

# Il Rinascimento della diagnostica allergologica

D. Villalta

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

## Riassunto

Sin dall'introduzione del primo test per la determinazione delle IgE specifiche sono stati preparati estratti più o meno purificati a partire dalle varie sorgenti allergeniche (pollini, epiteli animali, acari, muffe, alimenti, imenotteri), con lo scopo di legare le immunoglobuline circolanti. Nonostante i notevoli e continui sforzi profusi dai produttori per migliorare la qualità di tali estratti, però, la loro standardizzazione ha sempre presentato difficoltà e criticità.

Durante le ultime due decadi le molecole allergeniche maggiori e minori delle principali sorgenti allergeniche sono state identificate, caratterizzate a livello molecolare e, nella maggior parte dei casi, riprodotte sotto forma di proteine ricombinanti, rendendo possibile l'allestimento di test diagnostici, sia tradizionali che in forma di microarray, basati sull'utilizzo di singole molecole allergeniche. Oltre a semplificare i processi di standardizzazione dei preparati, ciò permette la definizione dello specifico profilo allergenico di ciascun soggetto (*Component Resolved Diagnosis*) (CRD). La CRD rappresenta, quindi, un concetto del tutto innovativo e per certi versi rivoluzionario nell'ambito della diagnostica allergologica, dal momento che sul piano teorico permette la discriminazione tra cross-sensibilizzazione e co-sensibilizzazione, nonché di predire la risposta alla immunoterapia e la potenziale gravità di alcune sensibilizzazioni verso specifici allergeni alimentari.

Prima che i test diagnostici basati sulla definizione molecolare trovino ampio utilizzo nella pratica clinica, comunque, è opportuno che vengano predisposti opportuni programmi di verifica di qualità, e che clinici e laboratoristi concorrano a meglio definire l'accuratezza diagnostica dei vari metodi e delle singole molecole in essi usate.

## Summary

### The Renaissance of allergy testing

Since the first introduction of the in vitro diagnostic test for the determination of IgE, crude or purified extracts prepared from various allergen-containing biological material (e.g. pollens, animal danders, mites, moulds, foods, insects) have been used as agents for capturing IgE antibodies in serum. In spite of the continuous efforts produced by the manufactures to improve the quality of the allergenic material applied in these tests, they remain cumbersome to standardize regarding their allergen content. During the last two decades, the major and minor IgE binding proteins of the most prevalent allergy-causing natural sources have been characterized on a molecular level, and many of them have been produced as recombinant proteins. Diagnostic tests based on single recombinant (or natural) allergens, both in classical and in microarray format, have been developed and today it is possible to determine the complex reactivity profile of allergic patients (Component Resolved Diagnosis) (CRD). The CRD represents an innovative and revolutionary concept in allergy diagnosis because it allows the discrimination between cross and co-sensitization, the prediction of the efficacy of immunotherapy and the prediction of the severity of the clinical manifestations in food allergy. However, before the CRD tests, and in particular the microarray-based tests, become a standard diagnostic tool in clinical laboratory, the quality assurance programs for specific IgE have to be revised and adapted for these new assays, and clinicians and pathologists have to better define their diagnostic accuracy and their impact on the clinical outcome.

*Key-words:* allergy, component resolved diagnosis (CRD), microarray, recombinant allergens.

## Note Storiche

L'inizio della diagnostica allergologica può essere fatto risalire al 1880, anno in cui Charles Blackley, un soggetto affetto da oculorinite primaverile, instillandosi un estratto pollinico da lui preparato nel naso e nella congiuntiva, fu in grado di riprodurre i sintomi della malattia, dimostrando così una ipotesi posta mezzo secolo prima da Ellioston, ma da esso non verificata. L'esperimento di Blackley, quindi, rappresentò il primo test di provocazione con estratto allergenico. Lo stesso ricercatore, inoltre, applicando l'estratto alla cute lievemente abrasa, osservò la comparsa di un pomfo circondato da eritema, eseguendo di fatto il primo *prick test*, che tuttora rappresenta l'approccio diagnostico iniziale delle malattie allergiche.

