mediante sperimentazione clinica o esito del test di provocazione orale si passa da 12% in età pediatrica e 13% in età adulta al 3% per tutte le età<sup>8</sup>.

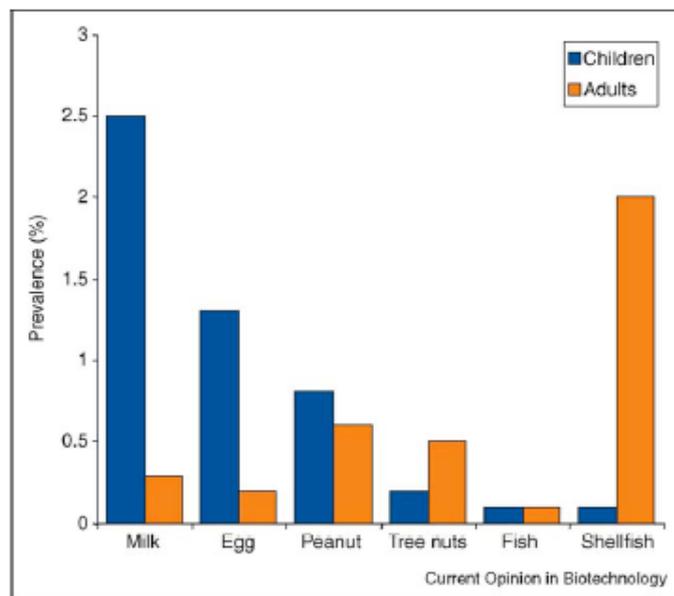
Negli ultimi decenni in tutto il mondo occidentale si è assistito a un aumento della prevalenza dell'allergia alimentare, valutata sia come aumento di richiesta di visite specialistiche<sup>9</sup> e che di ospedalizzazioni a causa di anafilassi, orticaria e angioedema<sup>10</sup> (Figura 2). Alcuni autori hanno definito questo fenomeno degli ultimi 10-15 anni come la seconda ondata epidemica di allergia, in riferimento al picco precedente registrato nell'incidenza delle allergie respiratorie (asma e rinite).<sup>11</sup> L'allergia alimentare attualmente interesserebbe più del 10% dei bambini nei primi 3 anni di vita<sup>12</sup> e sembra essere più persistente nel tempo rispetto a quanto accadeva per le generazioni precedenti.<sup>11</sup>

Nel tentativo di identificare strategie a contenere questa "epidemia", l'attenzione, specie recentemente, è stata rivolta alla comprensione dei meccanismi alla base delle allergie alimentari ed in particolare alla base dello sviluppo della tolleranza orale.

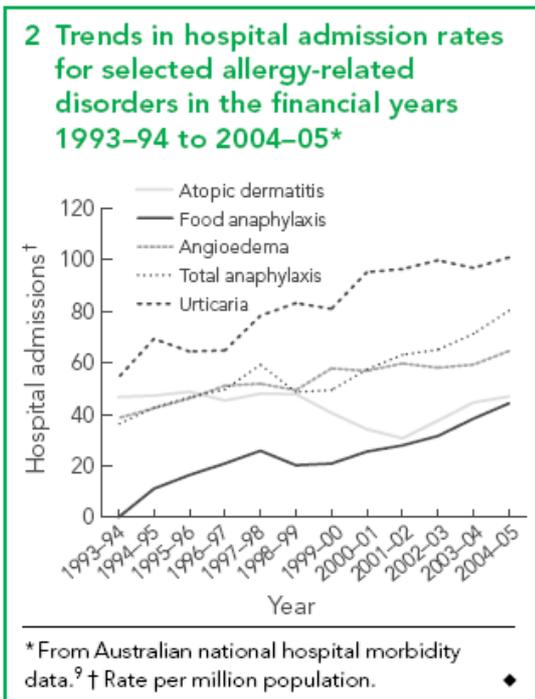
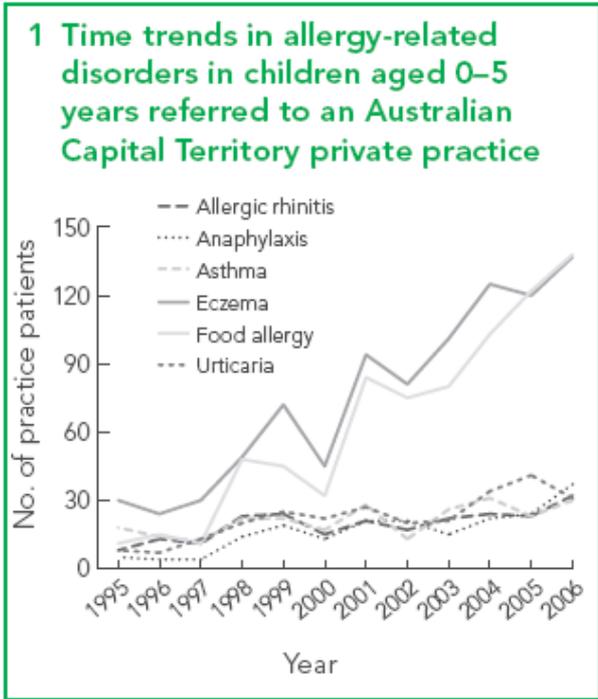
### 1.3 Storia naturale

La storia naturale alla base delle allergie alimentari è un processo “dinamico” che differisce a seconda di ciascun allergene ed attualmente è parzialmente nota l’evoluzione nel tempo dell’allergia alimentare nei soggetti mantenuti in dieta di eliminazione per l’alimento offendente.

Le proporzioni di bambini che supera spontaneamente l’allergia alimentare varia a seconda dei diversi studi, ma è possibile affermare che vi sono maggiori probabilità di risoluzione per l’allergia al latte, uovo, soia e grano rispetto a quella per noce, nocciola e arachide.<sup>13</sup> L’allergia ai crostacei e al pesce è più comune invece in età adulta.<sup>8</sup> Nel 1994, i tassi di



**Figura 1** (tratta da Zuercher 2006). Prevalenza delle allergie alimentari in età pediatrica e adulta



**Figura 2.** (tratta da Mullins RJ 2007) Trends in Australia dal 1995 al 2006 1. Delle visite specialistiche per malattie atopiche nei bambini fra 0-5 anni. 2. Delle ospedalizzazioni per anafilassi

risoluzione dell'allergia al latte vaccino erano del 45-50% a 1 anno, 60-75 % a 2 anni, 85-90% a tre anni.<sup>2</sup> Studi più recenti hanno documentato tassi di persistenza di allergia al latte vaccino più elevati.<sup>14, 15</sup> Il lavoro pubblicato da Skripak et al e condotto retrospettivamente su una popolazione di 807 bambini allergici al latte, ha documentato una risoluzione dell'allergia variabile, in base ai criteri usati, dall'1% al 9% a 2 anni, dal 5% al 26% a 4 anni, dal 21% al 56% a 8 anni e dal 55% all'88% a 16 anni. La popolazione caratterizzata da allergia persistente dopo i 16 anni era caratterizzata dall'avere le IgE sp più alte per età nel corso dell'intera durata della malattia. Nei bambini con allergia all'uovo lo stesso gruppo di autori ha riportato tassi di risoluzione pari al 4% all'età di 4 anni, 12% a 6 anni, 37% a 10 anni, e 68% a 16 anni, con minori probabilità di andare incontro a risoluzione spontanea dell'allergia con livelli di IgE sp superiori a 50 kU/l<sup>16</sup>. L'allergia al frumento mostra tassi di risoluzione del 29% a 4 anni, il 56% a 8 anni, e il 65% a 12 anni. Solo il 20% dei bambini con allergia alle arachidi, e meno del 10% di quelli con allergia a noce o nocciola superano spontaneamente la loro allergia<sup>17</sup>.

I livelli dei marker immunologici possono soltanto dare un'idea dell'andamento dell'allergia alimentare: riduzione dei livelli di IgE sp possono precedere l'inizio della completa tolleranza clinica, mentre l'andamento delle dimensioni del ponfo dei prick test cutanei è meno definito. In ogni caso sia le IgE sp che i prick-test possono rimanere positivi per lungo tempo dopo l'acquisizione della tolleranza clinica.<sup>17</sup>

#### **1.4 AllergenAllergeni alimentari**

I maggiori allergeni alimentari sono glicoproteine idrosolubili di peso molecolare compreso tra i 10 e i 70 kDa che posseggono multipli epitopi leganti le IgE. È interessante notare come solo un numero limitato di proteine agisca come allergene e rimane poco chiaro come mai in un individuo atopico predisposto a sviluppare una risposta allergica, solo un piccolo numero di proteine siano associate a manifestazioni allergiche.

La maggior parte degli allergeni alimentari sono proteine stabili, resistenti ai processi di digestione e processazione e ciò è confermato dal fatto che farmaci anti-acidi promuovono lo sviluppo di allergia sia nelle cavie che negli umani. È stato poi notato che la maggior parte degli allergeni alimentari contengono legami disolfurici intramolecolari che permettono alla proteina di resistere alla denaturazione<sup>18</sup>. Sebbene qualsiasi cibo possa causare una reazione allergica e più di 170 alimenti sono inseriti nel registro delle allergie alimentari IgE-mediate, solo un numero limitato di alimenti è

causa delle maggior parti delle anafilassi da cibo: latte vaccino, uovo, noce, nocciola, arachide, pesce, crostacei, grano e soia.<sup>2</sup>

#### Allergeni del latte vaccino

I principali allergeni del latte vaccino sono distribuiti tra il siero e le frazioni di caseina. Gli allergeni del siero di latte sono: alfa-lattoalbumina (Bos d 4), proteina termolabile il cui reale ruolo nell'allergia al latte è controverso sebbene alcuni lavori riportino tassi di reattività a questa proteina fino all'80%; beta-lattoglobulina (Bos d 5), la più abbondante proteina sierica del latte vaccino, presente nel latte di altre specie, ma non nel latte umano; albumina sierica bovina (Bos d 6), presente anche nella carne di manzo; immunoglobuline bovine (Bos d 7): raramente responsabili dei sintomi clinici dell'allergia al latte vaccino. Gli allergeni della caseina (collettivamente noti come Bos d 8) sono composti da 4 diverse proteine (alphas1, alphas2, beta e kappa caseina) dalla scarsa omologia sequenziale. Nonostante ciò, è frequentemente presente una simultanea sensibilizzazione a più caseine, in particolare a alfa (100%) e kappa caseine(91,7%).<sup>19</sup>

#### Allergeni dell'uovo

L'albume, la maggior fonte di allergeni nell'uovo, contiene 23 differenti glicoproteine. L'ovomucoide (Gal d1) e l'ovoalbumina (Gal d2) sono considerati i principali allergeni; il primo è un allergene termo e gastrostabile e la sensibilizzazione al Gal d1 è più frequentemente associata all'allergia persistente, mentre l'ovoalbumina è l'ovo-proteina più abbondante, sebbene la sua allergenicità sia fortemente ridotta dalla cottura.<sup>20, 21, 22</sup> È stato dimostrato inoltre che l'allergenicità dell'ovomucoide può essere diminuita nascondendo gli epitopi di accesso attraverso l'interazione con la matrice di frumento, per cui alimenti a base di uovo ben cotto in matrice di frumento (e.g. biscotti o altri prodotti da forno) sono più facilmente tollerati dagli allergici all'uovo.<sup>23</sup>

### **1.5 Diagnosi**

La diagnosi di allergia alimentare IgE- mediata si basa sull'anamnesi ed esame obiettivo ed è confermata dalla presenza di IgE rivolte verso gli antigeni specifici dell'alimento in causa e, laddove necessario, dal test di provocazione orale (TPO). L'anamnesi deve essere focalizzata a identificare l'eventuale alimento causale, la forma in cui è ingerito (cruda, semicotta, cotta), la quantità ingerita, il decorso e il tempo di

reazione, la natura delle reazioni e la presenza di fattori secondari favorenti come l'esercizio fisico, l'infezione, l'ingestione di FANS. Gli individui che sviluppano acutamente sintomi, quali orticaria, angioedema, eritema, prurito, vomito, dolore addominale, tosse persistente, voce rauca, respiro sibilante, stridore, difficoltà respiratoria, e congestione nasale da pochi minuti a 1-2 ore dopo l'ingestione di un alimento specifico dovrebbero essere valutati per una possibile allergia alimentare. Sintomi cardiovascolari come ipotensione, letargia estrema o sincope, sono meno comuni, ma anch'essi devono far sospettare un'allergia alimentare, in particolare se si verificano in combinazione con uno dei sintomi di cui sopra.<sup>4</sup>

La presenza di IgE sp può essere rilevata mediante test cutaneo (prick-test) o mediante dosaggio nel siero: entrambi i metodi sono molto sensibili e hanno le stesse capacità diagnostiche.<sup>24</sup> Le cutireazioni per gli allergeni alimentari presentano un valore predittivo negativo (VPN) prossimo al 100%: un test negativo pertanto virtualmente esclude la diagnosi di allergia alimentare. Il valore predittivo positivo (VPP) invece è inferiore al 20%; questo significa che la maggior parte dei pazienti cutipositivi presenta in realtà una sensibilizzazione asintomatica. Pertanto la presenza di sensibilizzazione ai test allergometrici è una condizione necessaria, ma non sufficiente, a determinare la presenza di un'allergia clinicamente significativa.<sup>25</sup> D'altro canto le concentrazioni sieriche di sIgE e le dimensioni del pomfo al test cutaneo sono generalmente correlati con una maggiore probabilità di reazione clinica, sebbene non siano predittivi della gravità della reazione. Per molti allergeni è stata descritta la dimensione del pomfo al prick-test corrispondente alla probabilità superiore al 95% di avere un'allergia clinicamente significativa, sebbene la scarsa standardizzazione del test che può variare in base all'età, sito di esecuzione, reattività cutanea, reagenti usati, ha sollevato dubbi rispetto alla riproducibilità in diverse popolazioni e ha portato al riscontro di cut-off differenti.<sup>26, 27</sup> Sampson et al, ad esempio, hanno determinato VPP > 95% quando il diametro del pomfo è superiore a 7 mm per l'uovo, 8 mm per il latte e l'arachide. Nei bambini di età inferiore ai 2 anni, che presentano una minore reattività cutanea, le cutireazioni presentano una specificità prossima al 100% anche per valori inferiori (5 mm per l'uovo, 6 mm per il latte e 4 mm per l'arachide).<sup>28</sup> Anche per quanto riguarda il livello di IgE sp sieriche sono stati individuati valori di cut-off corrispondenti ad un VPP > 95%, variabili comunque in base agli studi. Nello studio di Sampson sui bambini con dermatite atopica, il cut-off era 6 kU/l per l'uovo, 32 kU/l per il latte, 15

kU/l per l'arachide, 20 kU/l per il pesce;<sup>28</sup> valori minori sono stati identificati nei bambini di età inferiore ai 2 anni.<sup>29</sup>

In relazione alla bassa specificità dei test allergometrici, il test di provocazione orale in doppio cieco controllato con placebo (DBPCFC), è considerato il gold standard per la diagnosi di allergia alimentare.<sup>24</sup>

Tuttavia, poiché il DBPCFC è considerato dispendioso in termini di tempo e risorse rimane confinato per lo più in ambiti di ricerca, mentre nella pratica clinica si utilizza il singolo cieco o il TPO in aperto che possono essere considerati diagnostici in molte circostanze, come ad esempio nei bambini piccoli o in presenza di sintomi oggettivi di evidenti. In base a diverse Linee Guida il TPO è indicato se i valori delle sIgE non corrispondono alla storia clinica o se il risultato delle sIgE è minore/uguale al VPP 95% in soggetto apparentemente asintomatico o che non ha ancora mai assunto l'alimento in causa. Per valori di IgE superiori al VVP al 95% o in presenza di concordanza tra esito dei test allergometrici e storia clinica il TPO non è ritenuto necessario per la diagnosi e programmato in seguito (non prima dei 9-12 mesi) con il fine di verificare la persistenza o meno dell'allergia.<sup>1,19</sup>

## **1.6 Terapia**

### Terapie tradizionali

Allo stato attuale l'unica terapia standard consigliata da tutte le Linee Guida consiste nell'eliminazione dalla dieta dell'alimento in causa e nell'intervento farmacologico in caso di esposizione accidentale all'allergene con antistaminici, cortisonici, beta2 agonisti e adrenalina. Nonostante non esistano studi clinici randomizzati che dimostrino la superiorità della dieta di eliminazione come strategia terapeutica, viene tuttora considerata come l'approccio più sicuro.<sup>1</sup> La difficoltà nell'evitare determinati allergeni alimentari e il rischio di reazioni improvvise e pericolose per la vita influisce pesantemente sulla qualità di vita dei pazienti e delle loro famiglie. Basti pensare che è stato verificato che circa il 50% dei bambini con allergia IgE-mediata ingerisce accidentalmente l'allergene in causa in 5 anni e il 75% in 10 anni.<sup>30</sup> Il trattamento deve quindi comprendere l'educazione del paziente su tattiche specifiche per evitare gli allergeni alimentari. I bambini devono imparare a riconoscere gli allergeni nelle etichette degli ingredienti di alimenti confezionati e sapere che in alcune situazioni aumenta il rischio di esposizione accidentale (e.g. mangiare al ristorante o casa di un amico). In generale, i bambini dovrebbero evitare solo i cibi ai quali sono allergici,

anche se alcuni cibi possono cross-reagire tra loro e, a fronte di una sensibilizzazione ai test allergometrici, andrebbero precauzionalmente evitati a meno di verifica mediante TPO in ambiente protetto della loro innocuità (e.g. nocciola nell'allergico alla noce, molluschi nell'allergico ai crostacei, etc)<sup>4</sup>.

Secondo le Linee Guida DRACMA<sup>19</sup> (Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy) raccomandano una rigorosa eliminazione delle proteine del latte vaccino nel bambino con allergia al latte di mucca. Durante l'allattamento al seno e nei bambini di età superiore ai 2 anni, l'aggiunta di latte in formula non è ritenuta necessaria. Nei bambini più piccoli non allattati al seno l'utilizzo di latte in formula è invece obbligatorio ricorrendo a prodotti dietetici a bassa allergenicità (e.g. latte idrolisato spinto oppure miscele di aminoacidi), mentre vanno evitati latti di altri mammiferi per il forte rischio di cross-reattività (in particolare latte di capra e di pecora) e le formule idrolisate parzialmente. Il trattamento ufficialmente riconosciuto dell'allergia al latte si basa quindi sui seguenti punti:

- La dieta di eliminazione deve essere efficace e completa.
- L'inalazione e il contatto con la pelle dovrebbero essere impediti.
- Dovrebbe esserci un'adeguata legislazione sull'etichettatura dei prodotti per garantire i diritti dei consumatori.
- L'allergia al manzo implica l'allergia al latte, nella maggior parte dei casi ma l'inverso non è generalmente vero.
- Tutte le diete di eliminazione devono essere nutrizionalmente sicure in particolare nel primo e nel secondo semestre di vita.
- La conformità alla dieta deve essere attentamente monitorata in tutto.
- Una revisione periodica attraverso test di provocazione deve essere effettuata per evitare inutili diete di eliminazione prolungata.

### Terapie sperimentali

Una serie di strategie terapeutiche rivolte verso le allergie alimentari contro che più frequentemente provocano gravi reazioni anafilattiche IgE-mediate (arachidi, frutta a guscio, e crostacei) o che sono più comuni nei bambini (latte vaccino e uovo) sono attualmente in studio. Gli approcci perseguiti sono sia specifici che non specifici per l'allergene in causa. I primi includono l'immunoterapia orale (OIT), l'immunoterapia sublinguale (SLIT) e l'immunoterapia epicutanea (EPIT) con allergeni alimentari e proteine ricombinanti mutate (vedi capitolo). Approcci non specifici comprendono

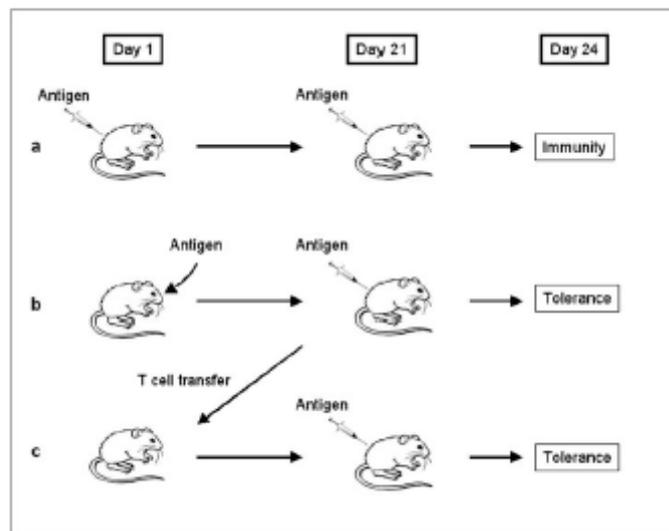
anticorpi monoclonali anti-IgE, che potrebbero aumentare la dose soglia per la reattività agli allergeni alimentari, una formulazione a base di erbe cinesi, che ha impedito anafilassi in un modello murino di anafilassi indotta da arachidi e i probiotici.<sup>17</sup> I probiotici, sono batteri vivi o loro componenti, che mostrano degli effetti benefici, presumibilmente migliorando la flora batterica intestinale del loro ospite. Le maggiori fonti di probiotici sono costituite da specie di *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. I potenziali meccanismi di azione includono l'immunomodulazione con aumento della secrezione di Ig A, IL-10 e soppressione del TNF alfa. Gli studi clinici sui probiotici, sono focalizzati alla prevenzione e al trattamento della dermatite atopica. È stato infatti ipotizzato che un difetto della barriera cutanea predisponga i neonati a risposte Ig E mediate ai cibi e agli allergeni ambientali. La supplementazione di probiotici prenatale nelle mamme e postnatale nei neonati durante i primi 6 mesi di vita sembra diminuire la prevalenza di dermatite atopica a 2 e a 7 anni di età, senza però nessun effetto sulla sensibilizzazione agli alimenti o agli allergeni alimentari.<sup>31</sup>

Diete meno restrittive contenenti l'allergene in forma cotta in matrice di frumento, prevalentemente latte o uova nei prodotti da forno (*baked milk, baked egg*) sembrano rappresentare un approccio alternativo all'immunomodulazione allergene-specifica di allergia alimentare. Numerosi studi hanno dimostrato che bambini con allergia transitoria all'uovo e al latte producono Ig E diretti principalmente contro degli epitopi conformazionale che vengono distrutti durante la cottura o la processazione dell'alimento.<sup>22, 32</sup> Come già detto, l'allergenicità dell'ovomucoide, allergene termostabile dell'uovo, è ridotta quando l'uovo viene cotto in matrice di frumento in grado di diminuire se l'uovo è assemblato in matrice alimentare, questo infatti è in grado di bloccare alcuni epitopi. Per questa ragione pazienti con allergia all'uovo possono tollerare i prodotti da forno che lo contengono.<sup>33</sup> È stato riportato che il 70% dei bambini con una precedente diagnosi di allergia all'uovo tollera l'ingestione di uovo cotto in matrice di frumento e si ipotizza che l'assunzione dei prodotti *baked* possa favorire la tolleranza completa verso l'alimento anche non processato.<sup>23, 34, 35</sup>

## 2. LA TOLLERANZA ORALE

### 2.1 Definizione

Alla base delle allergie alimentari vi è la mancata acquisizione della cosiddetta “tolleranza orale”. Questa è un processo *attivo* ed *inducibile*, il cui prerequisito fondamentale è la *ripetuta esposizione all’allergene alimentare*.<sup>36</sup> Una delle prime definizioni di tolleranza orale risale al 1946 quando Chase la descrisse come: “*uno stato di soppressione attiva della risposta immune (sia umorale che cellulare) nei confronti di antigeni introdotti precedentemente per via orale*”. Chase dimostrò come alla base della tolleranza orale ci fosse la produzione di linfociti T antigene-specifici in grado di inibire risposte immunitarie contro lo stesso antigene in vitro e di “trasferire” la tolleranza ad animali vergini (figura 3).<sup>37</sup>



**Figura 3** (tratta da Chehade M. 2005). Induzione della tolleranza orale. **a.** quando i topini sono immunizzati sottocute e successivamente ricevono una seconda immunizzazione sottocutanea dello stesso antigene, si dimostra in vitro una risposta immunitaria cellulo-mediata ed umorale contro l'antigene. **b.** quando invece i topini ricevono l'antigene per via orale e successivamente la seconda immunizzazione per via sottocutanea, le risposte immunitarie in vitro sono molto ridotte (induzione di meccanismi di tolleranza). **c.** quando linfociti T vengono trasferiti dai topini alimentati con l'antigene a topini vergini dal punto di vista immunitario (naive), la seconda immunizzazione sottocutanea nei topini vergini risulta in risposte immunitarie ridotte in vitro. Questo dimostra come la via di somministrazione orale è in grado di indurre risposte immunitarie T inibitorie.

