

RIVISTA DI **Immunologia e Allergologia Pediatrica**

Organo Ufficiale della Società Italiana di Allergologia ed Immunologia Pediatrica

Dicembre 2006 • Anno XX • Numero S2

Direttore Editoriale e Scientifico

Stefano Miceli Sopo

Comitato di Redazione

Alfredo Boccaccino, Diego Peroni, Alessandro Plebani,
Daniele Radzik, Giovanni Simeone, Luigi Terracciano

Direttore Responsabile

Angela Venturini

Segreteria di Redazione

Lisa Andreazzi

Progetto Grafico

Massimo Arcidiacono

Editore

Pacini Editore S.p.A. - Via Gherardesca - 56121 Pisa

Stampa

Industrie Grafiche Pacini - Pisa

Copyright by

Società Italiana di Allergologia e Immunologia Pediatrica



Presidente

Alberto G. Ugazio

Consiglio Direttivo

Mauro Calvani, Giovanni Cavagni, Maria Antonella Muraro,
Francesco Paravati, Giuseppe Pingitore, Pier Angelo Tovo

SOMMARIO

Introduzione

Cenni Storici

Test in Vitro

Capitolo I: Test specifici

- Dosaggio delle IgE specifiche in laboratorio
- Dosaggio delle IgE specifiche in ambulatorio
- Test di screening per atopia
- Dosaggio delle IgE specifiche: molecole ricombinanti
- Dosaggio di molecole legate all'attivazione dei basofili
- Dosaggio IgG₄ specifiche

Capitolo II: Test aspecifici

- Dosaggio IgE sieriche totali
- Dosaggio triptasi
- Dosaggio istamina
- Conta degli eosinofili in circolo e nelle secrezioni mucose
- Dosaggio dei mediatori della flogosi eosinofila
- A scopo di ricerca, si possono considerare ...

Capitolo III: Schede pratiche allergia

- Allergia ad inalanti
- Allergia alimentare
- Allergia ai Farmaci
- Allergia al Latice
- Allergia agli Imenotteri

Capitolo IV: Schede pratiche sintomi

- Asma Bronchiale
- Congiuntivite e Rinite allergica
- Dermatite atopica
- Orticaria ed Angioedema

Capitolo V: Test della medicina alternativa e complementare: cosa non fare

Capitolo VI: Prospettive future, i microarray



Per la corrispondenza scientifica:

Dott. Stefano Miceli Sopo
Policlinico A. Gemelli, Clinica Pediatrica,
Largo Gemelli, 8 - 00168 Roma
Tel. 0630154348 (osp.)
0630683479 (ab.)
Fax 0630683479
E-mail: stefano.micelisopo@poste.it

Abbonamenti

La Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica è bimestrale.

Viene inviata gratuitamente a tutti i soci della Società Italiana di Allergologia ed Immunologia Pediatrica.

I prezzi di abbonamento per l'anno 2006 per i non soci sono i seguenti:

Italia: Euro 71; Estero: 81 Euro;
Singolo fascicolo: 26 Euro

Le richieste di abbonamento e ogni altra corrispondenza relativa agli abbonamenti vanno indirizzate a:

Rivista di Immunologia
e Allergologia Pediatrica

Pacini Editore S.p.A.

Via Gherardesca - 56121 Ospedaletto (Pisa)

Tel. 050 313011 - Fax 050 3130300

abbonamenti@pacinieditore.it

<http://www.pacinimedicina.it>

Finito di stampare

presso le Industrie Grafiche
della Pacini Editore S.p.A. - Pisa
Dicembre 2006

*del presente fascicolo sono state stampate
n. 10.000 copie*



Hanno partecipato alla stesura della bozza del presente documento, discusso e approvato nei giorni 17-18 novembre 2006 a Brescia, i componenti del Gruppo di Lavoro sulla Diagnosi Allergologica in vitro della SIAIP, composta da C. Caffarelli (Parma), G. Cavagni (Roma – coordinatore), M. Duse (Roma), F. Marcucci (Perugina), P. Miglioranza (Verona – FIMP), S. Miceli Sopo (Roma), A. Muraro (Padova), I. Saponara (Roma – FIMP) e R. Bernardini (Firenze – coordinatore), E. Galli (Roma), come componenti della Commissione sulla diagnostica allergologica della SIAIP. Alcuni, per impegni concomitanti, non hanno potuto partecipare alla discussione; li ringraziamo vivamente per il sostanziale contributo scientifico che hanno apportato alla stesura del presente documento.

Ringraziamo Simona Donnanno, *Clinical Fellow* dell'Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù" (Roma), per l'eccellente lavoro redazionale sulle osservazioni degli esperti firmatari del documento.

Ringraziamo la sig.ra Marilena Ferri per l'eccellente lavoro di segreteria.

Questa pubblicazione è stata realizzata con il contributo di Phadia

Phadia

Prefazione

Il documento sulla diagnostica allergologica *in vitro* cui è dedicato questo supplemento della Rivista Italiana di Immunologia ed Allergologia Pediatrica rappresenta la naturale prosecuzione e, per molti versi, il completamento della monografia su "Il prick test nella diagnostica allergologica" che la nostra Società aveva approvato e quindi pubblicato nel 2005.

Alla stesura del presente documento si sono dedicati congiuntamente, con assoluta competenza e grande impegno il Gruppo di Lavoro sulla Diagnostica Allergologica *in vitro*, coordinato da Giovanni Cavagni, e la Commissione Diagnostica Allergologica della nostra Società coordinata da Roberto Bernardini. Il Gruppo di Lavoro è composto da C. Caffarelli, M. Duse, F. Maruccci, S. Miceli Sopo, P. Miglioranzi, A. Muraro e I. Saponara. Della Commissione Diagnostica Allergologica fanno parte F. Frati, F. Franceschini, E. Galli, G.L. Marseglia e G. Piacentini.

La Diagnostica Allergologica *in vitro* rappresenta un tema centrale – tanto attuale quanto controverso – della pratica allergologica. Purtroppo, temo si possa affermare senza tema di smentite che pochi accertamenti di laboratorio sono così abusati e così male interpretati come quelli allergologici.

Certamente, alla base di questi comportamenti c'è soprattutto la fragilità gnoseologica su cui ancora si regge (e con cui deve fare i conti) l'allergologia clinica: non tutti i fenomeni allergici sono IgE-mediati e per giunta la presenza di IgE specifiche non è affatto sinonimo di allergia. È un tema questo che Roberto Bernardini e la Commissione da lui coordinata avevano egregiamente affrontato introducendoci al corretto impiego ed alla interpretazione rigorosa dei prick test. Il problema si ripresenta, se possibile, in forma ancor più rilevante ed evidente quando dai test *in vivo* si passa a quelli *in vitro*, più facilmente quantificabili e riconducibili ai criteri della specificità e della sensibilità. Ma su basi clinico-biologiche così ambigue, com'è possibile aspirare a specificità e sensibilità che siano significative per la diagnosi? Per gli allergeni alimentari possiamo ricorrere ai test di scatenamento, peraltro gravati a loro volta da una miriade di difficoltà di esecuzione e di interpretazione, ma per gli aeroallergeni i test di scatenamento sono praticamente improponibili. Non rimane quindi che ricorrere ai risultati dei test allergologici *in vivo* o *in vitro* che,

un po' come nella caverna platonica, possono aiutarci a raggiungere la verità diagnostica soltanto "alla luce della valutazione clinica". Una valutazione, purtroppo, assai soggettiva e persino aleatoria se i sintomi attribuibili ad esempio alla allergia al latte vaccino – cito da un trattato di allergologia – arrivano a comprendere "la Sindrome Ipercinetica, la Sindrome Tensione-Stanchezza, la Colite Infantile, la Periostite Ricorrente ...". Siamo nella notte hegeliana: quella in cui tutte le vacche sono nere.

Il documento su "Le indagini di laboratorio nella diagnosi di malattia allergica nel bambino" ci riporta nell'ambito dell'interpretazione razionale e, quando sono disponibili dati, della medicina basata sulle prove di efficacia.

Stiamo per assistere ad una nuova rivoluzione tecnologica: la possibilità di svelare la presenza di IgE specifiche con microtest rapidi, utilizzabili nell'ambulatorio del pediatra. Al contempo, con il progressivo sviluppo della tecnologia dei microchip, sta diventando sempre più agevole affinare l'obiettivo della diagnosi allergologica che sta rapidamente passando dall'allergene estrattivo a quello di sintesi (ottenuto con le tecnologie del DNA ricombinante) per arrivare all'epitopo allergenico. E chissà che questa ultima fase non possa aiutarci a dipanare le ambiguità di fondo in cui l'allergologia ancora si dibatte.

Spetta a noi utilizzare nel migliore dei modi queste importanti opportunità. Il documento della SIAIP rappresenta a mio avviso un contributo autorevole ed al contempo fruibile sia dal pediatra allergologo che dal pediatra generalista – di famiglia e ospedaliero – per trarre il massimo profitto clinico dalla diagnostica allergologica *in vitro*.

Desidero quindi esprimere viva gratitudine e apprezzamento agli estensori di questo documento ed in particolare ai Coordinatori Giovanni Cavagni e Roberto Bernardini. La gratitudine della SIAIP va anche alla Phadia S.p.A. che si è assunta l'onere di finanziare la stampa e la distribuzione di questo documento come supplemento della RIAP.

Alberto G. Ugazio
Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù"
Presidente, Società Italiana di Allergologia e
Immunologia Clinica

Introduzione

Lo scopo del presente documento è quello di fornire uno strumento utile ai pediatri che vogliono approfondire le loro conoscenze sul reale significato diagnostico e valore clinico dei principali esami di laboratorio che a vario titolo vengono considerati nella categoria dei test allergologici *in vitro*.