Nel 1920 Prausnitz e Küstner dimostrarono come alla base della sensibilizzazione allergica ci fosse una componente sierica non meglio identificata che definirono "reagina". Dovettero passare quasi altri 50 anni prima che il gruppo di Ishizaka e il gruppo di Johanson, in maniera indipendente, nel 1967 identificassero nella nuova classe immunoglobulinica E (IgE) la natura della "reagina". Nello stesso anno Wide et al.<sup>1</sup> misero a punto il Radioallergosorbent test (RAST) per il dosaggio delle IgE specifiche, dando il via all'era della diagnostica allergologica in vitro, che negli anni successivi divenne un importante *step* nell'algoritmo diagnostico del paziente allergico.

Alla fine degli anni '80, con l'introduzione della seconda generazione dei sistemi per il dosaggio delle IgE specifiche, furono apportate varie modifiche al test originale, quali lo sviluppo di fasi solide con elevata capacità legante l'antigene, l'uso di traccianti enzimatici legati ad anticorpi anti-IgE monoclonali, nonché l'uso di curve di calibrazione eterologhe tarate sullo standard IgE WHO 75/502, che resero il test realmente quantitativo. All'inizio degli anni 2000, infine, è comparsa la terza generazione dei sistemi diagnostici per la determinazione delle IgE specifiche, caratterizzati dall'alta sensibilità analitica e da una totale automazione.

Nonostante il miglioramento continuo dei metodi diagnostici, però, analisi comparative dei dati ottenuti con test di terza generazione<sup>2</sup> hanno dimostrato come per alcuni allergeni permanga una scarsa concordanza fra metodi e in alcuni casi ci siano significative discrepanze tra dati analitici e clinici. Varie possono essere le motivazioni di tali osservazioni, ma la più importante è legata alla composizione degli estratti allergenici. Sebbene siano stati profusi diversi sforzi nel tentativo di migliorare la purificazione e la standardizzazione degli estratti allergenici usati sia per la diagnostica in vivo e in vitro, nonché per l'immunoterapia specifica, essi continuano a presentare una discreta variabilità nella loro composizione, sia tra metodi che tra lotti.

La maggiore limitazione degli estratti allergenici, però, è che essi rappresentano una miscela di proteine allergeniche e non, e quindi non sono in grado di dare informazioni precise circa le singole specificità allergeniche verso le quali un singolo soggetto è sensibilizzato.

Durante l'ultima decade, numerose molecole allergeniche sono state identificate, clonate e sequenziate, grazie all'uso di tecniche di biologia molecolare, e ora disponiamo di molti allergeni ricombinanti che possono essere utilizzati in diagnostica, facendo presagire che è già iniziata l'era di

transizione dalla diagnostica allergologica basata sull'uso di estratti allergenici a quella molecolare.

## Le molecole allergeniche

Negli ultimi anni sono stati identificati centinaia di allergeni provenienti da diverse fonti allergeniche quali erbe, alberi, acari, epiteli animali, cibi, imenotteri, etc, la maggior parte dei quali sono stati espressi come molecole ricombinanti in cellule procariote o eucariote, in forme in grado di mantenere l'attività biologica, nonché la struttura antigenica della molecola nativa. Per molti allergeni è stata identificata la localizzazione dei residui aminoacidici responsabili del legame con le IgE, come pure degli epitopi responsabili della attivazione dei linfociti T specifici. Per circa 40 molecole, infine, fra le quali Bet v 1, Der p 1, Der p 2, Bla g 2, Bos d 2, Ara h 1, è stata definita la struttura tridimensionale tramite risonanza magnetica e cristallografia a raggi X.

La lista delle molecole è costantemente aggiornata nella *Official list of allergens* dell'*International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature sub-committee del WHO (WHO/IUIS)* (<http://www.allergen.org>). Altri database, però, sono disponibili per consultazioni, quali *Allergome* (<http://www.allergome.org>), il *Food Allergy Research and Resource Program Allergen database* (<http://www.allergenonline.com>) e l'*InFormAll database* (<http://foodallergens.ifr.ac.uk>).

L'analisi di tali database suggerisce che le molecole allergeniche possono appartenere a oltre 120 distinte famiglie proteiche, anche se in realtà gli allergeni responsabili della maggior parte delle reazioni allergiche sono ristretti a poche famiglie proteiche con un ristretto numero di funzioni biologiche<sup>3</sup>.