Bisogna sottolineare come sia la stessa esposizione alle proteine alimentari a costituire uno stimolo fondamentale ed irrinunciabile per la maturazione del sistema immunitario intestinale. A dimostrazione di ciò, se topini appena nati vengono alimentati con una

dieta aproteica presentano un ridotto sviluppo del GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue), un ridotto numero di linfociti circolanti, ridotti livelli di IgG e IgA sieriche e una produzione citochinica in senso “allergizzante” (i.e. di tipo Th2).<sup>38</sup>

## 2.2 Come si acquisisce la tolleranza orale

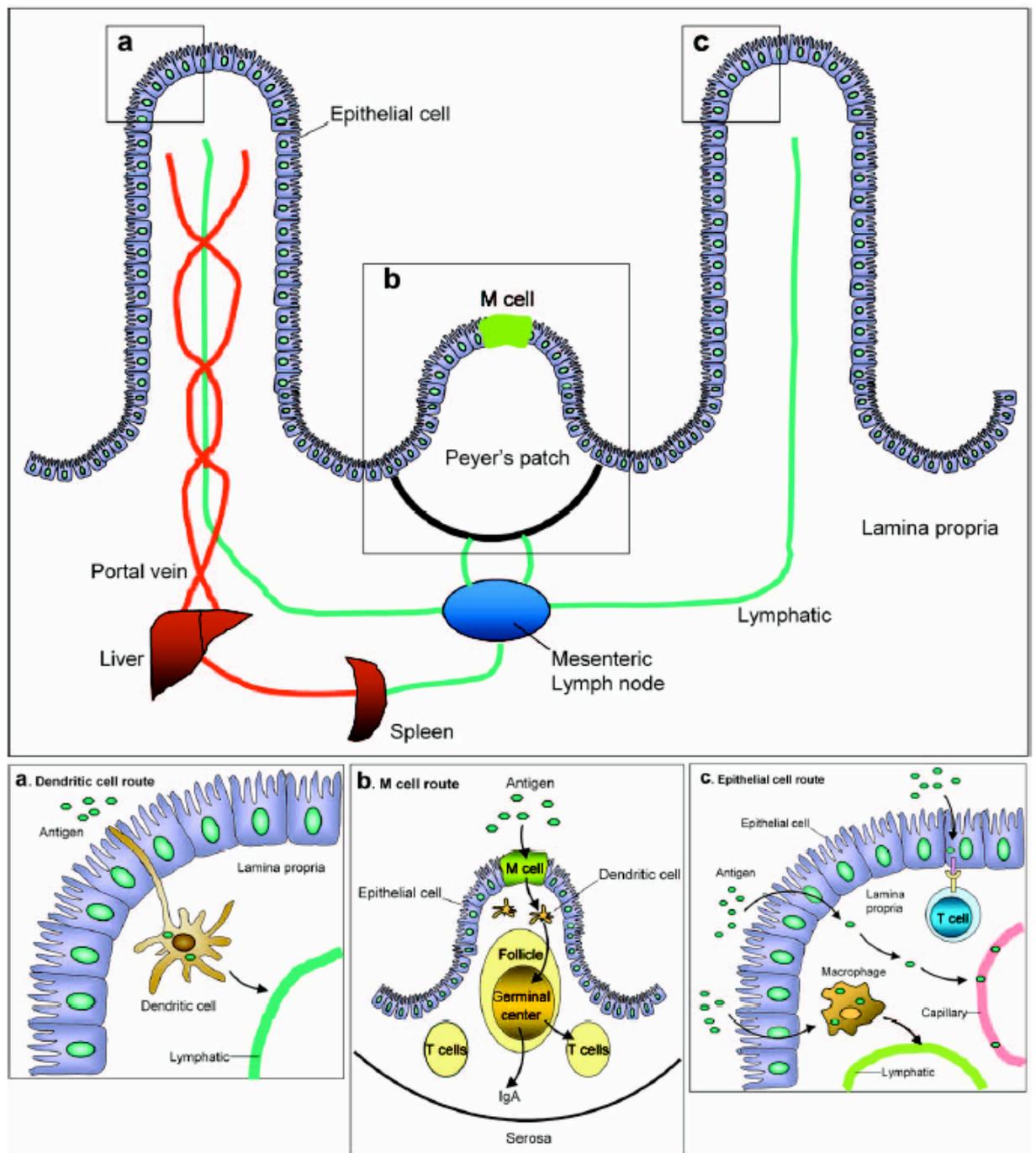
Uno degli aspetti più sorprendenti è che ogni giorno il nostro intestino viene “bombardato” da quantità elevate di proteine (si calcolano dai 130-190 grammi di proteine assorbite dall’intestino giornalmente) e da batteri.<sup>39</sup> Nonostante questa continua esposizione potenzialmente allergizzante, solo una piccola percentuale di individui (circa il 6%) diventa allergico ad uno o più alimenti. Ciò dipende dal fatto che in condizioni fisiologiche il sistema immunitario intestinale submucosale è in grado di sopprimere reazioni immunitarie contro antigeni “innocui” quali quelli alimentari ed i batteri commensali, la tolleranza appunto, mentre di riconoscere e di montare risposte immunitarie di difesa contro eventuali patogeni.

Di tutti le proteine alimentari ingerite però solo una piccola percentuale (il 2% circa) raggiunge effettivamente il sistema GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue) sottomucoso. Diverse sono le tappe del “viaggio” delle proteine a livello del sistema digestivo ciascuna delle quali può influenzare il delicato bilancio finale fra tolleranza ed allergia alimentare. Una **prima barriera** è quella **fisica** costituita dalla mucosa intestinale, dallo strato di muco protettivo, dal pH gastrico ed intestinale, dai sali biliari e dagli enzimi proteolitici. La degradazione degli epitopi immunogeni sta alla base dell’*ignoranza immunologica*. Alcuni di questi meccanismi sono meno efficienti in età infantile, e potrebbero in parte rendere conto della maggiore suscettibilità alla sensibilizzazione ed allergie alimentari nei primi anni di vita. Ad esempio nelle prime settimane di vita è meno rappresentato lo strato mucoso, minore è l’acidità gastrica<sup>40</sup>, maggiore la permeabilità mucosale.

Le proteine che sfuggono alla prima barriera fisica, entrano in contatto con l’epitelio intestinale, e vanno a stimolare sia il **sistema immunitario innato** (natural killers, macrofagi, toll-like receptors), che **adattivo** (linfociti intraepiteliali e della lamina propria, placche del peyer, sIgA, citochine) generando un’ampia varietà di risposte immunitarie, ancora lontano dall’essere del tutto chiarite.

### 2.3 Uptake dell'antigene nei diversi siti di entrata

In base alle loro proprietà intrinseche (in primis la solubilità), gli antigeni che superano la prima barriera fisica intestinale vengono captati da differenti tipi cellulari (le cellule M delle Placche del Peyer, le cellule intraepiteliali, le cellule dendritiche) che a loro volta determinano la natura della conseguente risposta immune (figura 4).



**Figura 4** (tratta da Chehade 2005): Siti di entrata dell'antigene. **a.** le cellule dendritiche attraverso processi aggettanti il lume intestinale saggiano antigeni intraluminali. **b.** le cellule M, che sovrastano le placche del Peyer saggiano antigeni particolati, li presentano alle cellule dendritiche sottomucose e quindi ai linfociti B, stimolando la produzione di IgA specifiche. **c.** gli antigeni solubili passano invece

attraverso l'epitelio intestinale attraverso gli spazi paracellulari o transcellulari raggiungendo o i linfociti T o i macrofagi sottomucosi o passando direttamente nel circolo sanguigno.

Placche del Peyer (PP) – sono organi linfoidei localizzati nella porzione distale del piccolo intestino e nel retto. La loro struttura è organizzata in centri germinativi, costituiti da linfociti B circolanti e da una piccola componente T. E' a questo livello che avviene la produzione delle IgA mucosali specifiche. In seguito ad un segnale appropriato, le cellule B migrano ai linfonodi mesenterici, acquisiscono lo stato maturativo di precursori delle plasmacellule, e si localizzano nella lamina propria, a livello della quale si possono differenziare e secernere IgA-dimeriche<sup>41</sup>. Le PP sono coperte da cellule epiteliali specializzate, chiamate cellule M (Microfold cells). Le cellule M sono cellule dendritiche deputate alla captazione di soli antigeni corpuscolati (virus, batteri, parassiti), ed alla loro liberazione nello spazio subepiteliale (dominio della PP), dove vengono processati da parte di cellule dendritiche che li presentano ai linfociti B follicolari. A questo punto sotto lo stimolo del TGF- $\beta$  prodotto dai linfociti T-regolatori, viene promosso lo switch isotipico e la produzione di IgA specifiche da parte della cellula B stimolata<sup>42</sup>, contribuendo al processo di tolleranza. Per lungo tempo le PP sono state considerate la sede principale dello sviluppo della tolleranza immunitaria. In realtà, è stato dimostrato che l'induzione di tolleranza può avvenire anche con un intestino privo di placche di Peyer.<sup>43</sup> Ad oggi sembra che l'uptake dell'antigene attraverso le cellule M favorisca risposte immunologiche "sensibilizzanti" più che di tipo tollerogenico, queste ultime stimulate invece dall'entrata dell'antigene attraverso le cellule dendritiche o epiteliali intestinali.

Cellule dendritiche (DC) – sono potenti cellule presentanti l'antigene localizzate in vari compartimenti del tratto gastrointestinale, inclusa la lamina propria, le placche del Peyer ed i linfonodi mesenterici. A livello dell'epitelio intestinale esse s'intercalano agli enterociti attraverso la protrusione di dendriti che, aggettandosi nel lume, permettono il contatto e l'eventuale captazione degli antigeni intraluminali solubili. Gli antigeni captati dalle cellule dendritiche verranno condotti, attraverso i linfatici, ai linfonodi mesenterici, che costituiscono la principale sede del processo di tolleranza orale<sup>44</sup>. Le DC sembrano svolgere un ruolo centrale nel bilancio tra tolleranza ed immunità attiva a livello intestinale, in quanto generano citochine e molecole costimolatorie in grado di stimolare o l'uno o l'altro processo. Si pensi come in un

modello sperimentale, si è riusciti ad elicitare risposte IgE-mediate tramite il solo trasferimento di DC da topini sensibilizzati a topini immunologicamente vergini per lo stesso antigene, o come ancora le DC di topini allergici al latte avessero un ridotto grado di apoptosi se coltivate in presenza dell'antigene e di cellule T-specifiche.

Cellule epiteliali intestinali (IEC) – svolgono due funzioni principali: la prima è la captazione di antigeni dietetici solubili, sfuggiti alla proteolisi intraluminale, che o degradano nei loro fagolisosomi o esocitano negli spazi intercellulari con successivo passaggio alla circolazione portale. La seconda funzione è quella di APC-non professionali. Tramite molecole MHC II espresse costituzionalmente,<sup>45</sup> sono in grado di presentare l'antigene ai linfociti T vergini. A differenza delle APC professionali, le IEC attivano selettivamente i linfociti T CD8<sup>+</sup> suppressor, stimolando quindi la tolleranza tramite la soppressione della risposta immune locale<sup>46</sup>.

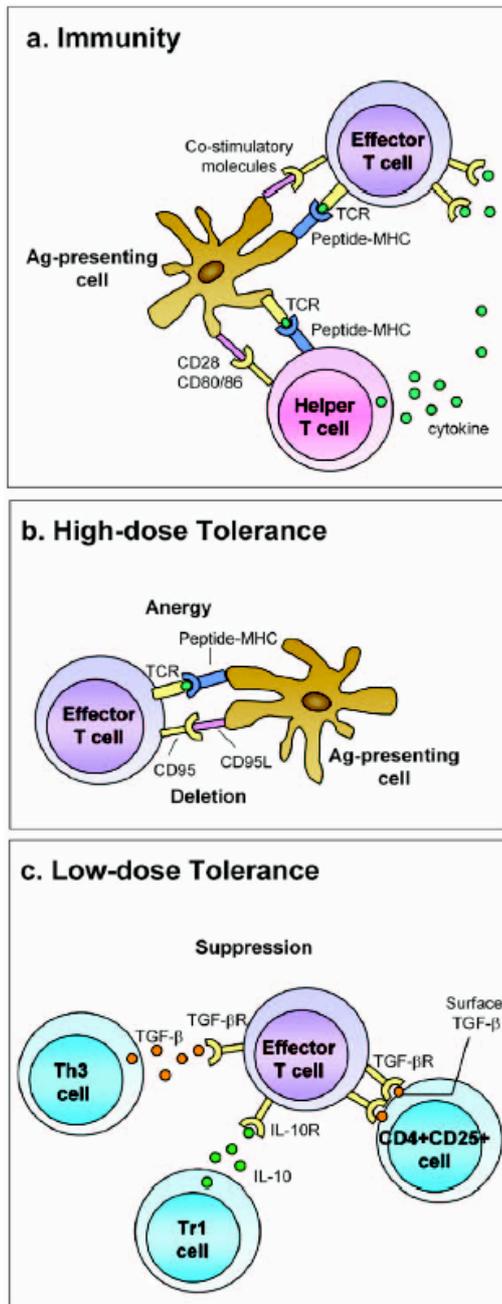
#### **2.4 I meccanismi immunologici della tolleranza.**

Una volta che gli antigeni sono stati captati e processati dalle cellule APC (DC, IEC, Macrofagi), vengono presentati in congiunzione con le molecole del maggior sistema di istocompatibilità (MHC) di classe II ai linfociti T sottomucosali. La loro attivazione dipende dal riconoscimento del complesso antigene-MHC-II, in congiunzione con molecole di co-stimolazione (B7-CD28) e citochine diverse (figura 5.a).

Alla base della tolleranza orale (che è una forma di tolleranza periferica in cui i linfociti T maturi vengono eliminati dopo essere emigrati dal timo o dal midollo osseo) si riconoscono due meccanismi immunologici principali a seconda della *quantità dell'antigene* somministrato:

- High-dose tolerance - indotta da una singola elevata dose di antigene che porta o all'*anergia*, uno stato di non responsività che determina incapacità dei linfociti T di rispondere in modo proliferativo, o alla *delezione linfocitaria*, processo che porta all'eliminazione, tramite meccanismi di apoptosi, dei cloni antigene-specifici
- Low-dose tolerance - indotta invece da dosi di antigene basse ma ripetute, raggiunta tramite una *soppressione attiva* dei linfociti T effettori da parte di linfociti *T-regolatori* (Th3, Tr1, T-reg CD4+CD25+) tramite la secrezione di particolari citochine (TGF- $\beta$ , IL-10)<sup>37,47,48</sup>

Questi due meccanismi non si escludono a vicenda, bensì è assai probabile che assieme partecipino al mantenimento della tolleranza.<sup>39</sup>



**Figura 5.** (tratta da Chehade M 2005) Meccanismi immunologici della tolleranza orale. **a.** La generazione della risposta immunitaria richiede il legame fra il recettore TCR ed il complesso antigene-MCH-II in presenza di adeguate molecole costimolatorie (CD80 e CD86) e citochine. **b.** La High-dose tolerance è mediata dall'anergia linfocitaria o dalla delezione clonale. L'anergia avviene tramite il legame TCR-complesso antigene-MCH senza i segnali di costimolazione. La delezione tramite l'apoptosi mediata dal legame FAS-FAS ligando. **c.** La low-dose tolerance prevede invece l'attivazione di linfociti T-regolatori che sopprimono le risposte immunitarie degli effettori tramite la secrezione di citochine inibitorie: IL-10, e TGFβ.

In particolare:

- L'anergia linfocitaria è un meccanismo poco conosciuto che sembrerebbe essere indotto dal legame recettoriale del linfocita T in assenza di segnali costimolatori (quali l'IL-2) o in assenza di interazione tra molecole costimolatrici presenti sulle cellule T (CD28) e sulle APC (CD80, CD86). Le cellule anergiche non solo

non producono IL-2 dopo la loro interazione con l'antigene, ma producono IL-10 con soppressione attiva delle cellule T circostanti.

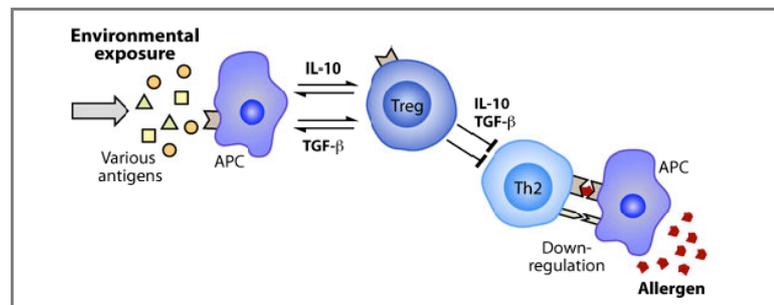
- La *delezione clonale* porta invece all'apoptosi della cellula T coinvolta. Può avvenire in assenza di fattori di crescita e di fattori di co-stimolazione durante l'interazione tra cellule T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>, o per l'interazione tra Fas e Fas-ligando. Questa via può venir bloccata dalla presenza di citochine proinfiammatorie (es. IL-12).
- La *soppressione attiva* richiede invece l'azione dei *T-regolatori antigene-specifici* che sembrano svolgere un ruolo fondamentale nella tolleranza alimentare, migrando negli organi linfoidi dove inibiscono le cellule effettrici o producendo citochine inibitorie non antigene-specifiche.

I *T-regolatori* possono essere distinti in due popolazioni: i *T-regolatori naturali* che svolgono la loro azione soppressiva attraverso il contatto cellula-cellula ed i *T-regolatori indotti* che agiscono invece secernendo citochine soppressive.

I *T-regolatori naturali* si riconoscono perché esprimono vari markers di superficie, i CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, e fattori di trascrizione, tra cui *FOXP3* che riveste un ruolo chiave nella differenziazione delle cellule-T regolatrici e nel mantenimento della funzione soppressiva.<sup>49</sup> Mutazioni del gene che codifica per *FOXP3* portano all'IPEX, malattia fatale dovuta proprio ad una perdita dei meccanismi di tolleranza periferica, e che non a caso si associa, oltre a poliendocrinopatia ed enteropatia, a numerose allergie alimentari.<sup>50</sup> Il ruolo dei *T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>* sarebbe fondamentale nella tolleranza orale: ad indicarlo il fatto che il loro numero è risultato aumentato in un gruppo di bambini che avevano superato l'allergia alimentare rispetto a coloro che erano rimasti allergici, ma bisogna notare che il gruppo studiato consisteva di bambini con allergia al latte non-IgE mediata.

I *T-regolatori indotti* si distinguono in una sottoclasse *Tr1* che produce primariamente IL-10 e la *Th3* che produce prevalentemente TGF- $\beta$ . Entrambi hanno un ruolo fondamentale nel mantenimento della tolleranza. L'IL-10 ha effetti inibitori sia sulle risposte Th1 che Th2 che azione inibitoria sulle ACP; il TGF- $\beta$  è uno stimolo necessario allo switch isotipico in senso IgA, all'induzione delle IgG4, immunoglobuline capaci di inibire il legame delle IgE al mastocita inibendone a sua volta la degranolazione, ed è cruciale nell'inibizione delle risposte Th2.<sup>36</sup> A

dimostrazione, entrambi l' IL-10 e il TGF- $\beta$  vengono prodotte meno dai linfociti isolati dalla mucosa duodenale di bambini con allergie alimentari rispetto a bambini sani.<sup>51</sup> E' importante sottolineare come citochine prodotte da linfociti T-regolatori antigene-specifici possano inibire risposte immunitarie contro altri antigeni in maniera aspecifica, il cosiddetto "bystander effect" (figura 6).<sup>52</sup>

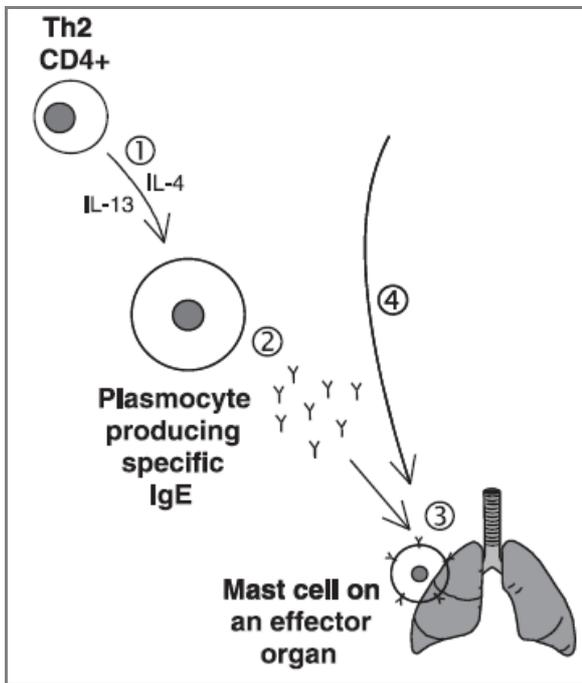


**Figura 6.** (tratta da Von Herten 2009): Il by-stander effect. T-regolatori antigene specifici possono secernere citochine (IL10 e TGFbeta) , in grado di inibire in maniera aspecifica risposte immunitarie ad antigeni diversi.

