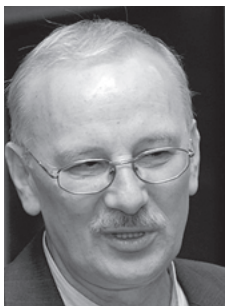


Nie tylko alergeny mleko krowie

Not only allergens- cow's milk



Prof. dr hab. n. med.
Krzysztof Buczyłko

Kierownik NZOZ
Centrum Alergologii
w Łodzi

S U M M A R Y

Cow milk protein (CMP) are ones of the first allergens sources introduced into human diet, which induces symptoms ranging from gastrointestinal, skin, and respiratory manifestations to anaphylaxis. According to clinical presentations and allergy testing, there are three types of CMP allergy (CMPA): IgE mediated, mixed (IgE/Non-IgE), and non-IgE mediated (cellular, delayed type). Children with IgE-mediated CMPA had a marked Th2-response, with high IL-13 production and proliferation, but low IFN- γ ; by contrast, children with non-IgE-mediated CMPA produced no, or very low, IL-13 and cell proliferation. APT has a role in the detection of gastrointestinal manifestations of CMPA. Numerous CMP components, such as lactoferrin, are recognized as health-promoting compounds. The oral food challenge is the gold standard for CMPA diagnosis and there is currently no reliable biological test. CMP hydrolysates are frequently used as milk substitutes for children with CMPA. T-cell-stimulatory capacity was less affected by hydrolysis. Detailed analysis of IgE and IgG4 binding to CMP may help in predicting whether CMP OIT will be tolerated successful

Białka mleka krowiego (BMK) są jednymi z pierwszych źródeł alergenów w diecie człowieka, które mogą wyzwać objawy obejmujące przewód pokarmowy, skórę i układ oddechowy oraz anafilaksję. Według symptomów klinicznych i testów alergicznych wyróżniamy 3 typy alergii na BMK (ABMK): zależny od IgE, mieszany (IgE/nie IgE) oraz nie IgE zależny (komórkowy, typu późnego) Dzieci z IgE zależną ABMK mają profil odpowiedzi Th2, z wysoką produkcją IL-13 oraz proliferacją, lecz niskim IFN- γ , z kolei dzieci z nie-IgE zależną ABMK prawie nie wytwarzają IL-13, ani proliferacji. APT mają znaczenie w rozpoznawaniu jelitowych form ABMK. Niektóre komponenty mleka, jak laktoferyna, zostały zaliczone do składników pro-zdrowotnych. Doustna próba prowokacyjna pozostaje złotym standardem w diagnostyce ABMK, nadal bowiem nie ma jednoznacznego testu biologicznego. Hydrolizaty BMK są często stosowane jako substytuty dla dzieci z ABMK. Zdolność do stymulacji komórek T jest mniej podatna na hydrolizę. Szczegółowa analiza wiązania IgE i IgG4 do BMK może pomagać w przewidywaniu czy OIT z BMK będzie tolerowane z powodzeniem

Buczyłko K.: Nie tylko alergeny: mleko krowie. *Alergia*, 2018, 2; 18-24

Słowa kluczowe:
Bos d 4, Bos d 5, Bos
d 6-7, Bos d 8,-9,-
10,-11,-12 Bos d Lf,
laktoza, histamina, pre/
probiotyki

Key words:
Key words: Bos d 4,
Bos d 5, Bos d 6-7
Bos d 8-9,-10,-11,-12,,
Bos d Lf, lactose,
histamine, pre/
probiotics

Mleko jest jednym z pierwszych pokarmów w diecie człowieka, a zarazem jednym z wczesnych źródeł alergii. Wyzwalać może objawy IgE zależne, IgE niezależne oraz mieszane. Obejmują one przewód pokarmowy, skórę oraz układ oddechowy, a także ciężkie, zagrażające życiu, uogólnione reakcje anafilaktyczne [1]. Pisana wiedza o mleku, jako pokarmie i leku sięga starożytności. Łódzcy historycy odnotowali w pismach bizantyjskich o mleku, już w pierwszych wiekach naszej ery, opinię: „Te same produkty przyrządzone na rozmaite sposoby mogą przyczynić się do generowania dobrych lub złych soków. Tą pierwszą grupę określano przymiotnikiem eúchyma, natomiast w odniesieniu do drugiej używano epitetu kakóchyma [2]. Obecnie potrafimy precyzyjnie określić, które z zawartych w mleku molekuł białkowych, cukrów czy innych substancji są szkodliwe, w zależności od oporności na temperaturę lub inne cechy, więc generują u niektórych „złe soki”, czyli objawy alergii i/lub nietolerancji.

Współczesne technologie mleczarskie

Smak i aromat mleka pitnego świeżego lub poddawanego procesowi pasteryzacji lub sterylizacji zależy od warunków hodowli (rasa, pasza, higiena), technologii pro-

dukcji, dodatków spożywczych [3]. Niebagatelny wpływ ma też ilość produktów reakcji nieenzymatycznej glikacji Maillarda redukującej laktozę (smak przypalenia) czy proteolizy i lipolizy poprzez produkty Amadori. Laktozylacja może prowadzić do powstania nowych antygenów podobnych do haptenu [4]. W serach czy jogurtach istotny jest poziom kwasowości i rodzaj szczepionki (*L. thermophilus*, *bulgaricus* itp.) [3]. Pasteryzacja to proces podgrzewania mleka w temp. 75-90 °C przez 15 sek., dla eliminacji aktywności drobnoustrojów. Metoda ta nie jest w pełni skuteczna, mleka pasteryzowane należy trzymać w lodówce i spożyć do 2 dob po otwarciu. Mleko tłuste jest lepiej przyswajalne. UHT- „ultra high temperature processing”, sterylizacja mleka w temp. 120-135 °C, przez kilka sekund, natychmiastowe schłodzenie. Giną wszelkie bakterie, także prozdrowotne. „Uchate” traci też w stosunku do mleka „prosto od krowy” witaminy z grupy B, witaminę C i kwas foliowy. Kazeina ulega daleko idącej denaturacji, zawarty w niej wapń ulega wytrąceniu i trzeba go uzupełniać sztucznie chlorkiem wapnia [5]. Hydrolizaty mleka krowiego są często używane, jako substytut mleka u dzieci z alergią na białka mleka krowiego- (ABMK). Po 15 minutach hydrolizy większość białek ulega degradacji, co powoduje w doświadczeniu na myszach 92%