Ai fini pratici e per una migliore comprensione di quanto seguirà, va ricordato che, in base alla nomenclatura internazionalmente accettata, un allergene viene definito usando le prime tre lettere del genere, seguito da una singola lettera indicante la specie e un numero indicante la cronologia della purificazione allergenica; ad esempio l'allergene maggiore (allergene 1) del gatto (*Felix domesticus*) verrà definito come Fel d 1, quello del *Dermatophagoides pteronissinus* come Der p 1, e così di seguito.

## L'uso delle molecole allergeniche nella diagnostica allergologica

L'uso di allergeni ricombinanti (o nativi altamente purificati) al posto degli estratti allergenici rappresenta una notevole conquista in allergologia, per diversi motivi.

Il primo è che esso permette di superare uno degli scogli più importanti legati all'uso di estratti allergenici, che è quello della standardizzazione, e ciò a causa della loro variabilità in composizione e in contenuto antigenico, dovuti alla diversità delle fonti di approvvigionamento, alla presenza di enzimi proteolitici, a quella di allergeni contaminati, etc. Recentemente il comitato per la standardizzazione del WHO/IUIS ha intrapreso un nuovo programma al fine di produrre nuovi standard a partire da proteine native purificate o ricombinanti, da distribuire a industrie o enti accademici per la preparazione dei test in vitro, oppure ad enti regolatori per la comparazione dei prodotti allergenici. L'uso di tali standard permette di definire il contenuto allergenico in unità di massa, e se ciò può avere un

significato relativo in diagnostica ha invece un significato importantissimo nelle preparazioni utilizzate per l'immunoterapia specifica. Se uno standard è ottenuto utilizzando molecole ricombinanti, inoltre, ha il vantaggio di poter essere riprodotto immutato e in quantità praticamente illimitata nel tempo.

Un altro grosso vantaggio della diagnostica molecolare è la capacità di discriminare se uno stato di polisensibilizzazione identificato in vivo o in vitro, usando preparati estrattivi, è dovuto a co-sensibilizzazioni, e cioè a sensibilizzazioni primarie verso specifiche proteine allergeniche maggiori o minori presenti nelle singole sorgenti allergeniche, oppure a cross-sensibilizzazioni, cioè cross-reattività verso molecole omologhe presenti in diverse sorgenti allergeniche, a volte senza significato clinico.

Il vantaggio senz'altro più importante, però, è a livello di definizione diagnostica. Una diagnostica basata sugli estratti allergenici, infatti, può arrivare solo alla identificazione della sorgente allergenica (es. allergia alla betulla, agli acari, etc), ma non ad identificare l'entità molecolare verso cui un paziente si è sensibilizzato (es. Bet v1, Bet v2, Bet v4, Der p1, Der p10, etc). La individuazione del profilo allergico individuale di un paziente (*Component Resolved Diagnosis*, CRD) non rappresenta solo un affinamento diagnostico<sup>4</sup>, ma ha notevoli ripercussioni sia prognostiche che terapeutiche, come viene esemplificato di seguito.

#### **Esempi di utilizzo della diagnostica molecolare nell'allergia a pollini**

L'allergia a pollini arborei o di erbe rappresenta una delle cause più frequenti di allergia. Essa può essere determinata dalla presenza di IgE rivolte verso diverse proteine con diverse funzioni. Alcune di queste proteine allergeniche sono altamente conservate e sono presenti in forme omologhe in specie botaniche fra loro non imparentate (panallergeni); altre molecole, invece, sono dotate di specificità a livello di specie o genere botanico. Quest'ultime sono molecole utili per definire una sensibilizzazione primaria ("genuina") verso una singola specie pollinica. Nel caso delle *Graminaceae* molecole appartenenti ai gruppi 1, 2, 5 e 6 sono esclusivamente presenti in tali erbe e pertanto IgE rivolte verso tali molecole sono indice di una sensibilizzazione specifica alle *Graminaceae*. In particolare le molecole del gruppo 1 sono presenti in circa il 95% dei pazienti affetti da allergia a *Graminaceae*. Fra queste, quella appartenente al *Phleum pratense* (codolina) (Phl p1), è quella che viene maggiormente usata in diagnostica e presenta omologie superiori all' 85% con molecole del gruppo 1 delle altre *Graminaceae* e superiori al 90% con quelle di *Lolium perenne* (loglierella) (Lol p 1). Le molecole appartenenti al gruppo 2 (Phl p 2) sono presenti in circa il 60% dei pazienti affetti da allergia a *Graminaceae*, ma non in quelli allergici al *Cynodon dactylon* (Erba canina) e *Zea mays* (granoturco). Analogamente le molecole del gruppo 5 (Phl p 5) sono presenti in circa l'85% di pazienti con allergia a *Graminaceae*, ma in genere non in pazienti con sensibilizzazione a *Cynodon dactylon* e *Zea mays*. Molecole del gruppo 6 (Phl p 6), infine, sono state identificate solo nella loglierella e gramigna dei prati (*Poa pretensis*). Da quanto sopra, quindi, pazienti con IgE specifiche verso Phl p1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6 sono da considerarsi primariamente sensibilizzati alle