La valutazione della costituzione atopica, presenza di allergia IgE mediata, può essere effettuata con test cutanei – *in vivo* – o con test *in vitro*. I test cutanei più frequentemente utilizzati sono gli *Skin Prick Test* (SPT) mentre più raramente si deve ricorrere ai

test intradermici per la valutazione delle reazioni immediate o ai test epicutanei da contatto, *Patch Test* per la valutazione delle reazioni ritardate. I test *in vitro* a loro volta comprendono numerose indagini di laboratorio effettuabili su sangue o su secrezioni. La Società Italiana di Allergologia e Immunologia Pediatrica si è già ampiamente occupata di SPT pubblicando tra l'altro una monografia a cura della Commissione sulla diagnostica allergologica coordinata da Roberto Bernardini e ora *intende prendere in rassegna i test in vitro*.

Cenni Storici

Il termine "allergia" fu introdotto per la prima volta nel 1906 dal pediatra viennese von Pirquet per segnalare un'alterata reazione in un organismo ospite.

Nel 1921 due ricercatori tedeschi, Prausnitz e Küstner, dimostrarono che l'allergia era correlata ad un fattore sierico che successivamente fu definito "reagina".

Nel 1923 Coca e Cooke usarono il termine "atopia" per definire la condizione costituzionale che predispone allo sviluppo di allergia ed infine nel 1966-67 il gruppo di Ishizaka, a Denver nel Colorado, identificò nel siero dei soggetti atopici una proteina della frazione gammaglobulinica con attività reaginica, che fu denominata IgE.

Contemporaneamente, in Svezia, altri 2 ricercatori, Bennich e Johansson, identificarono in un paziente con mieloma una nuova immunoglobulina definita IgND e successivamente rilevarono che tale molecola era presente in concentrazione elevata anche nel siero di soggetti atopici. Ma fu solo nel 1968 a Losan-

na che una commissione internazionale della Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) decise di denominare ufficialmente e definitivamente questa immunoglobulina "IgE".

Nel 1970 furono introdotte in commercio le prime metodiche di laboratorio per il dosaggio delle IgE da parte dell'azienda svedese *Pharmacia: il Paper Radio ImmunoSorbent Test* (PRIST) per il dosaggio delle IgE totali sieriche e il *Radio AllergoSorbent Test* (RAST) per il dosaggio delle IgE sieriche specifiche (sIgE) cioè orientate verso uno specifico allergene.

La scoperta delle IgE ha aperto la strada alla comprensione dei meccanismi delle manifestazioni allergiche e, di conseguenza, allo sviluppo di tecniche diagnostiche e alla standardizzazione degli estratti allergenici.

In anni recenti le conoscenze relative a reazioni allergiche non IgE mediate hanno permesso l'acquisizione anche di altre metodiche diagnostiche talora utilizzabili nella pratica clinica.

Test in vitro

La diagnostica delle allergie in vitro si avvale di:

- 1) test specifici (volti ad evidenziare le sensibilizzazioni allergiche);
- 2) test aspecifici (volti a misurare la produzione di IgE e/o la flogosi allergica).

Test specifici

Queste indagini sono considerate di supporto alla clinica. Sono prevalentemente test quantitativi e standardizzati che hanno una discreta affidabilità clinica ma, di contro, un costo più elevato rispetto agli SPT e richiedono tempi di risposta più lunghi.

Rientrano in questo gruppo:

- dosaggio delle IgE specifiche in laboratorio;
- dosaggio delle IgE specifiche in ambulatorio;
- test di *screening* per atopia;
- dosaggio delle IgE specifiche: molecole ricombinanti;

- dosaggio di molecole legate all'attivazione dei basofili;
- dosaggio IgG₄ specifiche.

Test aspecifici

Sono prevalentemente test quantitativi, alcuni dei quali di facile esecuzione come ad esempio la conta degli eosinofili nasali, che può essere eseguita anche nell'ambulatorio pediatrico. Comprendono:

- dosaggio IgE sieriche totali;
- dosaggio triptasi;
- dosaggio istamina;
- conta degli eosinofili in circolo e nelle secrezioni mucose;
- dosaggio dei mediatori della flogosi eosinofila.

In alcune parti del documento, specie nella sezione delle schede pratiche, saranno menzionate indagini diagnostiche non propriamente in vitro ma utili per completezza della trattazione diagnostica dell'allergia.

Capitolo 1

Test specifici

Dosaggio IgE specifiche in laboratorio

La ricerca delle sIgE in vitro verso un determinato allergene rimane il più utile tra i test di laboratorio per la diagnosi delle malattie allergiche da ipersensibilità immediata. Si basa su metodiche immunologiche che sono andate modificandosi continuamente negli ultimi anni a partire dal RAST il primo ad essere introdotto nella diagnostica clinica.

Nella pratica allergologica si utilizza soprattutto in situazioni di non concordanza tra anamnesi e test cutanei e/o di sensibilità multiple. Inoltre la ricerca delle sIgE nel siero (RAST e suoi equivalenti) rappresenta un test privo di rischi per il paziente, non influenzato dal grado di cooperazione e da eventuali somministrazioni di farmaci. Esso trova indicazione principalmente in patologie cutanee (estesa dermatite atopica, eritrodermia, dermatografismo, ecc.) tali da impedire l'esecuzione degli SPT, quando vi sia necessità di terapia antistaminica o steroidea continuativa per via sistemica o locale in sede di esecuzione (vedi anche documento SIAIP sugli SPT menzionato in introduzione).

Di contro esso risulta tecnicamente più complesso (necessita di un laboratorio analisi) e anche più costoso rispetto ai SPT.

Metodi

La metodica più in uso si basa sull'utilizzo di una fase solida (es. polimero di cellulosa) coniugata in modo covalente con l'allergene a cui viene fatto reagire il siero in esame in modo che le sIgE eventualmente presenti si leghino all'allergene. Dopo lavaggio per asportare le IgE non legate – non specifiche per l'allergene – si aggiungono anticorpi anti-IgE marcati. Si forma così un complesso "a sandwich" costituito dalla fase solida con allergene + sIgE del paziente + anti-IgE marcate. Mediante un metodo di rivelazione si misura la quantità di marcatore presente del complesso che sarà direttamente proporzionale alla quantità di sIgE presenti nel campione in esame.

Sistemi

Nel corso degli anni al "RAST" hanno fatto seguito numerosi altre metodiche che hanno sostituito i marcatori radioattivi e le tecniche sviluppate sono state numerose (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*, ELISA, agglutinazione, precipitazione). Il numero dei sistemi in vitro attualmente in commercio è molto elevato (oltre 10) ma essi presentano significative differenze per quanto riguarda il tipo di

sistema rivelatore (colorimetrico, fluorimetrico, chemio-luminescenza), l'antisiero (mono-policlonale, singoli o in miscela), il supporto per veicolare l'allergene (polimeri di cellulosa, sfere di polistirene ecc.), lo sviluppo in una fase solida o liquida, comportando grande disomogeneità tra i differenti sistemi a disposizione nel panorama laboratoristico. Poiché non tutti i sistemi sono uguali, e non tutti ugualmente validi, è molto importante che il laboratorio garantisca la riproducibilità del dato (sistema con Coefficiente di Variazione < 15% – NCCLS, 2004) e sia certificato da un programma di controllo qualità (QC) Nazionale e/o Internazionale.

Sensibilità e Specificità clinica

Anche questi parametri, sensibilità e specificità, risultano correlati, più che al tipo di sistema rivelatore adoperato, alla qualità della fase solida e alle sue capacità leganti l'allergene (un sistema che massimizza il legame con le IgE attraverso un eccesso di allergeni, sia maggiori che minori, risulta generalmente più sensibile), al tipo di antisiero adoperato (i sistemi più recenti adoperano in genere miscele di anticorpi monoclonali o policlonali con curve dose-risposta appropriate) e al tipo di allergene testato (aero-trofo allergene).

I dati disponibili in letteratura riguardano essenzialmente le metodiche RAST ed ImmunoCAP™ (vedi oltre). In particolare un esteso programma di valutazione clinica sui sistemi ImmunoCAP™ condotto a livello internazionale in 6 paesi su 894 pazienti per un totale di 5.170 dosaggi allergometrici, prevalentemente per inalanti, ha mostrato che i test hanno mediamente una sensibilità e una specificità clinica rispettivamente del 89% e del 91%.

Interpretazione dei risultati

Risultati quantitativi

Significativi progressi nell'ambito dei test volti alla ricerca delle sIgE si sono ottenuti dalle metodiche di ultima generazione di tipo "quantitativo", nelle quali si utilizza una curva di riferimento costruita con i valori di IgE totali di un siero standard (preparazione per le IgE umane n° 75/502 della *World Health Organization*) per convertire la risposta IgE specifica per l'allergene in un risultato quantitativo (c.d. interpolazione eterologa). I risultati si esprimono in kilo-Unità/L di IgE allergene-specifiche (kU_A/L). Nei sistemi

più diffusi la minima dose rilevabile di sIgE è < 0,008 kU_A/L; nella pratica clinica il limite significativo (confine tra il soggetto sano e l'atopico) si è concordato essere > 0,35 kU_A/L.

Il vantaggio della metodica di tipo quantitativo, data la sua standardizzazione e riproducibilità, è rappresentato dalla possibilità teorica di individuare, in soggetti selezionati, dei *cut-off* specifici per vari allergeni, in base ai quali predire una maggiore o minore probabilità di comparsa di sintomi dopo esposizione.