zahamowanie degranulacji mastocytów oraz 82% redukcję obrzęku mażowiny usznej. Natomiast zdolność do stymulacji ludzkich komórek T pozostaje mniej zaburzona, bo tylko w 9%. Można zwiększyć ten efekt do 74%, lecz dopiero po 45 minutach hydrolizy [6]. W przemyśle mleczarskim koncentraty białek serwatkowych wytwarzane są głównie za pomocą technik membranowych [7]. Dostępne w handlu produkty zawierają od 35 do 80 % białka w suchej masie, do ponad 90% w izolatach białek serwatkowych. Dzięki wysokiej zawartości α -laktoalbumina mają własności zbliżone do białek mleka kobiecego. Obecna w nich frakcja immunoglobulin wspomaga system odpornościowy [3]. Znajdują zastosowanie w mleku humanizowanym, mlecznych mieszankach kazeinowo-serwatkowych, odżywkach dla niemowląt oraz mieszankach mlecznych dla dzieci starszych oraz produktach takich, jak serki śmietankowe, topione, serki i pasty do smarowania, pieczywo, kremy i nadzienia cukiernicze, zupy, sosy, dressingi, lody, desery [5]. Poziom białka w mleku krowim zależy od pasz dostarczających energii mikroorganizmom żwacza oraz ilości pasz białkowych. Jeśli jednak pula energii dostarczonej do żwacza będzie niewystarczająca, drobnoustroje nie będą miały z czego syntetyzować tego składnika, a nadmiar białka (amoniaku – bo taka forma występuje w żwaczu) zostanie przekształcony przez mechanizmy obronne krwi do mocznika i wydalony z organizmu (np. w mleku) [4].

stratu w reakcjach enzymatycznej syntezy prebiotycznych galaktooligosacharydów(GOS) [9]. Około 1/3 Polaków cierpi z powodu nietolerancji laktozy. Oznacza to, że nie mają laktazy, czyli enzymu rozkładającego mleczny cukier. Problem rozwiązuje mleko bez laktozy lub suplement diety zawierający laktazę, dostępne w sklepach. Fizjologiczny niedobór laktazy, ma ok. 37 % Polaków, 70% Włochów, do 100% Afrykanów i Azjatów.

Nietolerancja histaminy

Nietolerancja histaminy (NH) w produktach mlecznych objawia się bólami głowy, pokrzywką oraz zaburzeniami ze strony układu pokarmowego. Dodatkowymi symptomami NH może być migrena, hypotonia, duszność, kaszel, świszczący oddech, nieżyt nosa, arytmia.



Zawartość histaminy w serach żółtych i białych [11]

Sery dojrzewające:	w mg/kg	Sery białe	w mg/kg
Cheddar	0-20 000	Mozzarella	0
Camembert	0-10 000	Ser śmietankowy	0
Gouda	100- 9000	Ser wiejski	1-30
Parmezan	100- 5800	Ser owczy	0-60
		Brie- Feta	35-40

Niealergiczne składowe mleka i wyrobów mleczarskich

Nieimmunologiczne rodzaje nietolerancji pokarmowej mleka i jego przetworów dotyczą około 15-20%, natomiast klasyczne postaci alergii pokarmowej 2- 2,5 % populacji [1]. Niezbędnym elementem właściwego postępowania jest zrozumienie różnicy pomiędzy reakcją alergiczną, a nietolerancją składników mleka o innym patomechanizmie np. enzymatycznym [8].

Nietolerancja laktozy

Laktoza (C12 H22O11.2H2O) Dwucukier (glukoza –galaktoza),masa cząsteczkowa 378,33, otrzymywany przez krystalizację zagęszczonej serwatki. Forma uwodniona alfa- laktoza, nieuwodniona β -laktoza, w roztworach w równowadze. Laktoza obecna w słodkim mleka, jest jednym z głównych substratów reakcji chemicznych, których celem jest zwiększenie wartości użytkowej żywności funkcjonalnej [9]. Jako substancja słodząca i stabilizator dodawana do słodczy, napojów, wędlin fermentowanych (salami), szynki, deserów, lodów [5]. Znajduje się także w maśle klarowanym.

Laktoza działa korzystnie nie tylko na florę bakteryjną jelit, ale równolegle wspomaga wchłanianie wapnia. Mieszanki bez laktozy zmniejszają wchłanianie wapnia o 25% [10].

Laktoza może być substratem w reakcjach hydrolizy, fruktozylotransferu, transgalaktozylacji, izomeryzacji, oksydacji i redukcji, w wyniku których powstają odpowiednio: glukoza i galaktoza, laktosacharoza, galaktooligosacharydy, laktuloza, kwas laktobionowy i laktikol. Obecnie duże zainteresowanie towarzyszy zastosowaniu laktozy jako sub-

Po spożyciu niektórych serów (głównie twarde, dojrzewające) występują objawy identyczne jak w alergii na mleko, przy ujemnych punktowych testach skórnych (PTS) oraz /lub sIgE (-), sugerując nietolerancję z niedoboru DAO. Niektórzy chorzy z AMBK wykazują dodatkowo niedobory DAO, co nasila ciężkość choroby. Rozpoznanie budują wywiady, DAO poniżej 10,7 IU/ml surowicy(laboratorium Synevo), poprawa po krótkotrwałej diecie nisko- histaminowej plus skuteczność suplementu diety Histasolv, zarówno w przypadkach NH izolowanej jak i powiązanej z alergią [11].

Probiotyki i prebiotyki

Bakterie fermentacji mlekowej obejmują szczepy *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus*, *L. plantarum Bifidobacterium bifidum*. Ich korzystny wpływ na zdrowie polega na zapobieganiu zaparciom, nowotworom jelita grubego, obniża poziom cholesterolu i stymuluje układ odpornościowy [12] Galaktooligosacharydy (GOS) są naturalnymi składnikami mleka, a także niektórych owoców i warzyw. GOS traktowano, jako mało ważne składniki żywności, m.in. ze względu na niewielką słodkość, słabą rozpuszczalność w wodzie i małą strawność. Obecnie GOS zalicza się do prebiotyków, tj. składników żywności nieulegających trawieniu w górnych odcinkach przewodu pokarmowego i będących składnikiem odżywczym dla pożytecznych bakterii bytujących w okrężnicy, głównie z rodzaju *Bifidobacterium i Lactobacillus*. Zaleca się spożywanie GOS w dawce około 3 g dziennie, a produkty zawierające GOS zalicza się do żywności prozdrowotnej. Znajdują zastosowanie, jako zamienniki sacharozы m.in. do produkcji gumy do żucia oraz żywno-

ści funkcjonalnej dla diabetyków i osób starszych. Preparaty GOS stosowane są w produkcji odżywek dla dzieci, jogurtów, deserów, mleka lub maślanki w proszku [9].