*Graminaceae*; pazienti che presentano solo positività per Phl p 1 sono con ogni probabilità sensibilizzati a *Cynodon dactylon* o *Zea mays*; pazienti con positività per Phl p 6 presentano sensibilizzazione per loglierella e gramigna dei prati<sup>5</sup>. I soggetti con positività verso tali molecole, infine, a differenza di quelli sensibilizzati a panallergeni, in genere rispondono bene all'immunoterapia, la quale è standardizzata verso molecole appartenenti ai gruppi 1, 2 e 5.

Un altro esempio di molecola con specificità di genere è Ole e 1, l'allergene maggiore dell'olivo. Quando sono presenti IgE specifiche verso tale molecola, quindi, si è di fronte ad una sensibilizzazione primaria all'olivo, anche se va ricordato come ci sia una notevole omologia con molecole di altre *Oleaceae* e in particolare del frassino (*Fraxinus excelsior*) (Fra e 1) del ligustro (*Ligustrum vulgare* (Lig v 1)). Pazienti, quindi, con positività verso Ole e 1 e residenti in zone dove non c'è l'olivo si sono con alta probabilità sensibilizzati a Frassino e Ligustro, i cui allergeni maggiori hanno una omologia superiore all' 85% con Ole e 1<sup>6</sup>. Pazienti con positività cutanea all'estratto di olivo e positività in vitro per Ole e 1, rispondono bene all'immunoterapia specifica (ITS).

Par j 1 e Par j 2 rappresentano gli allergeni maggiori della *Parietaria judaica* e hanno una elevatissima omologia con molecole analoghe presenti nella *Parietaria officinalis*. La presenza di tali allergeni, quindi, è indice di una sensibilizzazione genuina alla *Parietaria*.

L'allergia alle *Betulaceae*, dopo quella alle *Graminaceae*, è la più frequente allergia a pollini nel Nord Italia. Parecchie sono le molecole allergizzanti individuate nei pollini delle betulle, fra le quali Bet v 1, Bet v 2, Bet v 4, Bet v 6, Bet v 7. L'allergene maggiore, indice di una sensibilizzazione primaria alla betulla, è Bet v 1 una *Pathogenesis related protein* (PR10) presente in oltre l'80% dei pazienti affetti da allergia alla betulla. Molecole con alta omologia a Bet v 1 si trovano in altre piante dell'ordine delle *Fagales* quali l'ontano (Aln g 1), il nocciolo (Cor a 1), il carpino (Car b 1), la quercia (Que a 1), ma anche in alcuni tipi di frutta quali la mela (Mal d 1), la ciliegia (Pru av 1), l'albicocca (Pru ar 1), la pera (Pyr c 1), in alcuni vegetali come il sedano (Api g 1), la carota (Dau c 1), la soia (Gly m 4), le arachidi (Ara h 8). Da quanto sopra, quindi, una positività per Bet v 1 fa presupporre che il paziente presenti reazioni anche con altre piante contenenti le molecole omologhe, nonché possa avere la sindrome orale allergica (SOA) in seguito ad ingestione di frutta o verdura che contengono tale molecola. Sappiamo però che tale molecola è labile e non resiste al calore, per cui le persone sensibilizzate verso questa molecola che presentano la SOA tollerano bene i cibi cotti e comunque rarissimamente potranno avere anafilassi in seguito ad ingestione di tale frutta o verdura per cui non necessitano di precauzioni particolari. La positività al solo Bet v1 è un marcatore predittivo di risposta alla ITS<sup>7</sup>.