Oltre a questo complesso network di linfociti regolatori recentemente si è capito che alla tolleranza contribuisce anche il **sistema immunitario innato**, con i Toll-like Receptors (TLR) e recettori localizzati nel citosol, chiamati NOD-like receptors (NLR), mutazioni dei quali favorirebbero l'insorgenza non solo delle malattie infiammatorie intestinali ma anche dell'allergia. Non è ancora chiaro il loro meccanismo ma si ipotizza che un alterato riconoscimento di batteri patogeni possa esserne alla base.<sup>36</sup>

In sintesi: alla base dell'induzione della tolleranza orale vi è l'attivazione di un complesso "network" regolatorio, i cui "protagonisti" sembrano essere, allo stato attuale delle conoscenze, i T-regolatori, l'IL-10 e il TGF- $\beta$ . Il mancato funzionamento di questo network porta allo sviluppo delle allergie alimentari, tramite esagerate risposte Th2 caratterizzate da elevata produzione di IL4, IL13, responsabili dello switch isotipico e della secrezione delle IgE da parte delle plasmacellule, e di IL5, responsabile del richiamo e attivazione degli eosinofili.<sup>53</sup> In seguito alla fase di "sensibilizzazione" le IgE circolanti legheranno i recettori FC $\epsilon$ RI sui mastociti residenti nei vari organi bersaglio (cute, intestino, polmone etc) e a seguito dell'ingestione dell'allergene specifico, nella cosiddetta fase "effettrice" della risposta allergica, si

avrà la degranulazione degli stessi con la liberazione dell'istamina (figura 7) con comparsa di sintomi organo-specifici (orticaria, vomito, diarrea, broncospasmo).<sup>53</sup>



**Figura 7** (tratta da Eigenmann PA 2009): Rappresentazione schematica della reazione allergica IgE mediata: (1). Th2 ag-specifici producono IL4 e IL13 che promuovono la secrezione di IgE dalla plasmacellule (2). Le IgE si legano alle mastcellule residenti negli organi bersaglio (3), ed in seguito all'ingestione dell'allergene ne causano la degranulazione (4).

I sintomi allergici “a distanza” sembra possano anche dipendere dal fatto che in seguito alla stimolazione dei linfociti T a livello intestinale, si abbia a livello dei T memoria l'espressione di molecole di superficie diverse ne consentono l'“homing” in organi bersaglio diversi (i.e. il CLA, cutaneous lymphocyte antigen, per la cute, l' $\alpha 4\beta 7$  per l'intestino), determinando contemporanee reazioni cellulo-mediate a quelle IgE mediate.<sup>54</sup>

### 3. AGLI ALBORI DELL'ALLERGIA

Abbiamo visto nel capitolo precedente quanto siano complessi (e peraltro non del tutto chiariti) i meccanismi immunologici alla base dell'acquisizione della tolleranza orale.

Questi meccanismi cominciano molto presto, già in epoca prenatale,<sup>55</sup> e riuscire ad identificare quello che è il corso temporale dello sviluppo della sensibilizzazione allergenica rispetto alla tolleranza è fondamentale per cercare di identificare possibili strategie di prevenzione e di trattamento.<sup>56</sup>

E' innanzitutto assodato che fin dalla 22a settimana di età gestazionale siamo capaci di montare una risposta allergene-specifica.<sup>57</sup> Questo significa che il "priming", la prima sensibilizzazione agli allergeni ambientali, potrebbe già avvenire in utero attraverso il passaggio di allergeni o per via transplacentare o nel liquido amniotico che il feto in gran parte inghiottisce (la rimozione del 70% delle proteine del liquido amniotico avviene grazie all'ingestione da parte del feto), in parte aspira e con cui è a contatto cutaneo. Fra l'altro è stata recentemente dimostrata la capacità in epoca fetale di meccanismi di tolleranza sia centrale (timica con delezione di linfociti T autoreattivi) che periferica (con generazione di linfociti T-regolatori CD4+CD25+FOXP3+) contro alloantigeni materni, ed è verosimile che risposte simili possano essere montate contro antigeni alimentari.<sup>58</sup>

E' anche assodato che nasciamo tutti con una predominanza delle risposte Th2 (risposte "Th2 biased").<sup>59</sup> Questo dipenderebbe dal fatto che tale predominanza è presente nella mamma e all'interfaccia materno-fetale per ridurre le risposte Th1 cellulo-mediate predisponenti all'aborto (lo stesso INF $\gamma$  è abortigeno). A dimostrazione di questo shift verso risposte Th2 starebbe anche il fatto che nel primo anno di vita anche soggetti che non svilupperanno alcuna manifestazione allergica presentano IgE verso i comuni allergeni alimentari, seppure più basse e transitorie rispetto a soggetti allergici.<sup>60,61</sup>

L'incapacità di bilanciare alla nascita e in età infantile le risposte Th2 verso quelle Th1 si tradurrebbe quindi in allergia. E' verosimile che a seconda del background genetico vi sia una maggiore o minore polarizzazione delle risposte verso i Th2. Lo

suggeriscono studi che mostrano come la capacità di produzione di INF  $\gamma$  sia ridotta da parte di cellule mononucleari periferiche cordonali di neonati ad alto rischio di allergia (i.e. con familiarità atopica).<sup>62</sup>

### **3.1 Fattori “agli albori” che influenzano tolleranza o sensibilizzazione**

Il bilancio Th2-Th1 può essere modificato da una serie di fattori che agiscono durante la gravidanza, alla nascita e nell’epoca neonatale. Di seguito discutiamo quelli che sono i fattori che giocano un ruolo “agli albori” della tolleranza orale o viceversa della sensibilizzazione verso allergeni alimentari.

Background genetico... ed epigenetica - Un primo fattore di rischio per lo sviluppo di un’allergia è la familiarità. Il rischio è maggiore in presenza di un parente di I° grado affetto (specie la mamma).<sup>63</sup> Ad esempio, in caso dell’allergia alle arachidi, l’aver un genitore o un fratello affetto ne aumenta il rischio di ben 7 volte.<sup>64</sup> Siamo invece ancora lontani dall’aver individuato specifici markers genetici per le allergie alimentari - a differenza dell’asma e dell’eczema - seppure è recente la scoperta dell’associazione fra poliformismi di geni codificanti per l’IL10 e l’IL13 all’allergia alimentare.<sup>33</sup>

Affascinante ma ancora inesplorato il campo dell’epigenetica, ovvero di come fattori ambientali (ad esempio gli stessi allergeni alimentari) possano aver un ruolo non direttamente sul sistema immunitario quanto piuttosto sull’espressione di alcuni geni (tramite meccanismi di metilazione, demetilazione, remodelling della cromatina e degli istoni etc).<sup>65</sup> Uno studio sperimentale sui topi ha per esempio mostrato come l’assunzione di acido folico in gravidanza portasse al silenziamento di un fattore di trascrizione del gene Runt, predisponendo ad un maggior rischio di asma.<sup>66</sup>

Composizione della dieta materna in gravidanza – Che la composizione della dieta materna possa influenzare i meccanismi di sensibilizzazione/tolleranza del bambino è plausibile ma le evidenze a tal proposito sono scarse, non sempre univoche e la maggior parte degli studi ad oggi non ha valutato come “outcome” le allergie alimentari bensì altre condizioni atopiche.

Tra i *micro e macronutrienti* della dieta materna chiamati in causa nell’aumento globale delle allergie vi sono i grassi poli-insaturi  $\omega$ -3 ( $\omega$ -3-PUFA) contenuti negli oli di pesce, gli antiossidanti e la VIT D.<sup>64</sup> Una dieta in gravidanza povera di  $\omega$ -3-PUFA ma ricca in quelli  $\omega$ -6, presenti invece negli oli vegetali quali la margarina, è stato

associata ad un aumentato rischio nella prole di eczema a 2 anni di vita.<sup>67</sup> Il meccanismo con cui gli  $\omega$ -3-PUFA sarebbero protettivi nei confronti dei fenomeni allergici sarebbe la riduzione della PGE2, la quale è in grado di stimolare il linfociti B alla produzione delle IgE.<sup>33</sup> Questa associazione non è però stata dimostrata nei confronti delle allergie alimentari.

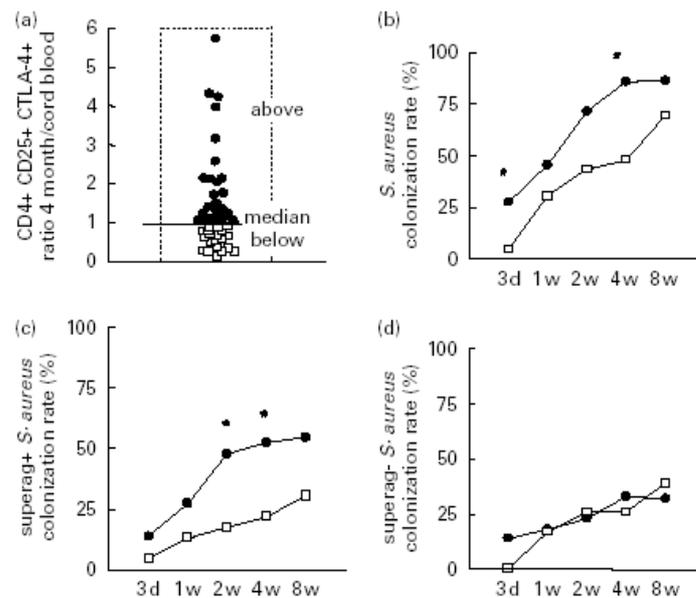
Stesso discorso vale per gli antiossidanti (VIT C,  $\beta$  carotene): si ipotizza possano avere benefici sulle malattie allergie tramite meccanismi anti-infiammatori, ma evidenze forti in tal senso non esistono.

Ci sono infine studi di coorte che hanno mostrato un'associazione fra supplementazione di VIT D in gravidanza e successivo rischio di allergie alimentari.<sup>68</sup> Quest'associazione è però in contrasto con studi ecologici che mostrano come vi sia un gradiente nord-sud delle allergie che si potrebbe spiegare con una minore esposizione solare e riduzione in VIT D.<sup>64</sup> Da un punto di vista immunologico, entrambi le associazioni potrebbero essere spiegate in quanto la letteratura mostra effetti immunomodulanti contrastanti della VIT D: da una parte capace in vitro di aumentare risposte Th2, dall'altra di aumentare i T-regolatori.

Parto cesareo – Anche la modalità del parto sembra poter essere associata ad un aumento del rischio allergizzante. Si è visto infatti che bambini nati da parto cesareo sarebbero a maggior rischio di successivo sviluppo di allergie, anche alimentari.<sup>69 70</sup> Si pensa che questa associazione possa essere spiegata da una parte dal mancato passaggio nel canale del parto e quindi da un ritardo nella colonizzazione intestinale del bambino da parte della microflora vaginale (vedi sotto sezione Flora batterica intestinale), dall'altra dalla maggiore frequenza dei parti cesarei sia in madri più anziane che nei primogeniti, entrambi condizioni indipendentemente correlate a maggior rischio di sviluppo di atopia. Un'ulteriore ipotesi è quella della maggiore frequenza nei bambini nati da parto cesareo di una precoce assunzione (sporadica e a bassa dosi) di latte vaccino, che risulterebbe in un aumentato rischio di sensibilizzazione ed allergia successiva (vedi sotto sezione Esposizione all'allergene alimentare).<sup>70</sup>

Flora batterica intestinale – Prerequisito per lo sviluppo ed il mantenimento della tolleranza orale è la presenza della flora microbica intestinale.<sup>36</sup> Essa, generando una minima flogosi intestinale, è ritenuta necessaria per la maturazione delle cellule

immunitarie (specie i linfociti T regolatori) che costituiscono il GALT e quindi per lo sviluppo della tolleranza orale.<sup>71</sup> Lo studio IMMUNOFLORA, tramite la valutazione sierata delle colture fecali per aerobi ed anaerobi di una coorte di bambini svedesi seguiti dalla nascita fino all'anno di vita, ha dimostrato come i bambini con un maggior numero di T-regolatori fossero quelli più precocemente e in percentuale maggiore colonizzati dallo *Stafilococco Aureus*, (figura 8) e, da un punto di vista clinico, come i bambini che nei primi 18 mesi sviluppavano allergie alimentari fossero proprio quelli con una minore colonizzazione intestinale alla nascita.<sup>55 72</sup> Questi risultati suggeriscono che la colonizzazione precoce intestinale da parte di specifici batteri sia in grado di stimolare risposte T-regolatrici e quindi di proteggere dallo sviluppo delle allergie.



**Figura 8.** (tratta da Calder PC 2006): In (a) i bimbi sono divisi in due gruppi: quelli con un aumento delle T-reg (cerchi neri), e quelli con T-reg costanti nei primi 4 mesi di vita. In (b) si mostra il pattern di colonizzazione da parte dello *Staphilococco aureus* nei due gruppi di bambini, in (c) da parte di *Staphilococco aureus* produttore il superantigene, in (d) superantigene negativo. Una maggiore colonizzazione da parte di *Staphilocco aureus* superantigene positivo è associato ad un significativo aumento dei T-reg.

Esistono poi altri studi che dimostrano come i bambini allergici abbiano una flora intestinale meno ricca in *Lactobacilli* rispetto ai non allergici, e come queste differenze possano spiegare la diversa prevalenza “geografiche” di allergie fra bambini Svedesi ed Estoni.<sup>56</sup> Nell’insieme, queste osservazioni hanno suggerito un potenziale ruolo protettivo dei probiotici (ovvero microrganismi vivi quali i

*Lactobacillus* e i *Bifidobacterium*)<sup>73</sup> nei confronti delle allergie ma nonostante numerosi lavori in tal senso il loro effetto rimane incerto nelle allergie alimentari, in quanto la maggior parte si sono focalizzati sulla dermatite atopica.<sup>63</sup>

Contatto con infezioni – La cosiddetta “hygiene hypothesis” risale al 1989.<sup>74</sup> In seguito all’osservazione di una relazione inversa fra prevalenza di allergie e numero di fratelli, Strachan ipotizza che un’esposizione precoce alle infezioni possa costituire un fattore protettivo nei confronti dell’allergia in quanto in grado di agire come “educatore immunologico”, stimolando una maggior risposta Th1 e bilanciare così la polarizzazione Th2 della nascita. Questa ipotesi – in linea con quella di una precoce colonizzazione intestinale – ha trovato nel tempo diverse conferme sia da studi sperimentali che in studi in vivo. Ad esempio, in modelli sperimentali murini la somministrazione di lipopolisaccaride in gravidanza è in grado di potenziare le risposte Th1 e ridurre i livelli di IgE nella prole,<sup>75</sup> mentre in uno studio di coorte si è evidenziato un ridotto rischio di asma, eczema e sensibilizzazione allergica nei confronti di alimenti in quei bambini che avevano avuto un maggior numero di infezioni virali nei primi 9 mesi di vita.<sup>76</sup> La “hygiene hypothesis” rimane in assoluto quella più “gettonata” nello spiegare l’aumento a livello mondiale delle malattie sia allergiche che autoimmuni.

Allattamento – Per lungo tempo si è pensato che un prolungato allattamento esclusivo al seno potesse essere in grado di prevenire l’insorgenza delle allergie, incluse quelle alimentari, tramite i suoi effetti immunomodulanti. I risultati degli studi condotti ad oggi (sia osservazionali che randomizzati esaminati in una recente review) sembrano indicare un effetto protettivo ma limitato: “...non al di là dei 4-6 mesi e solo nei bambini con familiarità atopica...”.<sup>77</sup> Al contrario il prolungamento dell’allattamento esclusivo al di sopra dei 6 mesi sembra poter aver l’effetto contrario e in vari studi prospettici di coorte è stato associato ad un aumentato rischio di successiva atopia e sensibilizzazione nei confronti di allergeni alimentari.<sup>78 79</sup> Un recentissima review e “position statement” dell’American Academy of Pediatrics<sup>80</sup> conclude che, al momento: “...vi sono evidenze che nei bambini a rischio atopico, l’allattamento esclusivo per 4 mesi possa ridurre il rischio di eczema e allergia alle proteine del latte vaccino nei primi due anni di vita, rispetto alle formule...”

Esposizione all'allergene alimentare – Il diventare tollerante o allergico ad un particolare allergene oltre ai fattori discussi sopra dipende dal tipo, dalla dose, dalla finestra temporale di esposizione e dalla modalità e via di esposizione dell'antigene stesso. Informazioni rispetto a tutti questi aspetti rimangono ancora scarse.

Rispetto al *tipo di antigene*, sappiamo che un antigene solubile è più tollerogenico rispetto ad uno particolato, che gli allergeni alimentari hanno più frequentemente un peso molecolare tra 10 e 70 kd, e che gli epitopi conformazionali degli alimenti sono meno allergizzanti di quelli sequenziali<sup>81</sup> in quanto distrutti più facilmente da tutti quei processi che alterano la struttura terziaria delle proteine (digestione, cottura, pH gastrico etc.). Uno studio recente, eseguito su un gruppo di bambini con allergia alle proteine del latte vaccino, ha evidenziato come, nei bambini con allergia persistente, sono riscontrabili più frequentemente IgE specifiche dirette verso gli antigeni lineari rispetto a quelli conformazionali della caseina.<sup>82</sup>

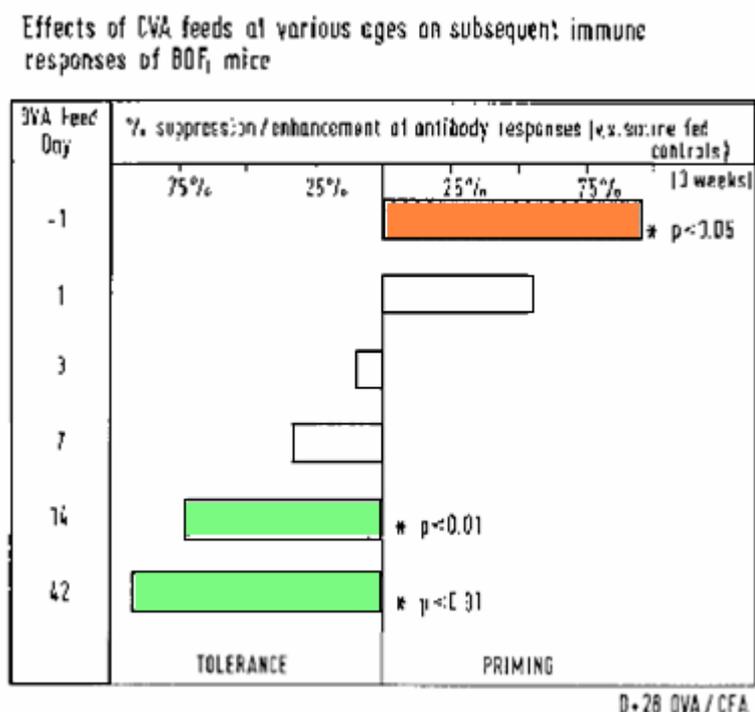
Riguardo alla *dose*, abbiamo già visto come i meccanismi immunologici che portano alla tolleranza orale siano diversi a seconda della quantità dell'allergene (high versus low-dose tolerance). Sappiamo però anche dalla pratica clinica come la stessa dose possa essere tollerogena in un paziente rispetto ad un altro, o come la stessa dose possa sensibilizzare o indurre tolleranza a seconda di “quando” e “come” viene introdotta.

Alcuni studi sembrano suggerire che la somministrazione di dosi piccole ed infrequenti di un determinato antigene possa favorire lo sviluppo di IgE specifiche.<sup>83</sup> Saarinen ha segnalato che, in una coorte di 6209 bambini finlandesi seguiti dalla nascita in poi, quelli che sviluppavano un'allergia alle proteine del latte (verificata al test di scatenamento orale) IgE-mediata (prick e/o RAST positivi, n=75, età media 5 mesi) risultavano essere stati alimentati nei primi due mesi di vita con dosi più piccole ed infrequenti di latte vaccino rispetto a quelli con allergia non IgE mediata (n=43), identificando una dose cumulativa di 1.5 litri di latte in formula come “potenziale” cut-off tollerogenico.<sup>84</sup> Un'associazione simile è stata evidenziata da Sanchez-Valverde che ha trovato, in uno studio di coorte di bambini spagnoli, un maggior rischio di allergia IgE mediata al latte vaccino in chi aveva ricevuto nei primi giorni di vita uno o due biberon di latte in formula e successivamente allattato al seno, pratica per altro di ben 10 volte più comune nei bambini nati da parto

cesareo, fattore anch'esso indipendentemente associato ad una maggior rischio di allergia IgE mediata.<sup>70</sup>

La dose in grado di indurre la tolleranza è plausibile vari a seconda delle proprietà immunogeniche intrinseche dell'allergene alimentare: a suggerirlo sarebbe uno studio sperimentale di Strid che ha verificato come nei topolini la dose di proteine delle arachidi in grado di indurre la tolleranza orale era di ben 50 volte superiore a quella dell'ovoalbumina.<sup>85</sup>

La tolleranza sembra non essere solo questione di dose ma anche di *epoca di introduzione* dell'allergene. Sappiamo per esempio che i primi mesi di vita sono caratterizzati da un'augmentata permeabilità intestinale, da una fisiologica inefficienza dei meccanismi di difesa aspecifici (minore muco, minore acidità gastrica, ridotta attività proteolitica) e da una bassa produzione di IgA secretorie. Tutto questo potrebbe spiegare il perché una troppo precoce introduzione di un'allergene possa favorire una sensibilizzazione. Quest'aspetto è stato studiato in maniera approfondita da Strobel e Ferguson in un modello murino sperimentale.<sup>86</sup> La somministrazione orale di una singola dose di ovalbumina (OVA) peso-correlata determina nei primi 7 giorni di vita una risposta immune di avvenuta sensibilizzazione sia umorale (anticorpi OVA-specifici) che cellulo-mediata, mentre a partire dal 14° giorno di vita è in grado di innescare la tolleranza, analogamente al topo adulto (figura 9).

