

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA IN

MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE

CURRICULUM IN SCIENZE PEDIATRICHE TRASLAZIONALI

XXXVI Ciclo

(Anni 2020-2023)

Coordinatore: Prof. Francesco Beguinot

TESI DI DOTTORATO

**STORIA NATURALE E MECCANISMI
FISIOPATOLOGICI DELLE ALLERGIE
ALIMENTARI NON-IgE MEDIATE IN ETÁ
PEDIATRICA:
RISULTATI DELLO STUDIO NIGEFA**

TUTOR/RELATORE

Chiar.mo Prof.

Roberto Berni Canani

CANDIDATO/A

Dott. Laura Carucci

ABSTRACT

Background: Le allergie alimentari (AA) non-IgE mediate sono caratterizzate dalla presenza di sintomi gastrointestinali con esordio subacuto o cronico. In base alle caratteristiche cliniche si classificano come: sindrome enterocolitica (FPIES), proctocolite allergica (FPIAP), enteropatia (FPE) e disturbi della motilità intestinale (FPIMD) indotti da proteine alimentari. La storia naturale ed i meccanismi fisiopatologici di queste condizioni sono ancora poco definiti e questo limita la possibilità di definire strategie efficaci per la prevenzione ed il management. Lo studio NIGEFA, osservazionale prospettico, ha l'obiettivo di definire le caratteristiche cliniche e fisiopatologiche delle AA non-IgE mediate in età pediatrica.

Metodi: Bambini (ambosessi, età <14 anni, follow-up 24 m) con AA non-IgE mediata, diagnosticata secondo i criteri standard presso il Centro di Terzo Livello di Allergologia Pediatrica e Gastroenterologia dell'Università Federico II di Napoli. Per lo studio dei meccanismi fisiopatologici è stato raccolto un campione di sangue periferico alla diagnosi per la valutazione delle popolazioni Th2, Th1, Treg e Th17 e delle relative citochine.

Risultati: Un totale di 123 bambini (56% maschi) con un'età mediana (IQR) di 150 (60-300) giorni sono stati arruolati nello studio. La frequenza delle AA non-IgE mediate è stata: FPE (39%), FPIES (17%), FPIAP (16%) e FPIMD (28%). Il 42% dei bambini presentava AA multiple al basale e il 64% aveva rischio allergico familiare. Il sesso maschile (Odds Ratio (OR)=2,24; IC 95% 1,07-4,71) e il ritardo diagnostico di 1 mese (OR=1,09; 1,01-1,18) aumentavano il rischio di sviluppare AA multipla. Il tasso di acquisizione della tolleranza immunologica totale a 24 m è stato del 54% [FPIAP (75%), FPIMD (62%), FPE (54%), FPIES (24%)]. La presenza di rischio allergico familiare (OR=0,41; 0,19-0,89) e di AA multipla (OR=0,24; 0,11-0,51), riduceva la probabilità di acquisire la tolleranza immunologica a 24 m. Al follow-up di 24 m, la marcia allergica è stata osservata nel 46% dei pazienti, con tassi simili nei quattro fenotipi clinici. La presenza di AA multipla aumentava il rischio di sviluppare marcia allergica (OR=2,22; 1,07-4,61) a 24 m. L'analisi delle popolazioni cellulari e delle citochine sul sopranatante di cellule mononucleate di sangue periferico stimulate con proteine totali del latte, ha mostrato un incremento simile dei linfociti Th2 e dei livelli delle rispettive citochine nei pazienti IgE e non-IgE mediati con allergia alle proteine del latte vaccino. Solo i pazienti con AA non-IgE mediata mostravano un aumento della popolazione Th1 e dell'IFN γ .
Conclusioni: Questi dati suggeriscono l'importanza di una diagnosi precoce per prevenire l'insorgenza di AA multiple e quindi limitare l'insorgenza di marcia allergica e accelerare l'acquisizione della tolleranza immunologica nei bambini con AA non-IgE mediata. Inoltre l'incremento dei linfociti Th1 e dell'IFN γ , risultato come marcatore di AA non-IgE mediata, potrebbe essere usato nella diagnosi di queste malattie.

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	pag 7
<i>1.1 Sindrome enterocolitica indotta da proteine alimentari.....</i>	pag 8
<i>1.1.1 <u>Epidemiologia</u>.....</i>	pag 8
<i>1.1.2 <u>Fisiopatologia</u>.....</i>	pag 8
<i>1.1.3 <u>Manifestazioni cliniche</u>.....</i>	pag 9
<i>1.1.4 <u>Diagnosi</u>.....</i>	pag 10
<i>1.1.5 <u>Diagnosi differenziale</u>.....</i>	pag 12
<i>1.1.6 <u>Management</u>.....</i>	pag 12
<i>1.1.7 <u>Prognosi</u>.....</i>	pag 14
<i>1.2 Proctocolite allergica indotta da proteine alimentari.....</i>	pag 15
<i>1.2.1 <u>Epidemiologia</u>.....</i>	pag 15
<i>1.2.2 <u>Fisiopatologia</u>.....</i>	pag 15
<i>1.2.3 <u>Manifestazioni cliniche</u>.....</i>	pag 15
<i>1.2.4 <u>Diagnosi</u>.....</i>	pag 16
<i>1.2.5 <u>Diagnosi differenziale</u>.....</i>	pag 17
<i>1.2.6 <u>Management</u>.....</i>	pag 17
<i>1.2.7 <u>Prognosi</u>.....</i>	pag 17
<i>1.3 Enteropatia indotta da proteine alimentari.....</i>	pag 18
<i>1.3.1 <u>Epidemiologia</u>.....</i>	pag 18
<i>1.3.2 <u>Fisiopatologia</u>.....</i>	pag 18
<i>1.3.3 <u>Manifestazioni cliniche</u>.....</i>	pag 18
<i>1.3.4 <u>Diagnosi</u>.....</i>	pag 19
<i>1.3.5 <u>Diagnosi differenziale</u>.....</i>	pag 20
<i>1.3.6 <u>Management</u>.....</i>	pag 21
<i>1.3.7 <u>Prognosi</u>.....</i>	pag 21

1.4 Disturbi della motilità intestinale indotti da proteine alimentari

<i>1.4.1 <u>Malattia da reflusso gastroesofageo</u></i>	pag 22
<i>1.4.1.1 Epidemiologia</i>	pag 22
<i>1.4.1.2 Fisiopatologia</i>	pag 22
<i>1.4.1.3 Manifestazioni cliniche</i>	pag 23
<i>1.4.1.4 Diagnosi</i>	pag 23
<i>1.4.1.5 Diagnosi differenziale</i>	pag 24
<i>1.4.1.6 Management</i>	pag 24
<i>1.4.1.7 Prognosi</i>	pag 24
<i>1.4.2 <u>Stipsi</u></i>	pag 25
<i>1.4.2.1 Epidemiologia</i>	pag 25
<i>1.4.2.2 Fisiopatologia</i>	pag 25
<i>1.4.2.3 Manifestazioni cliniche</i>	pag 25
<i>1.4.2.4 Diagnosi</i>	pag 26
<i>1.4.2.5 Diagnosi differenziale</i>	pag 26
<i>1.4.2.6 Management</i>	pag 26
<i>1.4.2.7 Prognosi</i>	pag 27
<i>1.4.3 <u>Coliche</u></i>	pag 27
<i>1.4.3.1 Epidemiologia</i>	pag 27
<i>1.4.3.2 Fisiopatologia</i>	pag 27
<i>1.4.3.3 Manifestazioni cliniche</i>	pag 28
<i>1.4.3.4 Diagnosi</i>	pag 28
<i>1.4.3.5 Management</i>	pag 29
<i>1.4.3.6 Prognosi</i>	pag 29

2. OBIETTIVI DELLO STUDIO	pag 30
3. MATERIALI E METODI	pag 31
3.1 <i>Disegno dello studio</i>	pag 31
3.2 <i>Procedure dello studio</i>	pag 32
3.3 <i>Test di screening allergologico</i>	pag 34
3.3.1 <u><i>Skin Prick Test</i></u>	pag 34
3.3.2 <u><i>Atopy Patch Test</i></u>	pag 34
3.3.3 <u><i>Test di Provocazione orale</i></u>	pag 35
3.4 <i>Procedure di laboratorio</i>	pag 36
3.4.1 <u><i>Modalità di estrazione delle PBMCs</i></u>	pag 36
3.4.2 <u><i>Protocollo di stimolazione</i></u>	pag 37
3.4.3 <u><i>Immunofenotipo cellulare</i></u>	pag 37
3.4.4 <u><i>Modalità di esecuzione dell'analisi dei livelli sierici di IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IFN-γ, TNF-α</i></u>	pag 38
3.5 <i>Gestione e analisi dei dati</i>	pag 38
3.6 <i>Analisi statistica</i>	pag 38
3.6.1 <u><i>Storia naturale</i></u>	pag 39
3.6.2 <u><i>Accuratezza diagnostica</i></u>	pag 39
3.7 <i>Comitato etico</i>	pag 40
4. RISULTATI	pag 41
4.1 <i>Popolazione dello studio</i>	pag 41
4.2 <i>Risultati degli obiettivi primari</i>	pag 42
4.2.1 <u><i>Caratteristiche cliniche</i></u>	pag 42
4.2.2 <u><i>Storia naturale</i></u>	pag 43
4.2.2.1 <i>Acquisizione della tolleranza immunologica</i>	pag 44
4.2.2.2 <i>Acquisizione della tolleranza immunologica alle proteine del latte vaccino</i>	pag 44

4.2.2.3 Sviluppo di marcia allergica.....	pag 45
4.2.2.4 Sviluppo di malattie immuno e non immunomediate..	pag 46
4.2.3 <u>Caratteristiche dei test di screening allergologici e dei Test di Provocazione Orale</u>	pag 47
4.3 Risultati degli obiettivi secondari.....	pag 48
4.3.1 <u>Meccanismi fisiopatologici</u>	pag 48
4.3.1.1 Analisi della popolazione linfocitaria	pag 48
4.3.1.2 Analisi delle citochine	pag 48
5. DISCUSSIONE	pag 49
6. CONCLUSIONI	pag 59
7. TABELLE E FIGURE	pag 60
8. BIBLIOGRAFIA	pag 74

1. INTRODUZIONE

L'allergia alimentare (AA) deriva da una abnorme risposta immunologica agli antigeni della dieta.¹ La prevalenza delle AA è aumentata significativamente negli ultimi due decenni ed attualmente fino al 10% della popolazione pediatrica ne è affetta.²

In base al meccanismo immunologico le AA vengono distinte nelle seguenti forme: IgE-mediate, Non-IgE-mediate e miste. Circa il 50% dei pazienti pediatrici affetti da AA presenta una forma non-IgE-mediata.³⁻⁴

Le AA non-IgE-mediate comprendono uno spettro di disturbi che colpiscono prevalentemente il tratto gastrointestinale ad esordio subacuto o cronico, e in base alle loro caratteristiche cliniche possono essere distinti in: sindrome enterocolitica indotta da proteine alimentari (FPIES), proctocolite allergica indotta da proteine alimentari (FPIAP), enteropatia indotta da proteine alimentari (FPE) e disturbi della motilità intestinale indotti da proteine alimentari (FPIMD).⁵⁻⁷

Gli allergeni più frequentemente coinvolti sono le proteine del latte vaccino, soia, riso e pesce.⁵⁻⁷

La storia naturale ed i meccanismi fisiopatologici di queste condizioni sono ancora poco definiti, e questo limita la possibilità di definire strategie efficaci per la prevenzione ed il management.^{8,9}

Lo studio NIGEFA (Non-IgE mediated Food Allergy) nasce con l'obiettivo di definire le caratteristiche cliniche e fisiopatologiche delle AA non IgE mediate in età pediatrica.

1.1 Sindrome enterocolitica indotta da proteine alimentari

La Sindrome enterocolitica indotta da proteine alimentari (FPIES) è la forma più severa tra le AA non-IgE e si caratterizza per un'inflammatione a carico di tutto il tratto intestinale.

1.1.1 Epidemiologia

Non vi sono dati precisi sulla prevalenza della FPIES. Uno studio prospettico sulla popolazione Israeliana ha riportato che l'incidenza cumulativa di FPIES da allergia alle proteine del latte vaccino (APLV) nei bambini entro i 2 anni di età è dello 0,34%, simile alla prevalenza dell'APLV IgE mediata (0,5%) nella stessa popolazione.¹⁰

La FPIES si presenta in genere nei bambini di età inferiore ai 9 mesi. Il latte vaccino e la soia, seguiti dai cereali (riso e avena) e pesce, sono gli allergeni più comunemente coinvolti in Europa occidentale e negli USA.¹¹⁻¹³

La FPIES causata da PLV e soia si manifesta generalmente prima dei 6 mesi di vita a causa dell'introduzione della formula nella dieta del lattante. La FPIES causata da alimenti solidi si presenta in età più avanzata, con una mediana di 5-7 mesi, in coincidenza con l'introduzione dei primi alimenti solidi con lo svezzamento.^{7,14}

1.1.2 Fisiopatologia

La FPIES è generalmente considerata una malattia mediata dai linfociti T. Tuttavia, il ruolo dei linfociti T è stato recentemente messo in discussione, in particolare dall'osservazione che la proliferazione delle cellule mononucleate di sangue periferico e gli atopy patch test (APT) non sembrano essere utili alla diagnosi di FPIES in tutti i soggetti affetti.¹⁵⁻²⁴

Inoltre, il ruolo delle cellule T come meccanismo patogenetico tipico di queste forme, è stato ulteriormente messo in discussione da dati recenti che mostrano simili risposte proliferative dei linfociti T CD4⁺ dopo la stimolazione con caseina nei pazienti con FPIES causata da PLV, nei pazienti con APLV IgE mediata e nei soggetti che tollerano il latte vaccino.²⁵⁻²⁷

Recenti evidenze hanno inoltre suggerito il ruolo dell'immunità innata nella patogenesi della FPIES, in particolare sembrerebbero attivamente coinvolti neutrofili, monociti e cellule eosinofile.²⁸⁻³⁰

Infine, a supporto dell'ipotesi secondo cui in pazienti con FPIES sia presente un meccanismo infiammatorio sistemico, è stato riscontrato un aumento significativo dei livelli di PCR dopo il test di provocazione orale (TPO) positivo.^{31,32}

Se i dati sulla patogenesi sono discordanti e ancora poco chiari, i dati sulla tolleranza immunologica sembrano convergere verso un ruolo attivo dei linfociti T regolatori (T-reg). In particolare, i linfociti T-reg CD4⁺ CD25⁺, tramite un'azione soppressiva attraverso il contatto cellula-cellula e la produzione del TNF- β e dell'IL-10 sarebbero coinvolti nei meccanismi di tolleranza nei soggetti con FPIES.^{20,26}

1.1.3 Manifestazioni cliniche

Nel 2017 sono state pubblicate le prime linee guida internazionali per la diagnosi e la gestione dei pazienti con FPIES.¹⁴

Pertanto, è possibile distinguere diverse forme cliniche di FPIES di vari gradi di severità, determinate dalla frequenza delle reazioni, dalla dose dell'alimento scatenante la reazione, dal fenotipo clinico e dall'età del paziente.^{11,14,33,34}

La forma più comune è la FPIES acuta, caratterizzata da vomito ripetuto, che si verifica tipicamente 1–4 ore dopo l'ingestione dell'alimento responsabile, associato a letargia e pallore.^{8,9} La diarrea acquosa può manifestarsi entro 24 ore, ma generalmente insorge entro le prime 5 ore.^{8,9,11,12,35} Casi gravi di FPIES possono portare a disidratazione con instabilità emodinamica (fino al 15% dei casi), richiedendo idratazione per via endovenosa e ricovero in ospedale.^{11,12,14}

La FPIES cronica sembra essere meno frequente, ma è classicamente caratterizzata da vomito intermittente, diarrea acquosa cronica con malassorbimento, responsabile di scarsa crescita; gli alimenti principalmente coinvolti sembrano latte vaccino o formula di soia.^{8,9}

1.1.4 Diagnosi

La diagnosi di FPIES acuta richiede che siano soddisfatti il criterio principale e 3 o più criteri minori.¹⁴ Il criterio principale è il vomito 1–4 h dopo l'ingestione del sospetto alimento responsabile e l'assenza di sintomi respiratori o cutanei indicativi di una reazione allergica IgE mediata. I criteri minori includono:

- due o più episodi di vomito ripetuto dopo aver mangiato lo stesso sospetto alimento;
- vomito ripetuto dopo aver mangiato un diverso sospetto alimento con una qualsiasi delle seguenti reazioni sospette
- estrema letargia,
- pallore marcato,
- necessità di una visita al pronto soccorso
- necessità di supporto di liquidi per via endovenosa
- diarrea entro 24 h
- ipotensione o ipotermia.

Se i criteri clinici sono rispettati dopo l'assunzione di un singolo alimento, il TPO non è necessario per confermare la diagnosi di FPIES.¹⁴

Il TPO deve essere effettuato per confermare la diagnosi di FPIES se invece non sono rispettati i criteri clinici e/o la comparsa di sintomatologia suggestiva è avvenuta dopo l'assunzione contemporanea di più alimenti.¹⁴

Non ci sono criteri diagnostici per la FPIES cronica e, di conseguenza, questa forma può essere più difficile da diagnosticare. Quando l'alimento responsabile è eliminato dalla dieta, la risoluzione dei sintomi si ha in genere entro 3-10 giorni. Se l'alimento responsabile viene reintrodotta dopo un periodo di dieta di eliminazione, si ha lo sviluppo di una reazione di FPIES acuta. Escludere altre diagnosi è importante in caso di sospetta FPIES cronica poiché, in assenza di un TPO positivo, la FPIES cronica resta una diagnosi presunta.¹⁴

L'esame endoscopico o le biopsie intestinali non sono raccomandati per la diagnosi di FPIES.¹⁴

Il ruolo degli esami endoscopici e dei test di screening allergologico come gli skin prick test (SPT) e gli APT è ad oggi ancora controverso.^{11,10,14,35,36}

La FPIES è classicamente definita come una malattia di tipo non-IgE mediata e per tale motivo SPT e IgE specifiche risultano generalmente negative.¹⁴ Di recente scoperta è la presenza di una FPIES definita "atipica", caratterizzata da sintomi tipici di FPIES e la presenza di o SPT positivi e/o bassi livelli di IgE specifiche per l'alimento sospetto; inoltre questo correla con una prognosi peggiore.^{10,11,15,35,36}

Il ruolo degli APT è ancora fortemente combattuto, prevalentemente dovuto alla mancata standardizzazione nell'utilizzo di estratti allergenici vs alimenti freschi; utilizzo di diversi supporti di adesione, di diverse concentrazioni di alimento, di diverse tempistiche di applicazione dell'APT, ma una recente metanalisi ha mostrato come questi test possano avere un buon valore predittivo

positivo in soggetti con allergia alimentare non-IgE mediata e sintomi gastrointestinali, se effettuati con alimenti freschi.^{5,8,9,15,23,37}

1.1.5 Diagnosi differenziale

La diagnosi differenziale della FPIES comprende principalmente malattie gastrointestinali e infettive. Tra queste troviamo: patologie ostruttive gastrointestinali (ad es. intussuscezione, volvolo, stenosi congenita del piloro), enterocolite necrotizzante, grave malattia da reflusso gastroesofageo, infezioni intestinali, malattie eosinofiliche del tratto gastrointestinale e celiachia.

1.1.6 Management

Una volta confermata la diagnosi, la gestione della FPIES prevede una rigorosa dieta di eliminazione dell'alimento responsabile dalla dieta del bambino o della madre se il bambino è allattato al seno. Nei pazienti con APLV allattati artificialmente, è necessario inserire una formula ipoallergenica e la formula a base di caseina estensivamente idrolizzata è generalmente ben tollerata nei pazienti con diagnosi di FPIES da PLV. L'utilizzo di una formula amminoacidica può essere necessario nel 10-20% dei pazienti con FPIES da PLV.^{5,8,9,11}

La gestione dei sintomi in pazienti con FPIES prevede la reidratazione orale o endovenosa, l'Ondasentron e il metilprednisolone a seconda della gravità dei sintomi.¹⁴

La complicanza più temuta di una reazione di FPIES acuta è lo shock ipovolemico. Pertanto, il trattamento principale è la reidratazione. Tra il 45 e il 95% delle reazioni positive ad un TPO sono state trattate con liquidi per via endovenosa, steroidi o entrambi.^{7,14}

Se i sintomi sono lievi (1-2 episodi di vomito in assenza di letargia), l'approccio iniziale consiste nella reidratazione per via orale, anche con l'allattamento al seno; se il bambino ha un'età superiore ai 6 mesi, si può considerare, come trattamento aggiuntivo, l'uso dell'Ondansetron i.m. (alla dose di 0.15 mg/kg fino ad una dose massima di 16 mg). Il paziente va monitorato per almeno 4-6 ore dall'inizio della reazione.¹⁴

In caso di sintomi moderati (≥ 3 episodi di vomito con lieve letargia), se il bambino ha un'età superiore ai 6 mesi è indicata la somministrazione di Ondansetron i.m. (alla dose di 0.15 mg/kg fino ad una dose massima di 16 mg). È necessario predisporre un accesso intravenoso per l'infusione in bolo di 20 mL/kg di soluzione fisiologica, eventualmente ripetibile se necessario. In caso di comparsa di ipotensione severa e/o persistente, shock, letargia marcata o distress respiratorio, il paziente va ricoverato in un'unità di terapia intensiva.¹⁴

In caso di sintomi severi (≥ 3 episodi di vomito con letargia severa o cianosi) è necessario predisporre un accesso intravenoso per la rapida infusione di un bolo di soluzione salina (20 mL/kg) ripetibile se necessario fino alla risoluzione dell'ipotensione. Inoltre, se il bambino ha un'età superiore ai 6 mesi è indicata la somministrazione di Ondansetron e.v. (alla dose di 0.15 mg/kg fino ad una dose massima di 16 mg); se la predisposizione di un accesso intravenoso è ritardata, si può procedere con la somministrazione i.m. di Ondansetron (alla dose di 0.15 mg/kg fino ad una dose massima di 16 mg). In questi pazienti viene somministrato metilprednisolone e.v. (alla dose di 1 mg/kg fino ad una dose massima di 16 mg). È necessario il continuo monitoraggio dei parametri vitali, dell'equilibrio acido-base e degli elettroliti sierici, procedendo alla correzione di eventuali anomalie. Il paziente può essere dimesso dopo almeno 4-6 ore dall'inizio della reazione se è in grado di assumere fluidi per via orale. In caso di comparsa di ipotensione severa e/o persistente, shock, letargia marcata o distress respiratorio, il paziente va ricoverato in un'unità di terapia intensiva.¹⁴

1.1.7 Prognosi

La valutazione dell'acquisizione della tolleranza immunologica comporta l'esecuzione di un TPO ogni 12-18 mesi.¹⁴ I TPO in regime ospedaliero sono raccomandati per la reintroduzione degli alimenti trigger poiché le reazioni possono portare a condizioni gravi come ipotensione e shock ipovolemico. L'accesso endovenoso periferico deve essere stabilito prima di iniziare il TPO.⁵ Le FPIES atipiche, definite dalla presenza di IgE specifiche per l'alimento responsabile, sono associate ad un'età più avanzata di acquisizione della tolleranza immunologica.^{8,11}

La maggior parte dei pazienti con FPIES diagnosticata durante l'infanzia sviluppa tolleranza immunologica. L'età media della tolleranza alle PLV sembra verificarsi intorno ai 3 anni di vita.^{7,14} La tolleranza immunologica alle FPIES causate da alimenti solidi si verifica più tardivamente, generalmente intorno all'età scolare.¹⁴

1.2 Proctocolite allergica indotta da proteine alimentari

La FPIAP rappresenta la forma più frequente di AA non-IgE mediata nei bambini allattati al seno e si manifesta tipicamente con sanguinamento rettale in pazienti altrimenti sani, è caratterizzata da infiammazione prevalentemente a carico dell'ultimo tratto del colon-retto.