Un allergene minore della betulla è Bet v 2. Esso è una profilina, componente importante del citoscheletro delle cellule eucariote in grado di legarsi all'actina. Ha una funzione biologica altamente conservata e, come spesso accade per tale tipo di proteine, presenta un'alta omologia fra molecole appartenenti a diversi organismi, anche di specie non affini. Pazienti con IgE specifiche alla profilina, quindi, possono manifestare reazioni allergiche a pollini di piante

appartenenti a generi diversi, nonché a vari tipi di frutta, verdure, semi, spezie, lattice. Trattasi, quindi di un panallergene, spesso chiamato in causa nel caso di reattività multiple a test cutanei. In tal caso non si tratta di co-sensibilizzazioni, ma di cross-sensibilizzazioni, dovute alla reattività crociata tra molecole omologhe (profiline) contenute in diversi estratti, ottenuti a partire da varie specie botaniche. Un paziente, quindi, apparentemente polisensibilizzato a vari pollini, ma che risulta al test molecolare positivo per Bet v 1 e Bet v 2 è un paziente primariamente sensibilizzato alla betulla, ma che nel corso della storia naturale della sua allergia ha sviluppato anche una sensibilizzazione alla profilina (Bet v 2), in grado di dare cross-reattività con molti altri estratti pollinici e che clinicamente può estrinsecarsi in una SOA verso una quantità di alimenti ancora maggiore rispetto a quella dovuta a Bet v 1. Tale paziente risponde meno bene alla ITS, che notoriamente è standardizzata per Bet v 1. Ovviamente non risponde ad alcuna ITS per altri pollini. Anche se ora non disponibile, teoricamente potrebbe trovare giovamento da un ITS contenente Bet v 2. Molecole omologhe a Bet v 2 già disponibili e che possono essere analogamente usate per definire una sensibilizzazione alla profilina sono Phl p 12 (da *Phleum pratense*), Ole e 2 (da *Olea europea*), Hev b 8 (da *Havea brasiliensis*), Mer a 1 (da *Mercurialis annua*), Hel a 2 (da *Helianthus annuus*) ed altre ancora.

Un altro panallergene del mondo vegetale è rappresentato dalle proteine con due siti di legami per il calcio (*Two-EF-Hand calcium-Binding Pollen Allergens*). Esse sono proteine contenute nei pollini, ma non in altri tessuti delle piante e quindi, a differenza delle profiline, non sono responsabili di SOA. Queste proteine, anch'esse presentanti alta omologia, sono evidenziabili in vari pollini quali quelli di *Graminaceae* (Phl p 7; Cyn d 7), betulla (Bet v 4), ontano (Aln g 4), olivo (Ole e 3), frassino (Fra a 3), etc. Un paziente sensibilizzato primariamente alle *Graminaceae* (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6), ma anche sensibilizzato a Phl p 7, quindi, presenterà cross-reattività con altri pollini, ma non SOA con frutta o verdura. Esso risponderà meno bene alla ITS, rispetto ai pazienti con sola sensibilizzazione agli allergeni maggiori e non risponderà alla ITS con estratti allergenici di altri pollini.

#### **Esempi di utilizzo della diagnostica molecolare nell'allergia ad acari**

Gli acari rappresentano uno delle maggiori cause di allergia nel mondo e circa il 50% dei pazienti allergici sono sensibilizzati alle proteine di tali artropodi. Dalla prima identificazione dell'allergene maggiore del *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1), altri 20 gruppi di molecole allergeniche, con funzione enzimatica o strutturale, e con stretta omologia fra i due acari maggiori (*pteronyssinus* e *farinae*) sono state identificate e caratterizzate a livello molecolare<sup>8</sup>. Der p 1, Der p 2 (oppure Der f 1 e Der f 2) rappresentano gli allergeni maggiori in grado di identificare da soli la maggior parte dei pazienti affetti da allergia agli acari domestici. Pazienti con positività a tali allergeni sono quindi primariamente sensibilizzati agli acari domestici ed è altamente probabile che rispondano alla ITS.