Risultati in classi

In alcuni sistemi la valutazione del risultato viene ancora espressa fino a 6 classi di positività, dove la classe 0 indica l'assenza di sIgE, la classe 1 è fortemente dubbia e le classi 2, 3, 4, 5 e 6 sono indicative di sensibilizzazione. Il risultato in classi è tuttavia meno utile rispetto al dosaggio quantitativo da un punto di vista clinico.

Automazione

I sistemi di ultima generazione sembrano dotati di sensibilità, specificità e riproducibilità superiori, grazie anche alla maggiore automazione e all'impiego di parametri standard internazionali di riferimento. Tuttavia, i risultati di determinazioni delle sIgE effettuate in laboratori differenti possono variare considerevolmente in rapporto alla precisione analitica e all'accuratezza della metodica adoperata.

Confronto con Skin Prick Test

In generale i test in vitro presentano una buona affidabilità diagnostica rispetto a quelli cutanei anche se in studi nei quali lo SPT è stato accettato come "gold standard" diagnostico, i test in vitro sono generalmente risultati meno sensibili, specie per allergeni alimentari come la soia o il grano. Invece, nell'allergia respiratoria altri studi hanno osservato che gli SPT e le sIgE sieriche con metodiche di ultima generazione forniscono risultati grosso modo equiparabili o addirittura, con particolari *cut-off*, superiori.

Almeno sotto il profilo concettuale, è immaginabile che un test in vitro faccia registrare un maggior numero di falsi positivi rispetto al SPT, potendo riconoscere la presenza di IgE leganti singoli epitopi di un antigene ma funzionalmente inattive in quanto incapaci di determinare un "cross-linking" con l'allergene. Per quanto detto sopra, d'altra parte, qualunque valutazione comparativa delle performance dello SPT con quelle della ricerca delle sIgE difficilmente può prescindere dal considerare l'affidabilità diagnostica del metodo in vitro adoperato, lo specifico allergene e il *gold standard* diagnostico preso in considerazione e, non ultime, le qualità dell'operatore.

Messaggi chiave

- Il dosaggio delle sIgE deve essere eseguito con un metodo validato che garantisca la riproducibilità del risultato (sistema con coefficiente di variazione < 15%) e sia certificato da un programma di controllo qualità Nazionale e/o Internazionale.
- È auspicabile che il dosaggio delle sIgE sia di tipo quantitativo anziché semi-quantitativo (quindi non espresso in classi).
- Può essere effettuato a qualsiasi età.
- La specificità e la sensibilità del test per differenti allergeni è superiore all'85%.
- sIgE e SPT sono entrambi utili ed i loro risultati sono in parte interscambiabili.
- Sebbene lo SPT positivo e/o le sIgE nel siero indichino che una persona ha IgE antigene specifiche (cioè presenza di sensibilizzazione) ciò non significa che l'esposizione all'allergene in questione causi sintomi IgE mediati.
- Nella pratica clinica, si possono trovare bambini con sensibilizzazioni di basso grado senza allergia clinicamente evidente.
- Come per gli SPT, i risultati devono essere interpretati in rapporto alla storia clinica; il test ha le stesse indicazioni dello SPT.

Bibliografia

- Ahlstedt S. *Understanding the usefulness of specific IgE tests in allergy*. Clin Exp Allergy 2002;32:11-6.
- Dolen WK. *Allergy Review Series X: Progress in diagnosis of allergy in vitro. IgE antibody in the serum – detection and diagnostic significance*. Allergy 2003;58:717-23.
- Duran-Tauleria E, Vignati G, Guedan MJA, Petersson CJ. *The utility of specific immunoglobulin E measurements in primary care*. Allergy 2004;59(Suppl 78):35-41.
- Høst A, Andrae S, Charkin S, Diaz-Vazquez C, Dreborg S, Eigenmann PA, et al. *Allergy testing in children: why, who, when and how? Statement of The Section on Pediatrics, European*. Allergy 2003;58:559-6.
- Johansson SGO. *ImmunoCAP[®] Specific IgE test: an objective tool for research and routine allergy diagnosis*. Exp Rev Mol Diagn 4:273-9.
- NCCLS Document I/LA20-A. *Evaluation Methods and Analytical Performance Characteristics of Immunological Assays for Human Immunoglobulin E (IgE) Antibodies of Defined Allergen Specificities; Approved Guideline*. NCCLS 1997;24.
- Paganelli R, Anotegui IJ, Sastre J, Roovers MHWM, Degroot H, Lindholm NB, et al. *Specific IgE antibodies in the diagnosis of atopic disease – clinical evaluation of a new in vitro test system, UniCAP, in six european allergy clinics*. Allergy 1998;53:763-8.
- Pastorello EA, Incorvaia, Ortolani, et al. *Studies on the relationship between the level of specific IgE antibodies and the clinical expression of allergy: definition of levels distinguishing patients with symptomatic from patients with asymptomatic allergy to common aeroallergens*. JACI 1996;5:580-7.
- Plebani M, Borghesan F, Faggian D. *Clinical efficiency of in*

vitro and in vivo tests for allergic diseases. Ann Allergy Asthma Immunol 1995;74:23-8.

Vignati G, Pastori E, Portalupi S, Temporiti R. *In vitro allergy diagnosis: comparison of a new method of fully automated determination of specific IgE, using Immulite 2000 compared with UniCAP 100.* Allergie Immunol 2003;35:285-94.

Williams PB. *Usefulness of specific IgE antibody tests: a progress report.* Ann Allergy Asthma Immunol 2003;91:518-24.

Yman L. *Standardization of in vitro methods.* Allergy 2001;56(Suppl 67):70-4.

Yunginger JW, et al. *Quantitative IgE antibody assays in allergic diseases.* J Allergy Clin Immunol 2000;105:1077-84.

Dosaggio IgE specifiche in ambulatorio

È di recente immissione sul mercato un test ambulatoriale, innovativo, per la determinazione rapida e simultanea di sIgE verso 10 allergeni tra i più comuni e maggiormente responsabili di Wheezing, Asma e Rinite nei bambini.

Il test valuta i seguenti gruppi di allergeni:

- Epteli e forfore – Gatto (e1), Cane (e5)
- Graminacee – *Phleum pratense* (g6)
- Alberi – Betulla (t3), Olivo (t9)
- Erbe – *Artemisia vulgaris* (w6), *Parietaria judaica* (w21)
- Acari – *Dermatophagoides pteronyssinus* (d1)
- Alimenti – Albume (f1), Latte vaccino (f2)

A questo test ne verranno presto affiancati altri due formulati per sintomi differenti, uno per problemi respiratori in bambini più grandi con un pannello di soli allergeni inalanti, ed uno per eczema con una selezione di allergeni alimentari.

Metodica

Circa 110 µl di sangue capillare vengono applicati sul dispositivo fornito dalla ditta produttrice. Il plasma, separato dalle cellule ematiche da un filtro presente nel pozzetto, migra lungo due strisce di nitrocellulosa alle quali sono legati i diversi allergeni. Dopo 5 minuti, una soluzione di sviluppo aggiunta nell'apposito pozzetto, rilascia il coniugato gold-anti-IgE. Il coniugato forma un complesso con gli anticorpi del campione, appena legati, visibile come una linea rosso-rosa nella finestra del test. Il risultato del test (colorimetrico) è chiaro e visibile ad occhio nudo.

Validità clinica

Il test è stato sottoposto ad eventuale approvazione tecnica *Food and Drugs Administration* (FDA). Dati preliminari su 296 bambini sembrano molto incoraggianti, per lo meno da quanto emerge in 2 recentissimi studi internazionali multicentrici presentati al Congresso EAACI 2005 e SIAIP 2006. Il primo è uno studio retrospettivo di un gruppo spagnolo-svedese, il secondo

prospettivo, italiano, si sono posti come obiettivo il confronto tra i risultati ottenuti con il test ImmunoCAP™ *Rapid Wheeze/Rhinitis Child* e la diagnosi clinica formulata dagli specialisti usando come riferimento anamnesi, storia clinica e risultato degli SPT.

La capacità del test di riconoscere i pazienti come positivi/negativi sembra concordare con la diagnosi del medico e gli SPT nel 96,5% dei casi. Il limite del profilo allergenico dell'attuale test è l'assenza di alcuni allergeni di rilevanza clinica per la popolazione italiana.

Messaggi chiave

- Il test è di facile e rapida esecuzione (20 minuti).
- Richiede un prelievo di sangue capillare dal dito del paziente.
- È standardizzato e non richiede una preparazione specifica dell'operatore.
- Potrà essere un semplice ma efficace mezzo diagnostico di primo livello, anche nell'ambulatorio del pediatra, nei pazienti con sospetto di allergia qualora i dati preliminari fossero confermati.

Bibliografia

Hedlin G, Nieto Garcia A, Lilja G, et al. *A new point-of-care test for first line diagnosis of allergy in children.* Vienna EAACI 2006, Abstract Book, Poster 502, p. 146.

Jonsson A, Lindqvist A, Molander H. *A new POC test for rapid detection of specific IgE antibodies.* Monaco: EAACI 2005.

Moreno C, Rak S, Palmqvist M, et al. *Clinical evaluation of a new capillary allergy blood test for adults.* Vienna: EAACI 2006, Abstract Book, Poster 502, p. 146.

Trimarco G, Donnanno S, Terracciano L, et al. *Valutazione della performance clinica di un nuovo test in vitro per il dosaggio qualitativo rapido delle IgE specifiche: ImmunoCAP Rapid™.* Reggio Calabria, 8° SIAIP, Apr 2006, Abstract Book, p. 242.