1.2.1 Epidemiologia

Nonostante la mancanza di studi sulla prevalenza, si ritiene che la prevalenza stimata di FPIAP vari ampiamente tra lo 0,16 e il 64% dei bambini con sanguinamento rettale isolato.^{5,8,38-40}

1.2.2 Fisiopatologia

Il meccanismo fisiopatologico della FPIAP rimane in gran parte sconosciuto. Si riscontra tipicamente la presenza di eosinofili superiori a 10/hpf (high-power field) e un aumento dei linfociti intraepiteliali T CD8+ del retto.^{7,9,41}

Le PLV sono l'allergene più frequentemente coinvolto nella FPIAP, seguito da soia e uova.⁴¹⁻⁴⁴

1.2.3 Manifestazioni cliniche

La caratteristica clinica principale della FPIAP è la presenza di sangue rosso vivo nelle feci di un bambino che cresce e si sviluppa normalmente, con o senza diarrea e muco.^{7,40,45,46} I sintomi raramente insorgono nelle prime ore dopo l'ingestione dell'alimento responsabile (< 12 h); infatti è più probabile che si sviluppino gradualmente nel tempo.⁴⁷ La FPIAP è stata descritta per la prima volta in neonati allattati esclusivamente al seno e sebbene possa essere

presentata anche in bambini allattati artificialmente, è più frequente nei bambini allattati esclusivamente al seno.^{40,46,48,49}

Diversi studi riportano la comparsa di FPIAP in lattanti che praticavano allattamento misto (latte materno e in formula) al momento della presentazione clinica.^{5,8,38,45}

Le indagini laboratoristiche possono mostrare in alcuni bambini affetti, un'ipereosinofilia periferica ed un'ipoalbuminemia.^{44,45,50}

L'esordio clinico è solitamente insidioso, con una latenza prolungata dopo l'introduzione dell'alimento responsabile, anche se raramente l'esordio può essere acuto, entro 12 ore dall'assunzione. Generalmente i bambini con FPIAP presentano buone condizioni cliniche generali ed una crescita regolare. Quando l'alimento sospetto non viene eliminato dalla dieta, anche se il sanguinamento continua, il bambino cresce bene sebbene possa svilupparsi anemia.^{41,46}

1.2.4 Diagnosi

La diagnosi di FPIAP è tipicamente clinica e necessita della risoluzione dei sintomi con l'eliminazione dell'alimento sospetto dalla dieta e una ricomparsa dei sintomi con la reintroduzione dello stesso alimento (TPO). I test di screening allergologico come APT ed SPT non sono raccomandati per la diagnosi.¹⁰ Tuttavia recenti evidenze mostrano che gli SPT o le IgE alimento specifiche possono risultare positive in alcune coorti, in particolare in quelle con storia di eczema.^{38,44,51}

Nei pazienti con FPIAP, il TPO diagnostico si effettua dopo 4 settimane di dieta di eliminazione e può essere eseguito a domicilio. La ricomparsa del sangue e/o diarrea e muco durante il TPO, conferma la diagnosi. In reazioni dubbie con assenza di sangue visibile, i campioni di feci possono essere testati per la ricerca del sangue occulto.^{8,52,53}

1.2.5 Diagnosi differenziale

Devono essere considerate, per la diagnosi differenziale con la FPIAP, altre cause di sanguinamento rettale nei neonati, come ragadi anali, enterocolite necrotizzante, infezioni, ostruzione gastrointestinale, ematochezia benigna e disturbi della coagulazione.⁴⁷

1.2.6 Management

La gestione del paziente con FPIAP causata da proteine della dieta, si basa tipicamente sull'eliminazione dell'alimento responsabile dalla dieta materna e/o del bambino.^{7,38} Il sanguinamento rettale si risolve in genere entro 3-4 giorni.⁴⁹ Nel caso di bambini con FPIAP secondaria ad APLV, allattati artificialmente, è necessario introdurre una formula ipoallergenica; generalmente si utilizza di una formula a base di caseina estensivamente idrolizzata o una formula a base di proteine vegetali se il bambino ha più di 6 mesi.^{45,46} Raramente è necessaria una formula amminoacidica.^{38,39}

1.2.7 Prognosi

Nella stragrande maggioranza dei casi, la FPIAP ha una prognosi favorevole e la tolleranza immunologica viene raggiunta entro un anno dalla diagnosi se è presente AA a singolo alimento.⁵ In casi di FPIAP associata a più alimenti, l'acquisizione della tolleranza immunologica può avvenire più tardivamente.⁵¹

1.3 Enteropatia indotta da proteine alimentari

La enteropatia indotta dalle proteine dalla dieta (FPE) è un'AA non-IgE mediata descritta per la prima volta in Finlandia da Kuitunen et al nel 1975; generalmente colpisce i lattanti al di sotto dei 9 mesi di vita ed è caratterizzata dal coinvolgimento prevalente dell'intestino tenue.⁵⁴

1.3.1 Epidemiologia

La prevalenza della FPE è ancora largamente sconosciuta e i dati sono piuttosto discordanti, ma si ritiene che sia una malattia relativamente rara. Uno studio finlandese ha stimato che la prevalenza della FPE sia circa un quinto rispetto ai pazienti affetti da celiachia.⁵⁴

In uno studio retrospettico su una coorte di 189 pazienti affetti da AA non-IgE mediate, il dolore addominale e la diarrea erano riportati in >80% dei soggetti e la perdita di peso >50%; sintomi tipici della FPE.⁵⁵

1.3.2 Fisiopatologia

I meccanismi fisiopatologici alla base dell'insorgenza della FPE rimangono scarsamente conosciuti; tuttavia è stato proposto il coinvolgimento dei linfociti T CD8+ soppressori nello sviluppo di tale patologia.^{9,54,56}

La FPE è solitamente causata dalle PLV; tuttavia possono essere coinvolti anche uova, soia e grano.^{9,54}

1.3.3 Manifestazioni cliniche

La FPE si manifesta con la comparsa di diarrea protratta, non ematica, generalmente nei primi 9 mesi di vita. I sintomi in genere si manifestano entro i primi 2 mesi di vita, entro qualche settimana dall'introduzione nella dieta del lattante delle PLV.^{56,57}

Oltre la metà dei bambini affetti manifesta anche vomito, distensione addominale, inappetenza e malassorbimento simile a quello provocato dalla malattia celiaca, con conseguente scarso accrescimento, anemia ed ipoalbuminemia. In alcuni rari casi è stata riscontrata la presenza di sangue occulto nelle feci.^{54,56,57}

Nella maggioranza dei pazienti l'esordio clinico è graduale ma in alcuni casi può essere acuto mimando il quadro clinico di una gastroenterite acuta, complicata da diarrea prolungata (sindrome post-enteritica).⁸

1.3.4 Diagnosi

La diagnosi di FPE è spesso clinica, effettuata attraverso un'anamnesi dettagliata, l'esame obiettivo, la risposta alla dieta di eliminazione con la scomparsa dei sintomi e la ricomparsa dei sintomi durante il TPO. Tuttavia, per formulare una diagnosi certa di FPE potrebbe essere necessario in casi selezionati, l'effettuazione di un esame endoscopico con una biopsia intestinale.⁵⁶

I reperti istologici derivati dalla mucosa dell'intestino dei pazienti affetti da FPE comunemente includono:

- atrofia dei villi;
- iperplasia linfonodulare del duodeno e del colon;
- aumento dei linfociti intraepiteliali (>25/100 cellule epiteliali);
- marcata infiltrazione e degranulazione degli eosinofili nella mucosa;
- aumento dei linfociti T CD8+ intraepiteliali intestinali specifici per gli allergeni alimentari;
- maggiore densità di cellule $\gamma\delta$ -TCR+ intraepiteliali.^{54,56}

In campioni di biopsia digiunale sono stati riscontrati livelli aumentati delle citochine IFN- γ e IL-4.⁵⁶

Ad oggi non esistono biomarkers specifici per la diagnosi di FPE; tuttavia, le indagini laboratoristiche possono risultare utili come supporto diagnostico, dato il frequente riscontro di anemia, ipoalbuminemia eipoproteinemia nei pazienti affetti.

Il valore diagnostico degli APT è controverso a causa della mancanza di validazione per cui non sono raccomandati per la diagnosi di routine; ma una recente metanalisi ha mostrato come questi test possano avere un buon valore predittivo positivo in soggetti con allergia alimentare non-IgE mediata e sintomi gastrointestinali, se effettuati con alimenti freschi. Gli SPT o il dosaggio delle IgE alimento-specifiche risultano utili nella diagnosi di FPE.^{8,57}

1.3.5 Diagnosi differenziale

La FPE entra in diagnosi differenziale con infezioni intestinali (virali, batteriche o parassitarie), immunodeficienze primitive, malattie metaboliche e con varie rare forme di malassorbimento quali linfangectasia, insufficienza pancreatica, difetti congeniti dell'enterocita, enteropatia autoimmune.⁹

Tuttavia, la principale diagnosi differenziale è con la celiachia. Infatti, clinicamente e anatomopatologicamente, sono indistinguibili, ma gli anticorpi tipici della celiachia sono assenti nella FPE. Inoltre, in quest'ultima sono assenti altri sintomi extra-digestivi osservati nella celiachia, come la dermatite erpetiforme.^{54,58}

1.3.6 Management

La dieta di eliminazione dell'alimento incriminato rappresenta il cardine della gestione della FPE, portando alla regressione della sintomatologia entro 4 settimane.^{8,56}

La regressione dell'atrofia dei villi invece può richiedere diversi mesi.⁹

La reintroduzione dell'alimento sospetto dopo 4 settimane di dieta di eliminazione può essere eseguita a casa e documentata con un diario dei sintomi. La ricomparsa della sintomatologia in seguito alla reintroduzione dell'alimento sospetto entro 4 settimane permette di confermare la diagnosi di FPE.⁵⁷

In caso di risultato positivo al TPO, la dieta di eliminazione dovrà essere praticata per 6 mesi, indi effettuare TPO per valutare l'acquisizione della tolleranza.⁵⁴

1.3.7 Prognosi

La prognosi è favorevole e l'acquisizione della tolleranza avviene in genere entro i 24–36 mesi di età.^{8,56,59}

1.4 Disturbi della motilità intestinale indotti da proteine alimentari

La malattia da reflusso gastroesofageo (MRGE), la stipsi e le coliche sono tra i disturbi pediatrici più comuni. Sono generalmente disturbi funzionali, ma se la sintomatologia è persistente da almeno 8 settimane (rigurgito persistente, costipazione o irritabilità), il trattamento convenzionale non è stato efficace e se il bambino presenta altri segni di atopia come la dermatite atopica, questi sintomi possono essere secondari ad una AA non-IgE mediata.⁶⁰

1.4.1 Malattia da reflusso gastroesofageo

1.4.1.1 Epidemiologia

Il RGE rappresenta il fisiologico transito di contenuto gastrico acido nell'esofago a causa del rilassamento transitorio dello sfintere esofageo superiore innescato soprattutto dalla distensione del fondo gastrico. Più della metà dei bambini sani rigurgita il latte dopo la poppata nei primi mesi di vita e i sintomi spesso si risolvono o migliorano significativamente entro i 12 mesi di età.^{9,60} Il RGE è considerato patologico e quindi si parla di malattia da reflusso gastroesofageo (MRGE) solo se provoca danno alla mucosa esofagea, ritardo della crescita o complicanze respiratorie.⁶⁰ Il ruolo degli allergeni alimentari, in particolare del latte vaccino, nella fisiopatologia del RGE è stato a lungo considerato. In uno studio svolto su bambini con esofagite istologica, circa il 42% è migliorato dopo il trattamento con formula idrolisata e ha ripresentato i sintomi dopo alla reintroduzione dell'alimento.⁶¹

1.4.1.2 Fisiopatologia

I meccanismi attraverso i quali gli allergeni alimentari inducono MRGE sono ancora poco conosciuti. È stato suggerito che il rilascio di mediatori proinfiammatori da parte di linfociti T ed eosinofili attivati possa stimolare il sistema nervoso enterico e causare disfunzioni peristaltiche innescando il rilascio dello sfintere esofageo inferiore.⁶⁰ I bambini con MRGE secondaria ad

APLV avevano livelli di IL-4 e TNF- α significativamente più alti rispetto a bambini con MRGE non indotta da APLV.⁵⁹

1.4.1.3 Manifestazioni cliniche

La MRGE si manifesta con rigurgito frequente soprattutto dopo i pasti. A differenza del vomito, il reflusso non è dovuto a contrazioni peristaltiche gastriche, per cui i rigurgiti si manifestano senza sforzo e di ridotta intensità.

Il rigurgito deve essere presente 2 o più volte al giorno per 3 o più settimane.

Nella MRGE possono apparire altri sintomi come irritabilità, rifiuto di alimentazione, sintomi respiratori quali tosse o dispnea. Molto meno frequentemente, i lattanti hanno apnea o episodi di inarcamento della schiena intermittenti con rotazione della testa da un lato (sindrome di Sandifer), inoltre possono presentare scarsa crescita ponderale.⁶²

1.4.1.4 Diagnosi

La diagnosi di MRGE è basata sulla clinica, tuttavia per confermare che la MRGE sia secondaria ad AA, è fondamentale osservare la scomparsa dei sintomi durante la dieta di eliminazione dell'alimento sospetto e osservare la ricomparsa dei sintomi con il TPO.⁶⁰ L'uso degli SPT o la misurazione delle IgE sieriche alimento specifiche non sono utili alla diagnosi; l'uso del APT è stato suggerito come strumento di supporto alla diagnosi, ma l'evidenza finora si basa solo su piccole serie di casi.⁶⁰

Di supporto alla diagnosi è l'esame istologico della mucosa esofagea. Il numero assoluto di eosinofili della mucosa nella MRGE indotta da proteine alimentari non è aumentato (<5/HPF), il che consente di distinguerlo

dall'esofagite eosinofila (presenza di almeno $\geq 15/\text{HPF}$ eosinofili nelle biopsie di esofago).^{9,60}

La manometria esofagea non consente invece di distinguere il RGE non allergico da quello indotto da proteine alimentari.^{59,60}

1.4.1.5 Diagnosi differenziale

Tra le diagnosi differenziali troviamo MRGE non secondaria ad AA, stenosi ipertrofica del piloro che deve essere esclusa mediante ecografia o pasto baritato. Quest'ultimo è utile anche per escludere la malrotazione intestinale.

Altra diagnosi differenziale deve essere effettuata con l'esofagite eosinofila che è caratterizzata da un numero di eosinofili della mucosa $\geq 15/\text{HPF}$ nell'esofago in assenza di ulcerazione della mucosa o neutrofilia.⁶⁰

1.4.1.6 Management

La terapia si basa sull'eliminazione dell'alimento implicato dalla dieta del bambino con risposta generalmente entro le 2-4 settimane.⁶⁰ Il TPO con la reintroduzione del cibo sospetto dopo 4 settimane dall'eliminazione può essere eseguita a casa e documentata con un diario dei sintomi. I tentativi di reintroduzione vengono effettuati ogni sei mesi.⁵³

1.4.1.7 Prognosi

La prognosi è favorevole con la risoluzione dei sintomi nella maggior parte dei bambini intorno ai 12-18 mesi di età.

1.4.2 Stipsi

1.4.2.1 Epidemiologia

Fino al 30% dei bambini è affetto da stitichezza, con una stima del 3-5% di tutte le visite ambulatoriali pediatriche.⁹ Circa il 97% delle stipsi nei bambini è di origine funzionale ed è spesso associata a defecazione dolorosa, ritenzione di feci e incontinenza fecale.⁶⁰

La stipsi indotta da proteine alimentari è un'entità clinica ancora poco definita e la sua incidenza nell'infanzia non è nota.⁶⁰ Recenti evidenze mostrano che la dieta priva di PLV porti a regressione della stipsi in una percentuale variabile dal 28-78% dei bambini con stipsi cronica.^{9,60}

1.4.2.2 Fisiopatologia

Il ruolo delle PLV nella stitichezza è controverso. Il passaggio dal latte materno alla formula è spesso associato a una lieve stitichezza. È stato dimostrato che formule con un alto contenuto di caseina, proteine del siero e alti livelli di acido palmitico influiscono negativamente sulla consistenza delle feci.⁶⁰

In soggetti con stipsi secondaria ad AA è stata riscontrata la presenza di eosinofili e mastociti nella mucosa rettale, che regredisce dopo dieta di eliminazione.^{59,60} L'infiammazione della mucosa rettale suggerisce che potrebbero essere coinvolti meccanismi non-IgE mediati simili a quelli riscontrati nella FPIAP o nella FPIES. L'infiammazione allergica inoltre può portare ad un aumento della pressione anale a riposo e predisporre alla ritenzione fecale.⁹

1.4.2.3 Manifestazioni cliniche

La stipsi cronica nel lattante indotta da proteine alimentari, è caratterizzata dal passaggio infrequente di feci dure per più di 8 settimane, in

associazione ad incontinenza fecale e defecazione dolorosa. Tale sintomatologia non regredisce utilizzando i trattamenti convenzionali per la gestione farmacologica della stipsi.⁶⁰

1.4.2.4 Diagnosi

La diagnosi di stipsi indotta da proteine alimentari è basata sulla clinica, tuttavia, la distinzione con la forma funzionale si basa sulla scomparsa dei sintomi durante la dieta di eliminazione e successiva ricomparsa della stipsi durante il TPO con l'alimento incriminato.⁶⁰

1.4.2.5 Diagnosi differenziale

La stipsi del lattante entra in diagnosi differenziale con forme funzionali, malformazioni anatomiche anorettali, malattia di Hirschprung, celiachia (dopo l'introduzione del glutine nella dieta), ipotiroidismo, alterazioni elettrolitiche (ipokaliemia, ipercalcemia), fibrosi cistica, anomalie spinali e masse addominali.⁶³

1.4.2.6 Management

La terapia si basa sull'eliminazione dell'alimento implicato dalla dieta del bambino con risposta generalmente entro le 4 settimane.⁶⁰

In caso di esame biptico effettuato alla diagnosi, potrebbe essere necessaria una nuova biopsia per dimostrare la risoluzione della infiammazione eosinofila e il monitoraggio della malattia.⁶⁰ La dieta di eliminazione per 6 mesi rappresenta il cardine della gestione di pazienti con stipsi secondaria ad APLV e il TPO va ripetuto semestralmente per valutare l'eventuale acquisizione della tolleranza immunologica.^{59,60}

1.4.2.7 Prognosi

La prognosi della stitichezza allergica alimentare sembra essere generalmente buona con l'80% dei pazienti che raggiunge la tolleranza entro 1 anno dalla diagnosi.⁵⁹

1.4.3 Coliche

1.4.3.1 Epidemiologia

La colica infantile è caratterizzata da episodi improvvisi di pianto inconsolabile della durata >3h al giorno per 3 o + giorni alla settimana per 3 o + settimane consecutive. Questa condizione colpisce fino al 19% dei bambini nei primi mesi di vita. Meno del 5% dei bambini con coliche ed irritabilità possono essere affetti da una patologia di base, ma la prevalenza di coliche secondarie ad AA non è nota.^{59,60,64}

1.4.3.2 Fisiopatologia

Sebbene l'eziologia delle coliche infantili secondarie ad AA rimanga controversa, la dismotilità gastrointestinale, l'ipereccitabilità neuronale intestinale e il rilascio di citochine proinfiammatorie sono state proposte come fattori patogenetici.^{42,64-69} In alcuni soggetti con dismotilità intestinale indotta da proteine della dieta, è stata riscontrata ipereosinofilia nella mucosa intestinale.⁷⁰

Studi sperimentali su topi mostrano il coinvolgimento delle cellule Th2 e di citochine, come l'IL-4 e IL-13, nella dismotilità indotta dagli antigeni alimentari e dell'IL-5 nella patogenesi dell'ipereosinofilia della mucosa intestinale.⁷¹ L'ipereccitabilità neuronale intestinale indotta dall'AA può portare ad una percezione alterata degli stimoli fisiologici, come la distensione intestinale e la peristalsi, che vengono percepiti come eventi dolorosi.^{69,70-72}

1.4.3.3 Manifestazioni cliniche

La colica infantile è stata definita clinicamente in modi diversi, ma il pianto prolungato è una caratteristica quasi costante.⁷³ I criteri di Wessel, che richiedevano la regola del "tre" per una diagnosi (pianto per più di tre ore/giorno, per più di tre giorni/settimana per >3 settimane), sono stati sostituiti dai recenti criteri Roma IV. Secondo tali criteri, la diagnosi di colica infantile può essere confermata in presenza dei seguenti criteri:⁵³

- età inferiore ai 5 m all'esordio e alla scomparsa dei sintomi;
- periodi ricorrenti e prolungati di pianto, agitazione o irritabilità segnalata dai genitori che si verificano senza cause specifiche e che non possono essere prevenuti o risolti dai genitori;
- nessuna evidenza di scarsa crescita, febbre o malattia.^{74,75}

In lattanti con coliche persistenti, dermatite atopica e/o altri sintomi gastrointestinali come alterazioni dell'alvo e/o MRGE, l'eziologia allergica delle coliche dovrebbe essere fortemente sospettata.⁵³

1.4.3.4 Diagnosi

Come per le altre AA non-IgE mediate, non sono disponibili biomarcatori per confermare il coinvolgimento degli alimenti e la diagnosi si basa sulla risposta clinica alla dieta di eliminazione di 4 settimane, seguita dalla ricomparsa della sintomatologia durante il TPO o entro le 4 settimane. Il TPO può essere effettuato a domicilio, vista la natura dei sintomi.⁵³

È stato dimostrato che gli SPT per l'alimento responsabile e/o le IgE alimento-specifiche possono risultare positivi in un sottogruppo di pazienti e che gli APT possano avere un buon valore predittivo positivo in soggetti con allergia alimentare non-IgE mediata e sintomi gastrointestinali, se effettuati con alimenti freschi. Pertanto, sebbene la negatività dei test di screening non escluda la diagnosi, questi possono essere di supporto al TPO nel processo diagnostico.^{9,53}

1.4.3.5 Management

Per i lattanti con coliche associate ad AA, la dieta di eliminazione si distingue in base al tipo di allattamento: nei bambini allattati al seno viene indicata una dieta materna priva dell'alimento responsabile;^{76,77} invece, nei bambini allattati artificialmente, l'utilizzo di una formula a base di PLV estensivamente idrolisate per un periodo di 4 settimane, rappresenta la strategia di scelta. Se si osserva una chiara risposta clinica, la dieta di eliminazione deve essere seguita dalla reintroduzione dell'alimento nella dieta (TPO) per confermare o sconfessare la diagnosi.^{69,76} Una volta confermata la diagnosi, la dieta di eliminazione deve essere effettuata per almeno 6 mesi prima di rivalutare l'eventuale acquisizione della tolleranza immunologica tramite TPO.^{69,76}

1.4.3.6 Prognosi

La prognosi delle coliche infantili indotte da AA è generalmente favorevole, con una risoluzione nel primo anno di vita.⁷⁸⁻⁸⁰

2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Gli obiettivi primari dello studio erano:

- 1) valutazione delle caratteristiche anamnestiche e cliniche attraverso l'analisi delle seguenti variabili: sesso, storia familiare di malattie allergiche, modalità di parto, tipo di allattamento, durata allattamento, età all'insorgenza dei sintomi, età alla diagnosi, ritardo diagnostico, presenza di dermatite atopica (DA) prima dell'insorgenza della AA, tipo di allergeni alimentari coinvolti, AA multipla;
- 2) valutazione della storia naturale, attraverso lo studio delle seguenti variabili: tempo di acquisizione della tolleranza immunologica, insorgenza di marcia allergica (MA), sviluppo di altre malattie immunomediate e non immunomediate;
- 3) risultati e caratteristiche del TPO e dei test di screening allergologico (APT, SPT).