Epidemiologia alergii na białka mleka

Dane Brytyjskiego Towarzystwa Alergii i Immunologii Klinicznej nie potwierdzają panującego powszechnie przekonania o narastaniu skali zjawiska, bowiem największy odsetek odnotowano w badaniu opublikowanym w roku 1993. Obecnie ocena występowania alergii na mleko jest zróżnicowana i waha się od 1,8 % do 7,5% [13]. Wg innych danych obejmujących samoobserwację pacjentów wynosi 1,2-17%. Na podstawie dodatknych PTS lub sIgE – 2-9%; natomiast według dodatknych prób prowokacji 0-3% [14]. W Australii mleko jest trzecią po białku jaja i orzeszkach ziemnych przyczyną alergii u dzieci [13]. Inne statystyki oscylują wokół 2-3% niemowląt [8, 15]. Randomizowane badania w USA

d 9, Bos d 10, Bos d 11, Bos d 12) [8,10,13,18]. Z innych białek mleka wyróżnia się głównie otoczki kuleczek tłuszczowych (MFGM – milk fat globule membrane) W skład MFGM wchodzi: białka – 41%, fosfolipidy – 27%, cerebrozydy – 3%, cholesterol – 2%, neutralne glicerydy – 14%, woda – 13% [3, 5].

Bos d 4 α -laktoalbumina

Bos d 4 α -laktoalbumina (inaczej ALA, f76.) Jest to monomeryczne białko globularne, stanowiące od 5% [10] do 25% białek serwatkowych [8]. W wartościach bezwzględnych około 0,1 -0,15 g/100 ml [10]. Bos d 4 wiąże kationy (Zn, Ca) ułatwia wchłanianie minerałów [19]. Pełni funkcje regulatorowe w procesie syntezy laktozy. Należy do alergenów głównych [8]. Może uczulać od 0 do 80% pacjentów [17].

Uczulenie na tą molekułę niesie ryzyko reakcji alergicznej po spożyciu surowego mleka, które maleje po ugotowaniu.

Wzrost tolerancji na Bos d 4 manifestuje się spadkiem poziomu sIgE w kolejnych oznaczeniach.

Bos d 5 β -laktoglobulina

Bos d 5 β -laktoglobulina (inaczej BLG, f77) Należy do lipokalin- panalergenu ssaków. Białko termolabilne przy temperaturze poniżej 120 C [10], ryzyko reakcji alergicznej głównie na surowe mleko [20]. Stanowi 10% [10] do 50% [8] białek serwatkowych, tj. 0,3- 0,4 g/100 ml, co stanowi ok. 10% zawartości proteinowej mleka [8]. Jest to białko związane z laktozą i bardzo odporne na działanie pepsyny i pasteryzację [10]. W mleku kobiecym nie występuje homolog Bos d 5 [8], ale u 50-90% karmiących matek można je wykryć po kilku godzinach od spożycia mleka krowiego [10]. Występuje także w mleku wielu innych ssaków. Około 13-76% chorych prezentuje objawy na ten alergen [17]. Wykazano, że w przeciętnym gospodarstwie domowym stężenie Bos d 5 w kurzu domowy jest podobne lub wyższe niż w mleku matki [10]. Bos d 5 zawiera kilka epitopów wiążących sIgE w różnych partiach struktury trzeciorzędowej białka. Podobnie do innych lipokalin wiąże m. in. retinol, beta- karoten i kwasy tłuszczowe.

Dzięki oporności na trawienie w żołądku jest nośnikiem witaminy A.

Proces fermentacji mleka np. w jogurtach powoduje zmniejszenie wiązania epitopów Bos d 5 z sIgE [8]. Zawartość BLG w mleku krowim 4 000 000 mikrogramów/l, w mieszance mlecznej Nan 1 1320 000 mcg/l, w mleku kobiecym 0,9- 150 mcg/l, w hydrolizacie kazeiny Nutramigen 1,2 oraz Nan HA 48-180 [10].

Bos d 6 surowicza albumina wołowa

Bos d 6 (surowicza albumina wołowa, BSA, inaczej e204) Jest słabym alergenem mleka, lecz silnym (głównym) mięsa wołowego [8] Jest to białko zbliżone strukturalnie do albuminy obecnej w surowicy krwi człowieka [10]. Obejmuje 1% białek serwatkowych, tj 0,01- 0,04 g/100 ml. Ma bardzo istotne znaczenie w organizmie krów, ze względu na swoją zdolność wiązania ligandów, a następnie transportowania ich do różnych miejsc ustroju.

2
Tab.

Alergeny molekularne nabiału będące markerami trwałej alergii [17,20, 22]

Nazwa cząsteczki wg	Nazwa zwyczajowa	Ryzyko anafilaksji
Bos d 5	Beta laktoglobulina mleka krowiego	umiarkowane
Bos d 8	Kazeina mleka ssaków (90% homologii m.in. z kazeiną kozią i owczą)	wysokie
Gal d 1	Owomukoid jaja kurzego	wysokie

przeprowadzono wśród rodziców 38 480 dzieci, rozpoznając alergię pokarmową w 3218 przypadkach, w tym 657 (19,9%) na mleko. Najwyższy odsetek uczulonych na mleko dotyczył dzieci w wieku 6-10 lat, a najmniejszy 11-15 lat. Niemal 1/3 dzieci doznała ciężkich reakcji [16].

Białkowe komponenty alergiczne mleka

Według różnych autorów mleko krowie składa się z około 40 białek, czyli potencjalnych alergenów [10]. Inni podają 20-30 białek, które mogą uczulać [17] albo tylko 20, z podkreśleniem roli alergenów głównych [8]. Z drugiej strony pacjenci traktują mleko, jak jeden alergen, a nie ich mieszaninę Tymczasem ranking częstości występowania sIgE dla komponent alergenów mleka w Polsce otwierają BSA i laktoalbumina, a zamyka kazeina [15]. Coraz szersze zastosowanie alergenów rekombinowanych pozwoliło zweryfikować identyfikację, jakość, homogenność, strukturę, rozpuszczalność, stabilność, siłę wiązania z sIgE oraz biologiczną aktywność cząsteczek alergenowych (komponent) Takich właśnie molekuł mleka krowiego wymienionych w oficjalnej liście WHO-UIUS [18] jest obecnie 20, w tym 9 cząsteczek to nieznacznie różniące się warianty: Bos d 10, Bos d 10.0101, Bos d 11, Bos d 11.0101, Bos d 12, Bos d 12.0101, Bos d 4, Bos d 4.0101, Bos d 5, Bos d 5.0101, Bos d 5.0102, Bos d 6, Bos d 6.0101, Bos d 7, Bos d 7.0101, Bos d 8, Bos d 9, Bos d 9.0101, Bos d Lactoperoxidase, Bos d LF (laktoferyna) [18]. Wyróżnia się 2 podstawowe grupy frakcji białek mleka krowiego (BMK) grupę białek serwatkowych (Bos d 4, Bos d 5, Bos d 6, Bos d 7) i grupę kazein (mieszanina Bos d 8, izoformy Bos



Stwarza ryzyko reakcji alergicznych na surowe mleko i surowe mięso wołowe [8].