Test di screening per atopia

Il raffreddore persistente, l'asma bronchiale, la dermatite atopica sono malattie complesse per l'etiopatogenesi multifattoriale. Individuare l'associazione della componente allergica alla iperreattività specifica d'organo è un obiettivo cui il pediatra mira con particolare interesse. I test a miscela di allergeni per l'identificazione del fenotipo atopico sono stati ideati per fornire una diagnosi di allergia/atopia mediante una risposta di tipo qualitativo (presenza/assenza di anticorpi di tipo IgE specifici verso una miscela di allergeni alimentari e/o respiratori), anche se non consentono di identificare con precisione l'allergene responsabile.

Il test più documentato e sperimentato è l'*ImmunoCAP Phadiatop (Pharmacia differentiate atopy)* del quale esistono due varianti: il *Phadiatop* con allergeni inalanti, indicato dopo i 4 anni d'età ed il *Phadiatop Infant* indicato sino ai 4 anni in quanto contiene solo alcuni allergeni inalanti e numerosi alimentari. La ricerca delle IgE viene fatta utilizzando il sistema *ImmunoCAP*.

Gli studi di validazione del test sono più numerosi per il test *Phadiatop* da inalanti, sul mercato da circa 15 anni, ed ancora limitati per il *Phadiatop Infant*, test in commercio dal 2003: la sensibilità di questi test oscilla tra 92% e 98%, e la specificità tra 82% e 98%. Anche se alcuni Autori hanno osservato che l'utilizzo di questi test di *screening* in pediatria generalistica aumenterebbe il numero di bambini avviati più correttamente ad un percorso diagnostico allergologico, nella pratica clinica non possono competere con gli SPT o con il dosaggio mirato delle sIgE.

Messaggi chiave

- Test di atopia, eseguiti con metodi validati, possono trovare una loro collocazione, in sostituzione alle IgE totali, nelle indagini di primo livello ai fini dell'inquadramento iniziale del bambino con sospetta malattia allergica.

sostanza in genere non occorre necessariamente essere sensibilizzati a tutte le proteine presenti; nel polline di betulla, ad esempio, sono state identificate alcune proteine allergeniche verso cui la popolazione reagisce in modo differente, secondo una sensibilizzazione "paziente-specifica" (Bet v 1, Bet v 2, Bet v 4, tra le principali). Dati epidemiologici riferiscono che molto dipende dalle aree geografiche considerate: alcune proteine sono allergeni minori, altre – presenti in più del 60-70% dei casi – devono essere considerate allergeni maggiori con differenti implicazioni cliniche e strategie terapeutiche.

Grazie a questi nuovi strumenti diagnostici è possibile escludere o confermare sensibilizzazioni multiple: infatti gli allergeni contenuti per esempio nei pollini – betulla, parietaria, coda di topo, ecc. – possono essere specie specifici oppure comuni ad altre specie se non addirittura all'intero regno vegetale.

Messaggi chiave

- La ricerca di anticorpi per le molecole ricombinanti allergeniche (porzioni di proteine responsabili di sensibilizzazione) consente di discriminare con maggior precisione le proteine responsabili, allergeni maggiori o minori e può essere utile nel percorso diagnostico e nella decisione prima di intraprendere una Immunoterapia Specifica.
- Questi test sono rivolti principalmente a specialisti con competenze specifiche in allergologia molecolare.

Bibliografia

- Ballardini N, Nilsson C, Nilsson M, et al. *ImmunoCAP™ Phadiatop_ Infant – a new blood test for detecting IgE sensitization in children at 2 years of age*. *Allergy* 2006;61:337-43.
- Duran-Tauleria E, Vignati G, Guedan MJA, et al. *The utility of specific immunoglobulin E measurements in primary care*. *Allergy* 2004;59:35-41.
- Fiocchi A, Besana R, Rydén AC, et al. *Differential diagnosis of IgE-mediated allergy in young children with wheezing or eczema symptoms using a single blood test*. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004;93:328-33.
- Paganelli R, Ansotegui IJ, Sastre J et al. *Specific IgE antibodies in the diagnosis of atopic disease*. *Allergy* 1998;53:763-8.
- Williams P, Siegel C, Portnoy J. *Efficacy of a single diagnostic test for sensitization to common inhalant allergens*. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;86:196-202.

Dosaggio IgE specifiche: molecole ricombinanti

L'utilizzo delle Molecole ricombinanti, o meglio Proteine Allergeniche prodotte con tecnologia ricombinante, per dosare le sIgE, è stato introdotto da qualche anno.

La proprietà sensibilizzante degli allergeni – es. pollini – è costituita dalle numerose proteine in essi contenute. Per risultare allergici ad un polline o ad una

Bibliografia

- Asero R, et al. *Plant Food Allergies: a suggested approach to allergen-resolved diagnosis in the clinical practice by identifying easily available sensitization markers*. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;138:1-11.
- Jutel M, et al. *Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens*. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:608-13.
- Kazemi-Shirazi L, Niederberger 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.
- Mari A, et al. *The oral allergy syndrome: improved diagnostic and treatment methods*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:267-73.
- Menz G, Dolecek C, Schonheit-Kenn U, Ferreira F, Moser M, Schneider T, et al. *Serological and skin-test diagnosis of birch pollen allergy with recombinant Bet v I, the major birch pollen allergen*. *Clin Exp Allergy* 1996;26:50-60.
- Moverare R, et al. *Development of new IgE specificities to allergenic components in birch pollen extract during specific immunotherapy studied with immunoblotting and Pharmacia CAP System™*. *Allergy* 2002;57:423-30.
- Valenta R, Duchene M, Vrtala S, Birkner T, Ebner C, Hirschwehr R, et al. *Recombinant allergens for immunoblot diagnosis of tree-pollen allergy*. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:889-94.

Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund H. *The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT)*. Clin Exp Allergy 1999;29:896-904.

Dosaggio molecole legate all'attivazione dei basofili

I basofili circolanti rappresentano non più del 0,5-1% dei globuli bianchi totali. La loro attivazione attraverso il legame tra IgE e recettori ad alta affinità per le IgE (FCεRI) presenti sulla membrana cellulare provoca degranolazione e liberazione di mediatori come istamina, eparina, proteasi neutre, idrolasi acide e altri fattori chemiotattici. Il test valuta l'attivazione dei basofili in risposta a diversi stimoli allergenici.

CAST-ELISA (Cellular Antigen Stimulation Test)

Descritto nel 1991, consiste nella determinazione quantitativa dei sulfidoleucotrieni (LTC₄ e suoi metaboliti LTD₄ e LTE₄) prodotti in vitro dopo stimolazione dei basofili con un allergene o un farmaco.

Flow-CAST

Misura l'espressione di molecole di superficie inducibili: una delle più studiate è il CD63 (gp53) che viene evidenziato sui basofili in citometria a flusso (Flow-CAST). Studi preliminari condotti con antibiotici betalattamici, ASA ed altri FANS, lattice e anche allergeni inalanti hanno confermato la applicabilità nello studio delle reazioni IgE-mediate.

Messaggi chiave

- Tali metodiche necessitano di ulteriori conferme e al momento vanno considerate solo a scopo di ricerca.

Bibliografia

Torres MJ, Padial A, Mayorga C, et al. *The diagnostic interpretation of basophil activation test in immediate allergic reactions to betalactams*. Clin Exp Allergy 2004;34:1768-75.

Dosaggio IgG₄ specifiche

Il ruolo delle IgG₄ specifiche e il loro rapporto con le IgE nelle malattie atopiche è tuttora controverso. In passato si pensava che le IgG₄ potessero avere una attività di tipo reaginico, sensibilizzante per la capacità di questi anticorpi simil-reaginic di fissarsi a recettori di membrana di mastociti e basofili, di attivarli e di causare quindi degranolazione e liberazione di

mediatori. Questa ipotesi tuttavia non è stata confermata da evidenze sperimentali convincenti ed è stata di fatto abbandonata. Ad oggi ha resistito l'ipotesi che le IgG₄ svolgano preminentemente una attività bloccante, legandosi agli allergeni specifici in competizione con le IgE fissate ai mastociti e ai basofili.

Va segnalato in ogni caso che le IgG₄ specifiche (ad esempio, verso alimenti) possono essere evidenziate anche in soggetti normali, senza alcuna manifestazione clinica e con negatività dei test di provocazione con l'allergene specifico. Per converso le IgG₄ specifiche possono essere assenti per la presenza di un deficit totale delle IgG₄, che è peraltro molto frequente nella popolazione generale (1:440).

I metodi per la rilevazione delle IgG₄ specifiche sono sostanzialmente di 3 tipi:

1. metodi basati sull'inibizione delle IgE: questi test non sono specifici in quanto rilevano tutti gli anticorpi non IgE eventualmente presenti, di qualunque isotipo;
2. metodi basati sull'impiego di antisieri anti-IgG marcati (ELISA-IgG, ecc.): questi test hanno una scarsa sensibilità e specificità;
3. metodi basati sull'impiego di antigeni marcati a cui viene fatto incubare il siero da dosare: questi test sono sufficientemente specifici e sensibili.

Potrebbero avere un ruolo prognostico nell'ipersensibilità al veleno di imenotteri se confermata l'osservazione che gli apicoltori con livelli significativi di IgG₄ specifiche hanno minor probabilità di sviluppare anafilassi in conseguenza delle punture di imenotteri.