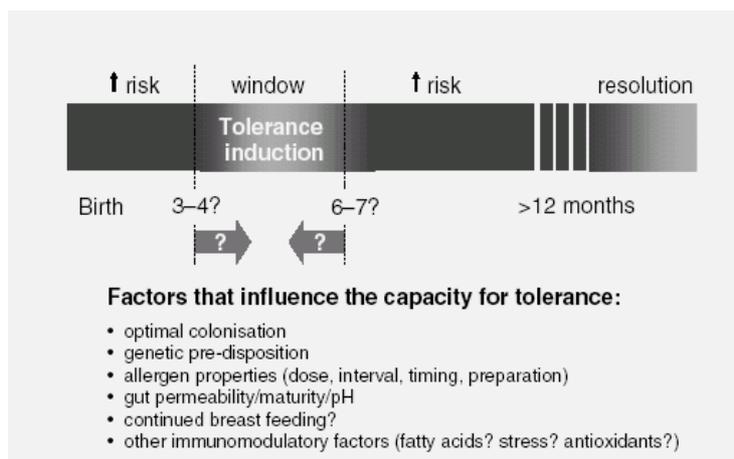


**Figura 9.** (tratta e modificata da Strobel 1984): La tolleranza orale in topini alimentati con un'unica dose di OVA, a seconda del giorno di somministrazione.

Nei topini “sensibilizzati” con somministrazione di OVA alla nascita, gli autori hanno poi paragonato vari regimi dietetici per valutare se fosse possibile modulare le successive risposte immunologiche. Mentre ri-somministrare un'unica dose di OVA entro i primi 14 giorni di vita non sopprimeva le risposte immunitarie innescate, somministrarla suddivisa in dosi giornaliere dal 1° al 14° giorno risultava in tolleranza sia anticorpale che cellulo-mediata, a suggerire che dosi giornaliere, ripetute seppur piccole possano facilitare l'acquisizione della tolleranza fin dai primi giorni di vita.

In contrasto con lo studio di Strobel e Fergusson è però quello recentissimo di Haverson, che dimostra come nel maialino - modello sperimentale animale completamente vergine da un punto di vista immunologico, data l'impermeabilità della placenta al passaggio di antigeni - una singola bassa dose di OVA somministrata in prima giornata di vita per via orale (analoga a quella somministrata ai topini di Strobel e Ferguson) induca da subito la tolleranza e non la sensibilizzazione.<sup>87</sup>

Sulla base di queste osservazioni sperimentali e delle evidenze di studi che hanno negato un ruolo protettivo del ritardo nello svezzamento (vedi capitolo successivo), alcuni autori hanno identificato una finestra critica, la cosiddetta “*critical early window*” che potrebbe essere favorevole per l'acquisizione della tolleranza, e costituire quindi il momento “ottimale” per l'introduzione degli allergeni alimentari.<sup>88</sup> Come illustrato dalla figura 10 si tratta di una finestra “variabile”, inclusa fra i 3 e i 7 mesi - dipendente peraltro da livelli ottimali di tutti quegli altri fattori, finora discussi, che favorirebbero l'acquisizione della tolleranza (i.e. dal background genetico alla colonizzazione batterica, ai fattori immunomodulanti potenziali quali il latte materno, i  $\omega$ -3-PUFA etc).



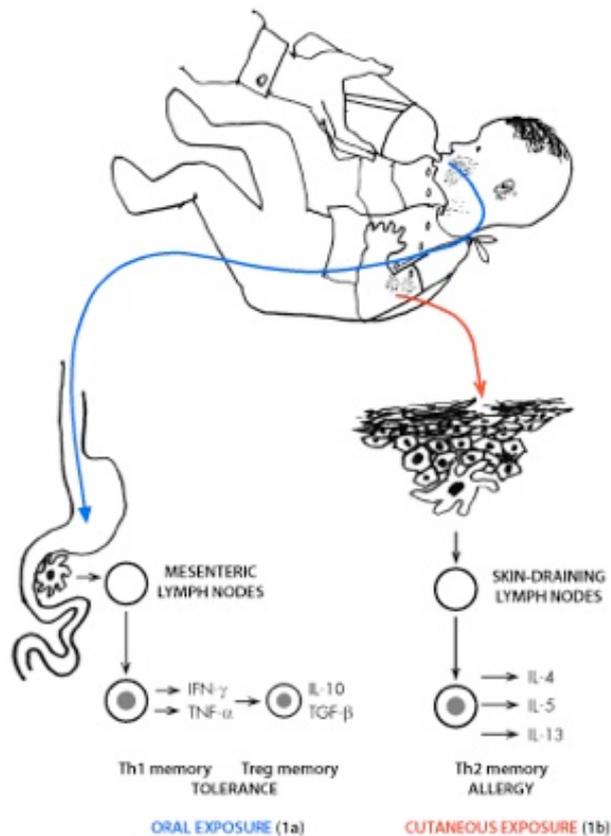
**Figura 10.** (tratta da Prescott SL 2008): La possibile “finestra critica di tolleranza”.

Alla luce poi del fatto che l’esposizione agli allergeni avviene già in utero (tramite il liquido amniotico o il passaggio transplacentare) o durante l’allattamento al seno, per lungo tempo ci si è interrogati quale sia il ruolo di tale esposizione nell’indurre sensibilizzazione *versus* tolleranza. Ad oggi le evidenze disponibili indicano che le diete materne di esclusione dell’allergene sia in gravidanza che durante l’allattamento non possano prevenire in alcun modo l’allergia nel bambino.<sup>79 89 90</sup>

Un ultimo fattore, identificato recentemente, che sembra poter influenzare l’acquisizione della tolleranza è la *via di esposizione dell’allergene*. Secondo l’ipotesi della “*dual-allergen exposure*” di Lack, il contatto dell’allergene alimentare che avviene attraverso la cute (specie quella del bambino con eczema in cui vi è un difetto intrinseco di barriera per alterazione della filaggrina) porta alla presentazione dell’antigene attraverso le cellule di Langerhans e stimola risposte Th2, a differenza del contatto per via orale in grado di attivare risposte Th1 nel GALT (figura 11). A determinare se il bambino avrà o meno l’allergia sarà il bilancio fra esposizione orale e cutanea, e l’epoca dell’esposizione attraverso una e l’altra via.<sup>64</sup> A sostegno di questa ipotesi, vi sono dati sia da studi sperimentali che su uomini. Strid e colleghi hanno mostrato in un modello murino come la sensibilizzazione IgE-specifica nei confronti di un alimento possa avvenire attraverso la pelle abrasa.<sup>91</sup> E’ interessante notare come il passaggio dell’antigene per via epicutanea non sia solo in grado di montare risposte Th2 in risposta al challenge sistemico (attraverso una riduzione dell’INF $\gamma$ , ed un aumento dell’IL4 e delle IgE), ma come questo stesso effetto Th2 sia osservabile anche quando una risposta Th1 era già stabilita, a sottolineare come la

via di esposizione - indipendentemente dalla dose – possa determinare risposte immunitarie diverse.<sup>92</sup> Lo stesso Lack, infine, ha individuato nello studio inglese di coorte dell'ALSPAC (Avalon Longitudinal Study of Parents and Children) come fattore di rischio per lo sviluppo dell'allergia alle noccioline a 5 anni di vita, l'utilizzo di creme contenenti olio di arachidi (OR 6.8 – IC 95% 1.4 – 32.9).<sup>93</sup>

Il ruolo dell'esposizione all'allergene per via epicutanea ha rivoluzionato il modo di vedere l'eczema, che da possibile conseguenza di un'allergia alimentare ne è diventato la probabile “causa”, tramite il passaggio di allergeni attraverso la barriera cutanea danneggiata e la conseguente sensibilizzazione. Sembra rinforzare questa teoria l'osservazione, in una coorte di più di 2000 bambini, che più severo l'eczema (ma solo se ad esordio sotto i 12 mesi a sottolineare il ruolo di “effect modifier” dell'età di esposizione), più probabile lo sviluppo di elevati livelli di IgE specifiche per alimenti con un chiaro effetto dose-dipendente.<sup>94</sup>



**Figura 11.** L'ipotesi della “dual-allergen-exposure” nella genesi delle allergie alimentari.

#### 4. LA RIVOLUZIONE “COPERNICANA”: DALL’ “AVOIDANCE” ALL’ INTRODUZIONE PRECOCE DEGLI ALLERGENI ALIMENTARI.

Come abbiamo visto i meccanismi immunologici alla base dell’acquisizione della tolleranza orale e i fattori che li influenzano sono molteplici, interdipendenti, ma soprattutto ancora non del tutto definiti. Alla luce però dell’attuale più profonda conoscenza di questi meccanismi, da qualche anno, l’approccio alle allergie alimentari ha subito, quella che è stata definita da un editoriale di Medico e Bambino, una vera e propria rivoluzione “copernicana”.<sup>95</sup>

Negli anni ‘80, il paradigma immunologico era che *“l’evitamento dell’allergene – specie “agli albori”, in età infantile e per quanto possibile anche prima della nascita – potesse prevenire le reazioni immunologiche alla base dello sviluppo della sensibilizzazione”*,<sup>96</sup> in netto contrasto, quindi, con il concetto di “tolleranza orale il cui prerequisito è l’esposizione continuativa all’allergene”. Il vecchio paradigma dell’evitamento ha portato negli anni ad una serie di raccomandazioni nel tentativo di prevenire le allergie (sia in termini di prevenzione primaria, ovvero della sensibilizzazione, che secondaria, ovvero delle manifestazioni cliniche delle allergie in chi già “sensibilizzato”). Nel 2000, l’American Academy of Pediatrics (AAP) proponeva come strategie di prevenzione delle allergie il prolungamento dell’allattamento al seno, il ritardo nell’introduzione degli allergeni (latte e derivati ad 1 anno, uovo a 2 anni, noccioline e pesce a 3 anni) assieme alla dieta materna di esclusione per alimenti potenzialmente “allergizzanti” (noccioline, pesce, ma anche uova e latte vaccino) durante l’allattamento.<sup>97</sup> Ma gli studi (sia trial clinici randomizzati che prospettici) eseguiti sulla base di queste raccomandazioni non hanno mostrato gli auspicati effetti protettivi, portando a rivedere le posizioni dell’AAP. Tre aree in particolare sono state studiate rispetto al “timing” dell’esposizione dell’allergene: la dieta materna durante la gravidanza e l’allattamento al seno, l’utilizzo di formule ipoallergeniche (idrolizzate o elementari) ed il ritardo nell’introduzione di alimenti potenzialmente “allergenici” nella dieta del bambino.

Come già discusso precedentemente, le diete materne sia in gravidanza che durante l’allattamento non si sono dimostrate essere associate ad una riduzione delle allergie alimentari nel bambino.<sup>80 89 90</sup>

L'utilizzo di formule "ipoallergeniche" è rimasto l'aspetto più controverso. Secondo una recente metanalisi della Cochrane (che include 14 RCT) *"ci sarebbe un effetto protettivo delle formule idrolizzate per lo sviluppo dell'allergia al latte vaccino ma solo nei bambini con familiarità atopica"*.<sup>98</sup> Un recente studio tedesco (GINI) ha poi dimostrato come, sempre in bambini ad alto rischio atopico, l'utilizzo di formule ad idrolisi spinta della caseina (ma non ad idrolisi spinta delle sieroproteine) sarebbero associate ad un rischio minore di eczema a 3 anni, senza però valutare l'aspetto specifico dell'allergia alimentare.<sup>99</sup> La posizione rivista dell'AAP è stata per questo motivo più cauta: *"... esiste una qualche evidenza che nei bambini a rischio atopico l'utilizzo di formule idrolizzate possa prevenire o ritardare la comparsa di eczema... ci sono indicazioni che non tutte le formule idrolizzate abbiano gli stessi effetti ..."*.<sup>80</sup> Da ultimo, la ritardata introduzione dei cibi solidi non sembra essere giustificata in termini protettivi nei confronti delle allergie<sup>100</sup>, e le nuove raccomandazioni dell'AAP sottolineano come *"...i dati che documentino un effetto protettivo nei riguardi dello sviluppo di malattie allergiche di qualunque intervento dietetico al di là dei 4-6 mesi sono da considerare insufficienti"*.

Ma non solo "l'avoidance" non è servita, ma potrebbe essere stata persino deleteria. La ritardata introduzione delle noccioline nella dieta del bambino sembra essere il culprit delle differenze in prevalenza fra l'allergia alle stesse nei bambini ebrei inglesi (1.85% a 6 anni) rispetto a quelli israeliani (0.17% sempre a 6 anni), questi ultimi "esposti" a quantitativi di noccioline molto maggiori e più precocemente rispetto ai loro coetanei inglesi (7.1 grammi/mese fra gli 8 e i 14 mesi rispetto a 0 gr/mese nello stesso periodo di vita).<sup>101</sup> E sempre sulla stessa "scia", non stupisce come ritardare l'introduzione del grano oltre i sei mesi (impedendo un precoce riconoscimento da parte del sistema immunitario e l'innescò dei meccanismi immunologici alla base della tolleranza) possa essere un fattore di rischio di ben quattro volte per lo sviluppo dell'allergia al grano a 4 anni.<sup>102</sup>

E non solo "l'avoidance" potrebbe essere deleteria nella "prevenzione primaria" delle allergie ma potrebbe persino peggiorare l'allergia stessa (i.e. le manifestazioni cliniche dell'allergia) in chi è già sensibilizzato nei confronti di quello specifico alimento.<sup>96</sup> Sono numerosi i case reports che suggeriscono come l'evitamento dell'allergene in bambini già sensibilizzati ma non clinicamente "reattivi" (i.e. IgE specifiche positive –

prick positivi) possa tradursi in reazioni allergiche severe. Flintermann et al descrivono per esempio una serie (con il limite di essere stata individuata in maniera retrospettiva senza un gruppo di controllo) di 11 bambini che, per la dermatite atopica e prick positivi per il latte vaccino, erano stati messi in dieta priva di latte vaccino, nonostante non avessero mai presentato alcuna reazione allergica acuta all'ingestione dei latticini, e che dopo un periodo di eliminazione di circa 2 anni sviluppavano una reazione anafilattica anche grave per semplice contatto con il latte.<sup>103</sup> In linea l'osservazione retrospettiva che nella storia alimentare della popolazione dei "superallergici"<sup>104</sup> (i.e. IgE per latte vaccino > 85 KUA/L, almeno 1 reazione anafilattica di classe 4 o 5 secondo la classificazione di Clark) sottoposti a protocollo di desensibilizzazione orale specifica presso il nostro Istituto, il 56% dei casi aveva sospeso il latte nonostante venisse prima tollerato.<sup>105</sup> Ed ancora, l'osservazione di soggetti che, sottoposti a desensibilizzazione orale specifica, alla sospensione anche per un breve periodo dell'alimento presentavano nuovamente sintomi allergici acuti immediati al contatto con l'allergene,<sup>106</sup> a suggerire che sia l'esposizione continua e regolare all'allergene a mantenere la tolleranza piuttosto che le esposizioni casuali.

Tutte queste evidenze negli ultimi due anni hanno portato a "guardare" alle allergie da un'altra prospettiva, "al contrario"<sup>95 107</sup>, spostando l'attenzione dall' "avoidance" alla ricerca di strategie in grado di "rafforzare la tolleranza". Allen scrive "*... forse il nostro pensiero deve essere focalizzato a identificare la presentazione degli allergeni alimentari in termini di dose ed forma, tali da indurre i meccanismi naturali della tolleranza orale ...*".<sup>96</sup> E Wennergren sottolinea: "*...l'introduzione precoce rispetto all'evitamento potrebbe essere una strategia migliore nella prevenzione delle allergie alimentari*".<sup>107</sup>

In linea con questo cambio di rotta, si mettono persino programmi di salute nazionali come quello finlandese, il Finnish Allergy Programme 2008-2018 che spostano l'enfasi "*dall'evitamento ... a quelle strategie in grado di rafforzare la tolleranza a livello di popolazione...*" sottolineando con forza che "*...l'eccessivo evitamento dell'antigene possa essere dannoso tanto da impedire lo sviluppo dei meccanismi regolatori alla base della tolleranza...*"<sup>36</sup>. Tutto ciò sembra finalmente dimostrato da un recentissimo studio randomizzato: il LEAP Study (Learning About Peanut Allergy) in cui l'introduzione precoce dell'arachide in lattanti fra 4 e gli 11 mesi di età ad alto rischio

per allergia ha ridotto drasticamente l'incidenza di allergia all'arachide a 5 anni di vita rispetto al gruppo di controllo in cui l'arachide è stato introdotto più tardivamente, seguendo le attuali raccomandazioni vigenti in Gran Bretagna.<sup>108</sup> Prossimamente dovrebbero poi essere disponibili i dati di un altro grosso studio randomizzato a cura degli stessi ricercatori, l'EAT study (Enquiring about tolerance), in cui viene valutato il ruolo preventivo sull'allergia alimentare dell'inserimento precoce (ossia nella dieta del lattante a partire dai 3 mesi) di 6 alimenti allergizzanti in successione.<sup>109</sup>

## 5. LA DESENSIBILIZZAZIONE ORALE COME STIMOLAZIONE DI TOLLERANZA

Ad oggi, la terapia dell'allergia è la dieta di esclusione (in attesa di una spontanea acquisizione della tolleranza o persino per tutta la vita), e nel caso di accidentale ingestione dello stesso il ricorso a farmaci quali l'adrenalina, gli antistaminici e il cortisone. Come alternativa, con l'intento di stimolare la tolleranza anche in chi già allergico, c'è la desensibilizzazione orale per alimenti (DOPA – nota nel mondo anglosassone come SOTI “Specific Oral Tolerance Induction” o più recentemente OIT “Oral ImmunoTheray”), ad oggi unico intervento attivo ampiamente studiato dell'allergia alimentare. Consiste nella somministrazione di piccoli dosi (inizialmente anche micro o milligrammi) dell'alimento con gradualmente aumenti giornalieri, solitamente con una prima fase di induzione ospedaliera seguita da una fase di mantenimento domiciliare.

Sono diversi gli studi che finora hanno valutato l'efficacia di questa strategia e la Tabella 1 riporta le caratteristiche dei più importanti.<sup>79-84</sup> Presi nel loro complesso, la percentuale di efficacia della OIT è molto variabile (dal 36% al 77%), con valori ben più alti nel momento in cui si considera l'acquisizione della tolleranza “parziale”, ovvero la capacità di tollerare dosi maggiori dell'alimento rispetto all'avvio del protocollo, aspetto per niente trascurabile dal punto di vista clinico in quanto in grado di proteggere il paziente da inavvertite somministrazioni dell'allergene, e migliorarne la qualità di vita (tabella 1).

Rimane in discussione se però la OIT modifichi effettivamente la storia naturale conducendo ad una vera e stabile acquisizione della tolleranza o piuttosto comporti solo un temporaneo innalzamento della soglia di sensibilità. Questo dubbio nasce dall'osservazione che nello studio randomizzato di Staden<sup>114</sup> la percentuale dei pazienti che raggiungono la tolleranza “permanente” è uguale nel gruppo sottoposto a OIT (36%) rispetto al gruppo messo in dieta di eliminazione (35%). Gli stessi autori però sottolineano come la OIT sia comunque superiore alla dieta di eliminazione, in quanto i vantaggi clinici offerti anche dalla sola tolleranza parziale (64% nel gruppo OIT) sono considerevoli.

L'aspetto della tolleranza "parziale" e l'esistenza di diversi fenotipi di risposta clinica alla OIT (figura 12) sottolinea come la tolleranza costituisca un "continuum" e suggerisce che i meccanismi immunologici che stanno alla base della tolleranza "permanente" siano distinti da quella "parziale".<sup>114</sup> Un altro aspetto della tolleranza "parziale" è rappresentato dall'esistenza di condizioni intercorrenti (definite da Staden come "*augmentation factors*", fattori di aggravamento) che aumentano il rischio che una dose di allergene precedentemente tollerata non lo sia più: in primis le infezioni, l'esercizio fisico.<sup>115</sup>,<sup>110</sup>

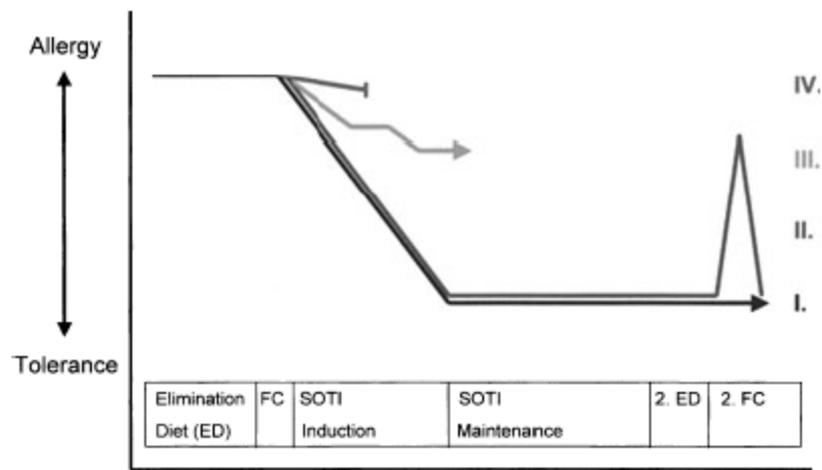


Figura 12. (tratta da Staden 2007). I 4 tipi di risposta alla OIT (ED: dieta di eliminazione, FC: challenge): I. La tolleranza permanente (o storia naturale?) II. Tolleranza parziale con reazione all'allergene alla sua sospensione III. Tolleranza parziale con aumento della soglia inizialmente tollerata. IV. Non risposta alla OIT

**Tabella 1.** Selezione di studi sulla OIT. \*non specificato quanti sotto l'anno. † 40 mg corrispondono a 1.3 ml, 5100 mg a 164 ml, 8100 mg a 261 ml di latte vaccino intero

	Tipo di studio	Allergene (N)	Età	Durata DOPA	Efficacia e altri outcome
<i>Patriarca et al, 2003</i> <sup>111</sup>	Non randomizzato, in aperto, prospettico con gruppo controllo (N=16 che avevano rifiutato la OIT)	Latte (24) Uova (16) Pesce (10) Arancia (2) Arachidi (1) Masi (1) Pesca (1) Mela (1) Lattuga (1) Fagioli (1)	3-55aa  (N=32 con <16 aa)	3-12 mesi	45 su 58 (77%) che han completato protocollo desensibilizzazione  Diminuzione IgE a 6-12-18 mesi  Aumento IgG4 a 6-12-18 mesi (più alte a 6 mesi)
<i>Meglio et al, 2004</i> <sup>112</sup>	In aperto, senza gruppo di controllo	Latte (21)	5-10 aa	6-8 mesi	15 su 21 (71.4%) tolleranza fino a 200 ml latte/die  3 su 21 (14.2%) tolleranza parziale (40-80 ml/die)  Riduzione prick in 6 mesi  IgE non variate
<i>Buchanan et al, 2007</i> <sup>113</sup>	In aperto, senza gruppo di controllo	Uovo (7)	1-16 aa  (mediana 2 aa)	24 mesi	4 su 7 (57%) tollerano fino a 8 gr di uovo
<i>Staden et al, 2007</i> <sup>114</sup>	Randomizzato, in aperto: gruppo OIT vs gruppo ELIMINAZIONE (N=25 vs N=20)  Al termine, dieta eliminazione per 2 mesi con challenge al termine	Latte (14) Uovo (11)	0.6-12.9 aa  (mediana 2.5 aa)*	7 mesi induzione + 7-15 mesi mantenimento	9 su 25 (36%) tolleranza permanente, 7 su 25 (28%) tolleranza "parziale"(sintomi dopo eliminazione o aumento soglia dose tollerata) vs 7 su 20 diventano tolleranti dopo eliminazione(35%)  Diminuzione IgE nei SOTI responsivi e nei tolleranti naturali
<i>Longo et al, 2008</i> <sup>115</sup>	Randomizzato, in aperto: gruppo OIT vs gruppo ELIMINAZIONE (N=30 vs N=30)  Popolazione di superallergici	Latte (30)	5-17 aa	12 mesi	11 su 30 (36%) tolleranti fino a 150 ml di latte 16 su 30 (54%) tolleranti fra 5-150 ml vs 30 su 30 rimangono sensibili a minime quantità  Diminuzione IgE a 6 e 12 mesi nel gruppo DOPA
<i>Sripak et al, 2008</i> <sup>116</sup>	Randomizzato, con placebo: gruppo OIT vs gruppo PLACEBO (N=13 vs N=7)  Seconda fase di unblinding e DOPA in aperto in 6 su 7 del gruppo PLACEBO	Latte (13)	6-21 aa	6 mesi	Aumento dose soglia di tolleranza da 40 mg a 5100 mg† nel gruppo DOPA. Non aumento nel gruppo PLACEBO.  Sui 6 in aperto, aumento dose soglia fino a 8100 mg†  Non variazione IgE.
<i>Burks et al 2012</i> <sup>117</sup>	Randomizzato, doppio cieco con placebo: gruppo OIT vs gruppo PLACEBO (N=40 vs N=15)	Uovo (40)	5-11 aa	22 mesi	Aumento IgG4 solo gruppo DOPA Tolleranti stabili (dopo 2 mesi di dieta di eliminazione secondaria): 11/40 (28%) vs 0 Tolleranti in DOPA: 30 (75%) vs 0

## 6. STUDIO “LATTANTI AL BIVIO”: TRA PREVENZIONE E TERAPIA

### 6.1 Presupposti

A partire da questa nuova visione delle allergie alimentari, dal fatto che la precoce introduzione regolare e continuativa dell'allergene possa indurre la tolleranza orale allo stesso, e che, invece, una dieta di esclusione possa favorire l'accrescersi della sensibilizzazione allergica, non potevamo non modificare il nostro atteggiamento nella gestione dell'allergia alimentare precoce. Abbiamo allora identificato quello che potremmo definire un gruppo di “*lattanti al bivio*”, ovvero lattanti che secondo la pratica clinica corrente e le attuali linee guida avrebbero dovuto essere messi in dieta di esclusione, ma che, in base alle attuali conoscenze sui meccanismi della tolleranza orale, potevano beneficiare di una precoce introduzione (o re-introduzione) dell'alimento offendentente.