L'obiettivo secondario dello studio era la valutazione della fisiopatologia delle AA non-IgE-mediate attraverso lo studio dei meccanismi immunologici.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Disegno dello studio

Lo studio NIGEFA è stato uno studio osservazionale monocentrico. È stato condotto da gennaio 2017 a gennaio 2023 presso il Centro di Terzo Livello di Allergologia Pediatrica e Gastroenterologia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II".

Tutti i soggetti di età ≤ 14 anni, consecutivamente osservati presso il Centro per sospetta AA con sintomi gastrointestinali (cioè diarrea, dolore addominale, sangue nelle feci, stitichezza, coliche, vomito, rigurgito), in presenza o in assenza di irritabilità, arresto della crescita stauo-ponderale e dermatite atopica per almeno 3 settimane sono stati valutati per lo studio.

I criteri di esclusione erano i seguenti:

- età >14 anni;
- malattie infettive;
- malattie sistemiche croniche;
- tumori maligni;
- immunodeficienze;
- malattie autoimmuni;
- celiachia;
- malattie metaboliche e genetiche;
- fibrosi cistica o altre forme di insufficienza pancreatica primaria;
- malformazioni o precedenti interventi chirurgici maggiori del tratto gastrointestinale, cardiovascolare, urinario o respiratorio;
- malattie psichiatriche e neurologiche;
- patologie eosinofile del tratto gastrointestinale;
- altre malattie allergiche senza una storia suggestiva di AA;

- trattamento con immunomodulanti o cortisonici nelle ultime 4 settimane.
- Lo schema di flusso dei pazienti è raffigurato in **figura 1**.

3.2 Procedure dello studio

Solo i soggetti che rispettavano i criteri di inclusione e di esclusione sono stati considerati per lo studio.

In occasione del primo incontro (T0), dopo aver illustrato finalità e modalità della sperimentazione ed ottenuto il consenso informato scritto da almeno un genitore/tutore di ciascun paziente, i soggetti arruolati sono stati sottoposti ad una valutazione anamnestica e clinica completa da parte di un team multidisciplinare composto da allergologi pediatrici, gastroenterologi pediatrici e dietologi certificati. I dati anamnestici, demografici, antropometrici e clinici (sesso, storia familiare di malattie allergiche, modalità di parto, tipo di allattamento, durata allattamento, età all'insorgenza dei sintomi, età alla diagnosi, ritardo diagnostico, presenza di dermatite atopica (DA) prima dell'insorgenza della AA, AA multipla) sono stati registrati in una cartella clinica dedicata. Alla prima visita (T0) i pazienti arruolati sono stati sottoposti a test di screening allergologici (SPT ed APT) e sono state fornite istruzioni scritte ai genitori, da parte dei dietologi certificati coinvolti nello studio, sulle modalità di esecuzione di esecuzione della dieta di eliminazione per 4 settimane.

Come illustrato in **Figura 1**, quattro settimane dopo la prima valutazione (T1), quando è stata raggiunta la remissione completa e stabile dei sintomi della sospetta AA, è stata eseguito il TPO per ottenere una diagnosi certa di AA non-IgE mediata. Tutti i TPO sono stati eseguiti presso il Centro di Allergia e Gastroenterologia Pediatrica dell'Università di Napoli "Federico II". In tutti i pazienti consecutivamente osservati, con diagnosi certa di APLV di tipo IgE e non-IgE-mediata confermata al TPO, è stato effettuato, un prelievo di sangue

venoso periferico raccolto in provette con eparina (10 ml di sangue intero) per la valutazione della fisiopatologia delle AA.

Quindi, nei pazienti con diagnosi confermata di AA Non-IgE mediata, è stato previsto un follow-up semestrale per una durata di 24 mesi.

Ad ogni visita è stata eseguita una valutazione anamnestica completa, compresa la valutazione di MA, definita come insorgenza di almeno un'altra manifestazione atopica, disturbi della motilità gastrointestinale e di malattie autoimmuni; inoltre tutti i bambini sono stati sottoposti a valutazione clinica ed è stata valutata la crescita staturo-ponderale ed. Infine, sono stati eseguiti SPT, APT e TPO per valutare l'acquisizione della tolleranza immunologica in tutti i soggetti, ad eccezione dei pazienti con FPIES, sottoposti a TPO dopo 12 e 24 mesi dalla diagnosi.¹⁴

Le AA non-IgE mediate, in particolare FPIAP, FPE e FPIMD sono state diagnosticate in base alla storia clinica, alla risposta ai test di screening allergologico, alla scomparsa dei sintomi durante il periodo della dieta di eliminazione e alla ricomparsa dei sintomi durante il TPO o nelle 2 settimane successive,⁵³ mentre la diagnosi di FPIES è stata effettuata sulla base dei criteri diagnostici internazionali.¹⁴

L'insorgenza di MA è stata valutata ad ogni visita e la diagnosi di DA, AA IgE mediata, rinocongiuntivite ed asma allergica, è stata eseguita da un allergologo pediatrico esperto, sulla base delle linee guida internazionali.⁸¹⁻⁸⁴ Inoltre, è stata studiata anche l'insorgenza di altri disturbi immunomediati (celiachia, tiroidite, diabete, malattie infiammatorie intestinali, artrite idiopatica giovanile) e non immunomediati (disturbi gastrointestinali funzionali); la diagnosi di tali disturbi è stata eseguita sulla base delle linee guida internazionali.⁸⁵⁻⁸⁹

3.3 Test di screening allergologico

3.3.1 Skin Prick Test

Gli SPT sono stati eseguiti utilizzando allergeni estratti di proteine del latte vaccino (α -lattoalbumina, β -lattoglobulina e caseina); di uova di gallina (albume e tuorlo), soia, semolino, riso, pesce, carne di maiale, vitello, pollo, coniglio, crostacei (gambero), legumi (piselli, ceci, fagioli, lenticchie), frutta a guscio (arachide, mandorla, nocciola, noce e pistacchio) in ciascun paziente sulla base della storia clinica (Lofarma S.p.A, Milano, Italia).

Gli aeroallergeni (cipresso, betulla, artemisia, ulivo, parietaria officinalis, ambrosia, acari della polvere, epitelio di cane e gatto, alternaria) sono stati testati in caso di insorgenza di sintomi respiratori.

Gli SPT sono stati eseguiti con una lancetta a punta singola da 1 mm (ALK-Abello, Copenhagen, Danimarca), l'allergene è stato applicato sulla superficie volare dell'avambraccio del paziente e sono stati utilizzati come controllo positivo e negativo, istamina dicloridrato e una soluzione salina isotonica rispettivamente. Le reazioni sono state registrate sulla base della media tra i due diametri maggiori (in millimetri) del pomfo dopo 15 minuti. La risposta degli SPT è stata considerata "positiva" se il pomfo ≥ 3 mm in assenza di reazione al controllo negativo.

3.3.2 Atopy Patch Test

Gli APT sono stati applicati sulla cute sana della schiena del bambino. è stata applicata una goccia (50 μ l) di alimento fresco (latte vaccino, albume e tuorlo, soia, semolino, riso, pesce, carne di maiale, vitello, pollo, coniglio, crostacei (gambero), legumi (piselli, ceci, fagioli, lenticchie), frutta a guscio (arachide, mandorla, nocciola, noce e pistacchio)) su un disco di cellulosa assorbente l'allergene, contenuto in un pozzetto di alluminio (FinnChambers, Epitest Ltd Oy, Tuusula, Finland) di 12 mm integrato in un cerotto

ipoallergenico (Scanpor tape, Epitest Ltd Oy, Tuusula, Finland). I siti di applicazione sono stati valutati dopo 20 minuti per valutare la comparsa di reazioni immediate.

Il tempo di occlusione degli APT sulla schiena del paziente è stato di 48 ore. I risultati sono stati letti per la prima volta 15 minuti dopo la rimozione del cerotto. Se è stato riscontrato un eritema da irritazione nell'area di applicazione del patch test, i risultati sono stati letti dopo 30 minuti.

La seconda valutazione è stata effettuata 72 ore dopo aver applicato gli APT. Le reazioni sono state classificate secondo gli standard e considerate come:

- 0, negativo – nessuna reazione, visibile o palpabile;
- +, arrossamento – reazione negativa o dubbia;
- ++, arrossamento e infiltrazione palpabile con papule – reazione positiva;
- +++, arrossamento, infiltrazione palpabile con molte papule ed eczema – forte reazione positiva.
- +++++, se la reazione è stata molto intensa come: arrossamento, edema, infiltrazione palpabile e vescicole.

Le reazioni 0 e + (arrossamento senza infiltrazione) sono state considerate negative, in quanto il verificarsi di arrossamento isolato può essere il risultato di irritazione locale.

3.3.3 Test di provocazione orale

I TPO si sono svolti presso il nostro Centro di Terzo Livello di Allergologia Pediatrica e Gastroenterologia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" e la preparazione del test è stata eseguita da dietisti esperti in AA sulla base dei protocolli internazionali.⁹⁰ Il TPO è stato eseguito in tutti i pazienti ad eccezione dei soggetti con criteri clinici di FPIES acuta dopo

l'ingestione di un singolo alimento, sulla base delle attuali linee guida per la FPIES.¹⁴

Il TPO è stato interrotto e considerato diagnostico per AA in caso di segni oggettivi di una reazione allergica o di sintomi soggettivi comparsi dopo almeno 3 dosi dell'alimento testato,⁹⁰ o per la presenza del criterio principale insieme ad almeno criteri minori, in soggetti con sospetta FPIES.^{7,90} I soggetti sono stati osservati per 6 ore dopo l'ultima dose dell'alimento o dopo la risoluzione dei sintomi, in caso di risultato positivo del TPO.

I risultati sono stati valutati simultaneamente dal team multidisciplinare operante presso il Centro. Se il paziente non mostrava alcun sintomo durante il TPO effettuato in ambiente ospedaliero, ai genitori venivano fornite indicazioni scritte sulla somministrazione domiciliare della dose massima utilizzata in ospedale, ogni giorno per 14 giorni. In caso di comparsa di sintomi durante questo periodo di reintroduzione a domicilio, i genitori sono stati istruiti a recarsi nuovamente presso il Centro lo stesso giorno per escludere risultati falsi negativi. Dopo 14 giorni di somministrazione dell'alimento a domicilio, i pazienti sono stati riesaminati e i genitori sono stati intervistati presso il Centro. Il risultato del TPO è stato considerato negativo se il paziente tollerava l'intero test, incluso il periodo di reintroduzione a domicilio di 14 giorni.

I bambini con un risultato negativo al TPO sono stati rivalutati ogni 6 mesi per verificare la persistenza dell'acquisizione della tolleranza, l'insorgenza di MA e l'insorgenza di altre malattie immunomediate e non immunomediate. Un soggetto con AA multipla era considerato tollerante se superava il TPO per tutti gli alimenti a cui era risultato sensibilizzato.

3.4 Procedure di laboratorio

3.4.1 Modalità di estrazione delle cellule mononucleate di sangue periferico (PBMCs)

Per ogni soggetto con APLV, sono stati raccolti 10 ml di sangue periferico intero in provette con eparina e trasferite in laboratorio a temperatura

ambiente entro 2 ore dal prelievo. Le PBMCs sono state estratte mediante centrifugazione in gradiente di densità Ficoll (Ficoll Histopaque-1077, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Le cellule sono state stratificate su Ficoll e centrifugate per 30 minuti a 1800 rpm a temperatura ambiente. Dopo la centrifugazione, le PBMCs sono state lavate con 10 ml di tampone fosfato salino (PBS) e centrifugate per 10 minuti a 1200 rpm. Dopo la centrifugazione, le PBMCs sono state raccolte con FBS 10%+ DMSO 1% e conservate a -80°C fino all'analisi.

3.4.2 Protocollo di stimolazione

Le PBMCs sono state piastrate (2×10^5 cellule/pozzetto) e stimulate con 250 µg/ml di proteine totali del latte vaccino e con siero albumina bovina (BSA) per 2 giorni per la valutazione delle cellule Th1, Th2 e Th17 e per 7 giorni per la valutazione delle cellule T regolatorie al citofluorimetro. Il surnatante raccolto e conservato a -80°C per l'analisi ELISA delle citochine coinvolte nella risposta allergica.

3.4.3 Analisi della popolazione linfocitaria tramite citofluorimetria

Dopo la stimolazione, le Treg sono state identificate come cellule positive a CD4(+)CD25(+)Foxp3(+)CD127(-), utilizzando specifici anticorpi, e i linfociti Th1, Th2 e Th17 utilizzando il kit di fenotipizzazione Th1/Th2/Th17 (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA) mediante l'analisi citofluorimetrica. La colorazione è stata eseguita utilizzando il kit umano di rilevamento Treg (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germania) e i risultati analizzati dal citometro a flusso BD CANTO II e dal software DIVA (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Un totale di 100.000 eventi sono stati acquisiti per l'analisi dopo il gating dei linfociti in base al dot plot FSC/SSC.

3.4.4 Analisi delle citochine della risposta Th2, Th1, IL-10 e proinfiammatorie mediante ELISA

Le concentrazioni delle citochine della risposta delle Th2 (IL-5, IL-9, IL-13), Th1 (IFN- γ), la citochina tolerogenica IL-10 e quelle pro-infiammatorie (IL-6, TNF- α) sono state eseguite utilizzando kit commerciali specifici secondo le istruzioni del produttore (tutte Elabscience, Houston, Texas, USA).

3.5 Gestione e analisi dei dati

Tutti i dati sono stati registrati nella cartella clinica dedicata dal team multidisciplinare. Quindi, utilizzando un unico metodo di inserimento dei dati, tutti i dati sono stati inseriti in forma anonima nella banca dati dello studio. Quindi, un team statistico ha esaminato il database dello studio, ha eseguito la pulizia e la verifica dei dati secondo le procedure standard.

3.6 Analisi statistica

La maggior parte delle variabili continue non erano distribuite secondo una curva gaussiana e tutte sono state riportate come mediana (50° percentile) e intervallo interquartile (IQR, 25° e 75° percentile). Le variabili discrete sono state riportate come numero e proporzione di soggetti per la caratteristica di interesse.

I confronti per le variabili continue tra soggetti con AA non-IgE mediata sono stati eseguiti utilizzando il Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test; quelli per le variabili categoriche utilizzando il test del χ^2 di Pearson.

3.6.1 Storia naturale

È stata utilizzata l'analisi univariata di regressione logistica per identificare i potenziali predittori di AA multipla al T0, di acquisizione della tolleranza immunologica totale e alle PLV a 24 mesi e di comparsa di MA a 24 mesi.

Il rate di acquisizione della tolleranza immunologica totale, alle PLV e il rate di comparsa di MA sono stati calcolati come probabilità marginali da un modello logistico univariato, utilizzando il verificarsi dell'outcome (0=no, 1=sì) come risposta. Un modello simile è stato utilizzato per calcolare il rate corrispondente all'interno delle singole forme di AA non-IgE mediata (0=FPE, 1=FPIES, 2=FPIAP, 3=FPMID).

Le variazioni nei 24 mesi del rate di tolleranza immunologica totale, tolleranza alle PLV e comparsa di MA, sono state calcolate come stime marginali da un modello di regressione logistica includendo gli outcome di interesse come risposta (0=no; 1=sì) e tempo (0= 6 mesi, 1=12 mesi, 2= 18 mesi, 3=24 mesi) e l'AA multipla al baseline (0=no; 1=sì) X interazione tempo (discretoXdiscreto) come predittori e intervalli di confidenza del cluster, per tenere conto delle misure ripetute.⁹¹

Le differenze di incidenza del rate di tolleranza e comparsa di MA tra i gruppi (AA multipla vs singola) sono state ottenute dallo stesso modello logistico di regressione usando contrasti, con la correzione di Bonferroni per 4 confronti (6, 12, 18 e 24 mesi).

3.6.2 Accuratezza diagnostica

Le stime e 95%CI della of true positive fraction (TPF), true negative fraction (TNF), positive diagnostic likelihood ratio (DLR+) e negative diagnostic likelihood ratio (DLR-) sono stati calcolati come probabilità stimate da un modello di regressione logistica che impiega intervalli di confidenza a grappolo tenendo conto delle misure ripetute all'interno del soggetto.

DLR+ e DLR- sono stati calcolati da tale modello utilizzando contrasti non lineari dei rapporti (TPF/ false positive fraction) e (FNF/true negative fraction) con il metodo delta. (I valori predittivi positivi e negativi non sono stati calcolati in quanto il presente disegno di studio non può essere considerato in grado di fornire una stima affidabile della vera "prevalenza" di AA non-IgE. I dati DLR+ e DLR- potrebbero comunque essere trasferiti ad altri contesti applicando il teorema di Bayes, cioè considerando le probabilità pre-test di AA non-IgE mediata).⁹²

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando Stata 17.0 (Stata Corporation, College Station, TX, USA).

3.7 Comitato etico

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", registrato presso www.clinicaltrials.gov (registrazione n. NCT04462978), e condotto in conformità alla Dichiarazione di Helsinki (revisione Fortaleza, 2013), agli Standard di Buona Pratica Clinica (CPMP/ICH/135/95), al D.Lgs. 211/2003 in materia di dati personali e alla normativa europea in materia.

4. RISULTATI

4.1 Popolazione dello studio

Da gennaio 2017 a gennaio 2021 sono stati valutati un totale di 195 soggetti per sospetta AA non-IgE mediata.

Venti soggetti sono stati esclusi per la presenza di almeno un criterio di esclusione:

- 16 hanno presentato sintomi gastrointestinali per <3 settimane;
- 2 hanno presentato disturbi neuropsichiatrici;
- 1 aveva una precedente diagnosi di celiachia;
- 1 era affetto da fibrosi cistica.

In 52 soggetti sono state ottenute altre diagnosi:

- 24 disturbi gastrointestinali funzionali;
- 9 infezioni gastrointestinali;
- 8 celiachia;
- 5 AA IgE-mediate;
- 2 malformazioni del tratto gastrointestinale;
- 2 intolleranze alimentari;
- 1 disturbi gastrointestinali eosinofili;
- 1 IBD ad esordio precoce.

In un totale di 123 pazienti è stata ottenuta una diagnosi certa di AA non-IgE mediata al termine dell'iter diagnostico.

4.2 Risultati degli obiettivi primari

4.2.1 Caratteristiche cliniche

Le principali caratteristiche anamnestiche, demografiche e cliniche della popolazione di studio sono riassunte nella **Tabella 1**. La maggior parte dei pazienti arruolati è risultata di sesso maschile (56.1%), nato da parto cesareo (61%) e con rischio allergico familiare (64.2%).

All'arruolamento, 52 pazienti (42%) presentavano AA multipla, di cui 24 (50%) erano affetti da FPE, 12 (57%) da FPIES, 3 (15%) da FPIAP (15%) e 13 (38%) da FPMID.

Confrontando i pazienti con AA singola vs multipla, in quest'ultimo gruppo vi era un numero significativamente più alto di maschi ($p<0.05$) e l'età alla diagnosi era significativamente più elevata ($p<0.05$), riflettendo il ritardo diagnostico più lungo nel gruppo delle AA multiple rispetto a quelle singole ($p<0.05$).