Jest też markerem ryzyka dla reakcji układowych, na przykład podczas procedur zapłodnienia in vitro, terapii komórkowej lub innych zabiegach medycznych, podczas których wstrzykuje się albuminę jako medium [20]. Po poddaniu BSA temperaturze 180 °C przez 30 minut lub 220 °C przez 10 minut działanie uczulającą zostaje praktycznie wyeliminowane. Samo gotowanie wołowiny takiego wpływu nie ma, przeciwnie może dojść do agregacji białek, które silnie wiążą sIgE [10]. Ogólnie u dzieci z ABMK tylko wyjątkowo (w ok 10%) należy eliminować z diety mięso wołowe niedogotowane [20]. Określenie stężenia sIgE dla alergenu mleka f niezupełnie koreluje z analizą poszczególnych frakcji białkowych, zwłaszcza BSA [15].

Bos d 7 Immunoglobulina bydłęca

Bos d 7 Immunoglobulina bydłęca, IgG Immunoglobulina, wariant Bos d 7.0101 [WHO-IUIS].

Bos d 8 Kazeina

Bos d 8 Kazeina, inaczej f78, mieszanina α , β , κ i γ kazein.

Jest to termostabilny alergen główny mleka i najważniejszy alergen sera [21]. Należy do alergenów pokarmowych pochodzenia zwierzęcego o wysokim ryzyku anafilaksji [22].

Nawet mieszanki o wysokim stopniu hydrolizy zawierają istotne ilości kazeiny.[8]. Kazeina stanowi ok. 79 % ogólnej ilości białek mleka, czyli około 3 gramy w 100 ml [10]. Jest mieszaniną fosfoprotein, a głównymi jej składnikami są frakcje α , β i κ -kazeiny [5]. Wyróżniono także podfrakcje α -s 1, α -s 2. Stanowi ryzyko reakcji alergicznej po spożyciu mleka w każdej formie, gdyż jest

odporna na działanie wysokich temperatur i enzymów trawiennych [10]. Malejący w przebiegu choroby poziom sIgE prognozuje wzrost tolerancji. Kazeina, stosowana jest do wzbogacania chleba w białko, w produktach garmażeryjnych, jako środek klarujący soki owocowe, piwo, ocet, wódki oraz w produkcji kazeinianów i innych hydroizatów białkowych. Preparaty białka mlecznego stosowane w przemyśle mięsnym to przede wszystkim kazeinian sodu w postaci emulsji do pasztetów, wędlin i produktów garmażeryjnych [5]. Stosowana jest także, jako dodatek, do parówek, chleba, zup, płatków śniadaniowych i batoników [8]. Wykazuje dużą homologię z kazeiną mleka owczego i koziego. Obserwuje się także reakcję krzyżową między kazeiną, a białkiem soi [8].

Bos d 9 α S 1 kazeina

Bos d 9 α S 1 kazeina. Izoforma kazeiny, inaczej podfrakcja α -s 1 [5]. Pacjenci najczęściej reagują na frakcje α , a następnie κ [23]. Rekombinowana α S1 kazeina (ρ α S1 kazeina), podobnie jak jej pochodne peptydy wykazywały oddziaływanie z IgE, szczególnie zaś nienaruszona ρ α S1 kazeina silnie pobudzała degranulację bazofilów, jednocześnie wykazując silne reakcje krzyżowe z mlekiem kozim i bawolim, co wyklucza ich zamienne zastosowanie [1].

Bos d 10 α S2-kazeina

Bos d 10 α S2-kazeina, inaczej α -s 2 [5]. Izoforma kazeiny. Uważa się, że α S1 kazeina jest bardziej uczulająca niż α 2 oraz κ kazeiny, choć są rozpoznawane z podobną częstością w surowicach chorych [21]. α -S2-kazeina przekształca się w kazocydynę 1 (Casocidin-1), która odgrywa ważną rolę w transporcie wapnia oraz hamuje wzrost bakterii *E. coli* czy *S. carnosus* [18].

3 Tab. Zestawienie frakcji i molekuł uczulających (komponent) mleka krowiego[20, 39]

Źródło alergenu	Grupy frakcji mleka	Frakcje i Subfrakcje	Komponenty WHO/UIUS	Zawartość białka g/L
Mleko f2	Białka serwatkowe f76, f77	α -laktoalbumina	Bos d 4	1.2
		β -laktoglobulina	Bos d 5	3.2
		Albumina surowicza BSA	Bos d 6	0.4
		Immunoglobulina	Bos d 7	0
		Laktoferyna	Bos d Lf	0.1
		Laktoperoksydaza	Bos d Lp	?
		Transferyna		0.1
		Proteozopeptony	PP3	0,3
	Białka kazeinowe f78	Kazeina α β κ γ	Bos d 8	16,0 (suma 5 subfrakcji)
		Kazeina α S1	Bos d 9	10
		Kazeina α S2	Bos d 10	2.6
		Kazeina β	Bos d 11	9.3
		Kazeina κ	Bos d 12	3.3
		Kazeina γ	Bos d γ	0.8
Inne białka	Białka otoczek kuleczek tłuszczowych	MFGM	0.4	

Bos d 11 β -kazeina Izoforma kazeiny

Bos d 11 β -kazeina Izoforma kazeiny, uczula najrzadziej spośród białek kazeinowych [21].

Bos d 12 κ -kazeina Izoforma kazeiny

Bos d 12 κ -kazeina Izoforma kazeiny. W sytuacji nasilonych objawów jelitowych, wyraźnie związanych ze spożyciem mleka, ze zdecydowaną poprawą po eliminacji mleka (jelitowa ABMK), a jednocześnie normalnym poziomem sIgE, niektórzy badacze sugerują test stymulacji limfocytów (LST). Opcja ta budzi liczne kontrowersje [10,17]. Kimura i wsp.[24] przeprowadzili takie badania wobec κ kazeiny w grupie 90 dzieci, w wieku średnio 9 dni, w połowie dziewcząt i chłopców. 86,1 % wyników było dodatnich. Dla porównania, wśród dzieci z nieswoistym zapaleniem jelit, o podobnych parametrach demograficznych, wynik dodatni dla κ kazeiny dotyczył tylko 20% Autorzy wnioskują że LST jest zdecydowanie przydatny w alergii nie IgE zależnej na jelitową postać ABMK [24].

