

Quello che la *Component Resolved Diagnosis* non è ancora in grado di dirci

D. Villalta

Allergologia e Immunologia Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, A.O. "S. Maria degli Angeli", Pordenone

Riassunto

L'individuazione delle singole molecole responsabili delle reazioni allergiche verso uno specifico allergene ha rappresentato una delle maggiori conquiste degli ultimi anni in campo allergologico. La possibilità di disporre di tali molecole in forma ricombinante o nativa, infatti, ha permesso l'allestimento di test *in vitro* in grado di definire il singolo profilo allergenico di ciascun paziente (Component Resolved Diagnosis – CRD), con notevoli ripercussioni sul piano clinico, come quello di distinguere tra stato di co-sensibilizzazione e cross-reattività, nonché la possibilità di predire l'eventuale gravità della reazione verso alcuni alimenti di origine vegetale. Nonostante tale innegabile utilità, la CRD presenta ad oggi alcune limitazioni. In alcune circostanze, infatti, non può ancora sostituire completamente la diagnostica basata su estratti allergenici e in particolare: a) quando non sono ancora a disposizione, in forma ricombinante o nativa, le principali molecole responsabili delle reazioni ad uno specifico allergene; b) quando non sono del tutto note le principali molecole responsabili delle reazioni ad uno specifico allergene; c) quando, pur essendo note e disponibili per test *in vitro* le principali molecole di uno specifico allergene,

il paziente con sintomatologia suggestiva per allergia allo stesso risulti negativo al test molecolare. La CRD, inoltre, non sembra, allo stato attuale, poter ancora rispondere ad alcuni quesiti clinici nell'ambito dell'allergia alimentare e in particolare: a) quali pazienti con sensibilizzazione a Bet v1 potranno sviluppare SOA e verso quali tipi di frutta e/o verdura; b) quali pazienti con sensibilizzazioni alimentari presenteranno sintomi dopo ingestione dell'alimento e quali risulteranno tolleranti; c) quando bambini con sensibilizzazione a latte, uova, arachidi avranno superato l'allergia e potranno reintrodurre l'alimento. Solo il test di provocazione in doppio cieco controllato con placebo (DBPCFC), test indaginoso e non scevro di rischi, è per il momento in grado di dare risposta a tale domande. Sono in sviluppo dei microarray, comunque, che non usano la molecola intera, ma sequenze peptidiche della stessa, (*peptide microarray*) i cui risultati preliminari sono estremamente interessanti e che, se confermati, potranno aprire la strada all'utilizzo di tale metodica nella pratica clinica, in particolare in alcune allergie alimentari dei bambini, con il duplice vantaggio di evitare il DBPCFC e di utilizzare limitatissime quantità di sangue.

Summary

What the Component Resolved Diagnosis cannot tell us yet

Detection of the single molecules responsible for allergic reactions represents one of the major advances in recent years in the field of allergy diagnosis. In fact, the availability of such molecules, whether in native or recombinant form, has allowed the development of *in vitro* tests able to define the exact allergenic profile of each patient (Component Resolved Diagnosis-CRD), with important repercussions for clinical practice, such as the ability to distinguish between states of co-sensitization or cross-reactivity as well as the possibility of predicting the severity of reac-

tion to any plant-based food. Despite such undeniable utility, CRD has some limitations. In some circumstances, it cannot completely replace diagnosis based on allergenic extracts. This is so in particular: (a) when the principal molecules responsible for the reaction to a specific allergen are no longer available in native or recombinant form; (b) when the principal molecules responsible for reaction to a specific allergen are not known; (c) when, although the principal molecules of a specific allergen are known and available for tests *in vitro*, the patient with symptoms suggestive of allergies nevertheless has negative results to molecular tests.

In addition, CRD in its present state does not seem to be

able to answer some clinical questions, in particular: (a) which patients with sensitization to Bet v1 may develop SOA toward fruit and/or vegetables? (b) which patients with food hypersensitivity are tolerant or symptomatic after ingestion of the food? and (c) when children with sensitivity to milk, eggs, or peanuts may outgrow their allergy? Only the double-blind placebo controlled oral food challenge (DBPCFC) - which is cumbersome and not without risk - is able to give results to such problems. However, microarrays which do not use the whole mole-

cule but peptide sequences of the molecules (peptide microarray) are under development. The preliminary results of these are extremely interesting and, if confirmed, may pave the way to the use of such methods in clinical practice, especially in some childhood food allergies. They have the double advantage of avoiding DBPCFC while using the most limited amount of blood.