Come noto da parecchio tempo, inoltre, alcuni soggetti con sensibilizzazione agli acari possono presentare sintomi

respiratori, cutanei e a volte sistemici in seguito ad ingestione di crostacei o lumache. Più studi hanno dimostrato come ciò sia legato a una sensibilizzazione alla tropomiosina, proteina presente in forma altamente conservata fra le varie specie di invertebrati quali artropodi, insetti, crostacei, molluschi, e quindi le IgE specifiche prodotte a partire dalla tropomiosina di una di questi invertebrati presenta un alto grado di cross-reattività con tutte le altre; non ci sarebbe cross-reattività, invece, con le tropomiosine dei vertebrati. Sul piano pratico, quindi, un soggetto sensibilizzato verso la tropomiosina degli acari (Der p 10), presenta reattività con la tropomiosina dei gamberetti (*Penaeus aztecus*, Pen a 1; *Penaeus monodon*, Pen m 1), di altri crostacei quali l'aragosta (*Panulirus stimpsoni*, Pan s 1; *Homarus americanus*, Hom a 1), di molluschi quali i calamari (*Todarodes pacificus*, Tod p 1), di ostriche (*Crassostrea gigas*, Cra g 1) e di altri invertebrati e di conseguenza possibili reazioni avverse in seguito alla ingestione di tali alimenti. La presenza di IgE specifiche verso Pen a 1 o Pen m 1 viene usata come marcatore di tale allergia.

Una nostra recente esperienza, usando sia rPen a 1 che nPen m 1, comunque, ha evidenziato come solo una piccola parte dei pazienti con allergia ad acari e reazioni avverse da ingestione di crostacei presentasse positività per tali molecole, facendo ipotizzare o che le molecole attualmente utilizzate in diagnostica non esprimono in maniera ottimale i siti leganti le IgE specifiche, o che la reattività crociata tra acari e gamberetti può essere dovuta anche a molecole diverse dalla tropomiosina. Sono attualmente in corso valutazioni tramite immunoblot e RAST inibizione al fine di verificare tali ipotesi.

#### **Esempi di utilizzo della diagnostica molecolare nell'allergia alimentare**

L'allergia alimentare presenta maggiori difficoltà diagnostiche rispetto alle allergie respiratorie, anche perché i test attualmente a disposizione difettano in sensibilità, ma soprattutto in specificità, e ciò fa sì che il test diagnostico di riferimento per l'allergia alimentare rimanga il test di scatenamento in doppio cieco controllato con placebo (DBPCFC), il quale, comunque, oltre al rischio di provocare reazioni gravi, è indaginoso e necessita di strutture adeguate per la sua esecuzione. La possibilità di disporre di test quantitativi per IgE specifiche ha senz'altro rappresentato un passo in avanti, permettendo di stabilire livelli di predittività per vari allergeni, cioè livelli soglia sopra i quali si ha una probabilità di positività del DBPCFC del 95%, come dimostrato dagli studi di Sampson<sup>9</sup>. Tale approccio, però, non è sempre facilmente realizzabile, dal momento che i livelli sono metodo dipendenti e in letteratura sono riportati solo per pochi allergeni. Ogni centro, quindi, dovrebbe farsi i propri valori, ma se ciò è possibile per le allergie più comuni, è praticamente impossibile per quelle dovute ad allergeni più rari.

La diagnostica molecolare ha in sé delle grandi potenzialità anche nel campo dell'allergia alimentare, come già sopra dimostrato per le SOA legate a Bet v 1 o a profiline. Sempre rimanendo nell'ambito dell'allergia alla frutta, la positività per molecole appartenenti alla categoria delle *Lipid Transfer Proteins* (LTPs) è stata associata a reazioni gravi, sistemiche a differenza di quanto avviene nel caso delle sen-

sibilizzazioni a proteine appartenenti alla famiglia delle PR10 (Bet v 1) o alle profiline e ciò è messo in relazione alla loro stabilità al calore e alla resistenza all'azione dei succhi gastrici. La positività a una LTP derivata dalla pesca (Pru p 3) o dalla nocciola (Cor a 8), oggi a disposizione, è predittiva di possibili reazioni sistemiche in seguito ad ingestione di tali alimenti, anche cotti o sotto forma di succhi di frutta, o di altri alimenti appartenenti alle *Rosaceae*.