Bos d LFa, Laktoferyna

Bos d LFa, Laktoferyna, inaczej LF, kod f334 Stanowi alergen główny mleka, o 70% homologii do laktoferyny znajdującej się w mleku ludzkim. Jest to glikoproteina wiążąca żelazo, pełni istotną rolę przeciwzapalną, chroni także jelita przed rozwojem patogennej flory bakteryjnej [8]. Jest białkiem wrażliwym na wysoką temperaturę. Denaturacja nasila się przy wysokim ciśnieniu przez odpowiedni czas [21]. Szkodzi w mleku surowym. Znajduje się w serwacie. Liczne składowe mleka, takie jak laktoferyna okazały się czynnikami promującymi zdrowie. Jednocześnie wykazano, że glikany mogą wpływać na bioaktywność laktoferyny. Porównano wpływ glikozylacji na laktoferynę mleka koziego, ludzkiego i krowiego. Za pomocą zaawansowanej spektrometrii mas rozpoznano 65 struktur, w tym mannozę i złożone N-glikany. Okazało się, że glikany te były podobne w mleku ludzkim i kozim oraz zidentyfikowano nowe glikany, tylko w mleku kozim. Autorzy sądzą, że kozie mleko może być źródłem składników bioaktywnych w tym laktoferyny, przydatnej do tzw. żywności funkcjonalnej [25]. Uważa się, że laktoferyna może być klasyfikowana jako silny alergen mleka.

Bos d Laktoperoksydaza

Bos d Laktoperoksydaza Nie uzyskano całkowitej inaktywacji laktoperoksydazy w żadnej z zastosowanych metod [21]. Reakcje alergiczne mogą być także skutkiem wytwarzania przeciwciał w stosunku do innych białek mleka, takich jak β 2-mikroglobulina, transferyna, laktoferyna, laktoperoksydaza, alkaliczna fosfataza i katalaza, ale częstość tego rodzaju alergii jest bardzo mała [20, 23].

Patogeneza alergii na mleko

Niektórzy wciąż sądzą, że za objawy alergii odpowiedzialne są głównie reakcje typu I wg Gella i Coombs'a, z udziałem swoistych przeciwciał E (sIgE). Studentów medycyny uczy się pięciu odmiennych typów reakcji, a specjalistów odpytuje także z innych mechanizmów wywołujących podobne do zapalenia alergicznego skutki kliniczne (pseudoalergie, nietolerancję dwucukrów, reakcje na meta-

le ciężkie). Wspomniana typologia nie jest jednak rozłączna. Pojawiają się prace o współistnieniu u jednego pacjenta różnych reakcji immunologicznych i poza immunologicznych, lecz literatura tematu pozostaje uboga [26]. Na podstawie testów alergicznych i charakterystycznych objawów wyróżnia się obecnie 3 typy alergii: zależną od IgE, mieszaną (IgE/ nie IgE) oraz nie IgE zależną (nadwrażliwość typu komórkowego). W ostatnim czasie rośnie rozpoznawalność zwłaszcza postaci nie IgE zależnych u małych dzieci [27]. ABMK jest jedną z najczęściej spotykanych, a jednocześnie najbardziej złożonych postaci alergii na pokarmy we wczesnym dzieciństwie, wywołującą objawy w mechanizmie IgE-zależnym i IgE-niezależnym oraz mieszanym lub w wyniku nakładania się alergii i nietolerancji. Reakcje IgE zależne pojawiają się w ciągu kilku minut do 2 godzin od spożycia alergenu, rzadziej w 6-12 godzin (reakcja późna). Alergeny BMK łączą się z sIgE na komórkach tucznych i bazofilach, powodując ich degradację, uwalnianie histaminy i innych mediatorów reakcji zapalnej, co powoduje typowe objawy [17]. W reakcji typu komórkowego biorą udział przede wszystkim cytokiny wytwarzane przez limfocyty Th, aktywujące inne komórki w tym makrofagi, bazofile i limfocyty cytotosycyczne. Objawy kliniczne występują po 24-48 godzinach, a nawet po kilku dniach po kontakcie z alergenem. Dzieci z nadwrażliwością pokarmową w mechanizmie nie-IgE zależnym szybciej rozwijają tolerancję, niż chorzy z IgE zależną ABMK [1, 17]. Według symptomów klinicznych i testów alergicznych wyróżniamy 3 typy alergii na BMK (ABMK): zależny od IgE, mieszany (IgE/nie IgE) oraz nie IgE zależny (komórkowy, typu późnego) Dzieci z IgE zależną ABMK mają profil odpowiedzi Th2, z wysoką produkcją IL-13 oraz proliferacja, lecz niskim IFN- γ , z kolei dzieci z nie-IgE zależną ABMK prawie nie wytwarzają IL-13, ani proliferacji. Dzieci wyrastające z ABMK wykazują zmianę w kierunku odpowiedzi Th1, ze zmniejszonym poziomem IL-13 oraz wzrostem IFN γ . IL-10 była wysoka we wszystkich grupach, lecz najwyższa u dzieci zdrowych, zaś IL-4 była nieoznaczalna [28].

Postacie kliniczne ABMK**IgE zależne formy kliniczne ABMK**

Najpoważniejszym skutkiem ABMK jest anafilaksja, która dotyczy 10-28% ciężkich przypadków u dzieci [17]. Inne objawy kliniczne mogą dotyczyć przewodu pokarmowego, skóry lub układu oddechowego. Najczęściej manifestują się one pod postacią atopowego zapalenia skóry (AZS), kolki niemowlęcej, zapalenia eozynofilowego przełyku (eosinophilic esophagitis) czy refluksu żołądkowo-przełykowego [27], niektórzy dodają zaparcia oraz pokrzywkę i obrzęk naczynioruchowy. Ostre objawy z układu oddechowego w ABMK są IgE- zależne i mogą wskazywać na początek ciężkiej reakcji anafilaktycznej. Nieżyt nosa (u niemowląt sapka) to rzadka manifestacja ABMK, podobnie jak astma oskrzelowa w postaci izolowanej [17].

Nie IgE-zależne ABMK

Nie IgE- zależne choroby alergiczne przewodu pokarmowego wywołane pożywieniem (non-IgE-GI-FA), w tym



ABMK, obejmują zapalenie jelita cienkiego i okrężnicy (food protein-induced enterocolitis syndrome- FPIES), enteropatia wywołana przez pokarm (food protein-induced enteropathy- (FPIE), oraz zapalenie prostnicy i odbytnicy (food protein-induced allergic proctocolitis -FPIAP) i są niezbyt rzadkie u dzieci i małych dzieci, lecz zazwyczaj pozostają nierozpoznane. Nie-IgE-GI-FA mają pomyślne rokowanie, w większości ustępują w wieku 3-5 lat [29].