Nel monitoraggio della immunoterapia specifica, alcuni Autori osservano un aumento delle IgG₄, anche se tale aumento non è costante e non correla con l'efficacia clinica.

Messaggi chiave

- L'utilità clinica del dosaggio delle IgG specifiche e delle sottoclassi IgG₄ è tuttora controversa.
- Il test non trova applicazione nella pratica clinica e va riservato a scopi di ricerca.

Bibliografia

Aberer W, Woltsche M, Woltsche-Kahr I. *IgG antibodies typical for extrinsic allergic alveolitis – An inter-laboratory quality assessment*. Eur J Med Res 2001;6:498-504.

Meier P, Mueller U. *Evaluation of IgG RAST FEIA for the assay of venom-specific IgG antibodies during venom immunotherapy*. Int Arch Allergy Immunol 1998;117:46-51.

Shek LPC, Bardina L, Castro R, et al. *Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders*. Allergy 2005;60:912-19.

Capitolo 2

Test aspecifici

Dosaggio IgE sieriche totali

Il dosaggio delle IgE totali consente di identificare tutta la popolazione delle IgE (specifiche e non) presenti nel siero di un paziente.

La concentrazione sierica delle IgE totali varia con l'età: nei neonati sono quasi indosabili e aumentano poi progressivamente raggiungendo i livelli dell'adulto intorno al 10° anno di vita. Le IgE rappresentano solamente lo 0,004% di tutte le immunoglobuline ed i valori di normalità nel siero presentano ampie oscillazioni a tutte le età della vita.

Il dosaggio delle IgE totali (noto in passato come PRIST) viene principalmente eseguito con metodi di marcatura fluoroimmunoenzimatica, colorimetrica ecc. e la metodica più utilizzata consiste nel mettere insieme ad incubare:

- anticorpi anti-IgE legati con sistema di covalenza ad una fase solida;
- siero da esaminare.

Le IgE presenti nel siero da esaminare si legano agli anticorpi anti-IgE della fase solida a formare un complesso allergene + anticorpi anti-IgE-IgE. Dopo lavaggio, si aggiungono anticorpi purificati anti-IgE marcati e viene così a formarsi un complesso allergene + anticorpi anti-IgE-IgE-IgE marcate.

La quantità di IgE può quindi essere valutata come quantità di marcatura che sarà tanto maggiore quanto maggiore è il titolo di IgE nel campione in esame.

Messaggi chiave

- Un aumentato livello di IgE totali non è sempre predittivo di allergopatia in quanto molte altre variabili – infestazioni parassitarie, infezioni, malattie infiammatorie croniche, neoplasie, mielomi, fattori ambientali, fumo di sigaretta attivo e passivo – possono indurre un aumento dei livelli di IgE totali.
- La determinazione delle IgE totali nel sangue di cordone ombelicale è stata ridimensionata e attualmente non ha un reale valore predittivo come *marker* di allergia.
- Alcune segnalazioni suggeriscono che nello *wheezing* precoce alti livelli di IgE totali potrebbero correlare con il rischio di persistenza dei sintomi in età scolare; se questo verrà confermato, il dosaggio delle IgE totali nei primi anni di vita potrebbe trovare utilità per meglio caratterizzare i bambini affetti da *wheezing*.

- Il dosaggio delle IgE totali non può competere con gli SPT o il dosaggio delle sIgE mirato e quindi, avendo una scarsa utilità clinica, non dovrebbe essere utilizzato per la diagnostica allergologica del singolo paziente, in quanto il più delle volte risulta confondente e genera inutile allarmismo.

Bibliografia

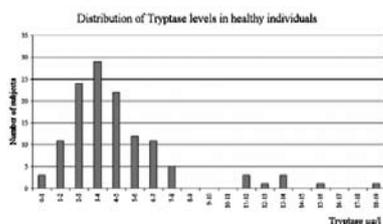
- Batellier L, Poilane C, Rault J, et al. *Measurement of total IgE in tears: the adaptation of an immunoenzyme technique and the value of investigating locally produced IgE in the diagnosis of chronic conjunctivitis*. *Annales de Biologie Clinique* 1999;57:469-73.
- King MJ, Bukantz SC, Phillips S, et al. *Serum total IgE and specific IgE to *Dermatophagoides pteronyssinus*, but not eosinophil cationic protein, are more likely to be elevated in elderly asthmatic patients*. *Allergy Asthma Proc* 2004;25:321-5.
- Liu CA, Wang CL, Chuang H, et al. *Prenatal prediction of infant atopy by maternal but not paternal total IgE levels*. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:899-904.
- Liu CA, Wang CL, Chuang H, et al. *Prediction of elevated cord blood IgE levels by maternal IgE levels, and the neonate's gender and gestational age*. *Chang Gung Med J* 2003;26:561-9.
- Makkonen K, Viitala KI, Parkkila S, et al. *Serum IgG and IgE antibodies against mold-derived antigens in patients with symptoms of hypersensitivity*. *Clinica Chimica Acta* 2001;305:89-98.
- Shirakawa T, Morimoto K, Sasaki S, et al. *Effect of maternal lifestyle on cord blood IgE factor*. *Eur J Epidemiol* 1997;13:395-402.

Dosaggio triptasi

I mastociti attivati liberano vari mediatori fra cui la triptasi, proteasi sierica di peso molecolare 134 kD. L'enzima consiste di quattro subunità non covalentemente legate e ciascuna subunità porta un sito enzimatico attivo. Dal momento che la triptasi si ritrova esclusivamente nei mastociti (nei basofili è presente in quantità trascurabili), la sua presenza nel siero o in altri liquidi biologici può fornire un indice di attivazione mastocitaria anche perché, a differenza di altri mediatori mastocitari, ad esempio l'istamina che si degrada rapidamente, la molecola rimane stabile per

più di 4 ore dopo il suo rilascio. Livelli elevati di triptasi si possono riscontrare nel siero in corso di anafilassi o nella mastocitosi sistemica e nel fluido nasale in corso di rinite allergica.

Per la determinazione della triptasi sierica o plasmatica è possibile utilizzare il test *UniCAP Tryptase* in cui anticorpi anti-triptasi, covalentemente legati all'ImmunoCAP, reagiscono con la triptasi eventualmente presente nel siero del paziente. Si aggiungono quindi anticorpi anti-triptasi coniugati con l'enzima a formare un immunocomplesso; dopo la fase di incubazione, l'enzima-antitriptasi in eccesso viene eliminato mediante lavaggi e l'immunocomplesso viene messo a contatto con il substrato di sviluppo. Dopo aver bloccato la reazione, si misura la fluorescenza liberata. Per la valutazione dei risultati, le risposte dei campioni sono trasformate in concentrazioni mediante l'impiego della curva di calibrazione.



I valori di normalità (= senza stimolazione mastocitaria) della triptasi sierica in adulti e bambini sani corrispondono a una media geometrica di 5,6 microg/L; con limite di confidenza al 95° percentile di 13,5 microg/L; eventuale aumento di triptasi può essere rilevato fino a 3-6 ore dopo reazione anafilattica con ritorno nella norma dopo circa 12 ore dall'inizio della reazione. La triptasi può essere ricercata anche nei liquidi di lavaggio bronchiale, nasale, lacrimale ed intestinale: in particolare il dosaggio nella mucosa nasale può essere utile per verificare lo stato di sensibilizzazione e per monitorare la flogosi *in situ* o in corso di test di provocazione. Il sospetto di anafilassi come causa di morte può essere verificato con il dosaggio della β -triptasi *post-mortem*.

Messaggi chiave

- Il dosaggio della triptasi sierica è utile nella diagnosi di reazione anafilattica: la concentrazione aumenta nelle prime 6 ore dall'inizio della reazione.

Bibliografia

- Bruno G, Andreozzi P, Magrini L, et al. *Serum tryptase in allergic rhinitis: effect of cetirizine treatment*. Int J Immunopathol Pharmacol 2001;14:147-52.
- Enrique E, Garcia-Ortega P, Sotorra O, et al. *Usefulness of UniCAP-tryptase fluoroimmunoassay in the diagnosis of anaphylaxis*. Allergy 1999;54:602-6.

Mentula P, Kylanpaa ML, Kempainen E, et al. *Serum levels of mast cell tryptase, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in patients with acute pancreatitis*. Pancreas 2003;27:E29-E33.

Nishio H, Suzuki K. *Serum tryptase levels in sudden infant death syndrome in forensic autopsy cases*. Forensic Sci Int 2004;139:57-60.

Dosaggio istamina

Come a tutti noto, il principale prodotto di degranulazione del mastocita e del basofilo attivato è l'istamina, che viene liberata entro pochi secondi e compare in circolo entro 2 minuti dall'inizio della reazione allergica. Tuttavia la brevità del tempo di emivita (massima concentrazione sierica in 5 minuti e ritorno ai valori basali entro 15-30 minuti) ne rende difficoltosa la determinazione.

Il dosaggio è in ogni caso possibile, utilizzando metodiche fluorimetriche ad elevata affinità e selettività (*Leukocyte Histamine Release Test: LHRT*) o metodiche radioimmunologiche (*Histamine-RIA*) o ancora immunoenzimatiche da eseguirsi comunque in laboratori specializzati.

Messaggi chiave

- Il dosaggio della istamina ha scarsa rilevanza nella pratica clinica.

Conta degli eosinofili in circolo e nelle secrezioni mucose

Nel soggetto sano il numero degli eosinofili si aggira intorno al 1-7% dei leucociti circolanti, ma può salire a valori superiori al 15-30% sia in patologie allergiche che non allergiche. L'aumento del numero di eosinofili nel sangue periferico può far sospettare una condizione atopica pur tenendo presente che può essere causato da numerose malattie (ad esempio infezioni, infestazioni) e da fattori ambientali (ad esempio inquinanti, diossido di zolfo).