Altre molecole già identificate, non ancora disponibili per la diagnostica ma di probabile prossima introduzione, sono quelle appartenenti alla famiglia delle 2S albumine, responsabili di importanti reazioni allergiche in seguito ad ingestione di senape (Sin a 1, Bra j 1), noce brasiliana (Ber e 1), noce (Jug r 1), sesamo (Ses i 1), anacardio (Ana o 3) e altri alimenti; alla famiglia delle *Vicilin-like proteins*, responsabili di importanti reazioni in seguito alla ingestione di arachidi (Ara h 1), lenticchie (Len c 1), nocciola (Cor a 11), noce (Jug r 2), anacardio (Ana o 1), sesamo (Ses i 3); alla famiglia delle parvalbumine, responsabili delle reazioni al pesce (Cyp c 1; Gad c 1, etc).

Se tali molecole, quindi, rappresentano una speranza reale di migliorare la diagnostica delle allergie alimentari, rendendo marginale l'uso del DBPCFC, rimane da valutare se la presenza di IgE specifiche verso di esse rappresenti sempre un rischio reale di scatenamento della reazione allergica e quindi siano sempre dotate di elevato valore predittivo positivo. Ciò sarà importante da definire in considerazione di quello che comporta per il paziente una diagnosi di allergia alimentare IgE mediata.

### La diagnostica molecolare con tecniche tradizionali e microarray

Attualmente con il sistema ImmunoCap di Phadia sono disponibili oltre 30 molecole, relative ad allergeni appartenenti alle *Graminaceae*, betulla, olivo, parietaria, acari, lattice, *Aspergillus*, olivo, cane e gatto. Il numero limitato di molecole disponibili, comunque, non permette per ora di sostituire l'uso degli estratti con quello delle singole molecole, ma quest'ultime possono essere di volta in volta usate per definire alcuni specifici profili, in base allo specifico quesito clinico. Ad esempio è possibile determinare se un soggetto con multi-sensibilizzazioni a pollini rilevate al prick test presenti reali co-sensibilizzazioni o se si tratta di cross-sensibilizzazioni, in base a quanto in precedenza riportato. E' possibile anche meglio definire la natura di una reazione allergica alla frutta, definendo se si tratta di una SOA da Bet v 1, da Bet v 2, oppure di una reazione con risvolti ben più gravi legata a una sensibilizzazione a Pru p 3. Qualora si avessero a disposizione molte altre molecole si potrebbe ipotizzare di poter sostituire gli estratti allergenici con le singole molecole. Al momento, però, tale strada sembra poco percorribile, essenzialmente per questione di costi; una alternativa potrebbe essere la sostituzione degli estratti attuali con miscele di molecole. Ciò senz'altro porterebbe ad un miglioramento della standardizzazione e della riproducibilità del sistema, ma farebbe venir meno i vantaggi della CRD precedentemente descritti.

Un modo per superare i limiti intrinseci legati alle metodiche tradizionali ci viene offerto dai microarray proteomici. In campo allergologico essi sono già una realtà ed è già commercializzato l'ISAC (Immuno Solid-phase Aller-

gen Chip), in cui in un supporto di vetro sono presenti quattro siti di reazione, ognuno di 7x7 mm. Ogni sito contiene 90 diverse molecole immobilizzate in tripletta sulla superficie del vetrino, ma in teoria può contenerne oltre 400. E' già in preparazione una seconda versione contenente oltre 100 molecole per sito. Il vantaggio maggiore del microarray è di poter determinare un profilo allergologico molto ampio in un unico dosaggio, con soli 20 µL di siero. A parità di numero complessivo di determinazioni anticorpali, inoltre, ha costi decisamente inferiori in quanto, per ogni singola specificità IgE, sono necessari solo qualche centinaio di picogrammi di molecola, anche se il costo fisso per singolo paziente si aggira oggi sui 100 euro. Esso, comunque, permette di passare da una visione particolare dello stato di sensibilizzazione del paziente, ad una olistica, con la definizione dell'intero profilo di sensibilizzazione, suddiviso per allergeni maggiori e minori.