Applicando l'analisi di regressione logistica univariata, l'odds ratio (OR) tra AA multipla vs singola era 1.09 (IC 95% da 1.10 a 1.18) per ogni 30 giorni di ritardo diagnostico; 2.24 (IC 95% da 1.07 a 4.71) per maschio vs femmina (**Tabella 2**). A causa dell'ampio IC al 95% e della dimensione relativamente bassa del campione, non è stato ritenuto opportuno eseguire il modello multivariato di tali predittori.

L'antigene alimentare più comune è stato il latte vaccino, presente in 99 pazienti (80.5%). Invece il 23.6% dei soggetti presentava allergia all'uovo; il 14.6% allergia alla soia, il 13.8% al frumento; il 9.8% allergia al riso; il 9.8% allergia alla carne; il 9% dei pazienti ha mostrato allergia ai legumi; il 7% allergia al pesce e il 9% ha presentato AA per altri alimenti. La somma supera il 100% per la presenza delle AA multiple.

Tra i 99 bambini con APLV, il 40.4% era affetto da FPE; il 12.1% da FPE; il 19.2% da FPIAP e il 28.2% da FPIMD.

Dei 99 pazienti con APLV, all'arruolamento, 9 pazienti erano allattati al seno, mentre 90 erano allattati con formula artificiale alla nostra prima osservazione.

Tra i pazienti alimentati con formula:

- 40 (44.4%) sono stati alimentati con una formula a base di caseina estensivamente idrolizzata supplementata con il probiotico *Lactobacillus rhamnosus* GG (EHCF-LGG);
- 9 (10%) assumevano una formula di sieroproteine del latte ampiamente idrolizzate (EHWF);
- 14 (15.6%) assumevano una formula a base di caseina estensivamente idrolizzata (EHCF);
- 10 (11.1%) utilizzavano una formula a base di aminoacidi (AAF);
- 10 (11.1%) assumevano una formula a base di riso (RF);
- 7 (7.8%) assumevano con una formula a base di soia (SF).

4.2.2 Storia naturale

4.2.2.1 Acquisizione della tolleranza immunologica totale

Complessivamente 67 pazienti [0.55 (IC del 95% tra 0.46 e 0.63)] hanno raggiunto la tolleranza immunologica totale, ovvero a tutti gli alimenti in caso di pazienti affetti da AA multiple, a 24 m di follow-up:

- 26 FPE (54.2%);
- 5 FPIES (23.8%);
- 15 FPIAP (75.0%);
- 21 FPIMD (61.8%).

Durante il periodo di studio, il tasso di tolleranza totale è stato: 0.17 (IC del 95% da 0.10 a 0.24, n= 21 su 123) a 6 mesi; 0.28 (IC del 95% da 0.20 a 0.36, n= 35 di 123) a 12 mesi; 0.40 (IC del 95% da 0.31 a 0.49, n= 49 di 123) a 18 mesi.

Separando i pazienti in due popolazioni, AA singola vs multipla, i primi avevano maggiori possibilità di acquisire tolleranza immunitaria a 24 mesi 69% vs 34.6% e durante tutto il follow-up. Nel dettaglio, la differenza assoluta è stata: -0.13 (IC del 95% da -0.29 a 0.03, p = 0.181) a 6 mesi; -0.26 (IC del 95% da -0.45 a -0.07, p = 0.002) a 12 mesi; -0.32 (IC del 95% da -0.53 a -0.12, p = 0.0003) a 18 mesi; -0.34 (IC del 95% da -0.56 a -0.13, p = 0.0003) a 24 mesi (**Figura 2**).

Per valutare il ruolo delle AA multiple e di altri potenziali predittori sul rate di acquisizione della tolleranza immunologica a 24 mesi, è stata eseguita un'analisi univariata. La AA multipla, rispetto a quella singola, è stata associata a un OR di 0.24 (IC del 95% da 0.11 a 0.51) di acquisizione complessiva della tolleranza immunologica a 24 mesi. È interessante notare che anche una storia familiare di allergia era inversamente associata al risultato, con un OR di 0.41 (IC del 95% da 0.19 a 0.89). Infine, l'OR dell'acquisizione complessiva della tolleranza immunitaria a 24 mesi è stato di 0.26 (IC del 95% da 0.08 a 0.84) per FPIES vs FPE (**Tabella 3**).

Nei bambini allattati artificialmente, il tasso di tolleranza immunologica totale a 24 mesi di follow-up è stato di 0.75 (95%CI 0.62-0.88) per i soggetti che avevano ricevuto EHCF+LGG rispetto a 0,46 (95%CI 0.32-0.60) per i pazienti trattati con altre formule (p=0.003) (stima marginale dalla regressione logistica).

4.2.2.2 Acquisizione della tolleranza alle proteine del latte vaccino

Un totale di 62 pazienti [0.63 (IC del 95% da 0.53 a 0.72)] ha raggiunto la tolleranza immunologica alle PLV a 24 m di follow-up. Di questi 25 erano

affetti da FPE (62.5%); 2 da FPIES (16.7%); 15 da FPIAP (79%) e 20 FPIMD (71.4%). Il tasso di tolleranza alle PLV durante il follow-up di 24 m è stato: 0.19 (IC del 95% da 0.11 a 0.27, n = 19 di 99) a 6 mesi; 0.31 (IC del 95% da 0.22 a 0.40, n = 31 di 99) a 12 mesi; 0.46 (IC del 95% da 0.37 a 0.56, n = 46 di 99) a 18. Il tasso di acquisizione della tolleranza a 24 mesi è stato inferiore nei bambini con AA multipla rispetto a quelli con singola AA. Nel dettaglio, la differenza assoluta era: -0.15 (IC del 95% da -0.34 a 0.03, p = 0.151) a 6 mesi; -0.19 (IC del 95% da -0.41 a -0.04, p = 0.140) a 12 mesi; -0.23 (IC del 95% da -0.48 a -0.01, p = 0.071) a 18 mesi; -0.30 (IC del 95% da -0.54 a -0.05, p = 0.009) a 24 mesi (**Figura 3**).

Non sorprende che tale risultato sia stato confermato dall'analisi univariata sui potenziali predittori di acquisizione della tolleranza alle PLV a 24 mesi. La presenza di AA multipla si è associata ad una probabilità inferiore di acquisire la tolleranza alle PLV a 24 m con un OR di 0.28 (IC del 95% da 0.12 a -0.66). Infine, l'OR dell'acquisizione della tolleranza alle PLV a 24 mesi è stato di 0.12 (del 95% da 0.02 a 0.62) per FPIES rispetto a FPE (**Tabella 4**).

Nei pazienti allattati artificialmente, il tasso di tolleranza alle PLV a 24 mesi, è stato di 0.83 (95%CI 0.71-0.94) per i soggetti che avevano ricevuto EHCF-LGG vs 0.48 (95%CI 0.34-0.62) per quelli trattati con altre formule ipoallergeniche (p=0.0002) (stime marginali dalla regressione logistica).

4.2.2.3 Sviluppo di marcia allergica

Alla fine del follow-up di 24 mesi un totale di 57 pazienti (46.3%) ha presentato MA, definita dallo sviluppo di almeno un'altra manifestazione atopica, e 7 pazienti hanno sviluppato ≥ 2 manifestazioni allergiche, senza differenze statisticamente significative tra le quattro malattie (**Figura 4**). Un costante incremento dell'insorgenza di MA è stato osservato a partire dal primo follow-up di 6 mesi. Nel dettaglio, il tasso di MA era 0.19 (IC del 95% da 0.12

a 0.26, n = 23 di 123) a 6 mesi, 0.30 (IC del 95% da 0.22 a 0.38, n = 37 di 123) a 12 mesi, 0.35 (IC del 95% da 0.26 a 0.43, n = 43 di 123) a 18 mesi e 0.46 (IC del 95% da 0.37 a 0.55, n = 57 di 123) a 24 mesi. Il tasso di MA è risultato inferiore nei bambini con AA singola rispetto a quelli con AA multipla, ma gli IC del 95% della differenza erano ampi e includevano il valore 0 nella maggior parte dei casi.

Applicando l'analisi univariata per valutare il ruolo di potenziali predittori sullo sviluppo di MA la AA multipla rispetto a quella singola è stata associata ad un OR di 2.22 (IC del 95% da 1.07 a 4.61) di sviluppo MA a 24 m (**Tabella 5**).

La manifestazione atopica più frequente è stata la DA insorta dopo la diagnosi di AA, presente nel 22% dei casi. La distribuzione delle varie forme di MA a 24 mesi è riportata in **Tabella 6**.

Nei bambini allattati in formula, il tasso di marcia allergica a 24 mesi era di 0.53 (95%CI 0.37-0.68) per i soggetti che avevano ricevuto EHCF-LGG rispetto a 0.36 (95%CI 0.23-0.49) per i pazienti trattati con altre formule (p=0.113).

4.2.2.4 Sviluppo di malattie immunomediate e non immunomediate

Durante il follow-up di 24 mesi, 2 bambini hanno sviluppato malattie autoimmuni, nello specifico:

- 1 artrite idiopatica giovanile;
- 1 tiroidite autoimmune.

Entrambe le malattie si sono sviluppate prima dell'acquisizione della tolleranza immunologica.

Inoltre, 6 bambini hanno sviluppato disturbi funzionali gastrointestinali, tra cui:

- 4 dolori addominali funzionali;
- 1 sindrome dell'intestino irritabile;
- 1 stipsi funzionale.

Questi disturbi si sono sviluppati tutti dopo la risoluzione della AA.

4.2.3 Caratteristiche dei test di screening allergologici e dei test di provocazione orale

Alla diagnosi sono stati eseguiti 275 TPO in 195 bambini con sospetta AA non-IgE-mediata: 217 di essi sono risultati positivi confermando la diagnosi in 123 pazienti (52 con AA multipla). Il tempo mediano (minimo; massimo) di reazione dopo l'ultima dose del TPO è stato di 24 (1; 80) ore. Le tempistiche di reazione variavano nelle 4 malattie: 30 (10; 48) per la FPE; 2 (1; 3) per la FPIES; 52 (36; 72) per la FPIAP; e 38 (5; 80) per la FPIMD ($p < 0.05$).

Alla diagnosi, in 195 bambini sono stati eseguiti 275 APT e SPT. Tra i 123 bambini con AA non-IgE mediata confermata dal TPO, 110 (89.4%) avevano un APT positivo, 5 (4.5%) avevano sia APT che SPT positivi e nessuno aveva un SPT positivo isolato.

Durante il follow-up sono stati eseguiti in totale 615 TPO per valutare l'eventuale acquisizione di tolleranza immunologica, nei 123 pazienti arruolati nello studio. Un totale di 116 OFC è risultato negativo in 67 bambini (18 con AA multipla), mentre 499 sono risultati positivi in 56 bambini (34 con AA multipla).

Durante il follow-up sono stati eseguiti anche 615 APT per monitorare l'acquisizione della tolleranza immunologica: 487 APT sono risultati positivi durante il follow-up. L'accuratezza diagnostica dell'APT nel predire il risultato del TPO alla diagnosi e durante il follow-up è riportata in **Tabella 7**.

4.3 Risultati degli obiettivi secondari

4.3.1 Meccanismi fisiopatologici

4.3.1.1 Analisi della popolazione linfocitaria

In condizioni basali, la percentuale di linfociti T-reg CD4+/CD25+/FoxP3+ era simile nei pazienti con AA IgE-, non-IgE mediata e nei controlli sani. Dopo la stimolazione con 250 µg/ml di PLV, è stata osservata una significativa riduzione del numero di linfociti T-reg CD4+/CD25+/Foxp3+ nei PBMCs di pazienti con AA non-IgE mediata e IgE mediata. Nessuna modulazione è stata invece osservata nei controlli sani (**Figura 5**).

In condizioni basali, la percentuale di linfociti Th1, Th2, Th17 era simile nei pazienti con AA IgE-, non-IgE mediata e nei controlli sani. Dopo la stimolazione con 250 µg/ml di PLV, è stato osservato un aumento simile della percentuale di linfociti Th2 e Th17 sia nei bambini con AA IgE- che non-IgE mediata, mentre la percentuale di linfociti Th1 (positivi per INFγ) aumentava in maniera significativa solo nelle PBMCs dei bambini con AA non-IgE mediata (**Figura 6**).

4.3.1.2 Analisi delle citochine

Dopo stimolazione con BSA e con il solo mezzo di coltura, le concentrazioni di IL-5, IL-13, IL-6, IL-9, IL-10, e TNF-α sono risultate simili nei 3 gruppi (controlli sani, pazienti con AA IgE mediate e pazienti con AA Non-IgE mediate). Dopo la stimolazione con PLV, si è osservato un aumento simile della produzione di IL-5, IL-13, IL-6, TNF-α nelle PBMCs tra i bambini con AA IgE- e non-IgE mediata (senza differenze tra i diversi fenotipi clinici). Non è stata osservata alcuna modulazione nella produzione di IL-9 e IL-10. Nel surnatante dei PBMCs di controlli sani non vi è stata una variazione di concentrazione di citochine dopo la stimolazione con PLV, rispetto ai livelli basali (**Figura 7**).

5. DISCUSSIONE

Lo studio NIGEFA è il primo studio prospettico con 24 mesi di follow-up che valuta le caratteristiche cliniche, la storia naturale e la fisiopatologia di pazienti pediatrici con diverse forme di AA non-IgE mediata. Le evidenze disponibili in letteratura derivano principalmente da studi retrospettivi, focalizzati su una singola forma di AA non-IgE mediata, in particolare solo su pazienti con FPIAP o FPIES indotta da PLV o con fenotipi non-IgE-GIFA non definiti.^{55,93-95} Sono stati condotti pochi studi prospettici, per lo più incentrati su una singola forma di AA non-IgE mediata, o che indagavano solo le caratteristiche cliniche, o la storia naturale, o i meccanismi fisiopatologici o l'accuratezza diagnostica dei test di screening allergologici.^{10,25,27,96,97}

Nella nostra popolazione, la maggior parte dei pazienti era di sesso maschile (56%), nata da parto cesareo (61%), aveva familiarità per allergia (64%), era allattata in formula (92.7%) ed aveva una AA singola (58%) in accordo con gli studi precedenti.^{10,55,59,93,98,99}

L'età mediana era di 90 giorni alla comparsa dei sintomi e di 150 giorni alla diagnosi, con un ritardo diagnostico mediano di 30 giorni. I dati relativi al ritardo diagnostico nella AA non-IgE mediate sono scarsi e discordanti, variando da 2,2 a 6 mesi, a seconda degli antigeni alimentari o dei fenotipi non-IgE-GIFA.^{59,100,101} La tipologia di sintomi (esclusivamente GI) e la caratteristica temporale d'insorgenza (subacuta o cronica) nelle AA non-IgE mediate, sono i fattori principalmente responsabili di mancata o ritardata diagnosi.³⁵ I dati relativi al ritardo diagnostico e alla prognosi delle AA non-IgE mediate non sono stati valutati in questi studi. Nello studio NIGEFA abbiamo riscontrato che per ogni 30 giorni di ritardo diagnostico vi era un OR di 1.09 per lo sviluppo di AA multiple. Oltre al ritardo diagnostico, anche il sesso maschile è risultato un fattore di rischio per l'insorgenza di AA multipla. Questi dati suggeriscono l'importanza di una diagnosi precoce per limitare l'insorgenza di AA multipla.

Le diverse forme di AA non-IgE-mediate erano così distribuite nella nostra coorte: FPE (39%), FPMID (28%), FPIES (17%) e FPIAP (16%). La mancanza di studi prospettici che valutino contemporaneamente il tasso di diversi fenotipi non-IgE-GIFA rende difficile il confronto con i nostri risultati.^{55,93,95} In uno studio retrospettivo che ha analizzato i sintomi gastrointestinali in una popolazione di soggetti con diagnosi certa di AA, il dolore addominale e la diarrea erano presenti in oltre l'80% dei soggetti e la perdita di peso in oltre il 50% dei pazienti, sintomatologia caratteristica della FPE.⁵⁵ Inoltre Meyer et al. riportavano una prevalenza maggiore di FPE tra i bambini allattati artificialmente e Nowak et al. segnalavano una crescente incidenza di FPE attribuita all'alimentazione con formula, come nella nostra popolazione di studio.^{55,102} L'elevato tasso di bambini allattati con formula nella nostra coorte potrebbe anche essere responsabile del basso tasso di FPIAP, che è considerato uno dei fenotipi di AA non-IgE mediata più comuni nei bambini allattati al seno.⁵³

Il termine FPIMD è un ombrello utilizzato per definire i disturbi della motilità gastrointestinale indotti dalle proteine della dieta; mancano dati certi sulla prevalenza, ma sono considerati una forma emergente di AA Non-IgE mediata.⁵³ A tal proposito, in una popolazione con stipsi cronica, l'AA alle PLV è stata identificata come la causa principale nel 77% dei soggetti, mentre in un gruppo di lattanti affetti da MRGE, il 40% era secondario ad APLV.^{103,104}

La storia naturale delle AA non-IgE mediate presenta ancora molti lati oscuri, principalmente per la presenza in letteratura di dati retrospettivi, nonché la mancata esecuzione di un TPO per confermare la diagnosi o per monitorare l'acquisizione della tolleranza immunologica ogni 6 mesi.^{13,35,55} Nel nostro studio prospettico, la tolleranza immunologica è stata attentamente monitorata in tutti i pazienti, tramite l'esecuzione di un TPO a ogni 6 mesi (ad eccezione dei pazienti con diagnosi di FPIES, in cui il TPO è stato eseguito ogni 12 mesi, come da linee guida).¹⁴

La tolleranza immunologica totale, ovvero a tutti gli alimenti nei pazienti con AA multipla complessiva, è stata raggiunta nel 54% dei pazienti a 24 m di follow-up, con un tasso più elevato nei pazienti con diagnosi di FPIAP (75%), in accordo con i dati presenti in letteratura.⁹ Questo è un aspetto molto importante per definire il reale tasso di tolleranza immunologica; infatti, i dati presenti in letteratura sono principalmente retrospettivi e relativi ai pazienti con FPIES.^{11,12} Confrontando i pazienti con AA singola e multipla, abbiamo osservato un tasso più basso di acquisizione della tolleranza immunologica a 24 m di follow-up in quest'ultimo gruppo (69% vs 35%, $p < 0.05$) come illustrato in **Figura 2**.

L'analisi logistica univariata ha confermato questi dati, mostrando che la presenza di AA multipla e la presenza di rischio allergico familiare influenzavano negativamente la possibilità di acquisizione della tolleranza immunologica, come precedentemente osservato in una popolazione selezionata di pazienti con diagnosi di FPIAP.^{93,105} Non vi sono dati in letteratura riguardanti pazienti con FPIMD, FPIES o FPE.

Nei pazienti affetti da APLV IgE-mediata, alcuni studi hanno suggerito un potenziale effetto della scelta della formula sul tempo di acquisizione della tolleranza immunitaria.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Analizzando i pazienti APLV non-IgE mediata, alimentati artificialmente nella nostra coorte di studio, è stato osservato un tasso significativamente più alto di acquisizione della tolleranza immunologica nel gruppo EHCF+LGG rispetto alle altre formule a 24 mesi di follow-up. Il tasso più elevato è stato osservato sia per il tasso di tolleranza immunologica totale che per quella al latte vaccino.

Il latte vaccino è risultato il principale allergene alimentare implicato nella nostra coorte, coerentemente a come già descritto in letteratura e anche il tasso di soggetti che acquisiscono tolleranza immunologica al latte vaccino è stato maggiore rispetto al tasso di acquisizione della tolleranza immunologica agli altri alimenti (54% vs 63%). Questo concetto è stato a lungo descritto in

letteratura per i pazienti con FPIES, in cui si descrive un'acquisizione precoce della tolleranza immunologica per alimenti liquidi (ad esempio il latte) rispetto ad alimenti solidi, ma non per le altre forme di AA Non-IgE mediata.^{11,109}

Durante i 24 m di follow-up, il 47% dei pazienti ha sviluppato almeno una manifestazione atopica. Un tasso simile è stato riportato in pazienti con APLV IgE mediata e in AA Non-IgE-mediate.^{59,110,111} L'alto tasso di comorbilità atopica tra i pazienti con AA non-IgE mediata è stato messo in evidenza nel 2018 da Meyer et al., che proponeva un nuovo modello di MA in pazienti con AA non-IgE mediata.⁵⁹ Evidenze cliniche hanno mostrato che fino al 52% dei pazienti con AA non-IgE mediata, presentano DA concomitante alla diagnosi. Nella nostra popolazione abbiamo rilevato che oltre il 35% dei soggetti presentava DA al momento della diagnosi di AA non-IgE-mediate, senza differenze significative tra le 4 differenti forme di AA Non-IgE mediata.^{55,59} Inoltre l'incidenza cumulativa di DA nella nostra popolazione (57%), è risultata maggiore se comparata a quella presentata da bambini europei di età <5 anni (10-15%).¹⁰

La rinite allergica è stata osservata nel 19% dei pazienti. Questo tasso di prevalenza risulta inferiore rispetto ai dati della letteratura, in cui variava dal 28% al 45%; questi però erano studi retrospettivi, con follow-up più lungo ed età media maggiore della popolazione.^{55,112} Inoltre il rate di comparsa di rinite risulta simile a quello osservato in bambini con APLV IgE mediata, nella stessa fascia di età.¹¹¹

Anche il tasso di prevalenza di asma allergico del 6%, nella nostra coorte di pazienti è risultato inferiore rispetto a quanto riportato in letteratura (26.6-32%), probabilmente anche in questo caso legato al più breve follow-up e all'età media inferiore della nostra popolazione, oltre che ai criteri stringenti utilizzati per diagnosticare l'asma allergico nel nostro centro.^{55,112} Ultimo per prevalenza, ma non per rilevanza, è stato il tasso di AA IgE mediata manifestata durante il follow-up, pari al 6% (1 FPIAP, 4FPE, 2 FPIES). Precedenti studi si

focalizzavano principalmente sulla concomitante presenza di IgE alimento specifiche in pazienti con diagnosi di AA non-IgE mediata (es. FPIES atipica) o sulle forme transienti (da AA non-IgE mediata ad AA IgE mediata) o sui diversi fenotipi di FPIAP.^{13,105,113} Ad oggi non ci sono dati riguardanti potenziali predittori dello sviluppo di MA in pazienti con AA non-IgE mediata, e questa è la prima prova che un'AA multipla può facilitare l'insorgenza di MA.