Mleko krowie to najczęstsza przyczyna FPIES u dzieci. Objawy: biegunka, obrzęki, hypoalbuminuria oraz ulewianie/wymioty, pokrzywka, stan podgorączkowy, krew i śluz w stolcu, wzdęcie brzucha, słaby wzrost.

Większość rozwija tolerancję w teście prowokacji BMK po 12 miesiącach diety. Opisano dzieci z ciężką postacią FPIES na mleko krowie, z niedożywieniem, niedobiałczeniem i niskim wzrostem. Leczenie mleko- zastępcze przyniosło remisję [30]. Sporadycznie spotykamy zespół Heiner'a [17].

Mieszane IgE/nielgE- zależne postacie kliniczne ABMK

Przewlekłe objawy przebiegają zwykle w mieszanym mechanizmie IgE-zależnym i komórkowym [17]. Szczegółowy opis tych patologii jest zawarty w licznych dostępnych publikacjach autorów krajowych [8,10,17]. W 2013 roku opublikowano brytyjskie wytyczne dotyczące rozpoznawania i leczenia IgE-niezależnej ABMK u niemowląt – MAP, które w prostej, algorytmicznej formie omawiają obie postaci ABMK, praktyczne zasady postępowania w najczęstszej postaci klinicznej, mianowicie łagodnej/umiarkowanej alergii IgE-niezależnej [20]. Wytyczne MAP oraz inne konsensusy stosowano również poza Wielką Brytanią [31].

Lokalne reakcje IgE zależne

Ostatnio pojawiło się doniesienie o eozynofilowym zapaleniu żołądkowo- jelitowym (Eosinophilic gastroenteritis -EG) jako manifestacji miejscowego wytwarzania IgE. Opisano nawracające owrzodzenia z krwawieniem, jako indukowane przez typ I miejscowej reakcji alergicznej [32].

Diagnostyka alergii IgE –zależnej na mleko

W diagnostyce alergologicznej w ogóle sugeruje się aktualnie zasadność korzystania zarówno z PTS jak i sIgE, na przykład w astmie ciężkiej [13]. W ABMK PTS należy wykonywać z pełnym mlekiem, mieszankami mleko-zastępczymi, hydrolizatami i frakcjami Bos d 4, Bos d 5 oraz Bos d 8 [33]. W rozpoznawaniu i prognozowaniu ABMK bąbel poniżej 5 mm w PTS daje w ponad 80% szansę, że u dziecka rozwinię się tolerancja w 4 rz. Natomiast bąbel powyżej 5 mm stanowi w ponad 70% ryzyko przewlekania się alergii na mleko. Spadek poziomu sIgE o 99% daje 94% nadziei na powstanie tolerancji, spadek miana o 50% tylko w 30 % [10]. Wzorzec przeciwciał IgE i IgG4 przeciwko epitopom jest stabilny u chorych z alergią trwałą, natomiast w przypadkach alergii przejściowej stężenie IgE obniża się, a IgG4 wzrasta [13]. Optymalny i łatwo dostępny jest panel Polycheck Mleko Plus EMMA (Biocheck GmbH, Germany, Muenster) obejmujący m.in. f02 Mleko, f78 Kazeina, f76 α - Laktoalbumina, f77 β -Laktoglobulina, e204 Albumina surowicy bydlęcej, f27 Wołowina. Można dodatkowo oznaczyć pojedyncze sIgE

ju., oraz dla f81 sera Cheddar, f106 hydrolizatu serwatki, f169 mleka UHT, f360 jogurtu i laktoferyny. Ocena alergii na mleko i jego frakcje w różnych grupach wiekowych wskazuje na wygasanie ABMK u osób starszych [15].

Diagnostyka alergii IgE –niezależnej na mleko

Niewiedza na temat zróżnicowanego, nie tylko IgE-zależnego podłoża alergii na mleko prowadzi do podważania wartości oznaczeń sIgE. Ujemny wynik jest traktowany jako fałszywie ujemny, co skłania nawet niektórych lekarzy do sięgania po metody niewiarygodne [13]. Atopowe testy płatkowe (ATP) są traktowane, jako użyteczne narzędzie diagnostyczne alergicznych reakcji typu opóźnionego, podczas gdy oznaczenia sIgE, a także wyniki PTS korelują tylko z reakcją wczesną. ATP stanowią najlepszą pojedynczą metodę potwierdzenia diagnozy w podejrzeniu alergii na mleko krowie dając PPV 95%. Łącznie z wynikami sIgE oraz/lub PTS optymalizują wskaźnik PPV do 100% i wg szkoły Niggemanna mogą redukować potrzebę podwójnie zaślepionej próby prowokacji mlekiem [34]. Standardy techniki ATP wynikają z zaleceń ETFAD (europejskiej grupy roboczej w atopowym zapaleniu skóry). Autorzy cytowanej opinii przyznają, że rola ATP w wyprysku atopowym pozostaje kontrowersyjna i nie podważają znaczenia próby prowokacyjnej. Zdaniem niektórych mają one znaczną rolę w diagnostyce przyczyn alergii manifestującej się w przewodzie pokarmowym, w tym w eozynofilowym zapaleniu przełyku [35]. Czas obserwacji dziecka po prowokacji mlekiem powinien wynosić co najmniej 72 godziny, celem wyeliminowania reakcji opóźnionej [20]. Weryfikacją rozpoznania ABMK powinna być próba prowokacyjna, wykonana w wyspecjalizowanej placówce opieki zdrowotnej. Średnica bąbla pokrzywkowego w PTS równa większa 8 mm (6 mm do 2 r.ż.) koreluje z dodatnim wynikiem testu prowokacji, który w istocie służy głównie celom naukowym. Prowokacje wykonywane są zbyt rzadko z różnych przyczyn, jak obawy o ryzyko anafilaksji, koszty i czas trwania [13]. Alergia na mleko krowie rozpoznana na podstawie próby prowokacyjnej może być potwierdzona alergenowo swoistym testem stymulacji limfocytów (asLST) wykonanym w 6 m-cu życia [36]. Inni autorzy negują przydatność LST w ABMK [10].

Postępowanie dietetyczne w alergii na mleko

Najczęstszym problemem w praktyce wydaje się być przecenianie roli alergii na mleko u dzieci z AZS, a w przypadkach potwierdzonej alergii przedłużanie diety znacznie poza okres proponowany w wytycznych [13].