A nostro parere due possono essere i modelli di “*lattanti al bivio*”:

- il lattante con già storia clinica di reazioni allergiche IgE mediate all'assunzione dell'alimento, espressione di una possibile naturale tolleranza “parziale”
- il lattante con eczema e sensibilizzazione (i.e. prick positivi) per alimento/i ancora mai assunto/i.

In entrambi i casi l'introduzione precoce in maniera graduale e continuativa dell'alimento potrebbe indurre una più rapida acquisizione della tolleranza rispetto alla nota storia naturale dell'allergia alimentare. Nel primo modello di lattante “allergico” l'intento è quello di effettuare una vera e propria “immunoterapia orale precoce”, andando ad agire in prossimità dell' “early critical window” ipotizzata dalla Prescott;<sup>88</sup> nel secondo di lattante “sensibilizzato a rischio di allergia” l'intento è di “prevenzione primaria”, cioè di impedire lo sviluppo di manifestazioni cliniche a fronte di una già significativa sensibilizzazione. In entrambi i casi possiamo definire il nostro approccio quello di una “*desensibilizzazione orale precoce*” o “*immunoterapia orale (OIT) precoce*”.

### 6.2 Obiettivi

L'obiettivo principale del presente lavoro di tesi è quello di verificare la fattibilità e la sicurezza di un protocollo di OIT precoce nei lattanti con (o a rischio di) allergia alimentare definiti come sopra.

Come outcome secondario si vuole dare una valutazione di efficacia rapportata alla storia naturale dell'allergia alimentare così come descritta in letteratura.

### **6.3 Materiali e Metodi**

Dal maggio 2012 è attivo, presso l'IRCCS Burlo Garofolo di Trieste, il progetto di ricerca "*Lattanti al bivio: studio pilota sull'efficacia e sicurezza di un protocollo di desensibilizzazione orale all'esordio dell'allergia alimentare*", progetto dal quale ha origine questo lavoro di tesi. La popolazione includibile nello studio comprende tutti i bambini di età inferiore ai 18 mesi afferenti alla S.S. di Allergologia, Dermatologia e Trattamento dell'Asma dell'Istituto per allergia alimentare e in dieta di esclusione per l'alimento in causa. Nella presente tesi sono stati inseriti anche quei lattanti afferenti al suddetto centro per altra condizione primaria (per lo più grave eczema costituzionale) e in dieta per alimento verso cui era documentata una chiara sensibilizzazione allergica IgE-mediata mediante prick-test o dosaggio delle IgE specifiche sieriche.

Gli alimenti offendenti inizialmente considerati come includibili nello studio per prevalenza di allergia in Italia erano: il latte vaccino, l'uovo di gallina, il frumento e il pesce e la forma dell'alimento usato per l'OIT rispettivamente; latte vaccino pastorizzato fresco intero, emulsione di uovo fresco di gallina, semolino istantaneo (24 g in 200 ml di acqua o brodo), omogenizzato di pesce. In realtà la maggior parte dei lattanti eleggibili risultava allergica al latte e all'uovo e i risultati per i pochi bambini che hanno fatto l'OIT per frumento e pesce non sono stati analizzati.

I criteri di esclusione erano: dermatite in immunodeficienza o sindrome ipereosinoflica, sensibilizzazione in assenza di storia di reazione allergica alimentare con valori (diametro medio prick-test o livello di IgE specifiche) inferiori al VPP del 95%, impossibilità della famiglia a seguire i follow-up previsti dallo studio.

Il protocollo prevede:

- Esecuzione dei prick test di conferma.
- Proposta di arruolamento, illustrazione del progetto di studio e compilazione del consenso informato da parte dei genitori.
- Esecuzione degli esami ematici per IgE e IgG4 specifiche per l'alimento in causa.
- Avvio del TPO a basse dosi: l'alimento viene somministrato diluito in una bevanda abitualmente assunta dal bambino o in una pappa semiliquida partendo dalla dose minima di 1 ml (0,33 ml nel caso di emulsione di uovo crudo) fino a

un massimo di 10 ml (2 ml nel caso di emulsione di uovo crudo). La desensibilizzazione non viene avviata (fallimento) in caso già la prima dose somministrata al TPO induca una reazione allergica anche lieve, purchè sistemica (grado 2), oppure, dopo qualunque delle 3 dosi del TPO, si verifichi una reazione grave (grado 4-5).

- Proseguimento a domicilio di assunzione giornaliera della dose massima tollerata al TPO (viene raccomandato ai genitori di mantenere in osservazione il piccolo per almeno due ore dopo la somministrazione giornaliera dell'alimento offendentente e dimezzare la dose domiciliare in corso di infezioni virali intercorrenti).
- Ripetizione dei prick test a ogni controllo e dosaggio delle IgE specifiche e IgG4 dopo 2 mesi circa dall'avvio del protocollo.
- Raggiunta la dose di almeno 20 ml di latte vaccino (8 ml di emulsione di uovo crudo) e un significativo incremento delle IgG4 rispetto al valore di partenza è previsto che gli aumenti successivi più modesti e gradualmente siano proseguiti a domicilio secondo un protocollo individualizzato.
- A sei mesi dal primo TPO, esecuzione TPO completo per verificare l'acquisizione della tolleranza a una dose *standard* dell'alimento in causa (150 ml per il latte vaccino, 40 ml per l'uovo, 24 g per il semolino, 80 g di omogenizzato per il pesce).

Abbiamo in ogni caso provveduto a dare informazioni dettagliate circa la gestione di eventuali reazioni allergiche con antistaminici e cortisone per bocca e raccomandato il pronto ricorso all'attenzione medica in caso di reazione con sintomi respiratori o cardiocircolatori. Prevedendo un protocollo molto cauto che nelle fasi iniziali e più rischiose richiede il solo mantenimento di una dose collaudata in ambiente protetto è stato scelto di non fornire l'adrenalina iniettiva, considerato anche che in commercio non si trovano siringhe predosate per bambini con peso inferiore ai 15 Kg e che non esistono ad oggi in letteratura segnalazioni di reazioni anafilattiche fatali in questa fascia d'età.

Per classificare la gravità delle eventuali reazioni avverse è stata usata la classificazione di Sampson<sup>118</sup> del 2003, ripresa e semplificata dell'*European Academy of Allergology and Clinical Immunology* (EAACI)<sup>119</sup> nel 2007, che divide i quadri clinici dell'anafilassi in 5 gradi: 1 e 2 lieve, 3 moderato, 4-5 grave (figura 13).

Si è esplicitamente deciso di non prevedere nel disegno dello studio un gruppo di controllo, sostanzialmente per due ragioni: la prima basata sul fatto che la storia naturale dei bambini che adottano i protocolli attualmente vigenti (dieta di eliminazione e rinvio del test di provocazione orale di 9-12 mesi) è ben nota e sancita da vasta letteratura; la seconda, e ancor più forte, è che dai nostri dati preliminari su una popolazione di 32 casi trattati secondo protocollo sperimentale la percentuale di successo è superiore al 90% senza evidenza di effetti

collaterali rilevanti<sup>120</sup>. Proporre una randomizzazione che preveda il placebo dopo aver doverosamente discusso con le famiglie le basi scientifiche e di esperienza clinica del nuovo tipo di intervento, risulterebbe difficile, dal punto di vista pratico e nei fatti non etico dal punto di vista della coscienza personale e professionale.

#### Analisi statistica

Tutti i dati sono stati raccolti ed archiviati su database in formato MS Access 2007, mentre per le analisi di statistica descrittiva sono stati utilizzati i software MiniTab for Windows v14, MS Excel 2007.

## Quadro clinico

		GRADO				
		Cutaneo	Gastrointestinale	Respiratorio	Cardiovascolare	Neurologico
LIEVE	<b>1</b>	Prurito e eruzione cutanea localizzata della faccia, degli occhi, etc. (orticaria angioedema localizzato)	Prurito in bocca Lieve gonfiore delle labbra	–	–	–
	<b>2</b>	Prurito e eruzione cutanea diffusa (orticaria angioedema generalizzato)	Come sopra + dolori addominali e/o nausea e/o vomito	Ostruzione nasale e/o starnuti ripetuti	–	Variazione nel comportamento o malessere
MODERATA	<b>3</b>	Come sopra	Come sopra + vomito ripetuto o rigonfiamento della lingua	Secrezione e marcata ostruzione nasale, sensazione di prurito o gonfiore o ostruzione della gola	Tachicardia (aumento della frequenza cardiaca > 15 battiti/min.) pallore	Variazione nel comportamento o malessere più ansia
GRAVE	<b>4</b>	Come sopra	Come sopra + diarrea	Come sopra + raucedine, tosse abbaiante, difficoltà nel deglutire, o nel respirare, asma, colorito bluastrò delle unghie o delle labbra (cianosi)	Come sopra + lieve alterazione del ritmo cardiaco o abbassamento della pressione arteriosa	Come sopra + confusione mentale e/o sensazione di morte imminente e/o collasso
	<b>5</b>	Come sopra	Come sopra + perdita di controllo dell'intestino	Come sopra + più arresto respiratorio	Severa bradicardia e/o ipotensione o arresto cardiaco	Perdita di coscienza

**Figura 13.** Classificazione di gravità dell'anafilassi redatta dalla Commissione anafilassi, allergie alimentari e dermatite atopica della società italiana di immunologia e allergologia pediatrica (SIAIP).

## 6.5 Risultati

Da maggio 2012 a novembre 2014 lo studio è stato proposto a 245 bambini (172 M) afferenti al S.S. di Allergologia, Dermatologia e Trattamento dell'Asma dell'IRCCS Burlo Garofolo di Trieste e 239 (167 M) hanno aderito al protocollo (97%). Di questi 28/239 (12%; 18 M) sono andati persi al follow-up. I dati clinici dei soggetti persi al follow-up non differivano in maniera significativa dagli altri soggetti inclusi nello studio e in tutti il protocollo stava procedendo senza complicazioni al momento dell'ultimo controllo disponibile.

Alla fine sono stati analizzati i dati di 211 lattanti (149 M).

Il protocollo è stato concluso con successo (raggiungimento della dieta libera per l'alimento in causa) in 140/211 lattanti (66%), mentre è attualmente in corso in altri 37/211 soggetti (18%). Nel 10% dei casi (20/211) non è stato possibile avviare la desensibilizzazione per comparsa di reazione allergica sistemica (grado 2-3) già alla prima dose del TPO (16/20 casi) o per reazione grave (grado 4) durante il TPO. Da sottolineare che anche le reazioni di grado 4 sono state così classificate per la presenza di sintomi respiratori quali lieve dispnea, tosse abbaiante, pianto con disfonia e sono state tutte facilmente controllate con l'adrenalina in aerosol. Infine 13/211 lattanti (6%; 8 M) hanno sospeso il protocollo: solo in un caso la sospensione è stata dovuta all'insorgere di effetti collaterali a domicilio (vomito ad ogni somministrazione dell'alimento in causa non risolvibile nemmeno riducendo la quantità dell'allergene), mentre in tutti gli altri la scelta è stata imposta dal rifiuto del bambino ad assumere l'alimento in causa anche se mascherato (*food aversion*).

Le desensibilizzazioni hanno riguardato i seguenti alimenti in ordine di frequenza: latte (58%), uovo (38%), frumento (3%), pesce (<1%). In relazione alla preponderanza del latte e dell'uovo in questa esperienza l'analisi dei dati è stata poi condotta solo sui lattanti desensibilizzati per questi alimenti. I soggetti sono stati divisi in 2 gruppi principali in base all'alimento offendente (gruppo latte e gruppo uovo) e in 2 sottogruppi in base al fatto che la diagnosi di allergia fosse certa (allergici) oppure solamente presunta sulla base del riscontro di sensibilizzazione per alimento mai introdotto o escluso dalla dieta (sensibilizzati). Nella tabella 2 è riportata la composizione dei gruppi e dei sottogruppi. Diciotto soggetti, dopo aver completato con successo la desensibilizzazione al latte, hanno avviato l'analogo percorso per l'uovo.

	Latte		Uovo	
	Allergici (n = 101, M 66)	Sensibilizzati (n = 24, M 16)	Allergici (n = 32, M 25)	Sensibilizzati (n = 45, M 34)
<b>OIT conclusa</b>	70 (M 45) 69%	17 (M 11) 71%	17 (M 14) 53%	29 (M 23) 64%
<b>OIT in corso</b>	19 (M 12) 19%	3 (M 1) 12%	7 (M 6) 22%	7 (M 6) 16%
<b>OIT non avviabile</b>	7 (M 5) 7%	4 (M 4) 17%	4 (M 2) 12,5%	5 (M 4) 11%
<b>OIT sospeso</b>	5 (M 4) 5%	-	4 (M 3) 12,5%	4 (M 1) 9%

**Tabella 2.** Popolazione in studio suddivisa per alimento e per diagnosi. Gli allergici sono così definiti dalla presenza di anamnesi positiva per reazione allergica all'alimento in causa, i sensibilizzati hanno una chiara sensibilizzazione IgE-mediata all'alimento non presente nella loro dieta abituale. M =maschi, n = numero soggetti; OIT = immunoterapia orale.

### Gruppo latte

Le caratteristiche cliniche e di sensibilizzazione dei 124 lattanti del gruppo latte al momento dell'arruolamento nello studio sono riportate in tabella 3.

Gruppo Latte (n = 124)				
<b>Età mediana alla diagnosi (mesi)</b>	7.5 (RI 6-10.2)			
<b>Età mediana avvio protocollo (mesi)</b>	7.7 (RI 6.1-11.1)			
<b>Familiarità per atopia (n)</b>	66 (53 %)			
<b>Dermatite atopica concomitante (n)</b>	89 (72%)			
<b>Positività prick-test (n)</b>	Latte*	α-lattoglobulina	β-lattoglobulina	caseina
	124 (100%)	104 (84%)	78 (63%)	53 (43%)
<b>Diametro medio prick-test (mm; DS)</b>	7.4 (2.4)	5.7 (2.4)	6.2 (2.5)	4.7 (1.7)
<b>Valore medio IgE specifiche (kU/l;DS)</b>	7.3 (12.3)	5.7 (9.8)	7.9 (11.9)	7.9 (13.3)

**Tabella 3.** Descrizione della popolazione del gruppo latte al momento dell'arruolamento nello studio. DS=Deviazione Standard. \* Prick-by-prick con latte vaccino pastorizzato fresco intero.

Il sottogruppo dei lattanti con allergia certa al latte era composto da 101 soggetti (81%), inclusi nello studio dopo la prima reazione allergica avvenuta all'età mediana di 5,4 mesi (range IQ: 4,2-6,2). Nell'86% dei casi (87/101) si era trattato di una reazione lieve (grado 2), nel 2% dei casi di una reazione moderato (grado 3), nel 12% dei casi di una reazione grave (grado 4). Ventinove famiglie (29%) si sono rivolte al Pronto Soccorso locale in occasione della prima reazione; in 23 casi è stata fatta terapia con

antistaminico e/o steroide per via generale, in un unico caso l'adrenalina i.m. Le altre 78 prime reazioni sono state autolimitate e a risoluzione spontanea.

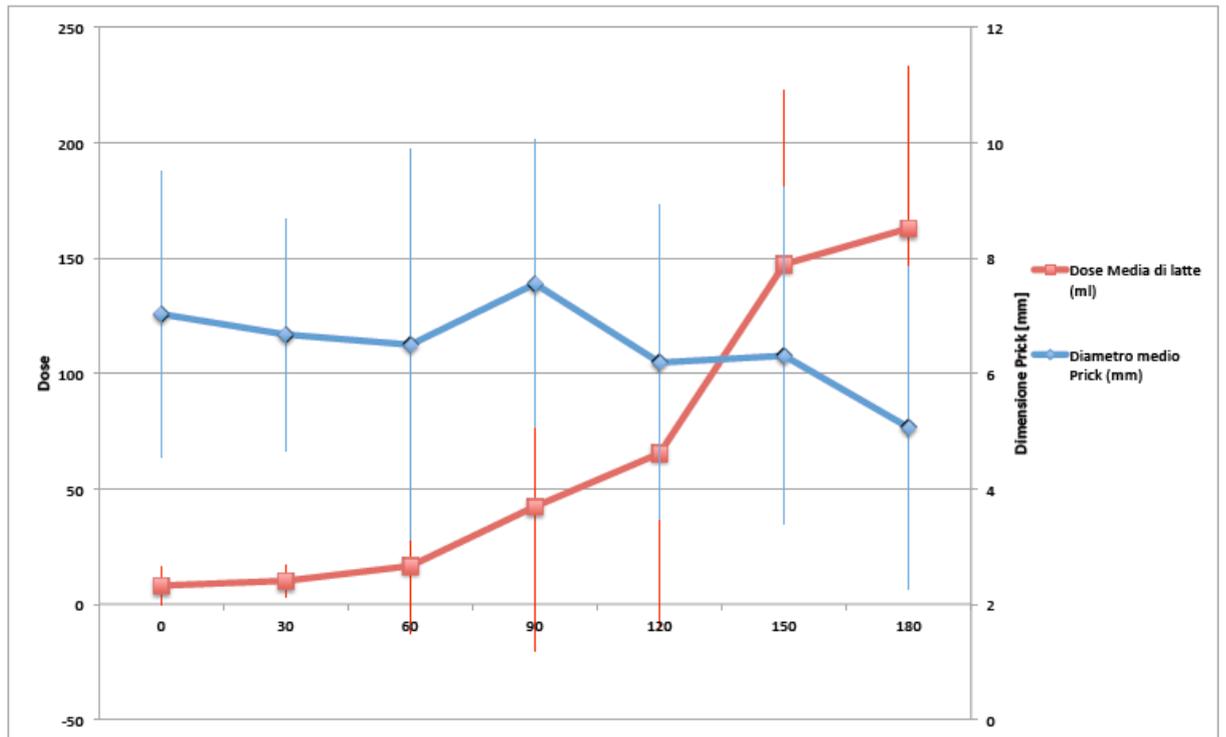
I 24 soggetti (19%) del sottogruppo dei sensibilizzati al latte erano a dieta priva di latte al momento dell'inclusione nello studio; in 22 casi (90%) i test allergici erano stati fatti per la presenza di dermatite atopica e nei restanti 2 a seguito di un'orticaria acuta senza rapporto temporale di causa-effetto con l'assunzione di latte vaccino o derivati. Il 50% di questo sottogruppo di lattanti (12/24) aveva già introdotto il latte vaccino in qualche forma nella dieta e, dopo l'esito dei test, era stata consigliata in altra sede dieta di eliminazione di latte vaccino e derivati.

Attualmente 77 lattanti del gruppo latte (62%) hanno completato con successo il protocollo e sono attualmente in dieta libera, mentre 22 (18%) stanno procedendo con il graduale aumento delle dosi quotidiane di latte vaccino senza reazioni avverse.