Key-words: allergy, component resolved diagnosis (CRD), microarray, peptide microarray.

Introduzione

La individuazione delle singole componenti allergeniche responsabili delle reazioni allergiche a pollini, acari, epiteli animali, muffe, veleno d'imenotteri, alimenti rappresenta una delle principali conquiste in campo allergologico. La disponibilità di tali molecole, infatti, sotto forma di allergeni ricombinanti o nativi purificati, ha permesso di mettere a punto sistemi diagnostici, utilizzando metodiche tradizionali (ImmunoCAP, Phadia) o microarray (ISAC[®], Phadia), in grado di definire il profilo allergologico individuale di ciascun paziente (*Component Resolved Diagnosis*, CRD). Esso non rappresenta solo un affinamento diagnostico rispetto ai sistemi utilizzando estratti allergenici, ma ha notevoli ripercussioni sia in campo terapeutico, che prognostico¹. Con la CRD, infatti, da un lato è possibile distinguere tra co-sensibilizzazioni e cross-reattività, e quindi predire l'eventuale risposta ad una immunoterapia specifica; dall'altra è possibile in alcuni casi predire l'eventuale gravità di un'allergia alimentare. Un esempio per tutti è quello dell'allergia a frutti appartenenti alle Rosaceae, dove se un paziente risulta sensibilizzato a molecole appartenenti alla famiglia delle *Lipid Transfer Proteins* (LTPs) può presentare reazioni sistemiche gravi, mentre se è sensibilizzato a molecole appartenenti alla famiglia delle *Pathogenesis related proteins* (PR) quale la PR-10 (Bet v 1) o alle profiline (Bet v 2), in genere presenta solo disturbi locali lievi (sindrome orale allergica) e comunque può assumere tale frutta se cotta, dal momento che Bet v 1 e Bet v 2 sono molecole termolabili.

Le molecole ricombinanti, inoltre, ci possono permettere di superare uno degli scogli più importanti legati all'uso di estratti allergenici, che è quello della standardizzazione, e organismi internazionali quali il WHO/IUIS e l'European Union CREATE Consortium già stanno operando in tal senso².

Comunque, nonostante la CRD presenti un notevole progresso nella diagnostica allergologica, in alcuni casi può presentare delle limitazioni rispetto alla diagnostica con estratti allergenici, mentre in altri non è ancora in grado di dare risposte ad alcuni questi clinici, in particolare nell'ambito dell'allergia alimentare.

Quando non è ancora possibile sostituire completamente la diagnostica con estratti allergenici con la CRD?

La diagnostica molecolare non può a tutt'oggi sostituire completamente la diagnostica con estratti allergenici nelle seguenti condizioni:

1. Quando non sono ancora a disposizione, in forma ricombinante o nativa, le principali molecole responsabili di reazioni avverse ad uno specifico allergene.

E' il caso, ad esempio, dell'allergia al veleno d'imenotteri, dove al momento sono a disposizione con il sistema ISAC[®] solo gli allergeni principali del veleno d'ape (Api m 1- fosfolipasi A2; Api m 4, mellitina), mentre non sono ancora disponibili gli allergeni del veleno di vespa, per cui, per la diagnosi sierologica a veleno d'imenotteri non è al momento possibile fare a meno degli estratti. Appena saranno a disposizione gli allergeni della *Vespa* (in particolare la fosfolipasi A1 e l'antigene 5 (Ves v 5), comunque, la CRD potrà assumere importanza diagnostica anche in questo campo, distinguendo i pazienti che sono veri co-sensibilizzati ad ape e *Vespa*, e che quindi dovranno essere sottoposti ad immunoterapia specifica per entrambi gli allergeni, da quelli che presentano cross-reattività, in genere dovuta a IgE rivolte verso la ialuronidasi o i determinanti carboidratici (CCDs)³. Ciò permetterà di limitare l'uso della RAST inibizione, tecnica costosa e indaginosa.