Gli eosinofili possono essere valutati anche a livello delle mucose: su biopsie di mucosa bronchiale e intestinale, ad esempio un aumento del numero di eosinofili o la presenza di nidi di eosinofili nel secreto mucoso nasale sono indicativi di rinite allergica.

Per quanto riguarda i costituenti degli eosinofili si possono distinguere:

- costituenti della membrana (Fosfolipasi E ecc.);
- costituenti dei granuli: la proteina basica maggiore (MBP), la perossidasi eosinofila (EPO), la proteina cationica eosinofila (ECP) e la proteina X (EPX);

- Costituenti non granulari: enzimi (arilsulfatasi A, fosfolipasi B, istaminasi ecc.), metaboliti dell'acido arachidonico (LTC₄, PGD₂, PGE₁ ecc.) e citochine.

Messaggi chiave

- La conta degli eosinofili nel sangue periferico ha scarsa rilevanza per la diagnosi delle malattie allergiche.
- Un elevato numero di eosinofili nelle secrezioni mucose può essere espressione di flogosi allergica.

Messaggi chiave

- Il test ha grande utilità nella ricerca clinica ma limitate applicazioni pratiche.

Bibliografia

- Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, et al. *Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation*. J Allergy Clin Immunol 2001;107:607-14.
- Bettiol J., Radermecker M, Sele J, et al. *Airway mast-cell activation in asthmatics is associated with selective sputum eosinophilia*. Allergy 1999;54:1188-93.
- Kantor O Jr, Rosario Filho NA. *Peripheral blood eosinophils and serum level of eosinophil cationic protein in asthmatics*. J Pediatr 1997;73:11-5.
- Marks GB, Kjellerby J, Luczynska CM, et al. *Serum eosinophil cationic protein: distribution and reproducibility in a randomly selected sample of men living in rural Norfolk, UK*. Clin Exp Allergy 1998;28:1345-50.

Bibliografia

- Hidvegi E, Cserhati E, Kereki E, et al. *Serum eosinophil cationic protein (sECP) level after cow's milk challenge test in allergic children*. Orv Hetil 2000;141:2775-7.
- Kosa L, Kereki E, Farkas MC. *Eosinophilic cationic protein levels in feces and serum in children with food allergies*. Orvosi Hetilap 1997;138:345-7.
- Marciniak D, Tomaszewicz-Fryca J, Plusa T et al. *Eosinophil cationic protein in children with allergic diseases of the respiratory tract in exacerbation and remission of symptoms*. Pol Merkuriusz Lek 1998;4:75-7.
- Pohunek P, Kucera P, Sukova B, et al. *Serum ECP taken in the acute episode of bronchial obstruction can predict the development of bronchial asthma in young children*. Allergy Asthma Proc 2001;22:75-9.
- Zubovic I, Rozmanic V, Ahel V, et al. *Manifold significance of serum eosinophil cationic protein in asthmatic children*. Acta Med Croatica 2002;56:53-6.

Dosaggio dei mediatori della flogosi eosinofila

Gli eosinofili, quando sono attivati, rilasciano vari mediatori fra cui la Proteina Cationica degli Eosinofili (ECP). È una proteina altamente basica ad azione citotossica, in grado quindi di indurre un danno delle mucose. Per la misurazione di questa proteina si utilizza un test immunoenzimatico: i livelli sierici normali sono compresi fra 2,3-15 µg/ml mentre negli allergici, in particolare negli asmatici e nei pazienti con dermatite atopica, si riscontrano valori notevolmente più elevati. Va sottolineato che l'emivita dell'ECP nei soggetti normali è di poco superiore ad un'ora mentre nelle fasi acute, come ad esempio in corso di crisi asmatica indotta dall'esposizione all'allergene, il turnover dell'ECP ed il tempo di dimezzamento si riduce a meno di 30 minuti.

... a scopo di ricerca, si possono considerare ...

- 1 Studio di morfologia e funzionalità delle principali cellule che avviano e/o partecipano al processo immunoflogistico (es. studio sottopopolazioni linfocitarie nel sangue periferico).
- 2 Dosaggio di alcuni mediatori cellulari coinvolti nel processo infiammatorio (IL-4, IL-5, IL-13, TNF-alfa, eotassina, ecc. nel liquido di lavaggio bronchiolo-alveolare, nasale o nella cute).
- 3 Studi citologici su neutrofilii e piastrine.
- 4 Studi funzionali su cellule deputate alla presentazione dell'antigene, monociti e macrofagi, che attraverso la produzione di IL-1 e GM-CSF possono aumentare la sopravvivenza degli eosinofili, provocando l'incremento dose dipendente di altri mediatori quali PAF e LTC₄.

Capitolo 3

Schede pratiche allergia

Allergia ad inalanti

Una sensibilizzazione agli inalanti può essere presente a qualsiasi età anche se nei primi anni di vita *wheezing*, asma, dispnea, tosse persistente, riniti sono frequentemente associati a flogosi infettive delle vie aeree.

Un numero sempre crescente di pazienti soffre di problemi respiratori di natura allergica (circa 1/3 della popolazione). Insidiose sono la rinite stagionale e la congiuntivite, che circa nel 33% dei casi, si associano ad asma. La diagnosi allergologica è utile per l'identificazione tempestiva e per la successiva eliminazione del relativo allergene che può migliorare il controllo della malattia.

Esami in vitro

- Test di *screening* per atopia: si possono richiedere per dirimere un problema allergico e per decidere se inviare il paziente verso un iter allergologico.
- IgE specifiche: si possono richiedere in seguito ad un'approfondita anamnesi.

Indicazioni

- Riniti, flogosi ricorrenti.
- Asma con terapia in atto.
- SPT negativi o dubbi, che non concordano con storia clinica.
- Assunzione di antistaminici o terapia steroidea continuativa per via sistemica o locale in sede di esecuzione.
- In patologie cutanee tali da impedire l'esecuzione degli SPT.

Allergeni prevalentemente responsabili nella popolazione italiana

- Nel 1° anno: acari, epitelio di gatto.
- Dopo il 1° anno: acari, epiteli animali, muffe, pollini (graminacee, alberi, erbe).
- Test ImmunoCAP Rapid: qualora i dati preliminari fossero confermati si potrà eseguire su pazienti con sintomi respiratori per stabilire la presenza di sensibilizzazione verso uno o più dei 10 allergeni presenti nel test.

Esami complementari

- Prove di funzionalità respiratoria.

- Conta degli eosinofili nelle secrezioni.
- Test di provocazione specifico e aspecifico.

Bibliografia

- Høst A, Andrae S, Charkin S, et al. *Allergy testing in children: why, who, when and how? Statement of The Section on Pediatrics, European. Allergy* 2003;58:559-6.
- Johansson SGO. *ImmunoCAP[®] Specific IgE test: an objective tool for research and routine allergy diagnosis. Expert Rev Mol Diagn* 2004;4:273-9.
- Kotaniemi-Syrjanen A, Reijonen TM, Romppanen J, et al. *Al- lergen-specific immunoglobulin E antibodies in wheezing infants: the risk for asthma in later childhood. Pediatrics* 2003;111:E255.
- Paganelli R, Ansotegui IJ, Sastre J, et al. *Specific IgE antibodies in the diagnosis of atopic disease – clinical evaluation of a new in vitro test system, UniCAP, in six european aller- gy clinics. Allergy* 1998;53:763-8.
- Wickman M, Ahlstedt S, Lilja G, et al. *Quantification of IgE antibodies simplifies the classification of allergic disea- ses in 4-year-old children. A report from the prospective birth cohort study – BAMSE. Pediatr Allergy Immunol* 2003;14:441-7.

Allergia alimentare

La prevalenza dell'allergia alimentare è pari a circa il 5% nei bambini, l'1-2% nei giovani e meno dell'1% negli adulti. Gli alimenti più frequentemente in causa sono: il latte, l'uovo, le arachidi, la soia, il pesce ed i crostacei. Il *gold standard* per l'allergia alimentare ri- mane sempre il test di provocazione orale (TPO) da eseguire in ambiente idoneo al trattamento dello shock anafilattico.

Esami in vitro

- IgE specifiche: si possono richiedere quando lo giustifica un'approfondita anamnesi, ricordando che la positività indica solo l'avvenuta sensibi- lizzazione per l'alimento e non che tale alimen- to sia responsabile delle manifestazioni cliniche della allergia. La valutazione delle sIgE in vitro ha pertanto un significato nella diagnostica delle al- lergie alimentari sia per conferma di sospetti, sia perché indica per quali alimenti è opportuno ese- guire ulteriori approfondimenti.

Alcuni Autori hanno stimato il rischio di gravi reazioni in corso di TPO in relazione ai livelli di sIgE. Gli stessi Autori propongono valori soglia di sIgE per i quali sarebbe sconsigliata l'esecuzione del TPO in quanto la probabilità di comparsa di reazione sarebbe elevata. Ciò è stato proposto per uovo, latte, arachidi e pesce. Per la valutazione della raggiunta tolleranza, il TPO dovrebbe essere rimandato, sulla scorta di periodici controlli al momento più opportuno, quando cioè i livelli di sIgE si abbassano sotto i valori soglia. L'utilità di questo approccio è legata esclusivamente al metodo analitico utilizzato. I valori soglia variano sia per autore che per allergene.