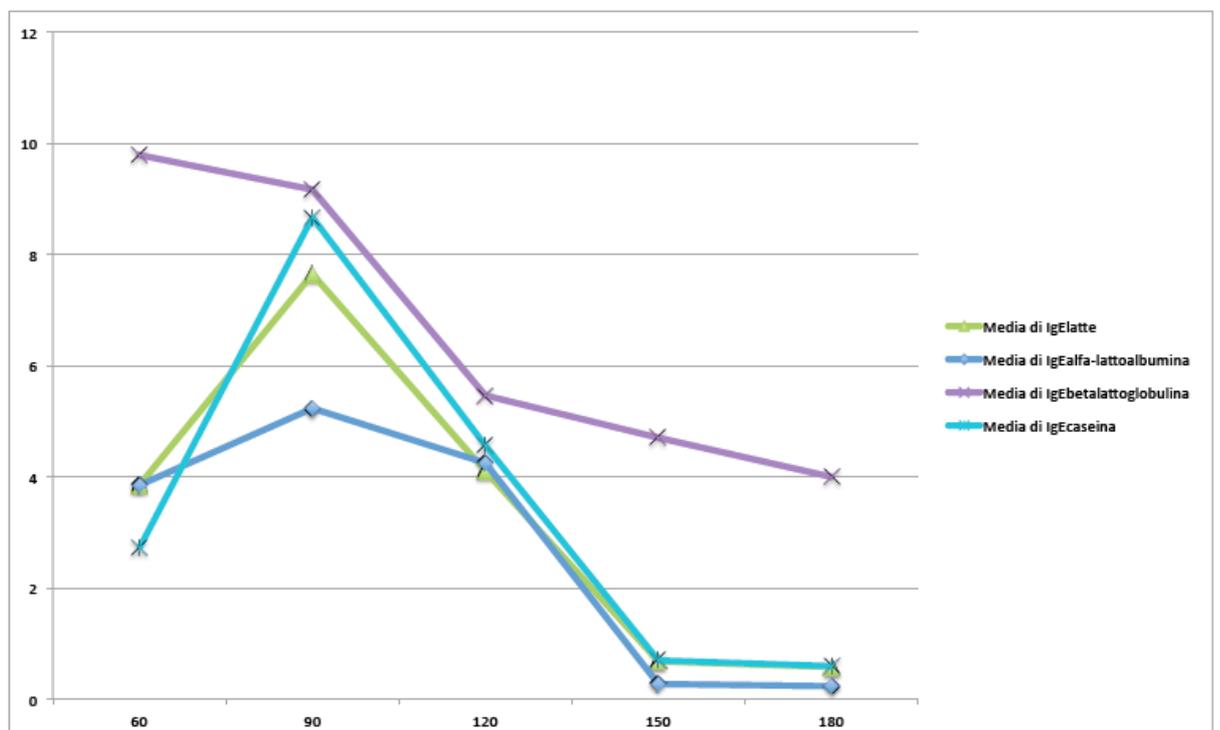
Durante il protocollo si sono verificate in media 1,1 per paziente (SD 0,76). Si è trattato di reazioni sempre lievi (inferiori o uguali al grado 2; 90% orticaria periorale a rapida risoluzione spontanea), tranne che in un caso di reazione di grado 3 durante il TPO iniziale. Solo in quest'ultimo caso è stata fatta terapia con adrenalina in aerosol, in aggiunta all'antistaminico e allo steroide per os.

Nei 77 lattanti in cui il protocollo di OIT è stato concluso il tempo mediano di raggiungimento della dieta libera è stato di 155 giorni (range IQ: 123-217). La guarigione è avvenuta entro i 12 mesi di età nel 37% dei casi; entro i 24 mesi nel 91% dei casi; entro i 36 mesi 100% dei casi.

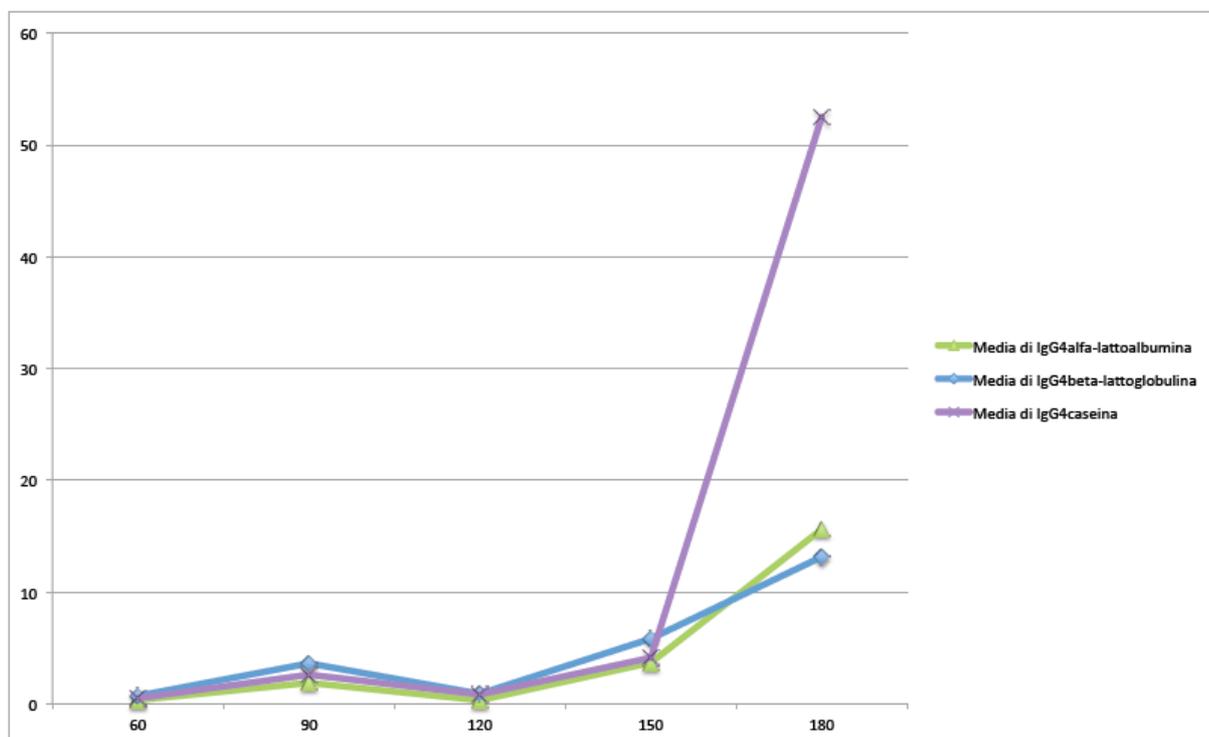
Dal punto di vista immunologico si è assistito a una progressiva riduzione del livello delle IgE specifiche per latte e lattoproteine dopo un iniziale aumento paradossale e a un analogo andamento del diametro del prick test per gli stessi allergeni, sebbene più lento e graduale (grafici 1 e 2). Le IgG4 specifiche hanno mostrato un rilevante e rapido incremento dopo circa 5 mesi dall'avvio del protocollo, quando il 50% dei soggetti è ormai a dieta libera, sebbene già attorno ai 3 mesi sia visibile un lieve trend in salita (grafico 3).



**Grafico 1.** Modifiche delle dimensioni medie del prick by prick per il latte e dose media di latte vaccino tollerata (in ml) in relazione al tempo (in giorni) trascorso dall' inizio dell'OIT.



**Grafico 2.** Modifiche nel tempo (in giorni) del valore medio delle IgE specifiche per latte e principali lattoproteine (kU/l)



**Grafico 3.** Modifiche nel tempo (in giorni) del valore medio delle IgG4 specifiche per latte e principali lattoproteine (mgA/l)

I parametri basali dei lattanti nel quale il protocollo di OIT non è stato iniziato (fallimento) per comparsa di effetti avversi rilevanti in riferimento alla bassa dose scatenante i sintomi o alla gravità della reazione (crf materiali e metodi) differivano in maniera significativa da quelli dei lattanti che hanno potuto avviare il protocollo soprattutto per quanto riguardava il livello di IgE sieriche specifiche per latte e lattoproteine (tabella 4).

Le reazioni avvenute al primo TPO sono state della seguente gravità: grado 2 (27%), grado 3 (18%), grado 4 (55%). Tutte le reazioni sono state agevolmente controllate con antistaminico e steroide per os, mentre nei 6 casi in cui la reazione allergica ha avuto anche una componente respiratoria (tosse stizzosa, disfonia e/o broncospasmo) ottima è stata la risposta ad un singolo aerosol di adrenalina (0,1 mg/kg). A distanza di un anno dal TPO 9/11 (81%) bambini sono ancora a dieta di eliminazione, 1 ha liberalizzato la dieta attorno ai 12 mesi, 1 ha effettuato il TPO da meno di 12 mesi ed è ancora in dieta di eliminazione.

Gruppo Latte Falliti (n = 11)				
<i>Età mediana alla diagnosi (mesi)</i>	8 (RI 6.2-11.4)			
<i>Età mediana avvio protocollo (mesi)</i>	8.2 (RI 6.2-12)			
<i>Familiarità per atopia (n)</i>	4 (38 %)*			
<i>Dermatite atopica concomitante (n)</i>	8 (75%)			
<i>Positività Prick-test (n)</i>	Latte*	$\alpha$ -lattoglobulina	$\beta$ -lattoglobulina	caseina
	11 (100%)	11 (100%)	7 (63%)	8 (75%)*
<i>Diametro medio Prick-test (mm; DS)</i>	8.6 (2.1)	7.8 (2.8)	9 (1.9)	5 (1.6)
<i>Valore medio IgE specifiche (kU/l;DS)</i>	103*	94.5*	43*	10*

**Tabella 4.** Descrizione dei soggetti del gruppo latte che non hanno potuto avviare la OIT al momento dell'arruolamento nello studio. DS=Deviazione Standard. \* Prick-by-prick con latte vaccino pastorizzato fresco intero. \*  $p \leq 0,05$ .

### Gruppo uovo

Le caratteristiche cliniche e di sensibilizzazione dei 124 lattanti del gruppo latte al momento dell'arruolamento nello studio sono riportate in tabella 5.

Gruppo uovo (n = 77)				
<i>Età mediana alla diagnosi (mesi)</i>	10.4 (RI 7.1-13)			
<i>Età mediana avvio protocollo (mesi)</i>	11.6 (RI 8.8-14.4)			
<i>Familiarità per atopia (n)</i>	48 (62 %)			
<i>Dermatite atopica concomitante (n)</i>	68 (88%)			
<i>Positività prick-test (n)</i>	Albume*	Ovoalbume	Ovomucoide	Pavesino*
	77 (100%)	68 (75%)	29 (38%)	29 (38%)
<i>Diametro medio prick-test (mm; DS)</i>	8.7 (2.5)	5 (1.3)	5.1 (3)	4.1 (1.4)
<i>Valore medio IgE specifiche (kU/l;DS)</i>	Albume	nGal d1	nGal d2	nGal d3
	52.3 (103.4)	5.4 (12)	9.9 (11.8)	0,4 (0,7)

**Tabella 5.** Descrizione della popolazione del gruppo uovo al momento dell'arruolamento nello studio. DS=Deviazione Standard. nGal d1 = ovomucoide; nGal d2 = ovoalbumina; nGal d3 = ovotransferrina; nGal d4 = lisozima.\* Prick-by-prick.

Il sottogruppo dei lattanti con allergia certa all'uovo era composto da 32 soggetti (42%), inclusi nello studio dopo la prima reazione allergica avvenuta all'età mediana di 10,4

mesi (range IQ: 8,9-12). Nella totalità dei casi si è trattato di una reazione lieve (grado 2). Undici famiglie (34%) si sono rivolte al Pronto Soccorso locale in occasione della prima reazione; in tutti e 11 casi è stata praticata terapia con antistaminico e/o steroide per via generale, in nessun caso l'adrenalina i.m. Le altre 21 prime reazioni sono state autolimitate e a risoluzione spontanea. In 25 soggetti (78%) l'uovo era già stato assunto in precedenza senza problemi, in 15 lattanti anche come uovo poco cotto, ma in quantità minore rispetto a quella che aveva provocato la reazione, negli altri 10 solo come uovo cotto in matrice di frumento.

I 45 soggetti (58%) del sottogruppo dei sensibilizzati all'uovo erano a dieta priva di uovo crudo/poco cotto al momento dell'inclusione nello studio e 29/45 (64%) non lo avevano mai assunto in nessuna forma. In due casi l'uovo crudo era già stato introdotto nella dieta senza problemi, ma poi eliminato nel tentativo di curare la dermatite.

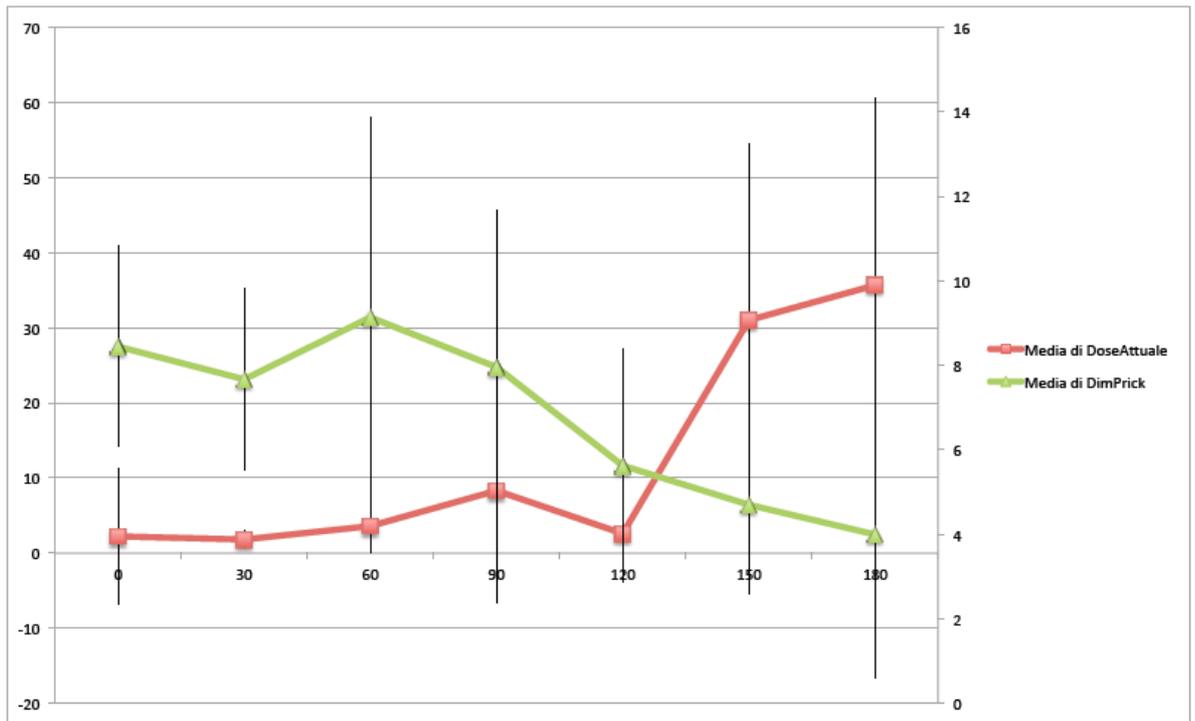
Nel 20% dei casi la sensibilizzazione all'uovo era stata ricercata per la presenza di dermatite atopica, negli altri 36 soggetti era stata riscontrata nell'indagare un'altra allergia alimentare e 18 di questi lattanti avevano già completato con successo la OIT per il latte vaccino.

Attualmente 46 lattanti del gruppo uovo (60%) hanno completato con successo il protocollo e sono attualmente in dieta libera, mentre 14 (18%) stanno procedendo con il graduale aumento delle dosi quotidiane di uovo crudo senza reazioni avverse.

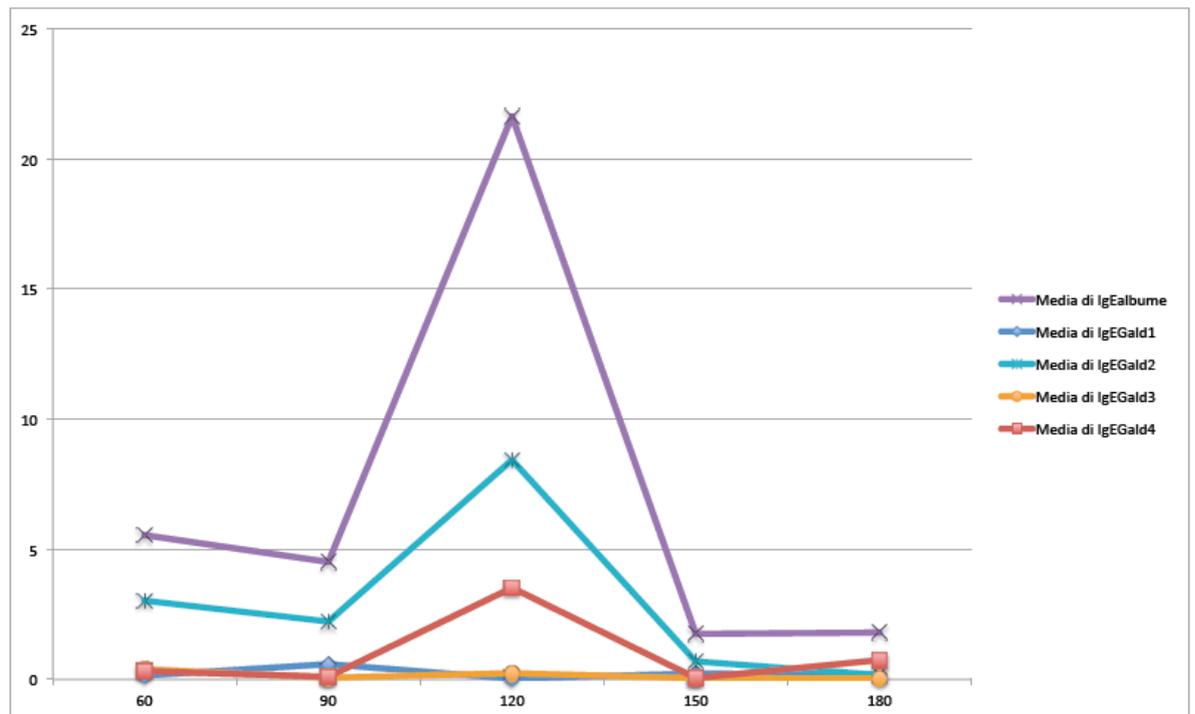
Durante il protocollo si sono verificate in media 1,1 per paziente (SD 1,4). Si è trattato di reazioni sempre lievi (inferiori o uguali al grado 2; 90% orticaria periorale a rapida risoluzione spontanea), tranne che in un caso di reazione di grado 3 durante l'aumento della dose a domicilio (a 32 ml di emulsione di uovo crudo) trattata e risolta con solo antistaminico.

Nei 46 lattanti in cui il protocollo di OIT è stato concluso il tempo mediano di raggiungimento della dieta libera è stato di 181 giorni (range IQ: 136-275). La guarigione è avvenuta entro i 12 mesi di età nel 7% dei casi; entro i 24 mesi nel 82% dei casi; entro i 36 mesi 100% dei casi.

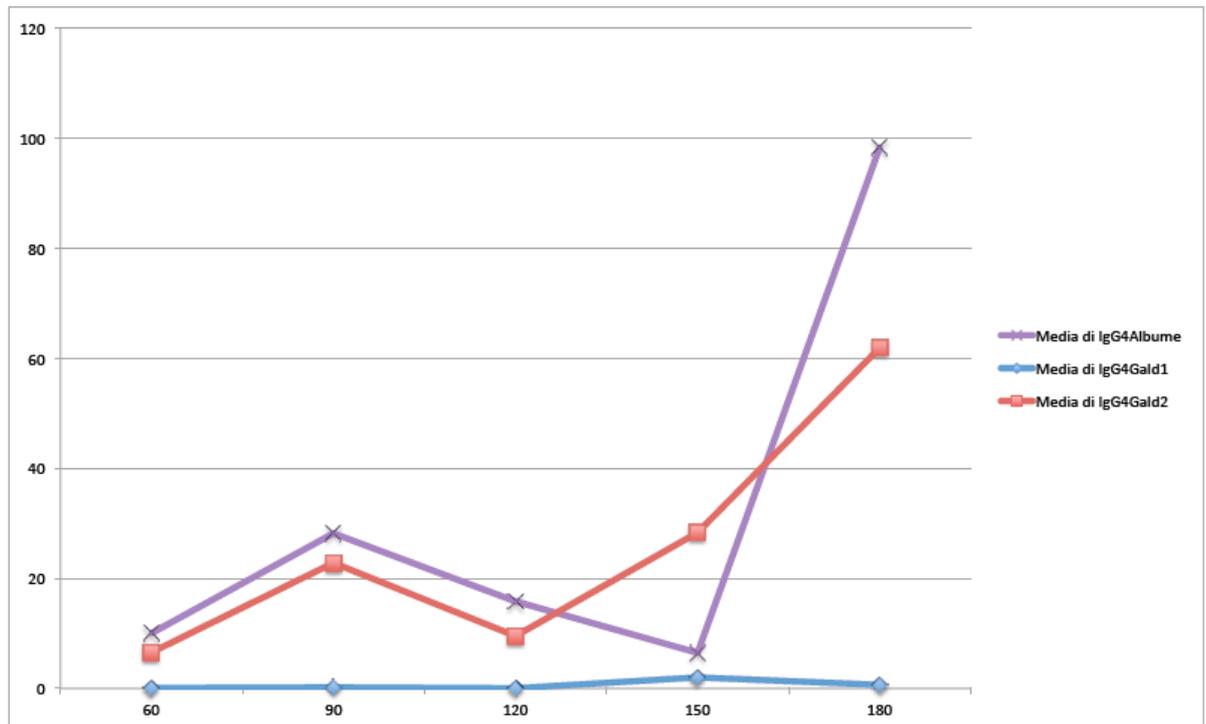
Dal punto di vista immunologico l'andamento delle dimensioni del prick-test, delle IgE ed IgG4 specifiche per albume e principali proteine allergogene dell'uovo è simile a quanto riscontrato per il latte (grafici 4,5 e 6).



**Grafico 4.** Modifiche delle dimensioni medie del prick by prick per albume e dose media di emulsione di uovo crudo (in ml) tollerata in relazione al tempo (in giorni) trascorso dall' inizio dell'OIT.



**Grafico 5.** Modifiche nel tempo (in giorni) del valore medio delle IgE specifiche per albume, ovomucoide (nGal d1), ovoalbumina (nGal d2), ovotransferrina (nGal d3) e lisozima (nGal d4) (kU/l).



**Grafico 6.** Modifiche nel tempo (in giorni) del valore medio delle IgG4 specifiche per albume, ovomucoide (nGal d1) e ovoalbumina (nGal d2). Valori espressi in mgA/l.

I parametri basali dei lattanti nel quale il protocollo di OIT per l'uovo non è stato iniziato (fallimento) per comparsa di effetti avversi rilevanti in riferimento alla bassa dose scatenante i sintomi (crf materiali e metodi) differivano in maniera significativa da quelli dei lattanti che hanno potuto avviare il protocollo per una maggior prevalenza di familiarità per allergia e di sensibilizzazione all'ovomucoide, ma non per quanto riguardava il livello di IgE sieriche specifiche per albume e principali proteine allergogene dell'uovo (tabella 6).