2. Quando non sono del tutto note le principali molecole responsabili delle reazioni avverse ad uno specifico allergene.

Un esempio di tale situazione è l'allergia ai crostacei. E' da tempo risaputo che il principale allergene responsabile di questa allergia è la tropomiosina, molecola di 38 kDa, presente anche in altri molluschi, polipi, seppie, blattelle, acari e per questa ragione considerata un pan-allergene degli invertebrati. Sono ora a disposizione diversi omologhi per la determinazione della sensibilizzazione a tale molecola (Pen a1, Pen i1, Pen m1, di derivazione da varie specie di gamberi; Der p10, di derivazione dall'acaro; Bla g7, di derivazione dallo scarafaggio, Ani s3, di derivazione dall'*Anisakis*) e il loro uso nella pratica clinica ha evidenziato che una quota di pazienti che presentano reazioni avverse dopo ingestione di crostacei, risulta negativa per la tropomiosina, facendo ipotizzare che uno o più allergeni non ancora conosciuti, diversi dalla tropomiosina, possano essere chiamati in causa in tale allergia. Del tutto recentemente Shiomi e coll.⁴, Ayuso e coll.⁵, nonché il nostro gruppo (dati non ancora pubblicati), hanno dimostrato come una proteina di 20 kDa sia un possibile bersaglio anticorpale IgE in pazienti con allergia ai crostacei, ma negativi per la tropomiosina. In tali pazienti, quindi, la sola determinazione delle IgE specifiche per la tropomiosina può essere responsabile di una erronea classificazione del paziente come

negativo, con conseguenze importanti sul piano clinico. In attesa della migliore definizione del nuovo allergene identificato e di una sua introduzione nella diagnostica clinica, quindi, tutti i pazienti con sospetta allergia ai crostacei, dovrebbero essere diagnosticati anche facendo ricorso a test che utilizzano estratti allergenici.

3. Quando, pur essendo note e disponibili per test in vitro le principali molecole di uno specifico allergene, il paziente con sintomatologia suggestiva per allergia allo stesso risulti negativo al test molecolare.

Un esempio può essere quello dell'allergia alla nocciola dove i principali allergeni responsabili sono ora ben definiti e sono Cor a 1, un omologo di Bet v 1, Cor a 2, una profilina, Cor a 8, una LTP, Cor a 9, una 11S globulina; altri allergeni quali Cor a 11, una vicilina, e l'oleosina, seppur raramente, possono essere causa di sensibilizzazione. In genere Cor a 1 e Cor a 2 sono responsabili di sindrome orale allergica (SOA), correlata a sensibilizzazione a pollini, e sono la principale causa di allergia alla nocciola nei paesi nordici. Nel sud Europa (Spagna e Italia), invece, le reazioni allergiche alla nocciola sono in molti casi dovuti ad una sensibilizzazione a Cor a 8, responsabile di sintomi più gravi. Un recente studio policentrico⁶ condotto in Danimarca, Svizzera e Spagna ha dimostrato come, usando solo due molecole (Cor a 1 e Cor a 8), il 100% dei pazienti danesi e svizzeri venivano correttamente identificati, mentre solo l'88% dei pazienti spagnoli, dove anche Cor a 9, Cor a 11 e una 2S albumina risultavano responsabili di sensibilizzazione in una significativa percentuale dei casi. Attualmente con i sistemi commerciali è possibile determinare IgE specifiche per Cor a 1, Cor a 2, Cor a 8 e Cor a 9, per cui, seppure in una piccola percentuale di casi, pazienti con allergia alla nocciola residenti in Italia potrebbero venire classificati come negativi. L'uso di un estratto allergenico può colmare tale *gap*.

Quando la diagnostica molecolare non è ancora in grado di dare una risposta certa al quesito clinico?

Anche se, come in parte già in precedenza accennato, la CRD ci permette di valutare correttamente verso quali allergeni un paziente è primariamente sensibilizzato e, nel caso di alcune allergie alimentari, di predire la possibile gravità delle stesse, allo stato attuale delle conoscenze non è ancora in grado di dirci con certezza:

1. Quali pazienti con sensibilizzazione a Bet v 1 potranno sviluppare SOA e verso quali tipi di frutta e/o verdura. Come da tempo noto, molecole omologhe della PR-10 (Bet v 1), oltre ad essere presenti nei pollini appartenenti alla Fagales, si trovano in vari tipi di frutta (*Rosaceae*) e di verdura (sedano, carota, etc). Non è noto perché alcuni pazienti con positività a Bet v 1 non presentino alcun sintomo alimentare, mentre altri presentino SOA solo con alcuni limitati alimenti (in genere mela, pesca, nocciola) e altri ancora con la quasi totalità delle *Rosaceae*, altra frutta o verdura. Un'ipotesi potrebbe essere la diversa risposta anticorpale IgE, rivolta verso epitopi diversamente rappresentati nelle molecole omologhe. Con la tecnica ISAC[®] è possibile determinare la risposta IgE

verso 11 diversi omologhi del Bet v 1, ma al momento non ci sono studi che abbiano valutato l'esistenza di diversi profili anticorpali nei vari *subset* clinici, come pure un eventuale ruolo del livello delle IgE specifiche verso i singoli omologhi.

2. Quali pazienti con sensibilizzazioni alimentari avranno sintomi dopo ingestione dell'alimento.

Una delle maggiori problematiche della diagnostica dell'allergia alimentare, sia in vivo che in vitro, è sempre stato il basso valore predittivo positivo dei test tradizionali. Se in genere, infatti, essi sembrano essere dotati di buona sensibilità, la loro specificità è bassa, in quanto pazienti ad essi positivi risultano spesso tolleranti al test di provocazione in doppio cieco controllato con placebo (DBPCFC), che è considerato il *gold standard* per la diagnostica delle allergie alimentari. Tale test, però, è indaginoso e non scevro di rischi per il paziente, per cui da sempre si sono cercate alternative allo stesso. Nella seconda metà degli anni '90 Sampson e coll.⁷ hanno descritto l'importanza del livello delle IgE specifiche, determinando per alcuni fra i principali alimenti responsabili di allergia alimentare (latte, uovo, arachide) i livelli soglia corrispondenti alla probabilità del 95% di sviluppare sintomi clinici in seguito all'ingestione dell'alimento e riservando solo ai pazienti con livelli di IgE specifiche sotto tale valore soglia eventuale DBPCFC. Purtroppo tali livelli sono metodo-dipendenti, non sempre riproducibili in etnie diverse e pertanto, nella pratica clinica, hanno trovato scarsa applicazione. Con l'avvento della CRD si è cercato di valutare se la definizione del profilo allergenico poteva essere di aiuto in alcune circostanze. Nel caso dell'allergia all'uovo, la presenza di una positività all'ovomucoide (Gal d 1) sembra associarsi ad un maggiore rischio di reazioni avverse rispetto a pazienti sensibilizzati ad altre proteine (ovoalbumina- Gal d 2; ovotransferrina-Gal d 3; lisozima) e comunque, essendo una molecola termoresistente, può provocare reazioni anche dopo ingestione di cibi cotti. Per quanto riguarda il latte, la molecola che si associa a reazioni più gravi, anche con cibi cotti, è la caseina (Bos d 8). La CRD, quindi, può essere di aiuto a meglio definire il profilo di rischio del paziente, ma non può avere un valore assoluto. In altri casi, come quello della sensibilizzazione a LTPs, la CRD può essere indicativa di potenziale gravità della reazione, ma non è in grado di predire con certezza quali altri alimenti contenenti proteine omologhe, oltre a quello/i responsabile/i della sintomatologia per cui si è ricorsi alla diagnosi, possono essere tollerati o meno.

3. Quando bambini con sensibilizzazione a latte, uova, arachidi avranno superato l'allergia e potranno reintrodurre l'alimento.

L'allergia alimentare, in particolare a latte e uova, è frequente nei primi anni di vita, arrivando ad interessare fino al 6-8% della popolazione nei paesi occidentali. Fortunatamente la maggior parte (80-85%) di tali soggetti tende a diventare tollerante a tali alimenti con la crescita. Individuare preventivamente tali soggetti e determinare quando essi possono reintrodurre con sicurezza il cibo responsabile delle reazioni allergiche è quindi importante. Anche in questo caso il DBPCFC sembra al momen-

to l'unico test dotato di elevato valore predittivo positivo e negativo, come di recente dimostrato da Ott e coll.⁸, anche se, nel caso dell'allergia al latte, la persistenza di alti livelli di IgE specifiche verso la caseina (Bos d 8) sembra giocare un ruolo importante nella persistenza dell'allergia. Allo stato attuale, quindi, la CRD sembra essere solo di parziale ausilio in tale campo.