Un alto rischio di sviluppare disturbi gastrointestinali funzionali (attualmente definiti anche come disordini dell'asse intestino cervello) nel corso del tempo in soggetti con AA non-IgE mediata, è stato riportato in letteratura.^{114,115} Uno studio retrospettivo su bambini con APLV diagnosticata entro il I anno di vita, ha mostrato che all'età di 8 anni, questi presentavano disturbi gastrointestinali funzionali nel 19.2% dei pazienti.¹¹⁴ In uno studio prospettico su pazienti con diagnosi di FPIAP, durante il follow-up di 4 anni, il 10% dei soggetti ha sviluppato disturbi gastrointestinali funzionali,¹¹⁵ simile a quanto riscontrato nella nostra popolazione, dove il 5% dei pazienti sviluppava questi disordini durante il follow-up di 2 anni.

La relazione tra AA non-IgE mediate e sviluppo di malattie autoimmuni non è stata ancora studiata; nella nostra coorte 2 pazienti (1.6%) hanno sviluppato queste condizioni (1 artrite idiopatica giovanile, 1 tiroidite autoimmune). Questa prevalenza sembra più elevata nella nostra popolazione, considerando che la tiroidite autoimmune nei primi 3 anni di vita è insolita e che la prevalenza attesa di artrite idiopatica giovanile nei primi 5 anni di vita è dello 0.002%.¹¹⁶ Questi dati potrebbero supportare il ruolo della AA come prima evidenza di una disregolazione del sistema immunitario in età pediatrica.⁵⁹

Come ultimo aspetto per la parte clinica, abbiamo valutato le caratteristiche dei test di screening e dei TPO. Abbiamo riscontrato che tra i 123 bambini con diagnosi confermata con TPO, 110 (89.4%) presentavano APT positivi, 5 (4.5%) mostravano positività sia per APT che per SPT (2 FPIES, 1 FPIAP, 1 FPE, 1 FPIMD), e nessuno presentava una positività isolata degli SPT. La

presenza e il ruolo di SPT positivi o di IgE specifiche nel siero nelle AA non-IgE mediate è ancora controverso.⁸ Recenti evidenze hanno dimostrato che fino al 35% dei pazienti con FPIES può presentare IgE alimento specifiche positive e che i pazienti con FPIAP possono presentare fenotipi diversi in base alla presenza di IgE specifiche.^{8,10,113} Inoltre, la presenza di IgE specifiche nelle AA non-IgE mediate, è stata proposta come fattore prognostico negativo sul timing di acquisizione della tolleranza immunitaria.^{10,51,113} Nella nostra popolazione nessuno dei 5 pazienti con SPT positivi ha raggiunto la tolleranza immunologica durante il periodo di studio di 24 mesi, con l'eccezione di un paziente con FPIAP indotta da PLV che ha raggiunto la tolleranza immunologica a 24 mesi (tardivamente rispetto ai restanti pazienti con FPIAP con AA singola), suggerendo il potenziale effetto prognostico negativo, della positività delle IgE specifiche.

Nella nostra coorte abbiamo riscontrato che l'APT eseguito con alimenti freschi, in soggetti con sospetta AA non-IgE mediata, potrebbe essere un utile strumento diagnostico, con una frazione vera positiva (TPF) per APT vs TPO di 0.94 (da 0.89 a 0.97) e una frazione vera negativa (TNF) di 0.81 (da 0.67 a 0.91). La TPF è risultata più elevata nella nostra popolazione se confrontata con i risultati ottenuti in precedenza in bambini con sintomi gastrointestinali, in cui è stata riportata una sensibilità che variava dal 57.4 all'84.2%.¹¹⁷ Questo potrebbe essere probabilmente correlato al diverso periodo di applicazione del cerotto, così come al diverso supporto utilizzato, al tipo di antigene utilizzato (alimenti freschi vs. estratti) e al tipo di alimenti (es. latte vaccino vs. uova) che variavano tra gli studi e che potrebbero aver influenzato l'accuratezza diagnostica. Infatti, nell'ambito di una recente metanalisi, la TPF è risultata più elevata quando sono stati utilizzati alimenti freschi, con supporto finn-chamber, un tempo di occlusione di 48 ore e un tempo di lettura a 72 ore in soggetti con sintomi gastrointestinali persistenti, come eseguito nel nostro studio.^{96,117}

Il rapporto di verosimiglianza diagnostica positiva dell'APT (DLR+), pari a 5 (95% CI: da 2 a 8), indica che i bambini con AA non-IgE mediata, possono avere una probabilità di avere un APT positivo 5 volte superiore a quella dei controlli. Inoltre, il DLR- di 0.08 (95% CI: da 0.03 a 0.13) indica che la probabilità di essere negativi all'APT nei bambini con AA non-IgE è di 0,08 volte superiore a quella dei controlli, evidenziando l'affidabilità e l'utilità dell'APT nei pazienti con sospetta AA non-IgE mediata. Inoltre, i nostri dati hanno confermato l'utilità dell'APT per il follow-up di questi pazienti, determinando così quando è possibile eseguire un TPO in modo sicuro, come precedentemente dimostrato.⁹⁷

Infine, riguardo le caratteristiche dei TPO, 24 ore è stato il tempo mediano per una reazione dopo l'esposizione all'alimento nei soggetti con sospetta AA non-IgE mediata. Il tempo di comparsa dei sintomi variava tra i diversi fenotipi, da 2 ore per la FPIES a 30 ore per la FPE, 38 ore per la FPIMD e 52 ore per i pazienti con FPIAP, suggerendo un potenziale ruolo dei diversi fenotipi delle AA non-IgE mediate, nell'influenzare la tempistica della reazione al TPO, come precedentemente riportato da altri gruppi di studio.⁸

Uno degli aspetti ancora poco definiti delle AA Non-IgE mediate è la loro fisiopatologia. Infatti i dati presenti in letteratura sono scarsi e prevalentemente relativi a pazienti affetti da FPIES.^{25,27,28,118} Nel nostro studio abbiamo osservato, dopo la stimolazione delle PBMCs con PLV, un aumento della produzione di IL-5, IL-13, IL-6, TNF- α simile tra i bambini con AA IgE mediata e non-IgE mediata (senza differenze tra i diversi fenotipi clinici), a differenza di quanto osservato da Morita et al. Questo gruppo di ricerca, infatti, ha mostrato che le PBMCs di pazienti con AA non-IgE mediata stimulate con PLV, rilasciavano citochine Th2 (IL-5, IL-6 e IL-13), ma in concentrazioni non significative rispetto ai pazienti con AA IgE mediata. La causa di tale discrepanza rispetto ai nostri risultati è da ricercare nei tempi e nelle

concentrazioni delle PLV utilizzati per il protocollo di stimolazione. In particolare, il nostro gruppo ha effettuato una serie di esperimenti time-course e dose-risposta per individuare la dose ed i tempi necessari e sufficienti per indurre il rilascio di citochine. Morita et al. avevano infatti stimolato le PBMCs per 6 giorni con 100 µg/ml di PLV a differenza del nostro protocollo che ha previsto una stimolazione di 7 giorni con 250 µg/ml di PLV.²⁷ Inoltre grazie alle analisi di citofluorimetria, abbiamo osservato come nella fisiopatologia delle AA IgE e non-IgE mediate fossero coinvolti in egual misura i linfociti Th2 (identificati dalla IL-4) e i Th17 (identificati dalla IL-17), ma solo le forme non-IgE mediate mostravano il coinvolgimento e l'attivazione dei Th1 (identificati dal IFN γ). Sempre Morita et al. nel loro studio non riscontrano il coinvolgimento di Th1 e Th17 nelle AA non-IgE mediate, probabilmente sempre a causa dei differenti protocolli di stimolazione utilizzati.²⁷ Nella nostra casistica i livelli delle citochine e le popolazioni cellulari non mostravano differenze tra le 4 patologie. In letteratura in una popolazione di pazienti affetti da FPIES, Caubet et al. non hanno osservato differenza significativa nella produzione delle citochine Th2 (IL-5, IL-6 e IL-13), nella secrezione di IFN γ e TNF- α nelle PBMCs stimolate con caseina rispetto ai pazienti con AA IgE-mediata.²⁵ Mentre nelle AA IgE-mediate sappiamo che sono diverse le PLV in grado di elicitare una reazione avversa (α -lattoalbumina, β -lattoglobulina e caseina), questo non è noto nei pazienti con AA non-IgE mediata. Per tale motivo, nel nostro protocollo di stimolazione, abbiamo deciso di utilizzare le PLV complete senza scindere le singole proteine. L'assenza di risposta da parte delle PBMCs riscontrata nei pazienti con FPIES da Caubet et al. potrebbe essere legata all'utilizzo solo della caseina e non di tutte le PLV e al dosaggio inferiore (50 µg/ml).^{25,27} In una popolazione di pazienti affetti da FPIES indotta da PLV, Adel-Patient et al. non hanno riscontrato un aumento della secrezione delle citochine Th2 e Th17 nelle PBMCs stimolate con PLV; viceversa, nei pazienti con APLV IgE mediata, è stato osservato un aumento della produzione di tali citochine, in particolare IL-3, IL-5, IL-6, TNF- α ed IFN γ .¹¹⁸ Probabilmente, il

motivo per cui tali risultati differiscono da quanto osservato nella nostra casistica è da ricercare nella diversità del protocollo di stimolazione e nell'utilizzo di una concentrazione più bassa di PLV (concentrazione di PLV compresa tra 10 e 50 µg/ml vs 250 µg/ml nei nostri esperimenti).¹¹⁸

Sulla base dei risultati ottenuti è possibile ipotizzare che in realtà le forme IgE- e non-IgE mediate siano sottese da uno stesso meccanismo fisiopatologico (rilascio di citochine Th2 e Th17) ma la presenza di citochine Th1-mediate (IFN γ) differenzi le forme IgE- dalle non-IgE mediate. La prima motivazione che potrebbe giustificare questo meccanismo è legata all'età dei pazienti. Infatti è noto che i livelli di IFN γ seguono un "age-related pattern", ovvero sono più elevati nella prima infanzia rispetto al bambino più grande e questo potrebbe giustificare l'età media di insorgenza di AA non-IgE mediate più bassa rispetto a quella che riscontriamo per le AA IgE-mediate.^{2,119}

Inoltre evidenze scientifiche mostrano che l'IFN γ bloccherebbe la produzione di IgE specifiche.¹¹⁹⁻¹²¹ Quindi, è possibile ipotizzare che nei bambini nel primo anno di vita con rischio atopico, la perdita della tolleranza immunologica e quindi il riconoscimento degli antigeni, segua la via classica delle AA IgE mediate, ma l'elevata presenza di IFN γ , bloccando la produzione di IgE sia responsabile della mancata produzione delle IgE alimento specifiche e quindi dello sviluppo di una forma non-IgE mediata.

Sulla base delle attuali conoscenze, questo è il primo studio prospettico che valuta simultaneamente la storia naturale, le caratteristiche cliniche e dei test allergologici e la fisiopatologia di una coorte di pazienti con diverse forme di AA non-IgE mediata con un follow-up di 24 mesi.

In precedenza sono stati pubblicati diversi studi retrospettivi che descrivono soggetti pediatrici con diversi sintomi gastrointestinali indotti da proteine alimentari, senza classificare le diverse forme di AA non-IgE mediata, principalmente focalizzati su FPIAP o FPIES e sull'APLV.^{15,55,93,94,104} Gli studi

prospettici sono limitati e principalmente focalizzati su una specifica forma di AA non-IgE mediata, o valutano separatamente le caratteristiche cliniche e la storia naturale o la fisiopatologia di singole forme di AA non-IgE mediata.^{10,11,27,60,96,97,118}

I punti di forza del nostro studio sono l'elevata numerosità della coorte di pazienti, il disegno prospettico dello studio, i rigorosi criteri diagnostici adottati per la diagnosi e per il monitoraggio dell'acquisizione della tolleranza immunologica per evitare diete di eliminazione prolungate e non necessarie. Inoltre, abbiamo confermato un ruolo potenziale dell'APT per la diagnosi e il monitoraggio dei bambini con AA non-IgE mediata. Abbiamo anche evidenziato diversi aspetti della storia naturale relativi al valore prognostico di potenziali predittori che agiscono come fattori di rischio o protettivi sullo sviluppo della tolleranza immunologica e la comparsa della MA. In ultimo lo studio dei meccanismi fisiopatologici ci ha permesso di mettere in luce le citochine coinvolte nella patogenesi di queste malattie, mostrando il coinvolgimento delle citochine Th2 nella stessa misura delle forme IgE mediate ma con l'assenza di IgE alimento specifiche in gran parte dei soggetti; questo probabilmente a causa dell'elevata produzione di IFN γ legato all'età inferiore media di insorgenza tra queste due forme di AA.

Inoltre, la presenza di elevate quantità di citochine Th2 in questi pazienti, spiegherebbe il perché questi sviluppino nel corso del follow-up MA nella stessa percentuale delle forme IgE mediate; anche in questo caso è probabile che la graduale riduzione di IFN γ legato alla crescita del bambino, porti alla predominanza dell'infiammazione Th2 e la conseguente comparsa di altre manifestazioni atopiche. Ulteriori studi sono necessari per convalidare tale ipotesi.

I punti deboli del nostro studio sono dati dal disegno monocentrico e dallo studio dei meccanismi fisiopatologici esclusivamente nei pazienti con AA alle PLV.

6. CONCLUSIONI

Lo studio NIGEFA fornisce dati sulle caratteristiche cliniche, sui fattori prognostici, sulla storia naturale dei diversi fenotipi AA non-IgE mediate e sulla fisiopatologia, che potrebbero avere un impatto rilevante sulla pratica clinica.

Infatti, quando un paziente pediatrico, prevalentemente di sesso maschile, di età inferiore a 1 anno, con rischio allergico familiare, nato da parto cesareo e allattato artificialmente, presenta sintomi gastrointestinali persistenti, si dovrebbe sospettare fortemente una AA non-IgE mediata e l'APT potrebbe essere uno strumento affidabile per il work up diagnostico.

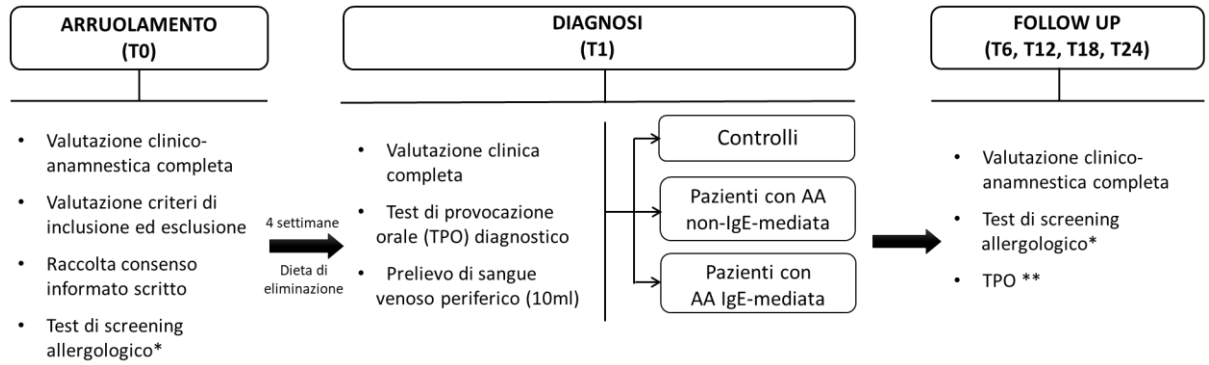
Riconoscere precocemente un bambino con sospetta AA non-IgE mediata è estremamente importante per evitare il ritardo diagnostico, in quanto per ogni mese di ritardo diagnostico vi è un rischio maggiore di sviluppare AA multipla.

Dai nostri dati emerge infatti che l'AA multipla è un fattore prognostico negativo sulla storia naturale della malattia.

Limitare quindi l'insorgenza di AA multiple potrebbe essere un importante strategia per facilitare l'acquisizione della tolleranza immunologica e limitare l'insorgenza di MA. Inoltre, la gestione della dieta con EHCF+LGG potrebbe essere una ulteriore strategia efficace per accelerare l'acquisizione della tolleranza immunologica e limitare la comparsa di altre AA in questi pazienti.

7. TABELLE E FIGURE

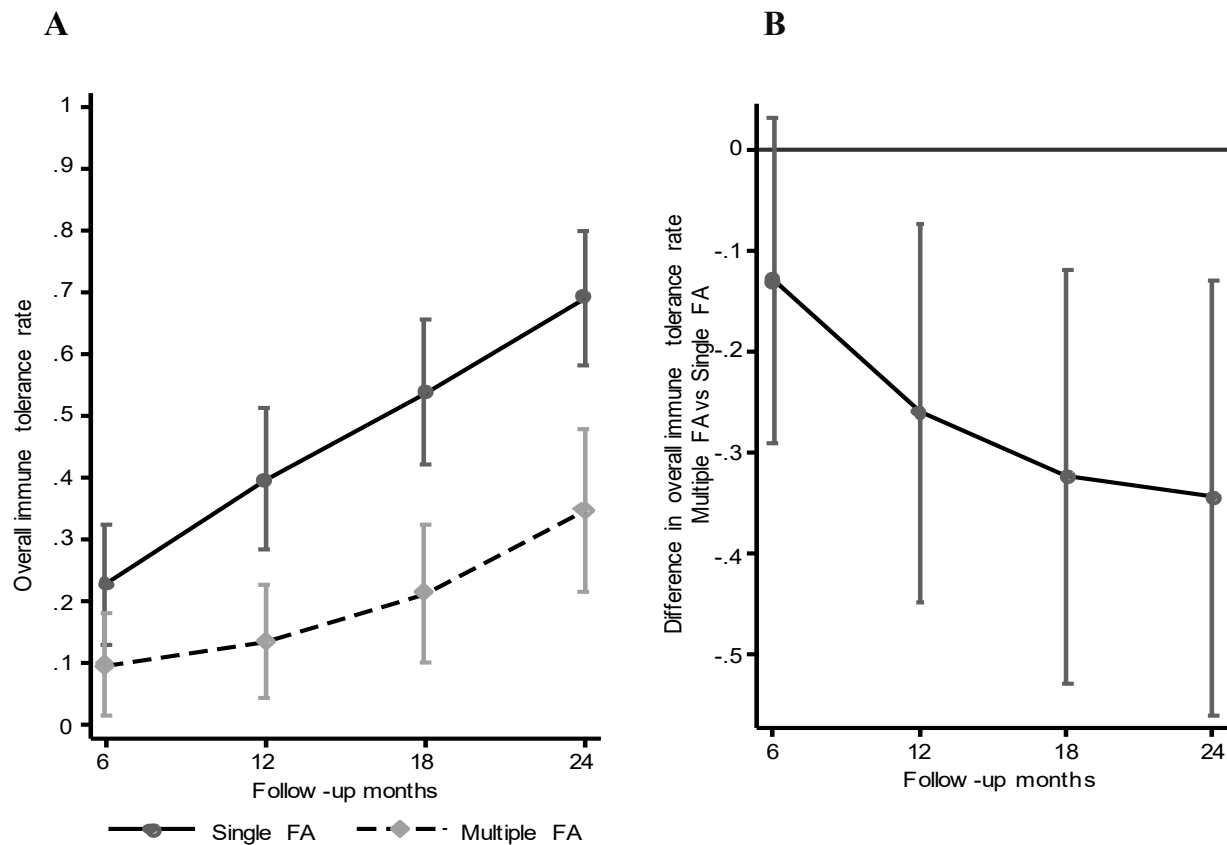
Figura 1. Disegno dello studio



* Skin prick tests (SPT), atopy patch test (APT)

**Eseguito ogni 12 mesi in pazienti con FPIES

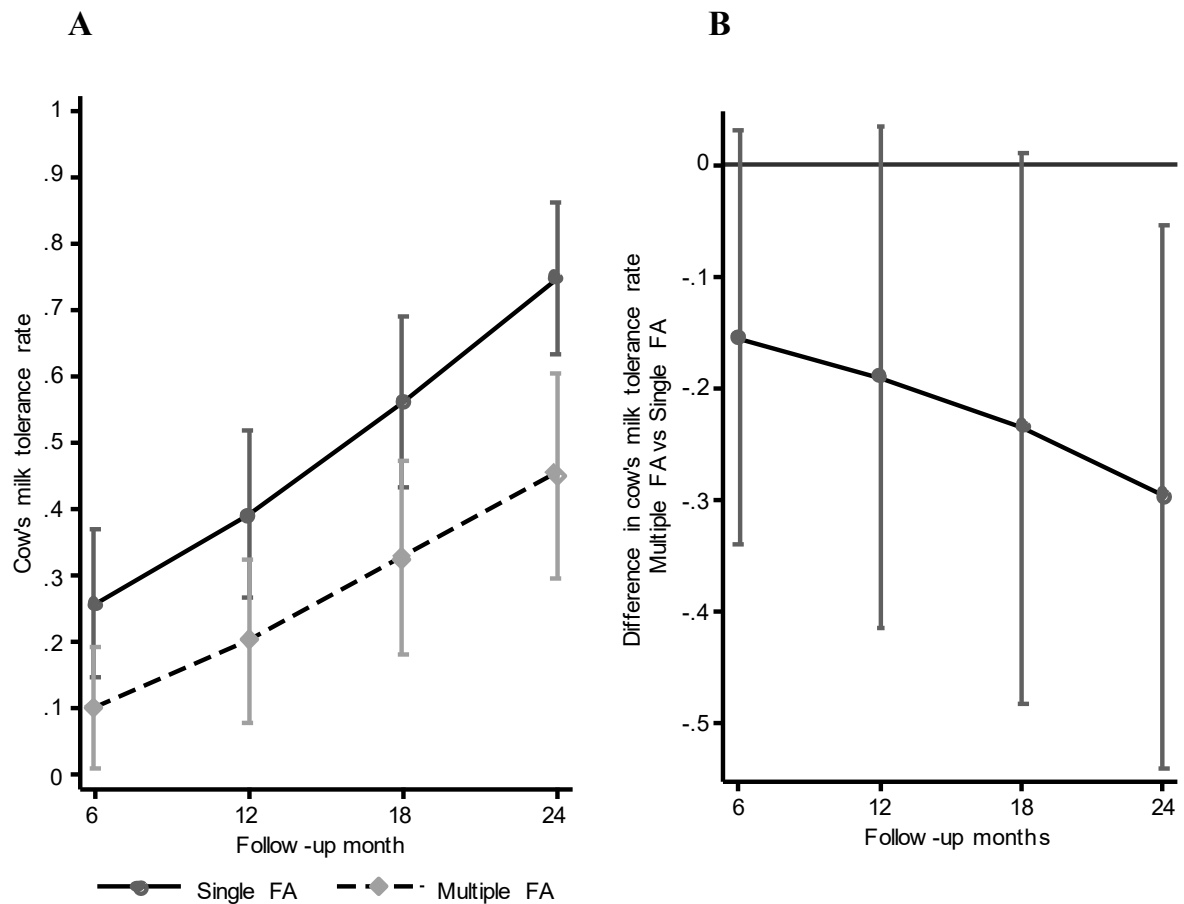
Figura 2. Tasso di acquisizione della tolleranza immunologica totale durante i 24 mesi di follow-up in pazienti con AA singola vs multipla



Pannello A: I valori sono espressi come probabilità marginali con IC del 95%.