Le reazioni avvenute al primo TPO sono state tutte di grado minore/uguale a 2, per lo più

caratterizzate da sintomi gastrointestinali (vomito, diarrea) e tutte agevolmente controllate con antistaminico e steroide per os. A distanza di un anno dal TPO 8 bambini sono ancora a dieta di eliminazione, 1 ha effettuato il TPO da meno di 12 mesi ed è ancora in dieta di eliminazione per l'uovo (ad eccezione degli alimenti a base di uovo cotto in matrice di frumento).

Tutti i soggetti del gruppo uovo, compresi quelli che non hanno potuto iniziare l'OIT per uovo crudo, hanno introdotto gli alimenti a base di uovo cotto in matrice di frumento (*baked egg*. E.g. biscotti, pan di spagna, brioche, altri prodotti da forno)

indipendentemente dalle dimensioni del prick-by-prick con pavesino, qualora non lo stessero già assumendo in maniera regolare, dopo aver testato la tolleranza in ambiente protetto di almeno 1 ml di emulsione di uovo (circa 2 pavesini). Il test è stato effettuato entro 2 settimane dalla formalizzazione del fallimento del protocollo di studio ed è risultato negativo in tutti i casi. In seguito e gradualmente a domicilio tutte le forme di *backed egg* anche casalinghe sono state introdotte senza alcuna reazione avversa.

Gruppo uovo falliti (n = 9)				
<i>Età mediana alla diagnosi (mesi)</i>	9.5 (IQ 8.8-9.9)			
<i>Età mediana avvio protocollo (mesi)</i>	10.2 (IQ 9.2-11.3)			
<i>Familiarità per atopia (n)</i>	8 (89%)*			
<i>Dermatite atopica concomitante (n)</i>	9 (100%)			
<i>Positività prick-test (n)</i>	Albume*	Ovoalbume	Ovomucoide	Pavesino*
	9 (100%)	9 (100%)	8 (89%)*	6 (67%)
<i>Diametro medio prick-test (mm; DS)</i>	9.5 (2.7)	5.1 (1.6)	6.1 (4)	4 (2.3)
<i>Valore medio IgE specifiche (kU/l;DS)</i>	Albume	nGal d1	nGal d2	nGal d3
	9.4* (9.5)	3.5 (3.2)	3.5 (3.1)	0,12 (0,10)
			nGal d3	nGal d3
				1.1 (1.7)

**Tabella 6.** Descrizione dei soggetti del gruppo uovo che non hanno potuto avviare la OIT al momento dell'arruolamento nello studio. DS=Deviazione Standard. \* Prick-by-prick. nGal d1 = ovomucoide; nGal d2 = ovoalbumina; nGal d3 = ovotransferrina; nGal d4 = lisozima. \*  $p \leq 0,05$ .

## 6,6 Discussione

I casi descritti in questo lavoro costituiscono un gruppo “sperimentale”, frutto delle nuove evidenze sull'allergia IgE-mediata che hanno dimostrato il ruolo chiave dell'esposizione allergenica precoce attraverso il tratto oro-gastro-intestinale nello sviluppo della tolleranza orale agli alimenti. I piccoli pazienti reclutati nel presente studio sono stati definiti “*lattanti al bivio*”, ovvero lattanti che, secondo la pratica clinica corrente e le attuali linee guida, avrebbero dovuto intraprendere una dieta di eliminazione completa dell'alimento in causa per almeno 9-12 mesi prima di confermare, mediante TPO completo, l'indicazione o meno a proseguire la dieta. Applicando queste Linee Guida su un'ampia popolazione di bambini allergici al latte Skripak et al hanno verificato che meno dell'1% avevano acquisito la tolleranza a un anno, il 5% a 4 anni, il 21% a 8 anni, il 55% a 16 anni.<sup>15</sup> Con gli stessi criteri Savage

et al hanno documentato i seguenti tassi di risoluzione spontanea dell'allergia all'uovo: meno dell'1% a 2 anni, 4% a 4 anni, 26% a 8 anni e 68% a 16 anni.<sup>16</sup>

All'interno dei "*lattanti al bivio*" sono stati distinti due modelli: i lattanti con allergia certa (anamnesi positiva per reazione immediata dopo ingestione dell'alimento in causa con conferma di sensibilizzazione IgE-mediata) e quelli con allergia potenziale (sensibilizzazione IgE mediata per alimento non presente nella dieta).

Nei lattanti con allergia certa, in relazione al chiaro rapporto causa-effetto, le recenti linee guida raccomandano l'eliminazione dell'alimento in causa (e la sua sostituzione con un idrolisato spinto in caso l'alimento offendentente sia il latte vaccino) e consigliano una rivalutazione mediante TPO non prima di 9 mesi dalla diagnosi per valutare l'eventuale acquisizione della tolleranza.<sup>1,19,121</sup>

La via alternativa proposta nel presente studio corrisponde a una vera e propria OIT precoce.

A oggi, la maggior parte degli studi che hanno valutato l'efficacia della OIT non hanno incluso bambini sotto i 12 mesi, ma bambini con un'età minima dai 3 ai 6 anni, proprio con lo scopo di selezionare quei soggetti con minori probabilità di acquisire la tolleranza spontanea. Tradizionalmente, infatti, sulla base di alcuni lavori più datati, l'allergia alimentare è sempre stata considerata una patologia a prognosi benigna con elevate percentuali di guarigione spontanea già in età prescolare.<sup>122</sup> Solo la popolazione dello studio randomizzato di Staden sulla OIT comprendeva soggetti in un ampio range di età (dai 7.5 mesi e ai 13 anni), ma il numero di bambini sotto l'anno non veniva specificato.<sup>114</sup>

Le percentuali di successo raggiunte in questi studi sono molto variabili, in base al tipo di alimento, al protocollo usato e alla popolazione selezionata. Il gruppo di ricercatori di Trieste ha riscontrato percentuali di desensibilizzazione completa ad un anno dall'inizio dell'OIT, intesa come assunzione asintomatica di quantitativi non limitati dell'allergene in causa, variabile tra 42% nei soggetti con grave allergia persistente al latte e 72% in quelli con storia e IgE sp compatibili con allergia lieve-moderata.<sup>115, 123</sup>

Nel presente studio, escludendo i pazienti che stanno ancora completando il protocollo di OIT e quelli che non hanno potuto avviarlo, in un tempo mediano variabile da 5 a 6 mesi (rispettivamente per latte e uovo) i piccoli pazienti possono assumere liberamente l'alimento in causa in una percentuale che raggiunge il 93% per il latte e l'81% per

l'uovo intero fresco. In base all'età di avvio del protocollo più dell'80% di questi è guarito prima dei 2 anni di età, il 100% entro i 3 anni.

Bisogna poi sottolineare come, sebbene siano molti gli studi che hanno documentato risultati incoraggianti della OIT per gli alimenti principali, quali latte<sup>112, 115, 124</sup>, uovo<sup>117,124</sup> e

arachidi<sup>125</sup> nei bambini più grandicelli, tutte le Linee Guida<sup>1, 2, 19</sup> continuano a raccomandare la dieta di esclusione come unica terapia accettabile per l'allergia alimentare al di fuori di progetti di ricerca. Si ritiene che i protocolli utilizzati negli studi siano troppo disomogenei per poter accumulare tutti i soggetti sottoposti a OIT e ricavarne un campione abbastanza ampio per determinarne la sicurezza, che gli effetti collaterali sono ancora troppo frequenti, che mancano studi che validino l'effettivo miglioramento della qualità della vita e che non è chiaro se l'effetto desensibilizzante dipenda sempre da una regolare e continuativa esposizione all'allergene o se la tolleranza completa e definitiva possa essere nel tempo effettivamente raggiunta.<sup>126</sup>

Il presente studio di OIT precoce nel lattante allergico è al momento unico nel suo genere e, con i limiti insiti nella natura osservazionale di un campione con numerosità limitata e senza un gruppo di controllo, mostra comunque dei vantaggi rispetto ai protocolli di OIT più tardiva a prescindere dal maggior numero di successi e il tempo più breve per ottenerli.

Per quanto riguarda gli effetti collaterali, reazioni severe sistemiche sono state descritte durante l'applicazione di protocolli di desensibilizzazione orale<sup>127, 128</sup> e un aspetto incoraggiante del presente studio sull'OIT precoce riguarda proprio la maggiore sicurezza rispetto a quanto riportato nelle esperienze precedenti sull'OIT nel bambino più grandicello.

La maggior parte delle reazioni che si sono verificate nei *"lattanti al bivio"* sono state lievi e anche quelle che, secondo il grading dell'anafilassi, risulterebbero di grado moderato-grave, sono state rapidamente e pienamente controllate con antistaminico e cortisone per os o al massimo con l'aggiunta di una singola dose di adrenalina nebulizzata. Mai è stato necessario ricorrere all'adrenalina per autoinoculazione, reperire una via venosa né ricoverare il paziente per un monitoraggio dopo una di queste reazioni, tutte autolimitate e prive di conseguenze per il bambino. Bisogna poi sottolineare che la dieta di eliminazione non è di certo un provvedimento terapeutico scevro da effetti collaterali. Il rischio di ingestione accidentale dell'alimento offendente è significativo, soprattutto per alimenti ampiamente presenti nella nostra cucina come il

latte e l'uovo. In dieta di eliminazione completa circa il 50% dei bambini con allergia IgE mediata ha una reazione allergica da ingestione accidentale dell'alimento offendente in 5 anni, il 75 % in 10 anni.<sup>30</sup> Facile da comprendere come sia ben diverso dover trattare una reazione inattesa, rispetto a dover intervenire in un tempo circostanziato, quando è ben noto il momento di esposizione all'allergene e si è nelle migliori circostanze per intervenire (ambiente domestico, farmaci pronti per l'uso, etc). L'impatto sulla qualità della vita non è stato indagato in questo studio, ma l'alta percentuale di aderenza nonostante la necessità di controlli ravvicinati nei primi mesi (spesso disagiati per le famiglie che hanno aderito anche se residenti a molti Km di distanza) fa intendere che la possibilità di un intervento attivo venga vista con favore dai genitori dei piccoli pazienti allergici. Inoltre, sebbene la percentuale di perdita al follow-up non è stata piccola (circa 12%), questa si è verificata sempre tra l'ultimo raddoppio in ambiente protetto e il controllo in dieta libera in bambini che non avevano avuto alcun problema fino a quel momento. Ciò fa presupporre che la scelta di non tornare all'attenzione medica sia stata indotta dal fatto che il problema fosse considerato ormai superato. Il protocollo di OIT precoce è infine sembrato ai clinici coinvolti più agevole da seguire rispetto a quello dell'OIT del bambino più grandicello, non solo perché gravato da meno effetti collaterali e da un più rapido raggiungimento della dieta libera per l'allergene alimentare in causa, ma anche per un impatto emotivo meno pesante di bambini e genitori. Il vissuto della dieta di esclusione rigorosa con la paura di cosa possa succedere in caso di errori anche minimi ha sicuramente un impatto importante nel condizionare l'approccio alla desensibilizzazione dei bambini più grandi e delle famiglie. Questi si trovano improvvisamente a dover ingerire volontariamente come fosse un farmaco l'allergene prima evitato come un veleno mortale (voce). In genere poi l'alimentazione in età infantile è quella che determina lo sviluppo del gusto e sapori mai provati in questi primi anni tendono a risultare sgradevoli. Tutto ciò complica l'OIT nel bambino e ancor più nell'adolescente e richiede una forte motivazione dell'interessato, mentre è molto meno presente nel lattante. Si tratta però di osservazioni dei ricercatori, non validate da questionari specifici e quindi di fatto deboli da un punto di vista metodologico.

Un ulteriore aspetto controverso dell'OIT riguarda l'effettiva capacità di promuovere nel tempo una tolleranza stabile. Secondo alcuni autori, infatti, l'OIT ha un ruolo solo desensibilizzante che rischia di venir meno se l'esposizione all'allergene viene interrotta per un periodo di tempo. Ciò si basa sull'osservazione di alcuni studi in cui

un numero significativo di bambini desensibilizzati con successo ha in parte perso tolleranza, dopo un breve periodo (settimane-mesi) di una dieta di eliminazione secondaria [87]. Bisogna dire che in questi studi la prova della dieta di eliminazione secondaria veniva fatta molto precocemente (6 mesi in media dal raggiungimento della dose di mantenimento) senza alcun presupposto teorico che questo potesse considerarsi un tempo sufficiente. Prendendo ad esempio l'immunoterapia specifica subcutanea per il veleno di imenotteri o per le allergie inalatorie, che vanta un maggior numero di studi e una più lunga tradizione, attualmente i protocolli prevedono una durata dai 5 ai 10 anni di terapia prima di poter sperare che la tolleranza acquisita si mantenga negli anni anche dopo aver sospeso le inoculazioni. Il presente studio non ha un follow-up abbastanza lungo per poter determinare se i *"lattanti al bivio"* siano solo desensibilizzati o abbiano acquisito una tolleranza duratura ed indipendente dall'esposizione continuativa all'allergene ed è stata una scelta precisa quella di non provare una dieta di eliminazione secondaria. La questione della dipendenza o meno dall'esposizione continuativa all'allergene per il mantenimento della tolleranza perde di significato, infatti, quando ci si confronta con allergeni di alimenti comuni quali il grano, il latte e le uova, largamente presenti nella nostra alimentazione. La presenza di IgE specifiche ridotte, ma ancora dosabili, e gli elevati livelli di IgG4 specifiche registrate in dieta libera (a circa 5-6 mesi dall'avvio del protocollo di OIT) farebbe pensare che a fine protocollo ci si trova ancora in una fase molto precoce dell'induzione della tolleranza e che non è consigliabile in questa fase fare tentativi di eliminazione secondaria. Considerando l'osservazione sperimentale che, una volta raggiunta la dose di mantenimento (che potremmo comparare alla quantità *"abituale"* per il singolo soggetto di latte o uovo anche in forma di derivati), 2 assunzioni a settimana dell'allergene sono sufficienti a mantenere lo stato di desensibilizzazione<sup>129</sup>, è veramente difficile che nella vita reale si verifichino situazioni nelle quali gli alimenti principali vengano completamente evitati per periodi più lunghi.

Il secondo modello del *"lattante al bivio"*, è quello con allergia potenziale, ossia il bambino con eczema e prick positivo per uno o più alimenti non ancora introdotti nella dieta, per cui manca il dato anamnestico di presenza o meno di reazione da ingestione. Parimenti, soprattutto in questa fascia d'età, l'eliminazione dalla dieta per un periodo anche relativamente breve di un alimento verso cui è presente sensibilizzazione asintomatica (quindi già assunto senza effetti avversi) può determinare la comparsa di

un'allergia sintomatica quando l'alimento viene reintrodotta nella dieta (voce). Nella pratica ambulatoriale non è raro che i bambini con eczema e prick positivi vengano da subito messi in dieta con idrolisato spinto o la mamma nutrice venga posta a dieta, anche in netto contrasto con le raccomandazioni più recenti che sconsigliano questa pratica (voce). Le stesse linee guida di Vandeplass e di Allen, di fronte ad un eczema grave essudativo consigliano il passaggio ad una formula elementare (a base di aminoacidi) per almeno 2-4 settimane con successivo TPO per latte e in caso di ricomparsa dell'eczema, eliminazione fino ai soliti 9-12 mesi di vita o comunque per almeno 6 mesi dall'avvio della dieta. **Errore. Il segnalibro non è definito. Errore. Il segnalibro non è definito.** È interessante notare come gli stessi autori siano consapevoli che la dieta di eliminazione, seppure breve, possa essere nociva per il bimbo e precisano: *“... nei bambini con eczema la reintroduzione degli alimenti, come il latte vaccino, dopo il periodo di eliminazione dovrà essere eseguita sotto supervisione medica in quanto si possono verificare reazioni allergiche gravi o anafilassi (anche quando lo stesso alimento non avesse causato in precedenza alcuna reazione allergica, ad eccezione delle esacerbazioni dell'eczema) ...”* **Errore. Il segnalibro non è definito.** Altre linee guida suggeriscono, di fronte ad una sensibilizzazione per alimento non ancora introdotto nella dieta del lattante, di fare il TPO per verificare la reale ricaduta clinica della sensibilizzazione e avviare la dieta solo se il TPO risulta positivo, anche indipendentemente dalla quantità di allergene necessaria a scatenare la reazione. Siccome però nella pratica clinica ciò comporterebbe l'esecuzione di un gran numero di TPO e quindi un impegno di risorse non indifferente e considerato che, non da ultimo, non è sempre facile far assumere l'intera quota di alimento richiesto per sancire la negatività del test ad un bambino piccolo, ancora poco avvezzo al cucchiaino (o al biberon se allattato al seno), le stesse linee guida suggeriscono di non eseguire il TPO qualora il test allergometrico (dimensioni del prick-test o livello di IgE specifiche seriche) superi il cut-off del valore predittivo positivo al 95% (valore oltre il quale la possibilità che il TPO sia positivo si attesta attorno al 95%). Se a queste raccomandazioni si unisce il timore di dover fronteggiare una reazione allergica in un bambino piccolo, si capirà come spesso questi lattanti finiscono in un circolo vizioso in cui la dieta viene perpetuata a lungo senza dimostrazione della sua reale necessità o, peggio ancora, si associno a una crescita della sensibilizzazione allergica che poi si traduce in reazioni allergiche per ingestioni accidentali di alimenti contaminati da minime quantità dell'allergene in causa<sup>104</sup>.

Nel modello di lattante con allergia potenziale il protocollo di OIT può essere quindi considerato a metà strada tra una terapia desensibilizzante e una prevenzione primaria. Negli ultimi anni molti studi hanno messo in luce come sia probabilmente essenziale allo sviluppo della tolleranza l'interazione delle proteine alimentari con il sistema linfatico intestinale, per lo sviluppo di una risposta tollerogena Th1 mediata. L'esposizione cutanea, in particolar modo nei lattanti con dermatite atopica, sembra invece favorire la sensibilizzazione allergica attivando una risposta Th2. Ritardare l'introduzione degli alimenti allergizzanti in questo modello di lattante ad alto rischio non solo non è indicato, ma potrebbe avere conseguenze deleterie. Le molecole allergeniche alimentari sono ovunque: nell'odore dei cibi cotti, sulle mani dei genitori che hanno mangiato l'alimento, nell'alito della mamma che allatta al seno<sup>130, 131</sup> e quindi le occasioni della sensibilizzazione transcutanea (e inalatoria) sono numerose fin dai primi giorni di vita. Un recente studio in doppio cieco randomizzato, ha osservato in un gruppo lattanti ( dai 4 agli 8 mesi) con dermatite atopica una prevalenza di sensibilizzazione all'uovo del 36% già a 4 mesi, già prima della finestra di tolleranza e ben prima dell'avvio medio dell'alimentazione complementare.<sup>132</sup>

A sancire l'effetto preventivo dell'introduzione precoce dell'allergene alimentare è stato un recentissimo studio condotto su lattanti a rischio di allergia all'arachide: il LEAP study che, su una popolazione di 640 lattanti fra 4 e 11 mesi randomizzati per inserire o meno l'arachide nella loro dieta quotidiana, ha verificato il ridursi di incidenza dell'allergia all'arachide (10,6% nel gruppo di studio vs 35,3% nel gruppo di controllo).<sup>108</sup> A breve dovrebbero poi essere disponibili i risultati di un altro grosso studio dei medesimi ricercatori, l'EAT study, in cui nel gruppo di intervento verrà verificata l'azione preventiva dell'introduzione precoce, a partire dai 3 mesi di vita, di 6 alimenti allergizzanti nella dieta dei lattanti sull'incidenza di allergia alimentare.<sup>109</sup>

I lattanti con allergia potenziale del presente studio differiscono dalla popolazione arruolata nel LEAP study proprio perché già sensibilizzati in maniera significativa verso l'alimento in causa. Dal LEAP study, infatti, sono stati esclusi tutti i lattanti che presentavano un ponfo al prick per arachide maggiore di 4 mm, in maniera che lo studio potesse risultare di pura prevenzione primaria. Nel nostro caso i lattanti arruolati, oltre ad essere ad alto rischio di allergia alimentare, avrebbero avuto una probabilità prossima al 95% di risultare allergici a un TPO completo. Di fatti le percentuali di fallimenti dovuti all'alta reattività clinica al TPO a basse dosi è simile, anzi tendenzialmente maggiore, a quella del gruppo di lattanti con allergia certa.

La tecnica di avviare un'introduzione graduale dell'alimento verso cui esiste una sensibilizzazione IgE mediata significativa, partendo da un TPO a basse dosi in ambiente protetto era già stata proposta da Devenney I et al.<sup>133</sup> La differenza con il presente studio era principalmente che il protocollo veniva interrotto in caso di reazioni avverse al TPO. Inoltre, mentre la tecnica di somministrazione del latte era la stessa da noi usata, per l'uovo si ricorreva ad una torta cotta al forno, quindi un prodotto a base di uovo ipoallergenico (uovo cotto in matrice di frumento). Di fatti nessuno dei bambini testati per l'uovo aveva avuto una reazione al TPO, mentre l'11% dei TPO a basse dosi per il latte risultava positivo. Difatti tutti i nostri lattanti, allergici o potenzialmente allergici, hanno potuto introdurre l'uovo cotto in matrice di frumento senza problemi a conferma che questa forma d'uovo è ben tollerata da oltre l'80% degli allergici all'uovo<sup>134</sup> e forse basterebbe questa introduzione a migliorare non solo la qualità di vita ma anche la prognosi dell'allergia all'uovo.<sup>34</sup>

L'andamento del protocollo nei lattanti con allergia potenziale è per il resto sovrapponibile a quello dei lattanti con allergia certa, sia in termini di sicurezza che di efficacia. È ragionevole pensare che ancor più facile possa essere l'introduzione graduale nei lattanti a rischio degli alimenti allergizzanti con sensibilizzazioni alimentari più lievi e protocolli simili, magari domiciliari, potrebbero essere usati in questi bambini invece del TPO completo suggerito dalle Linee Guida.

In conclusione, il presente studio dimostra come la strategia della OIT precoce possa essere applicata con sicurezza e probabile efficacia nei lattanti. E' plausibile che sia la precoce e continuativa ingestione dell'allergene a stimolare un più rapido sviluppo della tolleranza più rapidamente, evitando diete inutili e potenzialmente dannose. Studi controllati con casistiche più ampie saranno però necessari a confermare questi risultati.