Mleka innych ssaków w tym kozie, owcze, kobyłe, osłe, wielbłądzie są całkowicie nieprzydatne dla niemowląt, gdyż mają inną osmolarność oraz inny skład białek, tłuszczów i minerałów, niż mleko krowie. Może to prowadzić do niedoborów kwasu foliowego, witaminy B6, B12 oraz D3 [10].

Zalecając dietę bezmleczna w oparciu o kryteria kliniczne łatwo jest popełnić błąd niepotrzebnej zwykle eliminacji mięsa wołowego. Wykazano, że tylko 1/3 dzieci uczulonych na mleko faktycznie źle toleruje wołowe mięso. Według innych autorów było to jedynie 10 % z nich. Jest to

obecnie zrozumiałe w świetle poznanych dokładniej komponentów wspólnych (krzyżowych) takich jak BSA (Bos d 6) [8]. Jednocześnie te same odkrycia wykluczają podawanie jagnięciny czy mięsa królika, jako rzekomo bezpiecznej w alergii na mleko, przynajmniej w części przypadków.

W przypadku, gdy pomimo restrykcyjnej diety bezmlecznej matki, objawy nadal się utrzymują, to w zasadzie można wyeliminować nadwrażliwość na mleko [10].

Suplementacja nadwrażliwości na mleko i jego przetwory

Preparaty mleka modyfikowanego uczulają zdecydowanie częściej niż mleko matki [8].

Mieszanki elementarne (AAF) zawierające aminokwasy syntetyczne bez peptydów, ze względu na bardzo wysoki koszt, są przeznaczone tylko dla dzieci z ciężką postacią ABMK, alergią na wiele pokarmów, eozynofilowym zapaleniem przelyku, enteropatią i FPIES lub reakcją na mieszanki eHF i odmową przyjmowania eHF ze względu na smak. Ponowne wprowadzenie mleka do diety należy rozpocząć po obróbce termicznej w 180° przez 30 min. (tzw. mleko „pieczone” w produktach piekarniczych), gdzie u 70% dzieci uzyskano tolerancję [10]. Fermentacja przez *Lactobacillus casei* 1134 może znacząco zredukować alergogenność modyfikowanych BMK, co ułatwia ich symulowane trawienie [23]. Po 60 min gotowania pozostaje silnie aktywna kazeina, w odróżnieniu od Bos d 4 i Bos d 5. Ta ostatnia staje się nieoznaczalna już po 15-20 minutach ogrzewania [38].

„Mleka” roślinne mogą powodować anafilaksję, gdyż można je zrobić niemal z każdego ziarna, orzechów i pestek.

Alergolog powinien uprzedzić chorego, że taki płyn może zawierać silne alergeny ziaren i orzechów czyli termolabilne wycyliny, oleozyny lub / i LTP.

Mleko ryżowe zawiera graniczne wartości arsenu, co może uszkadzać DNA i niesie ryzyko nowotworów [10].

Odczulanie doustne

Doniesienia na temat odczulania doustnego OIT (OIT - oral immunotherapy) są nieliczne i wciąż sprzeczne.

Przykładowo wybrana praca omawia na podstawie obserwacji grupy 32 dzieci z ABMK w wieku 6-17 lat zakończone powodzeniem OIT u 26 z nich, natomiast u 6 leczenie przeważało z powodu reakcji ubocznych. OIT mlekiem krowim może wzbudzać korzystną odpowiedź, ale stwarza wciąż wiele wątpliwości [13]. Zaobserwowano spadek sIgE dla MK oraz wzrost swoistych IgG4 podczas OIT. Zauważono, że szczegółowa analiza poziomów IgE /IgG4 podczas OIT może pomóc w przewidywaniu powodzenia terapii, a także poprawić jej bezpieczeństwo [14].

Prognozy i przesłanie

Niekorzystne prognostycznie jest niskie stężenie IgG4 swoistego dla mleka krowiego [8] przy okazji warto skrytykować terapeutów budujących diety eliminacyjną w oparciu o wysokie miana IgG4, obrazujące wytworzoną tolerancję, a nie szkodliwość. Peptydy pochodne beta-laktoglobuliny (BLG) mogą ułatwiać tolerancję doustną i zapobiegać alergii na BMK. Umieszczenie peptydów BLG w nano-cząsteczkach PLGA poly (lactic-co-glycolic acid) zwiększa tolerancję. Nie wzmacnia też sekrecji IL-13, a podtrzymuje funkcję TGF-β. Wykazano osłabienie reakcji alergicznej na białka serwatkowe za pomocą PLGA, co być może, zapowiada nową strategię wytwarzania tolerancji na mleko [19]. W przyszłości zastosowanie technologii wysokich ciśnień (HPP-high pressure processing) wobec surowego mleka pozwoli prawdopodobnie na powstawanie produktów o niskim lub żadnym wpływie uczulającym, co powinno być skutecznym sposobem na problemy osób z ABMK [7]. Nasze babcie twierdziły, że mleko to samo zdrowie i starały się, by wnuki spożywały je przynajmniej na pierwsze śniadanie. Obecnie pojawia się coraz więcej niestudowanych opinii sugerujących, by ograniczyć picie mleka bądź całkowicie wykluczyć je z naszej diety. Ważne, aby stwierdzenie, że dziecko ma alergię na mleko, nie ograniczało się do opinii rodziców. Podstawą może być tylko rozpoznanie przez alergologa (PTS, PTS natywne, ATP, ATP natywne, sIgE, sIgE komponentowe, prowokacja, skuteczność diety bezmlecznej plus suplementacji), gdyż pozbawienie mleka dziecka, które nie jest uczulone, jest dużym błędem żywieniowym. ■

Prace nadesłano
25.04.2018
Zaakceptowano do
druku 20.05.2018

Konflikt interesów nie występuje.
Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