Pannello B: Differenze nelle probabilità marginali con IC 95% calcolate dalla regressione logistica per misurazioni ripetute, con correzione di Bonferroni per 4 contrasti.

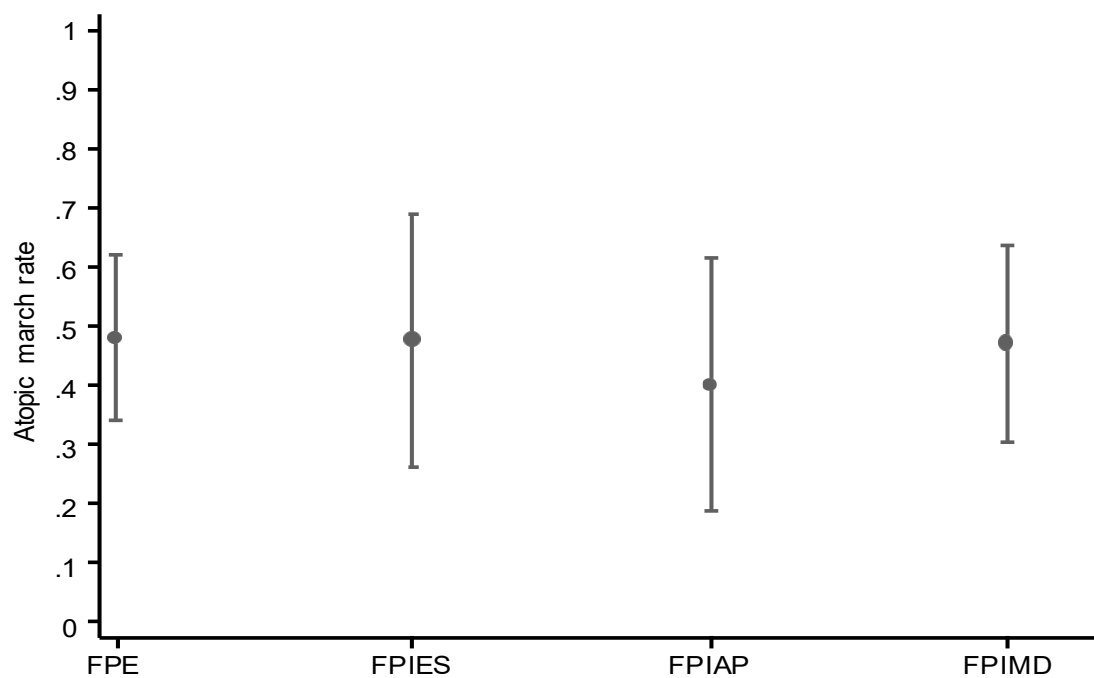
Figura 3. Tasso di acquisizione della tolleranza immunologica alle proteine del latte vaccino durante i 24 mesi di follow-up in pazienti con AA



Pannello A: I valori sono espressi come probabilità marginali con IC del 95%.

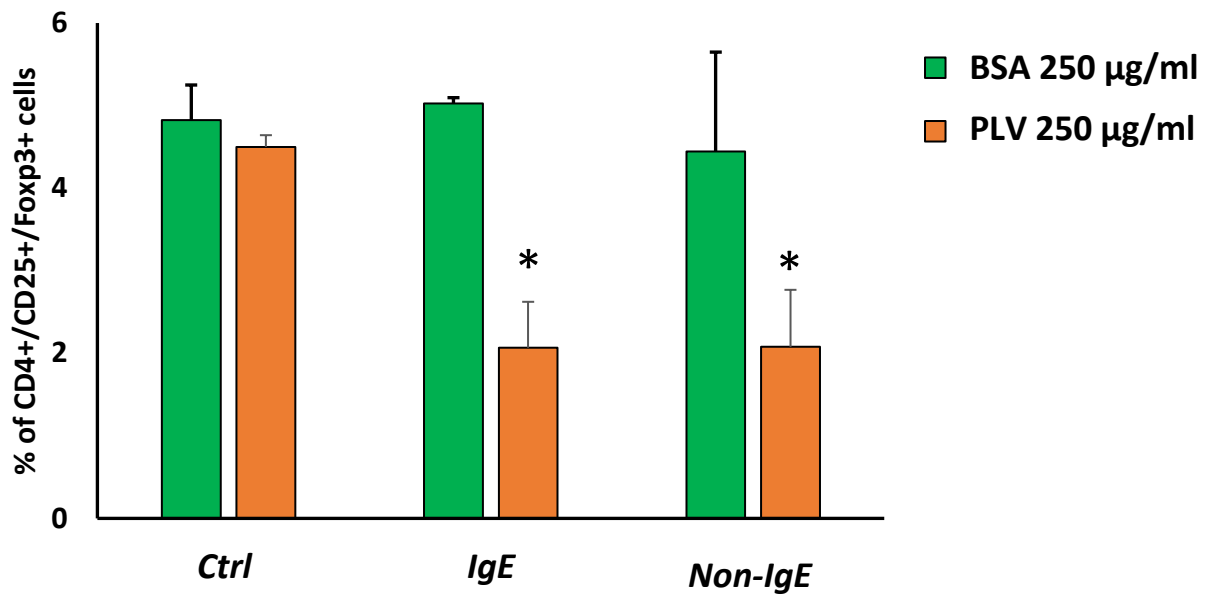
Pannello B: Differenze nelle probabilità marginali con IC 95% calcolate dalla regressione logistica per misurazioni ripetute, con correzione Bonferroni per 4 contrasti.

Figura 4. Percentuale di pazienti con marcia allergica a 24 mesi di follow-up



I valori sono stime marginali e l'intervallo di confidenza del 95% è calcolato dalla regressione logistica

Figura 5. Espressione dei linfociti T-reg CD4+/CD25+/Foxp3+ nei PBMCs di controlli, pazienti con AA non-IgE mediata e IgE-mediata dopo stimolazione con 250 µg/ml di PLV



BSA, Siero Albumina Bovina; Ctrl, controlli; PLV, Proteine del latte vaccino *p<0.05,

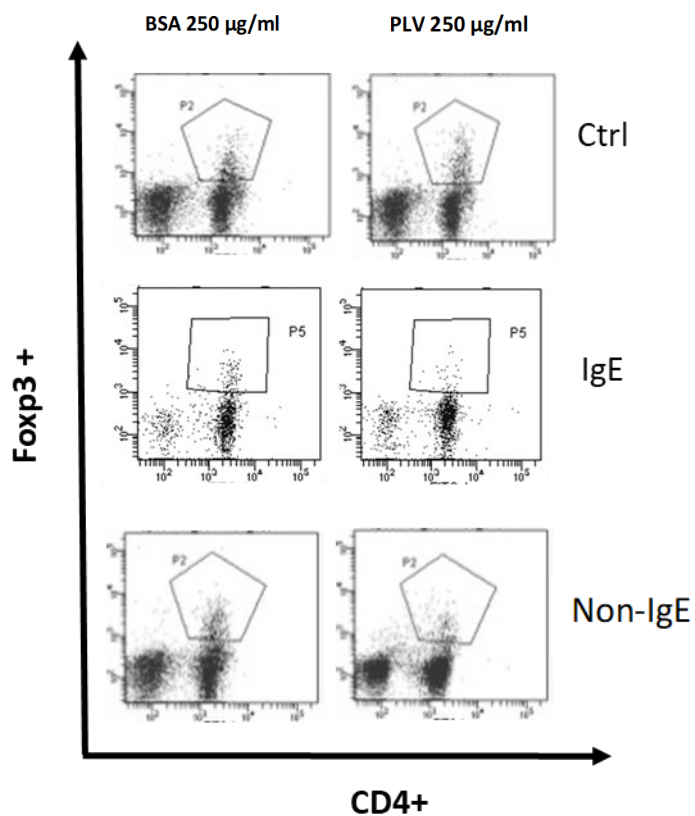
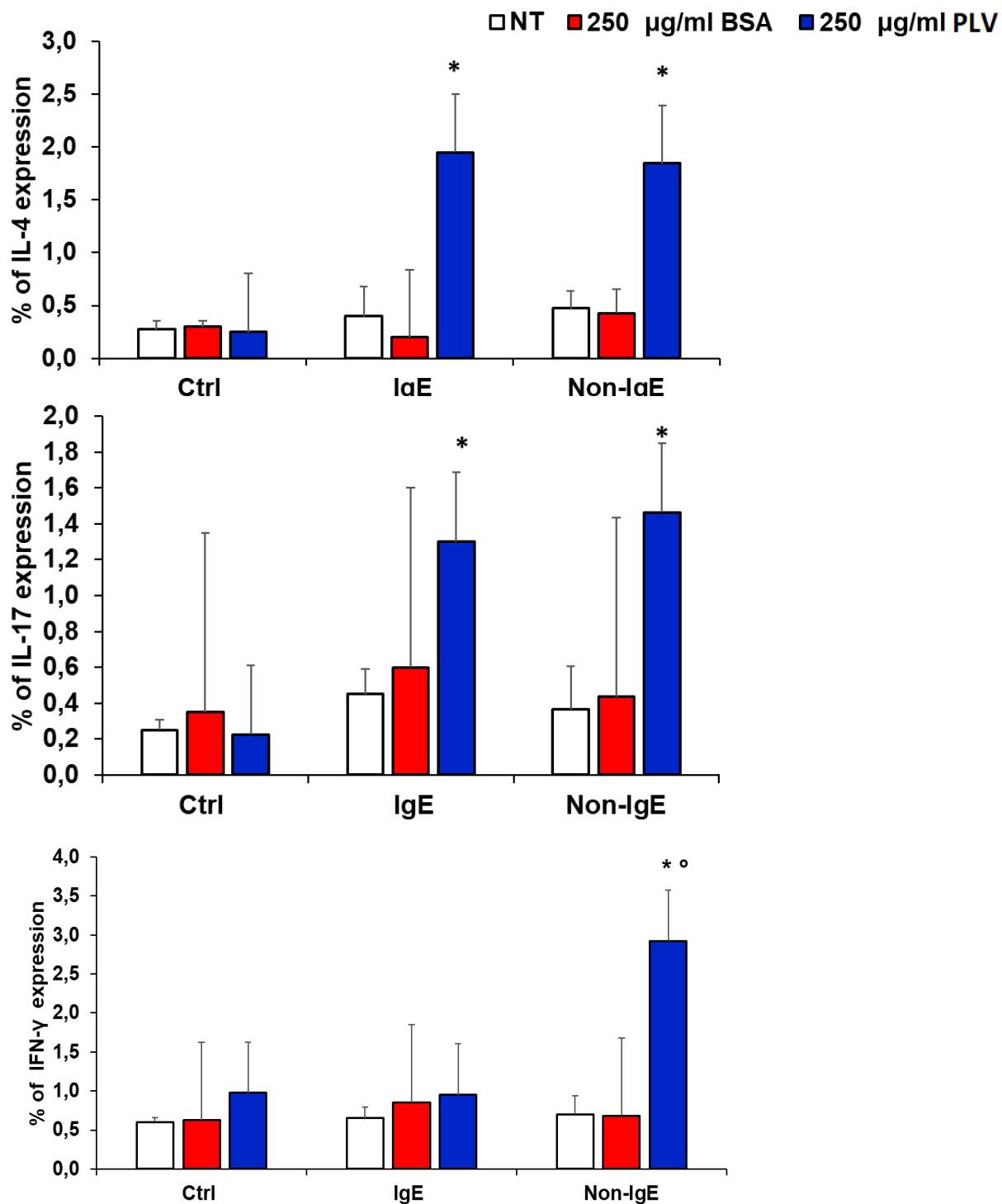


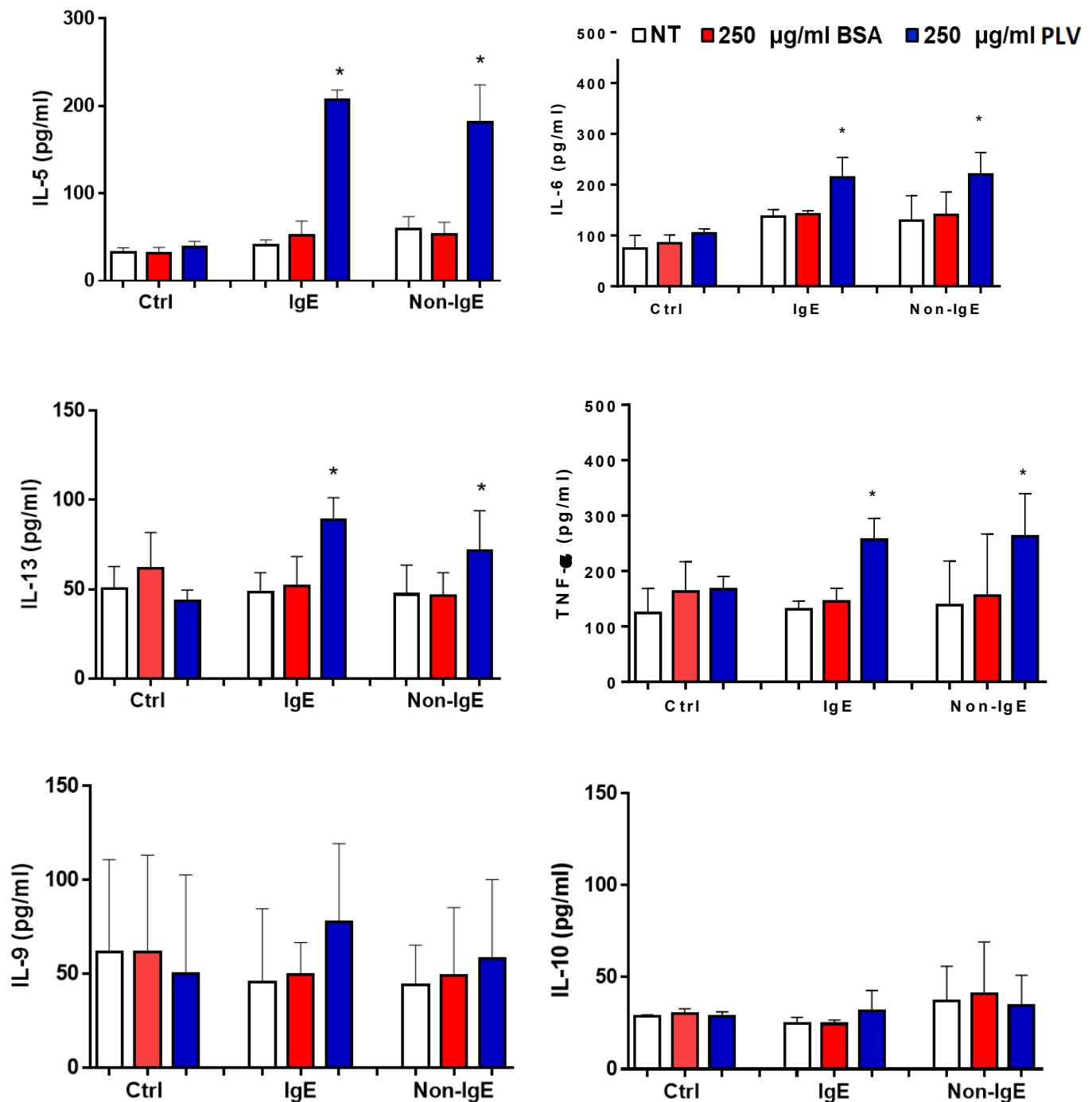
Figura 6. Espressione dei linfociti Th1, Th2, Th17 nei PBMCs di controlli, pazienti con AA non-IgE mediata e IgE mediata dopo stimolazione con 250 µg/ml di PLV



BSA, Siero Albumina Bovina; Ctrl, controlli; NT, non trattato; PLV, Proteine del latte vaccino

* p < 0.05 PLV vs BSA, NT e Ctrl; ° p < 0.05 non-IgE vs IgE

Figura 7. Espressione dei livelli di citochine nel surnatante di PBMCs di controlli, pazienti con AA non-IgE mediata e IgE-mediata dopo stimolazione con 250 µg/ml di PLV



BSA, Siero Albumina Bovina; Ctrl, controlli; NT, non trattato; PLV, Proteine del latte vaccino

* $p < 0.05$ PLV vs BSA, NT e Ctrl;

Tabella 1. Caratteristiche cliniche e demografiche della popolazione di studio

	Totale	FPE	FPIES	FPIAP	FPMID
	N=123	N=48	N=21	N=20	N=34
Sesso maschile, n (%)	69 (56.1)	32 (66.7)	9 (42.9)	9 (45.0)	19 (55.9)
Storia familiare di allergia, n (%)	79 (64.2)	34 (70.8)	15 (71.4)	11 (55.0)	19 (55.9)
Parto cesareo, n (%)	75 (61.0)	29 (60.4)	15 (71.4)	12 (60.0)	19 (55.9)
Nascita pretermine, n (%)	8 (6.5)	5 (10.4)	0 (0)	1 (5.0)	2 (5.9)
Allattamento al seno per almeno 1 mese, n (%)	67 (54.5)	24 (50)	13 (61.9)	14 (70)	16 (47.1)
Durata allattamento al seno (mesi),mediana (IQR)	0 (0; 6)	0 (0; 6)	6 (0; 7)	0 (0; 6)	0 (0; 0)
Allattamento al seno alla diagnosi, n (%)	9 (7.3)	1 (2.0)	2 (9.5)	1 (5.0)	5 (10.3)
Età di esordio (giorni), mediana (IQR)	90 (30; 180)	105 (30; 330)	120 (30; 180)	60 (30; 90)	105 (30; 180)
Età alla diagnosi (giorni), mediana (IQR)	150 (60; 300)	195 (90; 495)	150 (60; 180)	60 (60; 105)	180 (60; 360)
Ritardo diagnostico (giorni), mediana (IQR)	30 (0; 90)	60 (26; 195)	5 (0; 30)	0 (0; 30)	30 (0; 150)
Dermatite atopica prima di allergia, n (%)	45 (36.6)	20 (41.7)	7 (33.3)	9 (45.0)	9 (26.5)
Allergie alimentari multiple, n (%)	52 (42.3)	24 (50.0)	12 (57.1)	3 (15.0)	13 (38.2)

IQR, range interquartile

Tabella 2. Potenziali predittori di insorgenza di AA multipla.

Sesso maschile	2.24*						
	[1.07,4.71]						
Età all'esordio	1.00						
	[1.00,1.00]						
Età alla diagnosi	1.00						
	[1.00,1.00]						
Ritardo diagnostico	1.09*						
	[1.01,1.18]						
Parto cesareo	1.04						
	[0.50,2.17]						
Allattamento al seno	0.90						
	[0.33,2.48]						
Storia familiare di allergia	0.82						
	[0.39,1.72]						
Osservazioni	123	123	123	123	123	123	123

I valori sono espressi come odds ratio e intervallo di confidenza al 95% derivanti da una regressione logistica univariata.. *p<0.05, **p<0.001

Tabella 3. Potenziali predittori di acquisizione della tolleranza immunologica totale a 24 mesi di follow-up

Età d'insorgenza	0.97 [0.91,1.03]						
Età alla diagnosi		0.96 [0.92,1.01]					
Ritardo diagnostico			0.96 [0.90,1.02]				
Sesso maschile				0.81 [0.40,1.66]			
Storia familiare di allergia					0.41* [0.19,0.89]		
Allergie alimentari multiple						0.24** [0.11,0.51]	
FPE							1.00 [1.00,1.00]
FPIES							0.26* [0.08,0.84]
FPIAP							2.54 [0.80,8.10]
FPMID							1.37 [0.56,3.34]
Osservazioni	123	123	123	123	123	123	123

FPE, *food protein induced enteropathy*; FPIES, *food protein induced enterocolitis syndrome*; FPIAP, *food protein-induced allergic proctocolitis*; FPMID, *food protein-induced allergic dysmotility disorders*

I valori sono espressi come odds ratio e intervallo di confidenza al 95% derivanti da una regressione logistica univariata. *p<0.05, **p<0.001

Tabella 4. Potenziali predittori di acquisizione della tolleranza immunologica alle proteine del latte vaccino a 24 mesi di follow-up

Età d'insorgenza	1.02 [0.91,1.14]						
Età alla diagnosi	0.99 [0.94,1.04]						
Ritardo diagnostico	0.97 [0.92,1.04]						
Sesso maschile	1.03 [0.46,2.34]						
Storia familiare di allergia	0.51 [0.21,1.24]						
Allergie alimentari multiple	0.28** [0.12,0.66]						
FPE							1.00 [1.00,1.00]
FPIES							0.12* [0.02,0.62]
FPIAP							2.25 [0.63,8.05]
FPMID							1.50 [0.53,4.24]
Osservazioni	99	99	99	99	99	99	99

FPE, *food protein induced enteropathy*; FPIES, *food protein induced enterocolitis syndrome*; FPIAP, *food protein-induced allergic proctocolitis*; FPMID, *food protein-induced allergic dysmotility disorders*

I valori sono espressi come odds ratio e intervallo di confidenza al 95% derivanti da una regressione logistica univariata. *p<0.05, **p<0.001

Tabella 5. Potenziali predittori di insorgenza di marcia allergica a 24 mesi di follow-up

Età all'esordio	1.04						
	[0.98,1.10]						
Età alla diagnosi	1.04						
	[1.00,1.09]						
Ritardo diagnostico	1.05						
	[0.99,1.13]						
Sesso maschile	1.50						
	[0.73,3.07]						
Storia familiare di allergia	0.80						
	[0.38,1.67]						
Allergia alimentare multipla	2.22*						
	[1.07,4.61]						
FPE	1.00						
	[1.00,1.00]						
FPIES	0.99						
	[0.35,2.76]						
FPIAP	0.72						
	[0.25,2.09]						
FPMID	0.97						
	[0.40,2.33]						
Osservazioni	123	123	123	123	123	123	123

FPE, *food protein induced enteropathy*; FPIES, *food protein induced enterocolitis syndrome*; FPIAP, *food protein-induced allergic proctocolitis*; FPMID, *food protein-induced allergic dysmotility disorders*

I valori sono espressi come odds ratio e intervallo di confidenza al 95% derivanti da una regressione logistica univariata. *p<0.05

Tabella 6. Distribuzione delle manifestazioni atopiche nella 4 forme di AA non-IgE mediata a 24 m

	Totale N=123	FPE N=48	FPIES N=21	FPIAP N=20	FPMID N=34
Rinocongiuntivite, n (%)	23 (18.7)	8 (16.7)	4 (19)	2 (10)	9 (26.5)
Asma, n (%)	7 (5.7)	4 (8.3)	0 (0)	1 (5)	2 (5.9)
Dermatite Atopica, n (%)	27 (22)	11 (22.9)	5 (23.8)	4 (20)	7 (20.6)
AA IgE-mediata, n (%)	7 (5.7)	4 (8.3)	2 (9.5)	1 (5)	0 (0)

Tabella 7. Accuratezza degli APT per la diagnosi e il follow-up delle AA non-IgE mediate

	N of tests	TPF	TNF	DLR+	DLR-
Diagnosi	275	0.94 (0.89 to 0.97)	0.81 (0.67 to 0.91)	5 (2 to 8)	0.08 (0.03 to 0.13)
Follow-up	615	0.96 (0.92 to 0.99)	0.95 (0.89 to 0.98)	19 (4 to 33)	0.04 (0.01 to 0.07)

I valori sono proporzioni e l'intervallo è 95%CI.