Va ricordato infine che non esistono valori soglia al di sotto dei quali si possano escludere rischi di reazioni importanti alla ingestione di un alimento che possono verificarsi anche in totale assenza di sIgE. Qualora la clinica sia fortemente suggestiva si deve comunque procedere alla dieta di esclusione seguita dal TPO per conferma.

- IgG specifiche: alcuni Autori recentemente hanno segnalato una correlazione tra riduzione dei sintomi legati al colon irritabile con una dieta di eliminazione di alimenti per cui erano presenti alti livelli di IgG specifiche. Tuttavia questi studi sono controversi ed al momento tale dosaggio non trova indicazioni nella pratica clinica.

Indicazioni

- SPT negativi o dubbi, che non concordano con storia clinica.
- Assunzione di antistaminici o terapia steroidea continuativa per via sistemica o locale in sede di esecuzione.
- In patologie cutanee tali da impedire l'esecuzione degli SPT.

Allergeni da richiedere

- Nel 1° anno: latte, uovo, altri allergeni su sospetto.
- 1-4 anni: latte, uovo, grano, noci, pesce, altri allergeni su sospetto.
- > 4 anni: allergeni su sospetto.

Esami complementari

- Conta degli eosinofili: può essere effettuata su campioni di sangue o di muco fecali: l'eosinofilia è un dato aspecifico che acquista specificità solo se varia in seguito al contatto o all'eliminazione dell'antigene alimentare. La presenza di eosinofili fecali può essere un indizio di allergia alimentare nelle forme gastro-intestinali.
- Sangue nelle feci: (anche occulto) soprattutto se accompagnato dalla presenza di muco è utile

per suggerire una allergia alimentare con sintomi gastroenterici IgE e non IgE mediata, ma non dà indicazione sulla natura dell'allergene in causa. Il sospetto andrà accertato con il TPO.

Bibliografia

- Atkinson W, Sheldon TA, Shaath N, et al. *Food elimination based on IgG antibodies in irritable bowel syndrome: a randomised controlled trial.* Gut 2004;53:1459-64.
- 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;107:548-53.
- Sampson HA. *Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy.* J Allergy Clin Immunol 2001;107:891-6.
- Wickman M, Ahlstedt S, Lilja G, Hamsten MH. *Quantification of IgE antibodies simplifies the classification of allergic diseases in 4-year-old children. A report from the prospective birth cohort study – BAMSE.* Pediatr Allergy Immunol 2003;14:441-7.

Allergia ai farmaci

Reazioni avverse a farmaci si verificano nel 10% circa dei soggetti che li assumono. Le reazioni da ipersensibilità allergica a farmaci (a patogenesi immunomediata), rappresentano il 15% circa di tutte le reazioni avverse a farmaci e si distinguono in IgE mediate e non IgE mediate (citotossiche, da immunocomplessi e cellulo-mediate).

Queste reazioni comprendono un ampio spettro di manifestazioni cliniche (ad esempio orticaria, angioedema, asma, anafilassi, anemia emolitica, malattia da siero, eczema). Per confermare il sospetto clinico di reazione anafilattica, si può ricorrere ad accertamenti in vitro da eseguire al momento della reazione (fase acuta) e ad accertamenti in vitro e in vivo da eseguire dopo la risoluzione (remissione). Qualora si sospettino reazioni tardive è dirimente ricorrere alle intradermoreazioni e/o ai *Patch Test* con i farmaci sospettati, prima di eseguire l'eventuale test di provocazione orale specifico o alternativo (non correlato da un punto di vista allergenico al farmaco in causa).

Esami in vitro: accertamenti della fase acuta

- Dosaggio Triptasi sierica, in caso di sospetta anafilassi, da eseguirsi nelle prime 6 h dalla comparsa della reazione, possibilmente in determinazioni seriate.
- Test di Coombs: in caso di sospetta reazione di tipo II.
- Dosaggio frazioni del complemento (C3, C4,

CH50) e ricerca di immunocomplessi circolanti, in caso di sospetta reazione di tipo III.

Esami in vitro: accertamenti della fase di remissione (entro 1-3 mesi dalla reazione)

- Dosaggio sIgE sieriche eseguito con il sistema ImmunoCAP™ (disponibili solo per penicillina G, penicillina V, ampicillina, amoxicillina, cefaclor, succinilcolina, tossoide tetanico, insulina) in caso di sospetta reazione IgE mediata.

Esami complementari (da eseguirsi in centri allergologici di III livello)

Esami cellulari:

- CAST dosa la quantità di LTC₄, LTD₄ e LTE₄ prodotti dai leucociti dopo stimolazione con il farmaco indagato, in caso di sospetta reazione IgE mediata;
- FAST o Flow CAST dosa, in citofluorimetria, l'espressione dell'antigene CD63 o c203, marker di attivazione dei granulociti basofili, dopo stimolazione delle cellule del paziente con il farmaco responsabile della reazione;
- test di proliferazione linfocitaria dopo stimolazione con l'allergene: nelle reazioni avverse immunomediate di tipo IV.

Dati preliminari sull'utilizzo di questi test sono molto incoraggianti. Se tali dati verranno confermati, nel futuro, questi test, affiancheranno il dosaggio delle sIgE nella diagnosi delle reazioni IgE mediate ai farmaci.

Bibliografia

Blanca M, Mayorga C, Torres MJ, et al. *Clinical evaluation of Pharmacia CAP System RAST FEIA amoxicilloyl and benzylpenicilloyl in patients with penicillin allergy*. Allergy 2001;56:862-70.

Gruchalla RS. Drug Allergy. J Allergy Clin Immunol 2003;111: S548-59.

Novembre E, Cianferoni A, Vierucci A. *Anafilassi nel bambino*. In: *Allergologia Pediatrica*. Selecta Medica 2003, pp. 243-260.

Prosser DP, Gompels M. *Anaphylactic shock due to cefuroxime in a patient taking penicillin prophylaxis*. Paediatr Anaesth 2002;12:73-5.

Romano A, Blanca M, Torres MJ, et al. *Diagnosis of non immediate reactions to β-lactam antibiotics*. Allergy 2004;59:1153-60.

Sanchez Palacios A, Ortiz Ponce M, Rodriguez Perez A. *Allergic reactions and pseudoallergies in surgical interventions with general anesthesia*. Allergol Immunopathol 2000;28:24-36.

Torres MJ, Padial A, Mayorga C, et al. *The diagnostic interpretation of basophil activation test in immediate allergic reactions to betalactams*. Clin Exp Allergy 2004;34:1768-75.

Allergia al lattice

L'allergia al lattice di gomma naturale è causata dalla sensibilizzazione a varie proteine contenute nella linfa (caucciù) dell'albero *Hevea Brasiliensis*. La sensibilizzazione al lattice avviene al contatto con materiali sanitari come guanti di gomma, cateteri, tubi, maschere, lacci emostatici, ma anche con oggetti comunemente concessi ai bambini come succhiotti, tettarelle, palloni e palloncini, adesivi. Anche i materassi ad aria e alcuni tipi di tappeti e di stuoie sono a base di lattice. Le manifestazioni sono quasi sempre da contatto, ma alcune volte si hanno sintomi respiratori da inalazione della polvere di lattice che si libera dall'oggetto utilizzato. Sono inoltre sempre più frequenti le segnalazioni di *reazioni crociate* tra proteine del lattice e alcuni tipi di frutta, che solo in alcuni casi hanno un significato clinico.

Esami in vitro

- IgE specifiche: si richiedono in pazienti con sospetta reazione al lattice. Si considerano sensibilizzati i pazienti con sIgE > 0,35 kU/L. La ricerca delle sIgE dà risultati comparabili allo SPT.
 - In soggetti con spina bifida e sensibilizzati al lattice i valori di sIgE sieriche per lattice > 3,5 kU/L si associano significativamente alla comparsa di sintomi da allergia al lattice.

Esami complementari

- IgE specifiche con proteine ricombinanti: per una migliore definizione della sensibilizzazione, si possono utilizzare le proteine allergeniche contenute nel lattice, responsabili delle manifestazioni cliniche:
 - Hev b 1 e Hev b 3 sono le principali proteine responsabili dell'allergia al lattice in soggetti con spina bifida;
 - Hev b 2 (1-3 glucanasi), Hev b 6.02 (eveina), Hev b 7 (palatin – like protein), Hev b 8 (profilina), Hev b 11 (chitinasi di classe I), sono gli antigeni in gioco nei soggetti con allergia alla frutta.
- Test di provocazione con il guanto di lattice.

Bibliografia

Bernardini R, Novembre E, Lombardi E, et al. *Risk factors for latex allergy in patients with spina bifida and latex sensitization*. Clin Exp Allergy 1999;29:681-6.

Moneret Vautrin DA, Beaudouin E, Widmer S, et al. *Prospective study of risk factors in natural rubber latex hypersensitivity*. J Allergy Clin Immunol 1993;92:668-77.

Novembre E, Bernardini R, Brizzi I, et al. *The prevalence of la-*

- tex allergy in children seen in a university hospital allergy clinic.* Allergy 1997;52:101-5.
- Kelly KJ, Kurup VP, Reijula KE, et al. *The diagnosis of natural rubber latex allergy.* J Allergy Clin Immunol 1994;93:813-6.
- Bollinger ME, Mudd K, Keible LA, et al. *A hospital-based screening program for natural rubber latex allergy.* Ann Allergy Asthma Immunol 2002;88:560-7.
- Bollinger ME, Mudd K, Keible LA, et al. *A hospital-based screening program for natural rubber latex allergy.* Ann Allergy Asthma Immunol 2002;88:560-7.