Recenti studi del gruppo di Sampson, comunque, sembrano indicare come una evoluzione della CRD, basata non sulla individuazione delle IgE specifiche verso la molecola intera, ma verso singoli epitopi della molecola allergenica (*peptide microarray*)⁹ sia risolutiva in tale senso, riproducendo i dati da essi ottenuti in precedenza con la *SPOT membrane technology*, una tecnica complessa, costosa e non applicabile nella diagnostica clinica. Tramite tale tecnica essi dimostrarono che i bambini con allergia al latte, che non sviluppavano tolleranza a tale alimento con la crescita, presentavano IgE rivolte verso due specifici epitopi della caseina (aa 69-78 e aa 173-194), le quali erano assenti nei pazienti che sviluppavano tolleranza¹⁰. Se tali dati dovessero essere confermati da altri studi ed estesi ad altri alimenti è probabile che il *peptide microarray* possa diventare una metodica applicabile nella routine in particolare nella diagnostica delle allergie alimentare dei bambini, con il duplice vantaggio di evitare il DBPCFC e di dover utilizzare limitatissime quantità di sangue.

Conclusione

La CRD, anche se presenta un indubbio progresso nella diagnostica allergologica, in quanto definendo lo specifico profilo allergologico può predire il successo di una immunoterapia specifica e l'eventuale gravità di alcune allergie alimentari, presenta ad oggi alcune limitazioni. Alcune sono legate alla non disponibilità di alcune molecole allergeniche, altre alla non conoscenza di tutte le molecole responsabili della reazione ad un determinato allergene. La CRD, inoltre, come configurata attualmente, non sembra rispondere adeguatamente ad alcuni importanti quesiti clinici relativi all'allergia alimentare e cioè quali pazienti sensibilizzati saranno in gradi di tollerare o meno un determinato cibo

e quali bambini affetti da allergia a latte o uova nei primi mesi/anni di vita supereranno tale allergia. La tecnologia basata sul *peptide microarray* sembra dare risposte promettenti in tal senso e potrebbe sostituire in futuro il DBPCFC.

Bibliografia

1. Villalta D. Il Rinascimento della diagnostica allergologica. RIMeL/IJLaM 2008; 4(suppl.):54-9.
2. Chapman MD, Ferreira F, Villalba M, Cromwell O, Bryan D, Becker WM, et al. The European Union CREATE project: a model for International standardization of allergy diagnostics and vaccines. J Allergy Clin Immunol 2008; 122:882-9.
3. Müller UR, Johansen N, Petersen AB, Fromberg-Nielsen J, Haeblerli G. Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and Vespula venom by estimation of IgE antibodies to specie-specific major allergens Api m1 and Ves v5. Allergy 2009; 64:543-8.
4. Shiomi K, Sato Y, Hamamoto S, Mita H, Shimakura K. Sarcoplasmic calcium-binding protein: identification as a new allergen of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Int Arch Allergy Immunol 2008; 146:91-8.
5. Ayuso R, Grishina G, Bardina L, Carillo T, Blanco C, Ibanez MD, et al. Myosin light chain is a novel shrimp allergen, Lit v 3. J Allergy Clin Immunol 2008; 122:795-802.
6. Hansen KS, Ballmer-Weber BK, Sastre J, Lidholm J, Andersson K, Oberhofer H, et al. Component-resolved in vitro diagnosis of hazelnut allergy in Europe. J Allergy Clin Immunol 2009; 5:1134-41.
7. Sampson HA, Ho DG. Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. J Allergy Clin Immunol 1997; 100:444-51.
8. Ott H, Baron JM, Heise R, Ocklenburg C, Stanzel S, Merk HF, et al. Clinical usefulness of microarray-based IgE detection in children with suspected food allergy. Allergy 2008; 63:1521-8.
9. Lin J, Bardina L, Shreffler W, Andrae DA, Ge Y, Wang J, et al. Development of a novel peptide microarray for large-scale epitope mapping of food allergens. J Allergy Clin Immunol. 2009 Jul 2 [Epub ahead of print].
10. Chatchatee P, Järvinen KM, Bardina L, Beyer K, Sampson HA. Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on α_s -casein: Differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. J Allergy Clin Immunol 2001; 107:379-83.