Nonostante gli indiscussi vantaggi rispetto alla diagnostica tradizionale, però, prima dell'introduzione su larga scala nella pratica clinica, i microarray per la diagnostica allergologica dovranno essere ottimizzati e attentamente valutati sul piano analitico e clinico. In particolare andrà valutato se i risultati ottenuti per le singole molecole siano sovrapponibili a quelli ottenuti con metodi tradizionali, e i primi studi, limitati a pochi allergeni, riportano risultati confortanti per Der p 1, Der p 2, Fel d 1, Bet v 1, Bet v 2, Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6, Phl p 7, ma non, per esempio, per Art v 1<sup>10</sup>. Dovranno essere, inoltre, essere allestiti dei sieri da usarsi sia per il controllo di qualità interno che per le verifiche esterne di qualità, i quali necessariamente avranno caratteristiche diverse da quelli ora in uso in quanto dovranno essere molecola e non estratto specifici. Parallelamente alle valutazioni analitiche dovranno essere condotti ampi studi di validazione clinica, al fine di definire la reale accuratezza diagnostica di tali sistemi e se le premesse teoriche, che vedono nella diagnostica molecolare un'arma formidabile a supporto dell'allergologo clinico, siano realmente in grado, come atteso, di tradursi in un miglioramento dell'*outcome* clinico. Allergologi clinici e di laboratorio, pertanto, saranno chiamati ad una collaborazione sempre più stretta, mirata a rispondere a tali importanti quesiti.

In conclusione, quindi, la possibilità di passare da una diagnostica basata sull'utilizzo di estratti allergenici a una basata sull'utilizzo delle singole molecole allergeniche, in grado di definire lo specifico profilo allergenico di ciascun paziente (CRD), grazie anche all'uso di tecnologie proteomiche su microarray, sembra essere in grado di rivoluzionare la diagnostica allergologica e, probabilmente, in futuro anche l'immunoterapia. Stiamo quindi assistendo, in campo allergologico, a un fermento culturale e a dei cambiamenti che, rapportati al campo della storia dell'arte, possono essere paragonati a quanto avvenuto nel passaggio dal medioevo al Rinascimento. Il laboratorio è l'artefice principale di tale rivoluzione culturale e avrà il compito, in stretta collaborazione con la parte clinica, di valutare e validare i nuovi sistemi diagnostici affinché essi diventino realmente strumenti importanti e indispensabili della diagnostica allergologica, evitando così che referti composti di centinaia di sigle, di non immediata comprensione, portino ad un "imbarocchimento" della diagnostica, creino

nuove diffidenze da parte dell'utilizzatore clinico e, in definitiva, conducano al fallimento della prima vera grande rivoluzione innovativa in campo allergologico dall'epoca di Charles Blackley.

### Bibliografia

1. Wide L, Bennich H, Johansson SG. Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen antibodies. *Lancet* 1967; 2:1105-7.
2. Ollert M, Weissenbacher S, Rakoski J, Ring J. Allergen-specific IgE measurement by a continuous random-access immunoanalyzer: interassay comparison and agreement with skin testing. *Clin Chem* 2005; 51:1241-9.
3. Radauer C, Bublin M, Wagner S, Mari A, Breiteneder H. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:847-52.
4. Iancovici-Kidon M, Tim CF. Component-specific immunoglobulin E in the diagnosis of allergic disease in childhood: more of the same or something more? *Isr Med Assoc J* 2007; 9:476-8.
5. Kazemi-Shirazi L, Niederberg V, Linhart B, Lidholm J, Kraft D, Valenta R. Recombinant marker allergens: diagnostic gatekeepers for the treatment of allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 127:259-68.
6. Valenta R, Twaroch T, Swoboda I. Component-resolved diagnosis to optimize allergen-specific immunotherapy in the mediterranean area. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2007; 17 (suppl 1):88-92.
7. Mothes N, Horak F, Valenta R. Transition from a botanical to a molecular classification in tree pollen allergy: implication for diagnosis and therapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 135:357-73.
8. Thomas WR, Smith WA, Hales BJ, Mills KL, O'Brien RM. Characterization and immunobiology of house dust mite allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129:1-18.
9. Sampson HA. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:891-6.
10. Asero R. Plant-derived food allergens: an overview. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2006; 38:220-3.