Piśmiennictwo: 1. Schulmeister U, Hochwallner H, Swoboda I et al. Cloning, expression, and mapping of allergenic determinants of alphaS1-casein, a major cow's milk allergen. *J Immunol* 2009; 182(11):7019-7029. 2. Rzeźnicka Z, Kokooszko M. Dietetyka i sztuka kulinarna antyku i wczesnego Bizancjum (II-VII w.), cz. III. *Byzantina Lodziensia XXVIII* Wyd. UŁ. 3. Korulski K. Smak i aromat w artykułach mleczarskich. W: Smak i aromat w żywności i napojach. Polska Izba Dodatków do Żywności. Konin 2004:69-74. 4. Siciliano RA, Mazzeo MF, Arena S. Mass spectrometry for the analysis of protein lactosylation in milk products. *Food Res Int* 2013;54:988-1000. 5. Rutkowski A, Gwiazda S, Dąbrowski K. Kompendium dodatków do żywności Hortimex Konin, 2003. 6. Knipping K, van Esch BC, van Ieperen-van Dijk AG et al. Enzymatic Treatment of Whey Proteins in Cow's Milk Results in Differential Inhibition of IgE-Mediated Mast Cell Activation Compared to T-Cell Activation. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;211:159(3):263-270. 7. Huang HW, Hsu CP, Yang BB et al. Potential Utility of High-Pressure Processing to Address the Risk of Food Allergen Concerns. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2014; 13(1):78-90. 8. Ukleja-Sokolowska N, Bartuzi Z. Epidemiologia i naturalny przebieg alergii na białka mleka krowiego *Alergia Astma Immunologia* 2015;20, 1, 5-11. 9. Adamczak M, Bednarski W. Enzymatyczna synteza galaktooligosacharydów i laktulozy w permeacie po ultrafiltracji serwatki. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 2008, 6 (61), 105 – 11. 10. Małaczyńska T. Leczenie dietetyczne dzieci z alergią na białka mleka krowiego. *Alergia Astma Immunologia* 2015;20, 1, 24-34. 11. Buczyński K. Nie tylko alergeny: nietolerancja histaminy *Alergia*, 2016, 1, 35-8. 12. Waszkiewicz-Robak B, Świdorski F. Substancje prozdrowotne i biologicznie aktywne jako składniki żywności funkcjonalnej w: *Naturalne dodatki do żywności. Polska Izba Dodatków do Żywności*. Konin 2005. 13. Bręborowicz A, Sobkowiak P. Postępowanie diagnostyczne w alergii na białka mleka krowiego u dzieci. *Alergia Astma Immunologia* 2015;20, 1, 17-23. 14. Savilahti EM, Kuitunen M, Valori M, et al. Changes in IgE and IgG4 epitope binding profiles associated with the outcome of oral immunotherapy in cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2014; 25(3):227-235. 15. Majsiak E. Analiza przesiewowa występowania swoistych przeciwciał E w surowicach dzieci i dorosłych w Polsce. *UM Łódź* 2016. 16. Warren CM, Jhaveri S, Warrier MR et al. The epidemiology of milk allergy in US children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2013; 110(5):370-374. 17. Krauze A. Alergia na białka mleka krowiego-postacie kliniczne. *Alergia Astma Immunologia* 2015;20, 1, 12-16. *Allergology.org*. 19. Kostadinova AI, Middelburg J, Ciulla M et al. PLGA nanoparticles loaded with beta-lactoglobulin-derived peptides modulate mucosal immunity and may facilitate cow's milk allergy prevention. *Eur J Pharmacol*. 2017; 25; 818:211-220. 20. Łużyk D, Ball M, Makwana N et al. BSACI guideline for the diagnosis and management of cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy* 2014; 44:642-72. 21. Gaudin JC(1), Rabesona R, Choiset Y et al. Assessment of the immunoglobulin E-mediated immune response to milk-specific proteins in allergic patients using microarrays. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(4):686-93. 22. Blaźowski Ł, Kurzawa H. Molekularne aspekty diagnostyki alergii pokarmowej zależnej od IgE. *Terapia* 2014;22,11(313) 49-55. 23. Le T et al. Proteomics of major bovine milk proteins: Novel insights, *International Dairy Journal* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.11.016>. 24. Kimura M, Oh S, Narabayashi S, Taguchi T. Usefulness of Lymphocyte Stimulation Test for the Diagnosis of Intestinal Cow's Milk Allergy in Infants. *Int Arch Allergy Immunol* 2012; 157(1):58-64. 25. Le Parc A, Dallas DC, Duaut S et al. Characterization of goat milk lactoferrin N-glycans and comparison with the N-glycomes of human and bovine milk. *Electrophoresis* 2014; 35(11):1560-1570. 26. Reese I, Ballmer-Weber B, Beyer K et al. German guideline for the management of adverse reactions to ingested histamine. *Allergo J Int*. 2017; 26 (2):72-79. doi: 10.1007/s40629-017-0011-27. Ho MH, Wong WH, Chang C. Clinical spectrum of food allergies: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2014; 46(3):225-240. 28. Vocca I, Berni Canani R, Camarca A, Ruotolo S, Nocerino R, Radano G, Del Mastro A, Troncone R, Gianfranci C *Journal Pediatr Res* 2011; 70(6):549-554. 29. Caubet JC, Szajewska H, Shamir R et al. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies in children *Pediatr Allergy Immunol*. 2017;28(1):6-17. 30. Yang M, Geng L, Xu Z et al. Severe Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome to Cow's Milk in Infants. *Nutrients*. 2015 Dec 22;8(1). pii: E1. doi: 10.3390/nu8010001. 31. Venter C et al. Better recognition, diagnosis and management of non-IgE-mediated cow's milk allergy in infancy: iMAP: an international interpretation of the MAP (Milk Allergy in Primary Care) guideline C. *Clinical Translation Allergy*, 2017; 7 (26): 1-9. 32. Raithel M, Hahn M, Donhuijsen K, Eosinophilic gastroenteritis with refractory ulcer disease and gastrointestinal bleeding as a rare manifestation of seronegative gastrointestinal food allergy. *Journal Nutr J* 2014; 13(1):93. 33. Michaud B, Aroulandom J, Baiz N et al. Casein-Specific IL-4 And IL-13 Secreting T Cells: A Tool To Implement Diagnosis Of Cow's Milk Allergy. *Allergy* 2014; 69(11):1473-1480. 34. Roehr CC, Reibel S, Ziegert M et al. Atopy patch tests, together with determination of specific IgE levels, reduce the need for oral food challenges in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107(3):548-53. 35. Jurakic Tončić R, Lipozencić J. Atopy patch test—when is it useful? *Acta Med Croatica*. 2011;65(2):97-106. 36. Imamura T, Watanabe M, Kaneko M, et al. Cow's Milk Allergy with Severe Eosinophilia *Pediatr Neonatol* 2013[0] 37. Yao M, Xu Q, Luo Y et al. Study on reducing antigenic response and IgE-binding inhibitions of four milk proteins of *Lactobacillus casei* 1134 *J Sci Food Agric* 2015; 95(6):1303-1312. 38. Bloom KA, Huang FR, Benchaitiwong R et al. Effect of Heat Treatment on Milk and Egg Proteins Allergenicity. *Pediatr Allergy Immunol* 2014; 25(8):740-746. 39. Le, T. T., et al., Proteomics of major bovine milk proteins: Novel insights, *International Dairy Journal* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.11.016>