TPF, True positive fraction; **TNF**, True negative fraction; **DLR+**, diagnostic positive likelihood ratio; **DLR-**, diagnostic negative likelihood ratio.

Le stime e le IC al 95% di TPF, TNF, DLR+ e DLR- sono ottenute come stime marginali da un modello di regressione logistica che impiega intervalli di confidenza a grappolo per tenere conto delle misure ripetute all'interno del soggetto

8. BIBLIOGRAFIA

1. Berni Canani R, De Filippis F, Nocerino R, Paparo L, Di Scala C, Cosenza L, Della Gatta G, Calignano A, De Caro C, Laiola M, Gilbert JA, Ercolini D. Gut microbiota composition and butyrate production in children affected by non-IgE-mediated cow's milk allergy. *Sci Rep*. 2018 Aug 21;8(1):12500. doi: 10.1038/s41598-018-30428-3. PMID: 30131575; PMCID: PMC6104073.
2. Seth D, Poowutikul P, Pansare M, Kamat D. Food Allergy: A Review. *Pediatr Ann*. 2020 Jan 1;49(1):e50-e58. doi: 10.3928/19382359-20191206-01. PMID: 31930423.
3. Azouz NP, Rothenberg ME. Mechanisms of gastrointestinal allergic disorders. *J Clin Invest*. 2019 Mar 11;129(4):1419-1430. doi: 10.1172/JCI124604. PMID: 30855279; PMCID: PMC6436864.
4. Lozano-Ojalvo D, Lezmi G, Cortes-Perez N, Adel-Patient K. Non-IgE mediated food allergy. *Drug Discovery Today*. 2015; 17:45-53 <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2016.09.003>.
5. Biermé P, Nowak-Węgrzyn A, Caubet J C. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies. *Current Opinion in Pediatrics*. 2017 Dec; 29(6):697-703(7) DOI: 10.1097/MOP.0000000000000554.
6. Connors, L., O'Keefe, A., Rosenfield, L. et al. Non-IgE-mediated food hypersensitivity. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2018;56 <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0285-2>.

7. Leonard SA. Non-IgE-mediated Adverse Food Reactions. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2017 Nov 14;17(12):84. doi: 10.1007/s11882-017-0744-8. PMID: 29138990.
8. Nowak-Węgrzyn A, Katz Y, Mehr SS, Koletzko S. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 May;135(5):1114-24. doi: 10.1016/j.jaci.2015.03.025. PMID: 25956013.
9. Caubet JC, Szajewska H, Shamir R, Nowak-Węgrzyn A. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies in children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2017 Feb;28(1):6-17. doi: 10.1111/pai.12659. Epub 2016 Nov 3. PMID: 27637372.
10. Katz Y, Goldberg MR, Rajuan N, Cohen A, Leshno M. The prevalence and natural course of food protein-induced enterocolitis syndrome to cow's milk: a large-scale, prospective population-based study. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Mar;127(3):647-53.e1-3. doi: 10.1016/j.jaci.2010.12.1105. PMID: 21377033.
11. Caubet JC, Ford LS, Sickles L, Järvinen KM, Sicherer SH, Sampson HA, Nowak-Węgrzyn A. Clinical features and resolution of food protein-induced enterocolitis syndrome: 10-year experience. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Aug;134(2):382-9. doi: 10.1016/j.jaci.2014.04.008. Epub 2014 May 28. PMID: 24880634.
12. Katz Y, Goldberg MR, Rajuan N, Cohen A, Leshno M. The prevalence and natural course of food protein-induced enterocolitis syndrome to cow's milk: a large-scale, prospective population-based

- study. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Mar;127(3):647-53.e1-3. doi: 10.1016/j.jaci.2010.12.1105. PMID: 21377033.
13. Sopo SM, Giorgio V, Dello Iacono I, Novembre E, Mori F, Onesimo R. A multicentre retrospective study of 66 Italian children with food protein-induced enterocolitis syndrome: different management for different phenotypes. *Clin Exp Allergy*. 2012 Aug;42(8):1257-65. doi: 10.1111/j.1365-2222.2012.04027.x. PMID: 22805473.
 14. Nowak-Węgrzyn A, Chehade M, Groetch ME, Spergel JM, Wood RA, Allen K, Atkins D, Bahna S, Barad AV, Berin C, Brown Whitehorn T, Burks AW, Caubet JC, Cianferoni A, Conte M, Davis C, Fiocchi A, Grimshaw K, Gupta R, Hofmeister B, Hwang JB, Katz Y, Konstantinou GN, Leonard SA, Lightdale J, McGhee S, Mehr S, Sopo SM, Monti G, Muraro A, Noel SK, Nomura I, Noone S, Sampson HA, Schultz F, Sicherer SH, Thompson CC, Turner PJ, Venter C, Westcott-Chavez AA, Greenhawt M. International consensus guidelines for the diagnosis and management of food protein-induced enterocolitis syndrome: Executive summary-Workgroup Report of the Adverse Reactions to Foods Committee, American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Apr;139(4):1111-1126.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2016.12.966. Epub 2017 Feb 4. PMID: 28167094.
 15. Ruffner MA, Ruymann K, Barni S, Cianferoni A, Brown-Whitehorn T, Spergel JM. Food protein-induced enterocolitis syndrome: insights from review of a large referral population. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2013 Jul-Aug;1(4):343-9. doi: 10.1016/j.jaip.2013.05.011. Epub 2013 Jun 28. PMID: 24565539.

16. Benlounes N, Dupont C, Candalh C, Blaton MA, Darmon N, Desjeux JF, Heyman M. The threshold for immune cell reactivity to milk antigens decreases in cow's milk allergy with intestinal symptoms. *J Allergy Clin Immunol.* 1996 Oct;98(4):781-9. doi: 10.1016/s0091-6749(96)70127-6. PMID: 8876554.
17. Shek LP, Bardina L, Castro R, Sampson HA, Beyer K. Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders. *Allergy.* 2005 Jul;60(7):912-9. doi: 10.1111/j.1398-9995.2005.00705.x. PMID: 15932382.
18. Van Sickle GJ, Powell GK, McDonald PJ, Goldblum RM. Milk- and soy protein-induced enterocolitis: evidence for lymphocyte sensitization to specific food proteins. *Gastroenterology.* 1985 Jun;88(6):1915-21. doi: 10.1016/0016-5085(85)90019-8. PMID: 4039696.
19. Heyman M, Darmon N, Dupont C, Dugas B, Hirribaren A, Blaton MA, Desjeux JF. Mononuclear cells from infants allergic to cow's milk secrete tumor necrosis factor alpha, altering intestinal function. *Gastroenterology.* 1994 Jun;106(6):1514-23. doi: 10.1016/0016-5085(94)90405-7. PMID: 8194697.
20. Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med.* 2004 Jun 21;199(12):1679-88. doi: 10.1084/jem.20032121. Epub 2004 Jun 14. PMID: 15197226; PMCID: PMC2212808.

21. Hoffman KM, Ho DG, Sampson HA. Evaluation of the usefulness of lymphocyte proliferation assays in the diagnosis of allergy to cow's milk. *J Allergy Clin Immunol.* 1997 Mar;99(3):360-6. doi: 10.1016/s0091-6749(97)70054-x. PMID: 9058692.
22. Caubet JC, Nowak-Węgrzyn A. Current understanding of the immune mechanisms of food protein-induced enterocolitis syndrome. *Expert Rev Clin Immunol.* 2011 May;7(3):317-27. doi: 10.1586/eci.11.13. PMID: 21595598.
23. Järvinen KM, Caubet JC, Sickles L, Ford LS, Sampson HA, Nowak-Węgrzyn A. Poor utility of atopy patch test in predicting tolerance development in food protein-induced enterocolitis syndrome. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2012 Sep;109(3):221-2. doi: 10.1016/j.anai.2012.06.020. Epub 2012 Jul 25. PMID: 22920080; PMCID: PMC3586209.
24. Michelet M, Schluckebier D, Petit LM, Caubet JC. Food protein-induced enterocolitis syndrome - a review of the literature with focus on clinical management. *J Asthma Allergy.* 2017 Jun 27;10:197-207. doi: 10.2147/JAA.S100379. PMID: 28721077; PMCID: PMC5499953.
25. Caubet JC, Bencharitiwong R, Ross A, Sampson HA, Berin MC, Nowak-Węgrzyn A. Humoral and cellular responses to casein in patients with food protein-induced enterocolitis to cow's milk. *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Feb;139(2):572-583. doi: 10.1016/j.jaci.2016.02.047. Epub 2016 Jul 15. PMID: 27545065.

26. Mori F, Barni S, Cianferoni A, Pucci N, de Martino M, Novembre E. Cytokine expression in CD3+ cells in an infant with food protein-induced enterocolitis syndrome (FPIES): case report. *Clin Dev Immunol.* 2009;2009:679381. doi: 10.1155/2009/679381. PMID: 20011655; PMCID: PMC2786190.
27. Morita H, Nomura I, Orihara K, Yoshida K, Akasawa A, Tachimoto H, Ohtsuka Y, Namai Y, Futamura M, Shoda T, Matsuda A, Kamemura N, Kido H, Takahashi T, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy are predominantly skewed to T(H)2. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Feb;131(2):590-2.e1-6. doi: 10.1016/j.jaci.2012.09.005. Epub 2012 Oct 16. PMID: 23083674.
28. Goswami R, Blazquez AB, Kosoy R, Rahman A, Nowak-Węgrzyn A, Berin MC. Systemic innate immune activation in food protein-induced enterocolitis syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Jun;139(6):1885-1896.e9. doi: 10.1016/j.jaci.2016.12.971. Epub 2017 Feb 10. PMID: 28192147; PMCID: PMC5461215.
29. Kimura M, Ito Y, Shimomura M, Morishita H, Meguro T, Adachi Y, Seto S. Cytokine profile after oral food challenge in infants with food protein-induced enterocolitis syndrome. *Allergol Int.* 2017 Jul;66(3):452-457. doi: 10.1016/j.alit.2016.12.001. Epub 2017 Jan 2. PMID: 28057433.
30. Wada T, Matsuda Y, Toma T, Koizumi E, Okamoto H, Yachie A. Increased CD69 Expression on Peripheral Eosinophils from Patients with Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome. *Int Arch Allergy*

- Immunol. 2016;170(3):201-5. doi: 10.1159/000448755. Epub 2016 Sep 6. PMID: 27595267.
31. Kimura M, Ito Y, Tokunaga F, Meguro T, Shimomura M, Morishita H, Seto S. Increased C-reactive protein and fever in Japanese infants with food protein-induced enterocolitis syndrome. *Pediatr Int*. 2016 Sep;58(9):826-30. doi: 10.1111/ped.12938. Epub 2016 May 16. PMID: 26824628.
 32. Pecora V, Prencipe G, Valluzzi R, Dahdah L, Insalaco A, Cianferoni A, De Benedetti F, Fiocchi A. Inflammatory events during food protein-induced enterocolitis syndrome reactions. *Pediatr Allergy Immunol*. 2017 Aug;28(5):464-470. doi: 10.1111/pai.12723. Epub 2017 Jun 22. PMID: 28375580.
 33. Hwang JB, Sohn SM, Kim AS. Prospective follow-up oral food challenge in food protein-induced enterocolitis syndrome. *Arch Dis Child*. 2009 Jun;94(6):425-8. doi: 10.1136/adc.2008.143289. Epub 2008 Oct 1. PMID: 18829623.
 34. Miceli Sopo S, Battista A, Greco M, Monaco S. Ondansetron for food protein-induced enterocolitis syndrome. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;164(2):137-9. doi: 10.1159/000363384. Epub 2014 Jun 28. PMID: 24993542.
 35. Mehr S, Kakakios A, Frith K, Kemp AS. Food protein-induced enterocolitis syndrome: 16-year experience. *Pediatrics*. 2009 Mar;123(3):e459-64. doi: 10.1542/peds.2008-2029. Epub 2009 Feb 2. PMID: 19188266.

36. Sicherer SH. Food protein-induced enterocolitis syndrome: case presentations and management lessons. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Jan;115(1):149-56. doi: 10.1016/j.jaci.2004.09.033. PMID: 15637562.
37. González-Delgado P, Caparrós E, Moreno MV, Clemente F, Flores E, Velásquez L, Rubio G, Fernández J. Clinical and immunological characteristics of a pediatric population with food protein-induced enterocolitis syndrome (FPIES) to fish. *Pediatr Allergy Immunol*. 2016 May;27(3):269-75. doi: 10.1111/pai.12529. Epub 2016 Jan 27. PMID: 26681231.
38. Elizur A, Cohen M, Goldberg MR, Rajuan N, Cohen A, Leshno M, Katz Y. Cow's milk associated rectal bleeding: a population based prospective study. *Pediatr Allergy Immunol*. 2012 Dec;23(8):766-70. doi: 10.1111/pai.12009. Epub 2012 Oct 11. PMID: 23050491.
39. Xanthakos SA, Schwimmer JB, Melin-Aldana H, Rothenberg ME, Witte DP, Cohen MB. Prevalence and outcome of allergic colitis in healthy infants with rectal bleeding: a prospective cohort study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005 Jul;41(1):16-22. doi: 10.1097/01.mpg.0000161039.96200.f1. PMID: 15990624.
40. Arvola T, Ruuska T, Keränen J, Hyöty H, Salminen S, Isolauri E. Rectal bleeding in infancy: clinical, allergological, and microbiological examination. *Pediatrics*. 2006 Apr;117(4):e760-8. doi: 10.1542/peds.2005-1069. PMID: 16585287.

41. Lake AM. Food-induced eosinophilic proctocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;30 Suppl:S58-60. doi: 10.1097/00005176-200001001-00009. PMID: 10634300..
42. Lozinsky AC, Morais MB. Eosinophilic colitis in infants. *J Pediatr (Rio J).* 2014 Jan-Feb;90(1):16-21. doi: 10.1016/j.jped.2013.03.024. Epub 2013 Oct 13. PMID: 24131740..
43. Erdem SB, Nacaroglu HT, Karaman S, Erdur CB, Karkiner CU, Can D. Tolerance development in food protein-induced allergic proctocolitis: Single centre experience. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2017 May-Jun;45(3):212-219. doi: 10.1016/j.aller.2016.10.005. Epub 2017 Feb 1. PMID: 28159385.
44. Jenkins HR, Pincott JR, Soothill JF, Milla PJ, Harries JT. Food allergy: the major cause of infantile colitis. *Arch Dis Child.* 1984 Apr;59(4):326-9. doi: 10.1136/adc.59.4.326. PMID: 6721558; PMCID: PMC1628682.
45. Machida HM, Catto Smith AG, Gall DG, Trevenen C, Scott RB. Allergic colitis in infancy: clinical and pathologic aspects. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1994 Jul;19(1):22-6. doi: 10.1097/00005176-199407000-00004. PMID: 7965472.
46. Lake AM, Whittington PF, Hamilton SR. Dietary protein-induced colitis in breast-fed infants. *J Pediatr.* 1982 Dec;101(6):906-10. doi: 10.1016/s0022-3476(82)80008-5. PMID: 7143166.
47. Nowak-Węgrzyn A. Food protein-induced enterocolitis syndrome and allergic proctocolitis. *Allergy Asthma Proc.* 2015 May-

- Jun;36(3):172-84. doi: 10.2500/aap.2015.36.3811. PMID: 25976434; PMCID: PMC4405595.
48. Anveden-Hertzberg L, Finkel Y, Sandstedt B, Karpe B. Proctocolitis in exclusively breast-fed infants. *Eur J Pediatr.* 1996 Jun;155(6):464-7. doi: 10.1007/BF01955182. PMID: 8789762.
 49. Pumberger W, Pomberger G, Geissler W. Proctocolitis in breast fed infants: a contribution to differential diagnosis of haematochezia in early childhood. *Postgrad Med J.* 2001 Apr;77(906):252-4. doi: 10.1136/pmj.77.906.252. PMID: 11264489; PMCID: PMC1741985.
 50. Goldman H, Proujansky R. Allergic proctitis and gastroenteritis in children. Clinical and mucosal biopsy features in 53 cases. *Am J Surg Pathol.* 1986 Feb;10(2):75-86. doi: 10.1097/00000478-198602000-00001. PMID: 3953938.
 51. Koksall BT, Baris Z, Ozcay F, Yilmaz Ozbek O. Single and multiple food allergies in infants with proctocolitis. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2018 Jan-Feb;46(1):3-8. doi: 10.1016/j.aller.2017.02.006. Epub 2017 Jul 22. PMID: 28739021.
 52. Sampson HA, Aceves S, Bock SA, James J, Jones S, Lang D, Nadeau K, Nowak-Wegrzyn A, Oppenheimer J, Perry TT, Randolph C, Sicherer SH, Simon RA, Vickery BP, Wood R; Joint Task Force on Practice Parameters; Bernstein D, Blessing-Moore J, Khan D, Lang D, Nicklas R, Oppenheimer J, Portnoy J, Randolph C, Schuller D, Spector S, Tilles SA, Wallace D; Practice Parameter Workgroup; Sampson HA, Aceves S, Bock SA, James J, Jones S, Lang D, Nadeau K, Nowak-Wegrzyn A, Oppenheimer J, Perry TT, Randolph C,

- Sicherer SH, Simon RA, Vickery BP, Wood R. Food allergy: a practice parameter update-2014. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Nov;134(5):1016-25.e43. doi: 10.1016/j.jaci.2014.05.013. Epub 2014 Aug 28. PMID: 25174862.
53. Meyer R, Chebar Lozinsky A, Fleischer DM, Vieira MC, Du Toit G, Vandenplas Y, Dupont C, Knibb R, Uysal P, Cavkaytar O, Nowak-Wegrzyn A, Shah N, Venter C. Diagnosis and management of Non-IgE gastrointestinal allergies in breastfed infants-An EAACI Position Paper. *Allergy*. 2020 Jan;75(1):14-32. doi: 10.1111/all.13947. Epub 2019 Aug 27. PMID: 31199517.
 54. Labrosse R, Graham F, Caubet JC. Non-IgE-Mediated Gastrointestinal Food Allergies in Children: An Update. *Nutrients*. 2020 Jul 14;12(7):2086. doi: 10.3390/nu12072086. PMID: 32674427; PMCID: PMC7400851.
 55. Meyer R, Fleming C, Dominguez-Ortega G, Lindley K, Michaelis L, Thapar N, Elawad M, Chakravarti V, Fox AT, Shah N. Manifestations of food protein induced gastrointestinal allergies presenting to a single tertiary paediatric gastroenterology unit. *World Allergy Organ J*. 2013. Aug 6;6(1):13. doi: 10.1186/1939-4551-6-13. PMID: 23919257; PMCID: PMC3828665
 56. Zhang S, Sicherer S, Berin MC, Agyemang A. Pathophysiology of Non-IgE-Mediated Food Allergy. *Immunotargets Ther*. 2021 Dec 29;10:431-446. PMID: 35004389. PMCID: PMC8721028. DOI: 10.2147/ITT.S284821.

57. Calvani M, Anania C, Cuomo B, D'Auria E, Decimo F, Indirli GC, Marseglia G, Mastrorilli V, Sartorio MUA, Santoro A, Veronelli E. Non-IgE- or Mixed IgE/Non-IgE-Mediated Gastrointestinal Food Allergies in the First Years of Life: Old and New Tools for Diagnosis. *Nutrients*. 2021 Jan 14;13(1):226. PMID: 33466746. PMCID: PMC7829867. DOI: 10.3390/nu13010226.
58. Zubeldia-Varela E, Barker-Tejeda TC, Blanco-Pérez F, Infante S, Zubeldia JM, Pérez-Gordo M. Non-IgE-Mediated Gastrointestinal Food Protein-Induced Allergic Disorders. Clinical Perspectives and Analytical Approaches. *Foods*. 2021 Nov 2;10(11):2662. doi: 10.3390/foods10112662. PMID: 34828942; PMCID: PMC8623505.
59. Meyer R, Fox AT, Chebar Lozinsky A, Michaelis LJ, Shah N. Non-IgE-mediated gastrointestinal allergies-Do they have a place in a new model of the Allergic March. *Pediatr Allergy Immunol*. 2019 Mar;30(2):149-158. doi: 10.1111/pai.13000. Epub 2019 Jan 10. PMID: 30403301.
60. Heine RG. Allergic gastrointestinal motility disorders in infancy and early childhood. *Pediatr Allergy Immunol*. 2008 Aug;19(5):383-91. doi: 10.1111/j.1399-3038.2008.00785.x. PMID: 18713339.
61. Iacono G, Carroccio A, Cavataio F, Montalto G, Kazmierska I, Lorello D, Soresi M, Notarbartolo A. Gastroesophageal reflux and cow's milk allergy in infants: a prospective study. *J Allergy Clin Immunol*. 1996 Mar;97(3):822-7. doi: 10.1016/s0091-6749(96)80160-6. PMID: 8613639.