## 7. BIBLIOGRAFIA

---

- <sup>1</sup> Burks aW, Tanf M, Sicherer S, et al. ICON: food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129:906-20.
- <sup>2</sup> Burks aW, Jones SM, Boyce JA, et al. NIAID-sponsored 2010 guidelines for managing food allergy: application in the pediatric population. *Pediatrics* 2011;128:955-65.
- <sup>3</sup> Burks aW, Jones SM, Boyce JA, et al. NIAID-sponsored 2010 guidelines for managing food allergy: application in the pediatric population. *Pediatrics* 2011;128:955-65.
- <sup>3</sup> Zuercher AW, Fritschè R, Corthésy B, Mercenier A. Food products and allergy development, prevention and treatment. *Curr Opin Biotechnol* 2006;17:198-203.
- <sup>4</sup> Longo G, Berti I, Burks AW, Krauss B, Barbi E. IgE-mediated food allergy in children. *Lancet* 2013;382:1656-64.
- <sup>5</sup> Macdougall CF, Cant AJ, Colver AF. How dangerous is food allergy in childhood? The incidence of severe and fatal allergic reactions across the UK and Ireland. *Arch Dis Child* 2002;86:236-39.
- <sup>6</sup> Lack G. Food allergy. *NEJM* 2008; 359: 1252-60
- <sup>7</sup> Sampson H. Update on food allergy. *JACI* 2004; 113: 805-19
- <sup>8</sup> Rona RJ, Keil T, Summers C. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J Allergy Clinical Immunol.*
- <sup>9</sup> Mullins RJ. Paediatric food allergy trends in a community-based specialist allergy practice, 1995-2006. *Med J Aust* 2007;186:618-21.
- <sup>10</sup> Poulos LM, Waters AM, Correll PK, Loblay RH, Marks GB. Trends in hospitalizations for anaphylaxis, angioedema, and urticaria in Australia, 1993-1994 to 2004-2005. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:878-84.
- <sup>11</sup> Prescott S, Allen KJ. Food allergy: riding the second wave of the allergy epidemic. *Pediatr Allergy Immunol.* 2011;22:155-60.
- <sup>12</sup> Osborne NJ, Koplin JJ, Martin PE. Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:668-76.
- <sup>13</sup> Høst A, Halcken S. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. Clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity reaction. *Allergy.* 1990;45:587-96.
- <sup>14</sup> Wood RA1, Sicherer SH, Vickery BP. The natural history of milk allergy in an observational cohort. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131:805-12.
- <sup>15</sup> Skripak JM, Matsui EC, Mudd K, Wood RA. The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 ;120:1172-7.
- <sup>16</sup> Savage GH, Matsui EC, Skipak JM, Wood RA. The natural history of egg allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:1413-7.
- <sup>17</sup> Nowak-Węgrzyn A, Sampson HA. Future therapies for food allergies. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:558-73
- <sup>18</sup> van Wijk F, Knippels L. Initiating mechanisms of food allergy: Oral tolerance versus allergic sensitization. *Biomed Pharmacother.* 2007;61:8-20.
- <sup>19</sup> Fiocchi A, Brozek J, Schünemann H, et al. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010;21 (Suppl):1-125.
- <sup>20</sup> Bernhisel-Broadbent J, Dintzis HM, Dintzis RZ, Sampson HA. Allergenicity and antigenicity of chicken egg ovomucoid (Gal d III) compared with ovalbumin (Gal d I) in children with egg allergy and in mice. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93:1047-59.
- <sup>21</sup> Martos G, Lopez-Exposito I, Bencharitiwong R, Berin MC, Nowak-Węgrzyn A. Mechanisms underlying differential food allergy response to heated egg. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:990-7.
- <sup>22</sup> Järvinen KM, Beyer K, Vila L, Bardina L, Mishoe M, Sampson HA. Specificity of IgE antibodies to sequential epitopes of hen's egg ovomucoid as a marker for persistence of egg allergy. *Allergy.* 2007;62:758-65.

- 
- <sup>23</sup> Lemon-Mulé H, Sampson HA, Sicherer SH, Shreffler WG, Noone S, Nowak-Węgrzyn A. Immunologic changes in children with egg allergy ingesting extensively heated egg. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:977-983.
- <sup>24</sup> Calvani M, Berti I, Fiocchi A, et al. Oral food challenge: safety, adherence to guidelines and predictive value of skin prick testing. *Pediatr Allergy Immunol*. 2012;23:755-61.
- <sup>25</sup> Sicherer SH, Wood RA. Allergy testing in childhood: using allergen-specific IgE tests. *Pediatrics* 2012;129:193-7.
- <sup>26</sup> Roberts G, Lack G. Diagnosing peanut allergy with skin prick and specific IgE testing. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:1291-6.
- <sup>27</sup> Bruno I, Longo G. prick e RAST: troppo o troppo poco. *Medico e Bambino* 2004;23:641-48.
- <sup>28</sup> Sampson HA1, Ho DG. Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *J Allergy Clin Immunol*.1997;100:444-51.
- <sup>29</sup> Sicherer C, Sampson HA: Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(suppl 2):S116– S125.
- <sup>30</sup> Bock SA1, Atkins FM. The natural history of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1989;83:900-4.
- <sup>31</sup> Kalliomäki M1, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2003;361:1869-71.
- <sup>32</sup> Cooke SK, Sampson HA. Allergenic properties of ovomucoid in man. *J Immunol*. 1997;159:2026-32.
- <sup>33</sup> Badina L, Matarazzo L, Longo G, Barbi E. Could slightly cooked egg be a suitable medium for oral immunotherapy in persistent hen's egg allergy? *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2013;41:141-2.
- <sup>34</sup> Leonard SA, Sampson HA, Sicherer SH, et al. Dietary baked egg accelerates resolution of egg allergy in children. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130:473-80.
- <sup>35</sup> Huang F, Nowak-Węgrzyn A. Extensively heated milk and egg as oral immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2012 ;12:283-92.
- <sup>36</sup> Von Hertzen LC et al. Scientific Rationale for the Finnish Allergy Programme 2008-2018 : emphasis on prevention and endorsing tolerance. *Allergy* 2009; 64: 678-701.
- <sup>37</sup> Chehade M and Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *JACI* 2005; 115: 3-12
- <sup>38</sup> Menezes Jda S et al. Stimulation by food protein plays a critical role in the maturation of the immune system. *Int Immunol* 2003; 15:447-55
- <sup>39</sup> Faria AMC, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Reviews* 2005; 206: 232-259.
- <sup>40</sup> Untersmayr E, Jensen-Jarolim E. The effect of gastric digestion on food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006; 6: 214-9
- <sup>41</sup> Roux ME, McWilliams M, Phillips-Quagliata JM, Lamm ME: Differentiation pathway of Peyer's patch precursors of IgA plasma cells in the secretory immune system. *Cell Immunol* 1981; 61:141-53
- <sup>42</sup> Kim PH, Kagnoff MF: Transforming growth factor- $\beta$ 1 is a costimulator for IgA production. *J Immunol* 1990; 144:3411-6
- <sup>43</sup> Kraus TA, Brimnes J, Muong C, Liu JH, Moran TM, Tappenden KA et al. Induction of mucosal tolerance in Peyer's patch-deficient, ligated small bowel loops. *J Clin Invest* 2005;115:2234-2243.
- <sup>44</sup> Worb T, Bode U, Yan S, Hoffmann MH, Hintzen G, Bernhardt G et al. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* 2006;203:519-527.
- <sup>45</sup> Scott H., Solheim BG, Brandtzaeg P, Thorsby E: HLA-DR-like antigen in the epithelium of the human small intestine. *Scand J Immunol* 1980; 12:77-82
- <sup>46</sup> Mayer L, Shlien R: Evidence for function of IgA molecules on gut epithelial cells in man. *J Exp Med* 1987; 166:1471-83
- <sup>47</sup> Burks WA, Laubach S, Jones S. Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. *JACI* 2008; 121: 1344-50

- 
- <sup>48</sup> Friedman A, Weiner HL. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6688-92.
- <sup>49</sup> Yagi H et al. Crucial role of FoxP3 in the development and function of human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004; 16:1643-56.
- <sup>50</sup> Bennett CL et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutation of FOXP3. *Nat Genet* 2001; 27: 20-1
- <sup>51</sup> Perez-Machado MA et al. Reduced transforming growth factor-beta1-producing T cells in the duodenal mucosa of children with food allergy. *Eur J Immunol* 307-15.
- <sup>52</sup> Strobel S. Oral tolerance, systemic immunoregulation and autoimmunity. *Ann NY Acad Sci* 2002; 958: 47-58
- <sup>53</sup> Eigenmann PA. Mechanisms of food allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2009; 20: 5-11
- <sup>54</sup> Eigenmann PA. T lymphocytes in food allergy: overview of an intricate network of circulating and organ-resident cells. *Pediatr Allergy Immunol* 2002; 13: 162-71
- <sup>55</sup> Calder PC et al. Early nutrition and immunity – progress and perspectives. *British Journal of Nutrition* 2006; 96:774-90.
- <sup>56</sup> Warner JA, Warner JO. Early life events in allergic sensitization. *British Medical Bulletin* 2000; 56: 883-93.
- <sup>57</sup> Jones AC, Miles EA, Warner JO et al. Fetal peripheral blood mononuclear cell proliferative responses to mitogenic and allergenic stimuli during gestation. *Pediatr Allergy Immunol* 1996; 7: 109-16.
- <sup>58</sup> Mold JE, Michaelsson J, Burt TD et al. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic regulatory T cells in utero. *Science* 2008; 322: 1562-65.
- <sup>59</sup> Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, et al. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *The Journal of Immunology* 1998; 160: 4730-37.
- <sup>60</sup> Hattevig G, Kjellman B, Johansson GO et al. Clinical symptoms and IgE responses to common food proteins in atopic and healthy children. *Clinical Allergy* 1984; 14: 551-59
- <sup>61</sup> Hattevig G, Kjellman B, Bjorksten B. Appearance of IgE antibodies to ingested and inhalant allergens during the first 12 years of life in atopic and non-atopic children. *Pediatr Allergy Immunol* 1993; 4: 182-6.
- <sup>62</sup> Tang MLK, Kemp J, Thorburn J, et al. Reduced interferon-gamma secretion in neonates and subsequent atopy. *Lancet* 1994; 344: 983
- <sup>63</sup> Cochrane S, Beyer K, Clausen M et al. Factors influencing incidence and prevalence of food allergy. *Allergy* 2009;64: 1246-55.
- <sup>64</sup> Lack G. Epidemiologic risks for food allergy. *JACI* 2008; 12: 121: 1331-6.
- <sup>65</sup> Pali-Scholl I, Renz H, Jensen-Jarolim E. Update on allergies in pregnancy, lactation and early childhood. *JACI* 2009; 123:1012-21
- <sup>66</sup> Hollingsworth JW, Maruoka S, Boon K et al. In utero supplementation with methyl donors enhances allergic airway disease in mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 3462-9.
- <sup>67</sup> Sausenthaler S, Koletzko S, Schaaf B et al. Maternal diet during pregnancy in relation to eczema and allergic sensitization in the offspring at 2 years of age. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 530-7.
- <sup>68</sup> Milner JD, Stein DM, McCarter R et al. Early infant multivitamin supplementation is associated with increased risk for food allergy and asthma. *Pediatrics* 2004; 114: 27-32.
- <sup>69</sup> Bager P, Wohlfahrt J, Westergaard T. Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disease: meta-analyses. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 634-42.
- <sup>70</sup> Sanchez-Valverde F, Gil F, Martinez D et al. The impact of caesarean delivery and type of feeding on cow's milk allergy in infants and subsequent development of allergic march in childhood. *Allergy* 2009; 64: 884-89.
- <sup>71</sup> Wold E: The hygiene hypothesis revised: is the rising frequency of allergy due to changes in the intestinal flora? *Allergy* 1998; 53:20-5

- 
- <sup>72</sup> Adlerberth I, Lindberg E, Aberg N et al. Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: effect of hygienic lifestyle? *Pediatr Res* 59; 96-101.
- <sup>73</sup> Vaarala O. Immunological effects of probiotics with special reference to lactobacilli. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1634-40.
- <sup>74</sup> Strachan DP. Hay fever, hygiene and household size. *BMJ* 1989; 299: 1259-60
- <sup>75</sup> Blumer N, Herz U, Wegmann M et al. Prenatal lipopolysaccharide exposure prevents allergic sensitization and airway inflammation, but not airway responsiveness in a murine model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 397-402.
- <sup>76</sup> Zutavern A, Von Klot S, Gehring U et al. Pre-natal and post-natal exposure to respiratory infection and atopic diseases development: a historical cohort study. *Respir Res* 2006; 7: 81
- <sup>77</sup> Muraro A, Dreborg S, Halken S et al. dietary prevention of allergic diseases in infants and small children. Part III. Critical review of published peer-reviewed observational and interventional studies and final recommendations. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; 15: 291-307.
- <sup>78</sup> Pesonen M, Kallio MJ, Ranki A, et al. Prolonged exclusive breastfeeding is associated with increased atopic dermatitis: a prospective follow-up study of unselected healthy newborns from birth to 20 years. *Clin Exp Allergy* 2006; 36: 1011-18.
- <sup>79</sup> Mahrshahi S, Ampon R, Webb K et al. The association between infant feeding practices and subsequent atopy among children with a family history of asthma. *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 671-79.
- <sup>80</sup> Greer FR, Sicherer SH, Burks W, et al. Effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and children: the role of maternal dietary restrictions, breastfeeding, timing of introduction of complementary foods, and hydrolysed formulas. *Pediatrics* 2008; 121:183-91.
- <sup>81</sup> Vila L, Beyer K, Jarvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Sampson HA: *Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy*. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:1599-606
- <sup>82</sup> Chatchatee P, Jarvinen KM, Bardina L, Beyer K, Sampson HA: Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on  $\alpha$ s1-caseina: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:179-83
- <sup>83</sup> Jarret EE: Perinatal influences on IgE responses. *Lancet* 1984; 2:797-9
- <sup>84</sup> Saarinen KM, Savilahti E : Infant feeding patterns affect the subsequent immunological features in cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:400-6
- <sup>85</sup> Strid J, Thomson M, Hourihane J et al. a novel model of sensitization and oral tolerance to peanut protein. *Immunology* 2004; 113: 293-303.
- <sup>86</sup> Strobel S, Ferguson A: Immune responses to fed protein antigens in mice. Systemic tolerance or priming is related to age at which antigen is first encountered. *Pediatric Res* 1984; 18:588-94
- <sup>87</sup> Haverson K, Cofield G, Jones P. effect of oral antigen and antibody exposure at birth on subsequent immune status. *Int Arch Allergy Immunol* 2009, 150: 192-204.
- <sup>88</sup> Prescott SL, Smith P, Tang M et. The importance of early complementary feeding in the development of oral tolerance. Concerns and controversies. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19:373-80
- <sup>89</sup> Venter C, Pereira B, Voigt K et al. Factors associated with maternal dietary intake, feeding and weaning practices, and the development of food hypersensitivity in the infant. *Pediatr Allergy Immunol* 2009; 20: 320-27
- <sup>90</sup> Kramer MS, Kamuma R. Maternal dietary antigen avoidance during pregnancy or lactation, or both for preventing or treating atopic disease in the child. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006, 3: CD000133.
- <sup>91</sup> Strid J, Hourihane J, Kimber I et al. Disruption of the stratum corneum allows potent epicutaneous immunization with protein antigen resulting in a dominant Th2 response. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2100-09
- <sup>92</sup> Strid J, Callard R, Strobel S. Epicutaneous immunization converts subsequent and established antigen-specific T helper type I to Th2-type responses. *Immunology* 2006; 119: 27-35

- 
- <sup>93</sup> Lack G, Fox D, Northstone K et al. Factors associated with the development of peanut allergy in childhood. *NEJM* 2003; 34: 977-85.
- <sup>94</sup> Hill DJ, Hosking CS, de Benedictis FM et al. Confirmation of the association between high levels of IgE food sensitization and eczema in infancy: an international study. *Clinical and Experimental Allergy* 2007; 38: 161-8
- <sup>95</sup> Marchetti F. La rivoluzione copernicana possibile per il pediatra: la dieta non previene l'allergia. *Medico e Bambino* 2009; 6: 347.
- <sup>96</sup> Allen CW, Campbell DE, Kemp AS. Food allergy: is strict avoidance the only answer? *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 20: 415-422
- <sup>97</sup> Committee on Nutrition AAP. Hypoallergenic infant formulas. *Pediatrics* 2000; 106:346-9
- <sup>98</sup> Osborn DA, Sinn J. Formulas containing hydrolysed protein for prevention of allergy and food intolerance in infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 3: CD003664.
- <sup>99</sup> Von Berg A, Koltz S, Filipiak-Pittroff B. et al. Certain hydrolysed formulas reduce the incidence of atopic dermatitis but not that of asthma: three-year results of the German Infant Nutritional Intervention. *JACI* 2007; 119: 718-25.
- <sup>100</sup> Tarini BA, Carroll AE, Sox CM et al. Systematic review of the relation between early introduction of solid foods to infants and the development of allergic disease. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2006; 160: 502-7.
- <sup>101</sup> Du Toit G, Katz Y, Sasieni P et al. Early consumption of peanuts is associated with a low prevalence of peanut allergy. *JACI* 2008 ; 122 : 984-91
- <sup>102</sup> Poole JA, Barriga K, Leung DY et al. Timing of initial exposure to cereal grains and the risk of wheat allergy. *Pediatrics* 2006; 117;2175-2182
- <sup>103</sup> Flintermann AE, Knulst AC, Meijer Y et al. Acute allergic reactions in children with AIDS after prolonged cow's elimination diets. *Allergy* 2006; 61: 370-74.
- <sup>104</sup> Longo G., Berti I. La "fabbrica dei superallergici" chiude i battenti o apre nuove filiali" *RIAP* 2006; 6:11-15.
- <sup>105</sup> Longo G, Panizon F. La dieta dei primi mesi e lo sviluppo dell'atopia. *Medico e Bambino* 2009; 28: 162-7
- <sup>106</sup> Rholick-Wernighaus C, Staden U, Mehl A, et al. Specific oral tolerance induction with food in children: transient or persistent effect on food allergy? *Allergy* 2005; 60: 1320-2
- <sup>107</sup> Wennergren G. What if it is the other way around? Early introduction of peanut and fish seems to be better than avoidance. *Acta Paediatrica* 2009; 1-3.
- <sup>108</sup> Du Toit G, Roberts G, Sayre PH, et al. Randomized trial of peanut consumption in infants at risk for peanut allergy. *N Engl J Med*. 2015;372:803-13
- <sup>109</sup> EAT: enquiring about tolerance. Disponibile sul sito <http://www.eatstudy.co.uk/> [ultimo accesso 2 febbraio 2015].
- <sup>110</sup> Calvani M, Miceli-Sopo S. Exercise-induced anaphylaxis caused by wheat during specific oral tolerance induction. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007; 98: 98-9
- <sup>111</sup> Patriarca G, Nucera E, Roncallo C. et al. Oral desensitizing treatment in food allergy: clinical and immunological results. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 459-65
- <sup>112</sup> Meglio P, Bartone E, Plantamura M et al. A protocol for oral desensitization in children with IgE mediated cow's milk allergy. *Allergy* 2004; 59: 980-7
- <sup>113</sup> Buchanan AD, Green TD, Jones SM et al. Egg oral immunotherapy in non-anaphylactic children with egg allergy. *JACI* 2007; 119: 199-205
- <sup>114</sup> Staden U, Rolinck-Wernighaus C, Brewe F et al. Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reaction. *Allergy* 2007, 62: 1261-1269
- <sup>115</sup> Longo G, Barbi E, Berti I et al. Specific oral tolerance induction in children with very severe cow's milk-induced reactions. *JACI* 2008; 121: 343-7

- 
- <sup>116</sup> Skripak JM, Nash SD, Rowley H et al. a randomised, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. *JACI* 2008; 122: 1154-60.
- <sup>117</sup> Burks AW, Jones SM, M.D., Wood RA, et al. Oral Immunotherapy for Treatment of Egg Allergy in Children. *N Engl J Med* 2012;367:233-43.
- <sup>118</sup> Sampson HA. *Anaphylaxis and emergency treatment*. *Pediatrics* 2003;111:1601-8.
- <sup>119</sup> Muraro A, Roberts G, Clark A, et al. The management of anaphylaxis in childhood: position paper of the European academy of allergology and clinical immunology. *Allergy* 2007; 62: 857-71.
- <sup>120</sup> Badina L, Matarazzo L, Berti I, Longo G. Specific oral tolerance induction at the onset of IgE-mediated food allergy. *Allergy* 2012;67(S96):117
- <sup>121</sup> Allen KJ, Davidson GP, Day AS et al. Management of cow's milk protein allergy in infants and young children: an expert panel perspective. *Journal of Paediatrics and Child Health* 2009; 45: 481-6.
- <sup>122</sup> Host A, Halken S, Jacobsen HP et al. Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 2002; 13: 23-8
- <sup>123</sup> Longo G, Berti I, Barbi E, et al. Diagnosed child, treated child: food challenge as the first step toward tolerance induction in cow's milk protein allergy. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2012;44:54-60.
- <sup>124</sup> Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Guenard L, et al. Oral desensitization in children with milk and egg allergies obtains recovery in a significant proportion of cases. A randomized study in 60 children with cow's milk allergy and 90 children with egg allergy. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2007;39:12-9.
- <sup>125</sup> Hofmann AM, Scurlock AM, Jones SM, et al. Safety of a peanut oral immunotherapy protocol in children with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124:286-91.
- <sup>126</sup> Brożek JL, Terracciano L, Hsu J, et al. Oral immunotherapy for IgE-mediated cow's milk allergy: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Allergy*. 2012;42:363-74.
- <sup>127</sup> Barbi E, Longo G, Berti I, et al. Adverse effects during specific oral tolerance induction: in-hospital "rush" phase. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2012 ;44:18-25.
- <sup>128</sup> Barbi E, Longo G, Berti I, et al. Adverse effects during specific oral tolerance induction: in home phase. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2012;40:41-50.
- <sup>129</sup> Pajno GB, Caminiti L, Salzano G, et al. Comparison between two maintenance feeding regimens after successful cow's milk oral desensitization. *Pediatr Allergy Immunol*. 2013;24:376-81.
- <sup>130</sup> Lack G. Update on risk factors for food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129:1187-97.
- <sup>131</sup> Roberts G, Lack G. Relevance of inhalational exposure to food allergens. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2003;3:211-5.
- <sup>132</sup> Palmer DJ, Metcalfe J, Makrides M, et al. Early regular egg exposure in infants with eczema: A randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:387-92.
- <sup>133</sup> Devenney I, Norrman G, Oldaeus L, Stromberg L, Falth-Magnusson K. A new model for low-dose food challenge in children with allergy to milk or egg. *Acta Paediatrica*, 2006; 95: 1133-1139
- <sup>134</sup> Osborne NJ, Koplin JJ, Martin PE, Gurrin LC, Lowe AJ, Matheson MC, et al. Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:668-76.