62. Ireland-Jenkin K, Wu X, Heine RG, Cameron DJ, Catto-Smith AG, Chow CW. Oesophagitis in children: reflux or allergy? *Pathology*. 2008 Feb;40(2):188-95. doi: 10.1080/00313020701813727. PMID: 18203041.
63. Tabbers MM, DiLorenzo C, Berger MY, Faure C, Langendam MW, Nurko S, Staiano A, Vandenplas Y, Benninga MA; European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition; North American Society for Pediatric Gastroenterology. Evaluation and treatment of functional constipation in infants and children: evidence-based recommendations from ESPGHAN and NASPGHAN. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014 Feb;58(2):258-74. doi: 10.1097/MPG.0000000000000266. PMID: 24345831.
64. Barr RG. Colic and crying syndromes in infants. *Pediatrics*. 1998 Nov;102(5 Suppl E):1282-6. PMID: 9794970..
65. Valeur J, Lappalainen J, Rita H, Lin AH, Kovanen PT, Berstad A, Eklund KK, Vaali K. Food allergy alters jejunal circular muscle contractility and induces local inflammatory cytokine expression in a mouse model. *BMC Gastroenterol*. 2009 May 18;9:33. doi: 10.1186/1471-230X-9-33. PMID: 19450258; PMCID: PMC2689247.
66. Leonardi S, Pecoraro R, Filippelli M, Miraglia del Giudice M, Marseglia G, Salpietro C, Arrigo T, Stringari G, Ricò S, La Rosa M, Caffarelli C. Allergic reactions to foods by inhalation in children. *Allergy Asthma Proc*. 2014 Jul-Aug;35(4):288-94. doi: 10.2500/aap.2014.35.3755. PMID: 24992548.

67. Nowak-Wegrzyn A, Muraro A. Food protein-induced enterocolitis syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009 Aug;9(4):371-7. doi: 10.1097/ACI.0b013e32832d6315. PMID: 19474706.
68. Yu MC, Tsai CL, Yang YJ, Yang SS, Wang LH, Lee CT, Jan RL, Wang JY. Allergic colitis in infants related to cow's milk: clinical characteristics, pathologic changes, and immunologic findings. *Pediatr Neonatol*. 2013 Feb;54(1):49-55. doi: 10.1016/j.pedneo.2012.11.006. Epub 2013 Jan 11. PMID: 23445743.
69. Nocerino R, Pezzella V, Cosenza L, Amoroso A, Di Scala C, Amato F, Iacono G, Canani RB. The controversial role of food allergy in infantile colic: evidence and clinical management. *Nutrients*. 2015 Mar 19;7(3):2015-25. doi: 10.3390/nu7032015. PMID: 25808260; PMCID: PMC4377897.
70. Wood JD. Histamine, mast cells, and the enteric nervous system in the irritable bowel syndrome, enteritis, and food allergies. *Gut*. 2006 Apr;55(4):445-7. doi: 10.1136/gut.2005.079046. PMID: 16531524; PMCID: PMC1856149.
71. Saavedra Y, Vergara P. Hypersensitivity to ovalbumin induces chronic intestinal dysmotility and increases the number of intestinal mast cells. *Neurogastroenterol Motil*. 2005 Feb;17(1):112-22. doi: 10.1111/j.1365-2982.2004.00597.x. PMID: 15670271.
72. Murch S. Allergy and intestinal dysmotility--evidence of genuine causal linkage? *Curr Opin Gastroenterol*. 2006 Nov;22(6):664-8. doi: 10.1097/01.mog.0000245546.18279.7e. PMID: 17053446.

73. Lucassen PL, Assendelft WJ, van Eijk JT, Gubbels JW, Douwes AC, van Geldrop WJ. Systematic review of the occurrence of infantile colic in the community. *Arch Dis Child*. 2001 May;84(5):398-403. doi: 10.1136/adc.84.5.398. PMID: 11316682; PMCID: PMC1718751.
74. Wessel MA, Cobb JC, Jackson EB, Harris GS Jr, Detwiler AC. Paroxysmal fussing in infancy, sometimes called colic. *Pediatrics*. 1954 Nov;14(5):421-35. PMID: 13214956.
75. Benninga MA, Faure C, Hyman PE, St James Roberts I, Schechter NL, Nurko S. Childhood Functional Gastrointestinal Disorders: Neonate/Toddler. *Gastroenterology*. 2016 Feb 15:S0016-5085(16)00182-7. doi: 10.1053/j.gastro.2016.02.016. Epub ahead of print. PMID: 27144631.
76. Vandenplas Y, Gutierrez-Castrellon P, Velasco-Benitez C, Palacios J, Jaen D, Ribeiro H, Shek LP, Lee BW, Alarcon P. Practical algorithms for managing common gastrointestinal symptoms in infants. *Nutrition*. 2013 Jan;29(1):184-94. doi: 10.1016/j.nut.2012.08.008. Epub 2012 Nov 6. Erratum in: *Nutrition*. 2013 Apr;29(4):702. Shek, Pei-Chi Lynette [corrected to Shek, Lynette Pei-Chi]. PMID: 23137717.
77. Shergill-Bonner R. Infantile colic: practicalities of management, including dietary aspects. *J Fam Health Care*. 2010;20(6):206-9. PMID: 21319674.
78. Hall B, Chesters J, Robinson A. Infantile colic: a systematic review of medical and conventional therapies. *J Paediatr Child Health*. 2012

- Feb;48(2):128-37. doi: 10.1111/j.1440-1754.2011.02061.x. Epub 2011 Apr 7. PMID: 21470331.
79. Heine RG. Gastrointestinal food allergies. *Chem Immunol Allergy*. 2015;101:171-80. doi: 10.1159/000371700. Epub 2015 May 21. PMID: 26022877.
 80. Bergmann MM, Caubet JC, McLin V, Belli DC, Schäppi MG, Eigenmann PA. Common colic, gastroesophageal reflux and constipation in infants under 6 months of age do not necessitate an allergy work-up. *Pediatr Allergy Immunol*. 2014 Jun;25(4):410-2. doi: 10.1111/pai.12199. Epub 2014 Jan 20. PMID: 24438166.
 81. Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, Roberts G, Beyer K, Bindslev-Jensen C, Cardona V, Dubois A, duToit G, Eigenmann P, Fernandez Rivas M, Halken S, Hickstein L, Høst A, Knol E, Lack G, Marchisotto MJ, Niggemann B, Nwaru BI, Papadopoulos NG, Poulsen LK, Santos AF, Skypala I, Schoepfer A, Van Ree R, Venter C, Worm M, Vlieg-Boerstra B, Panesar S, de Silva D, Soares-Weiser K, Sheikh A, Ballmer-Weber BK, Nilsson C, de Jong NW, Akdis CA; EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy*. 2014 Aug;69(8):1008-25. doi: 10.1111/all.12429. Epub 2014 Jun 9. PMID: 24909706.
 82. Roberts G, Pfaar O, Akdis CA, Ansotegui IJ, Durham SR, Gerth van Wijk R, Halken S, Larenas-Linnemann D, Pawankar R, Pitsios C, Sheikh A, Worm M, Arasi S, Calderon MA, Cingi C, Dhami S, Fauquert JL, Hamelmann E, Hellings P, Jacobsen L, Knol EF, Lin SY, Maggina P, Mösges R, Oude Elberink JNG, Pajno GB, Pastorello

- EA, Penagos M, Rotiroti G, Schmidt-Weber CB, Timmermans F, Tsilochristou O, Varga EM, Wilkinson JN, Williams A, Zhang L, Agache I, Angier E, Fernandez-Rivas M, Jutel M, Lau S, van Ree R, Ryan D, Sturm GJ, Muraro A. EAACI Guidelines on Allergen Immunotherapy: Allergic rhinoconjunctivitis. *Allergy*. 2018 Apr;73(4):765-798. doi: 10.1111/all.13317. Epub 2017 Oct 30. PMID: 28940458.
83. Mauer Y, Taliercio RM. Managing adult asthma: The 2019 GINA guidelines. *Cleve Clin J Med*. 2020 Aug 31;87(9):569-575. doi: 10.3949/ccjm.87a.19136. PMID: 32868307.
84. Atopic eczema in under 12s: diagnosis and management. London: National Institute for Health and Care Excellence (NICE); 2023 Jun 7. PMID: 34101396.
85. Rasquin A, Di Lorenzo C, Forbes D, Guiraldes E, Hyams JS, Staiano A, Walker LS. Childhood functional gastrointestinal disorders: child/adolescent. *Gastroenterology*. 2006 Apr;130(5):1527-37. doi: 10.1053/j.gastro.2005.08.063. PMID: 16678566; PMCID: PMC7104693.
86. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó I, Kurppa K, Mearin ML, Ribes-Koninckx C, Shamir R, Troncone R, Auricchio R, Castillejo G, Christensen R, Dolinsek J, Gillett P, Hróbjartsson A, Koltai T, Maki M, Nielsen SM, Popp A, Størdal K, Werkstetter K, Wessels M. European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2020 Jan;70(1):141-156. doi: 10.1097/MPG.0000000000002497. PMID: 31568151.

87. Ringold S, Angeles-Han ST, Beukelman T, Lovell D, Cuello CA, Becker ML, Colbert RA, Feldman BM, Ferguson PJ, Gewanter H, Guzman J, Horonjeff J, Nigrovic PA, Ombrello MJ, Passo MH, Stoll ML, Rabinovich CE, Schneider R, Halyabar O, Hays K, Shah AA, Sullivan N, Szymanski AM, Turgunbaev M, Turner A, Reston J. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Treatment of Juvenile Idiopathic Arthritis: Therapeutic Approaches for Non-Systemic Polyarthritis, Sacroiliitis, and Entesitis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2019 Jun;71(6):717-734. doi: 10.1002/acr.23870. Epub 2019 Apr 25. PMID: 31021516; PMCID: PMC6561125.
88. Mayer-Davis EJ, Kahkoska AR, Jefferies C, Dabelea D, Balde N, Gong CX, Aschner P, Craig ME. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2018 Oct;19 Suppl 27(Suppl 27):7-19. doi: 10.1111/pedi.12773. PMID: 30226024; PMCID: PMC7521365.
89. Levine A, Koletzko S, Turner D, Escher JC, Cucchiara S, de Ridder L, Kolho KL, Veres G, Russell RK, Paerregaard A, Buderus S, Greer ML, Dias JA, Veereman-Wauters G, Lionetti P, Sladek M, Martin de Carpi J, Staiano A, Ruemmele FM, Wilson DC; European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. ESPGHAN revised porto criteria for the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014 Jun;58(6):795-806. doi: 10.1097/MPG.0000000000000239. PMID: 24231644.

90. J Andrew Bird, Stephanie Leonard, Marion Groetch, Amal Assa'ad, Antonella Cianferoni, April Clark, Maria Crain, Tracy Fausnight, David Fleischer, Todd Green, Matthew Greenhawt, Linda Herbert, Bruce J Lanser, Irene Mikhail, Shahzad Mustafa, Sally Noone, Christopher Parrish, Pooja Varshney, Berber Vlieg-Boerstra, Michael C Young, Scott Sicherer, Anna Nowak-Wegrzyn. Conducting an Oral Food Challenge: An Update to the 2009 Adverse Reactions to Foods Committee Work Group Report. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020 Jan;8(1):75-90.e17. PMID: 31950914. DOI: 10.1016/j.jaip.2019.09.029.

91. Rabe-Hesketh S, Skrondal A. *Multilevel and Longitudinal Modeling Using Stata, Volumes I and II.* Stata Press 2021.

92. Pepe M. *The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction.* Oxford University Press 2004.

93. Galip N, Yuruker O, Babayigit A. Characteristics of allergic proctocolitis in early infancy; accuracy of diagnostic tools and factors related to tolerance development. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2021 Sep 5. doi: 10.12932/AP-160221-1068. Epub ahead of print. PMID: 34542304.

94. Díaz JJ, Espín B, Segarra O, Domínguez-Ortega G, Blasco-Alonso J, Cano B, Rayo A, Moreno A; Gastrointestinal Allergy Working Group of the Spanish Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (SEGHNP). Food Protein-induced Enterocolitis Syndrome: Data From a Multicenter Retrospective Study in Spain. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2019 Feb;68(2):232-236. doi: 10.1097/MPG.0000000000002169. PMID: 30320669.

95. Vieira MC, Morais MB, Spolidoro JV, Toporovski MS, Cardoso AL, Araujo GT, Nudelman V, Fonseca MC: A survey on clinical presentation and nutritional status of infants with suspected cow' milk allergy. *BMC Pediatr* 2010, 10:25. doi: 10.1186/1471-2431-10-25. PMID: 20416046; PMCID: PMC2873518.

96. Canani RB, Ruotolo S, Auricchio L, Caldore M, Porcaro F, Manguso F, Terrin G, Troncone R. Diagnostic accuracy of the atopy patch test in children with food allergy-related gastrointestinal symptoms. *Allergy*. 2007 Jul;62(7):738-43. doi: 10.1111/j.1398-9995.2007.01351.x. PMID: 17573720.

97. Nocerino R, Granata V, Di Costanzo M, Pezzella V, Leone L, Passariello A, Terrin G, Troncone R, Berni Canani R. Atopy patch tests are useful to predict oral tolerance in children with gastrointestinal symptoms related to non-IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergy*. 2013 Feb;68(2):246-8. doi: 10.1111/all.12071. Epub 2012 Dec 4. PMID: 23205566.

98. Lemoine A, Lemale J, Aroulandom J, Tounian P. Rectal bleeding and cow's milk protein-induced allergic proctocolitis: A prospective study. *Clin Exp Allergy*. 2021 Sep;51(9):1242-1245. PMID: 33960550. DOI: 10.1111/cea.13896.

99. Wong S, Duan L, Galper A, Atkinson A, Upton J, Eiwegger T. Food protein-induced enterocolitis syndrome in a tertiary pediatric center: safety of guideline-conforming food challenges. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2022 Jun 16;18(1):54. PMID: 35710451. PMCID: PMC9202320. DOI: 10.1186/s13223-022-00694-y.

100. Blackman AC, Anvari S, Davis CM, Anagnostou A. Emerging triggers of food protein-induced enterocolitis syndrome: Lessons from a pediatric cohort of 74 children in the United States. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2019 Apr;122(4):407-411. doi: 10.1016/j.anai.2019.01.022. Epub 2019 Feb 10. PMID: 30742916.
101. Guest JF, Valovirta E. Modelling the resource implications and budget impact of new reimbursement guidelines for the management of cow milk allergy in Finland. *Curr Med Res Opin.* 2008 Apr;24(4):1167-77. doi: 10.1185/030079908x280455. Epub 2008 Mar 13. PMID: 18341760.
102. Nowak-Węgrzyn A, Katz Y, Mehr SS, Koletzko S. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 May;135(5):1114-24. doi: 10.1016/j.jaci.2015.03.025. PMID: 25956013.
103. Swain, LK. Narrative review of the role of inflammation in gastroesophageal reflux disease. Can food allergies play a part? *Lifestyle Med.* 2021; 2:e35. <https://doi.org/10.1002/lim2.35>.
104. El-Hodhod MA, Younis NT, Zaitoun YA, Daoud SD. Cow's milk allergy related pediatric constipation: appropriate time of milk tolerance. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010 Mar;21(2 Pt 2):e407-12. doi: 10.1111/j.1399-3038.2009.00898.x. Epub 2009 Jun 25. PMID: 19555354.
105. Koksall BT, Baris Z, Ozcay F, Yilmaz Ozbek O. Single and multiple food allergies in infants with proctocolitis. *Allergol Immunopathol*

- (Madr). 2018 Jan-Feb;46(1):3-8. doi: 10.1016/j.aller.2017.02.006. Epub 2017 Jul 22. PMID: 28739021.
106. Sánchez-Valverde F, Etayo V, Gil F, Aznal E, Martínez D, Amézqueta A, Mendizábal M, Galbete A, Pastor N, Vanderhoof J. Factors Associated with the Development of Immune Tolerance in Children with Cow's Milk Allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2019;179(4):290-296. doi: 10.1159/000499319. Epub 2019 May 16. PMID: 31096239.
 107. Tan W, Zhou Z, Li W, Lu H, Qiu Z. *Lactobacillus rhamnosus* GG for Cow's Milk Allergy in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Pediatr*. 2021 Oct 22;9:727127. doi: 10.3389/fped.2021.727127. PMID: 34746056; PMCID: PMC8569903.
 108. Berni Canani R, Nocerino R, Terrin G, Frediani T, Lucarelli S, Cosenza L, Passariello A, Leone L, Granata V, Di Costanzo M, Pezzella V, Troncone R. Formula selection for management of children with cow's milk allergy influences the rate of acquisition of tolerance: a prospective multicenter study. *J Pediatr*. 2013 Sep;163(3):771-7.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.03.008. Epub 2013 Apr 10. PMID: 23582142.
 109. Mehr S, Kakakios A, Frith K, Kemp AS. Food protein-induced enterocolitis syndrome: 16-year experience. *Pediatrics*. 2009 Mar;123(3):e459-64. doi: 10.1542/peds.2008-2029. Epub 2009 Feb 2. PMID: 19188266.

110. Carucci L, Nocerino R, Paparo L, Di Scala C, Berni Canani R. Dietary Prevention of Atopic March in Pediatric Subjects With Cow's Milk Allergy. *Front Pediatr.* 2020 Aug 11;8:440. doi: 10.3389/fped.2020.00440. PMID: 32850553; PMCID: PMC7431922.
111. Berni Canani R, Di Costanzo M, Bedogni G, Amoroso A, Cosenza L, Di Scala C, Granata V, Nocerino R. Extensively hydrolyzed casein formula containing *Lactobacillus rhamnosus* GG reduces the occurrence of other allergic manifestations in children with cow's milk allergy: 3-year randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Jun;139(6):1906-1913.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2016.10.050. Epub 2016 Dec 30. PMID: 28043872.
112. Ruffner MA, Wang KY, Dudley JW, Cianferoni A, Grundmeier RW, Spergel JM, Brown-Whitehorn TF, Hill DA. Elevated Atopic Comorbidity in Patients with Food Protein-Induced Enterocolitis. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020 Mar;8(3):1039-1046. doi: 10.1016/j.jaip.2019.10.047. Epub 2019 Nov 20. PMID: 31759160; PMCID: PMC7064432.
113. Cetinkaya PG, Ocak M, Sahiner UM, Sekerel BE, Soyer O. Food protein-induced allergic proctocolitis may have distinct phenotypes. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2021 Jan;126(1):75-82. doi: 10.1016/j.anai.2020.08.021. Epub 2020 Aug 25. PMID: 32853787.
114. Saps M, Lu P, Bonilla S. Cow's-milk allergy is a risk factor for the development of FGIDs in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011 Feb;52(2):166-9. doi: 10.1097/MPG.0b013e3181e85b55. PMID: 20975580.

115. Di Nardo, G.; Cremon, C.; Frediani, S.; Lucarelli, S.; Villa, M.P.; Stanghellini, V.; La Torre, G.; Martemucci, L.; Barbara, G. Allergic Proctocolitis Is a Risk Factor for Functional Gastrointestinal Disorders in Children. *J. Pediatr.* 2018, 195, 128–133.e1. PMID: 29352590. DOI: 10.1016/j.jpeds.2017.10.073.
116. Harrold LR, Salman C, Shoor S, Curtis JR, Asgari MM, Gelfand JM, Wu JJ, Herrinton LJ. Incidence and prevalence of juvenile idiopathic arthritis among children in a managed care population, 1996-2009. *J Rheumatol.* 2013 Jul;40(7):1218-25. doi: 10.3899/jrheum.120661. Epub 2013 Apr 15. PMID: 23588938; PMCID: PMC5657479.
117. Luo Y, Zhang GQ, Li ZY. The diagnostic value of APT for food allergy in children: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Allergy Immunol.* 2019 Jun;30(4):451-461. doi: 10.1111/pai.13031. Epub 2019 Mar 3. PMID: 30703250.
118. Adel-Patient K, Lezmi G, Castelli FA, Blanc S, Bernard H, Soulaïnes P, Dumond P, Ah-Leung S, Lageix F, de Boissieu D, Cortes-Perez N, Hazebrouck S, Fenaille F, Junot C, Dupont C. Deep analysis of immune response and metabolic signature in children with food protein induced enterocolitis to cow's milk. *Clin Transl Allergy.* 2018 Sep 28;8:38. doi: 10.1186/s13601-018-0224-9. PMID: 30275944; PMCID: PMC6161449.
119. Chi VLD, Garaud S, De Silva P, Thibaud V, Stamatopoulos B, Berehad M, Gu-Trantien C, Krayem M, Duvillier H, Lodewyckx JN, Willard-Gallo K, Sibille C, Bron D. Age-related changes in the

- BACH2 and PRDM1 genes in lymphocytes from healthy donors and chronic lymphocytic leukemia patients. *BMC Cancer*. 2019 Jan 17;19(1):81. doi: 10.1186/s12885-019-5276-2. PMID: 30654767; PMCID: PMC6337793.
120. Cimmino L, Martins GA, Liao J, Magnusdottir E, Grunig G, Perez RK, Calame KL. Blimp-1 attenuates Th1 differentiation by repression of ifng, tbx21, and bcl6 gene expression. *J Immunol*. 2008 Aug 15;181(4):2338-47. doi: 10.4049/jimmunol.181.4.2338. PMID: 18684923.
 121. Pène J, Rousset F, Brière F, Chrétien I, Bonnefoy JY, Spits H, Yokota T, Arai N, Arai K, Banchereau J, et al. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Sep;85(18):6880-4. doi: 10.1073/pnas.85.18.6880. PMID: 2970644; PMCID: PMC282082.