Allergia agli imenotteri

Il veleno di imenotteri (api, vespe, calabroni) è costituito da una miscela di tossine, enzimi e molecole vasoattive che di per sé non ha potere anafilattogeno, ma in presenza di sIgE nei soggetti sensibilizzati può causare reazioni sistemiche anche gravi.

L'iter diagnostico che porta all'identificazione del veleno in causa deve essere intrapreso solo in caso di reazioni sistemiche o di orticaria generalizzata grave a seguito di puntuta o morso di insetto. Il rischio è altrimenti quello di iniziare un percorso diagnostico-terapeutico molto oneroso e non scevro di effetti collaterali a fronte di una sensibilizzazione molto modesta e totalmente priva di rischi per il paziente. Poiché vi è spesso una positività a più allergeni per la presenza di crossreattività, il dosaggio quantitativo delle sIgE indirizza nella scelta dell'immunoterapia. In caso di negatività, i test vanno ripetuti dopo 6-12 mesi. Solo in pazienti adulti e in caso di fortissima suggestione anamnestica ma non in età pediatrica si può eventualmente proseguire con il *challenge*. Il dosaggio delle sIgE, per quanto preciso, non aiuta a

misurare il rischio di reazioni sistemiche gravi perché i livelli di sIgE non correlano con la gravità della reazione alla puntura di insetti.

Esami in vitro

- IgE specifiche: vanno richieste nella diagnosi di reazione allergica generalizzata al veleno di imenotteri per identificare l'insetto pungitore. Una volta dimostrata la presenza di sIgE il paziente va inviato ad un centro allergologico di III livello per completare l'iter diagnostico-terapeutico.

Indicazioni

Tra 1-6 mesi dalla reazione allergica grave.

Allergeni disponibili

Richiedere gli allergeni vespa (*polistes dominilus* e *vespula germanica*), ape mellifera, calabrone, bombo.

Bibliografia

- Dubois AE. *Investigational and clinical use of the sting challenge.* Curr Opin Allergy Clin Immunol 2003;3:283-5.
- Faux JA, Moffatt MF, Lalvani A, et al. *Sensitivity to bee and wasp venoms – association with specific IgE responses to the bee and wasp venom and HLA DRB1 and DPB1.* Clin Exp Allergy 1997;27:578-83.
- Komase Y, Sakata M, Azuma T, et al. *IgE antibodies against midge and moth found in Japanese asthmatic subjects and comparison of allergenicity between these insects.* Allergy 1997;52:75-81.
- Meier P, Mueller U. *Evaluation of IgG RAST FEIA for the assay of venom-specific IgG antibodies during venom immunotherapy.* Int Arch Allergy Immunol 1998;117:46-51.
- Rieger-Ziegler V, Rieger E, Kranke B, et al. *Hymenoptera venom allergy: time course of specific IgE concentrations during the first weeks after a sting.* Int Arch Allergy Immunol 1999;120:166-8.

Capitolo 4

Schede pratiche sintomi

Asma bronchiale

L'asma bronchiale è una malattia infiammatoria cronica delle vie respiratorie caratterizzata da iperreattività bronchiale a vari stimoli e responsabile della comparsa di sintomi respiratori conseguenti all'ostruzione bronchiale reversibile spontaneamente o dopo terapia; nei primi anni di vita "il respiro sibilante o/e la tosse persistente" possono essere definiti come asma solo in presenza di un evidente stato atopico e dopo aver escluso altre rare condizioni. La prevalenza nella popolazione è del 10% circa. La diagnosi è clinica e può avvalersi della valutazione delle prove di funzionalità respiratoria. Dal momento che in età pediatrica oltre l'80% dei casi ha un'eziopatogenesi allergica, possono essere utili i test allergologici (cutanei o in vitro).

Esami in vitro

- Test di *screening* per atopia: si possono richiedere per dirimere un problema allergico e per decidere se inviare il paziente verso un iter allergologico.
- IgE specifiche: l'accuratezza diagnostica del dosaggio delle sIgE è buona, ma si limita ad indicare una presenza di una sensibilizzazione che va poi correlata con la storia clinica del paziente.
- ImmunoCAP Rapid: qualora i dati preliminari fossero confermati, il test potrà essere utilizzato sia per escludere un problema allergico che per identificare gli allergeni responsabili in caso di sensibilizzazione.

Indicazioni

- Riniti, flogosi ricorrenti.
- Asma con terapia in atto.
- SPT negativi o dubbi, che non concordano con storia clinica.
- Assunzione di antistaminici o terapia steroidea continuativa per via sistemica o locale in sede di esecuzione.
- In patologie cutanee tali da impedire l'esecuzione degli SPT.

Esami complementari

- Eosinofili nell'escreato indotto: la presenza di eosinofili nell'escreato indotto può predire la com-

parso di esacerbazioni asmatiche. L'utilizzo nel bambino è limitato dalla mancanza di standardizzazione della procedura di raccolta e dalla necessità di collaborazione attiva.

- Concentrazione Ossido Nitrico nell'aria espirata (eNO). I valori di normalità del eNO nella popolazione sana corrispondono a 6,4-26,8 ppb. L'eNO è considerato un *marker* di infiammazione allergica delle vie aeree, ma l'interpretazione dei suoi valori è tuttora oggetto di studio: è un esame promettente la cui applicazione è ancora limitata alla ricerca.

Bibliografia

- Grebski E, Wu J, Wuthrich B, et al. *Does eosinophil cationic protein in sputum and blood reflect bronchial inflammation and obstruction in allergic asthmatics?* J Investig Allergol Clin Immunol 1999;9:82-8.
- Jatakanon A, Lim S, Barnes PJ. *Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control.* Am J Respir Crit Care 2000;161:64-72.
- Meijer RJ, Postma DS, Kauffman HF, et al. *Accuracy of eosinophils and eosinophil cationic protein to predict steroid improvement in asthma.* Clin Exp Allergy 2002;32:1096-103.
- Sanz ML, Prieto I, Garcia BE, et al. *Diagnostic reliability considerations of specific IgE determination.* J Investig Allergol Clin Immunol 1996;6:152-61.
- Soderstrom L, Kober A, Ahlstedt S, et al. *A further evaluation of the clinical use of specific IgE antibody testing in allergic diseases.* Allergy 2003;58:921-8.

Congiuntivite e rinite allergica

Congiuntivite Allergica

La congiuntivite allergica è un processo infiammatorio a carico della congiuntiva oculare e delle palpebre, che provoca bruciore, prurito, iperemia e lacrimazione. Si distingue nella forma stagionale o perenne la prima è causata dalla diretta esposizione della mucosa oculare agli allergeni stagionali (di solito pollinici) mentre la seconda agli allergeni perenni (di solito acari e i derivati epidermici degli animali domestici).

Rinite Allergica

La rinite allergica è un processo infiammatorio carat-

terizzato, alla rinoscopia, da una mucosa pallida, secrezione acquosa filamentosa, e ipertrofia dei turbinati, provocato da diversi allergeni. Se sono in gioco allergeni stagionali o occasionali si ha la rinite allergica stagionale o episodica, se sono invece in gioco allergeni perenni, si osserva una rinite che, a seconda della durata e della gravità sarà intermittente (se i sintomi durano meno di 4 giorni alla settimana o meno di 4 settimane consecutive) o persistente (se i sintomi durano più di 4 giorni alla settimana e per più di 4 settimane).

Esami in vitro

- Test di *screening* per atopìa: si possono richiedere per dirimere un problema allergico e per decidere se inviare il paziente verso un iter allergologico o escludere un problema di atopìa.
- IgE specifiche l'accuratezza diagnostica del dosaggio delle sIgE è buona, ma si limita ad indicare una presenza di una sensibilizzazione che va poi correlata con la storia clinica del paziente.
- ImmunoCAP Rapid: qualora i dati preliminari fossero confermati il test potrà essere utilizzato sia per escludere un problema allergico che per identificare gli allergeni responsabili in caso di sensibilizzazione.

Indicazioni

- Congiuntiviti, riniti, flogosi ricorrenti.
- Asma con terapia in atto.
- SPT negativi o dubbi, che non concordano con storia clinica.
- Assunzione di antistaminici o terapia steroidea continuativa per via sistemica o locale in sede di esecuzione.
- In patologie cutanee tali da impedire l'esecuzione degli SPT.

Esami complementari

- Citologia congiuntivale-nasale: è un test di 2° livello, nel quale si analizzano le cellule infiammatorie e non presenti nel liquido lacrimale (centrifugato), nelle secrezioni congiuntivali o nel lavaggio nasale. La presenza di eosinofili, raccolti in agglomerati, è indicativa della natura allergica dell'infiammazione.

Bibliografia

- Gendo K, Larson EB. *Evidence-based diagnostic strategies for evaluating suspected allergic rhinitis*. Ann Intern Med 2004;140:278-89.
- Marseglia GL, Barberi S, Scaramazza C, et al. *La rinite allergica*. In: Vierucci A, ed. *Allergologia Pediatrica*. Selecta Medica 2003, p. 223.

Pucci N, Massai C. *Le congiuntiviti allergiche*. In: Vierucci A, ed. *Allergologia Pediatrica*. Selecta Medica 2003, p. 209

Dermatite atopica

La dermatite atopica è una malattia infiammatoria della cute caratterizzata da eruzione eritematosa scarsamente demarcata e pruriginosa localizzata in sedi tipiche differenti per età. Nel 30-75% dei casi è presente allergia alimentare, prevalenza che tende a diminuire dal primo anno di vita fino ad arrivare a circa l'8% in età scolare. I test allergologici possono essere utili per documentare la presenza di una sensibilizzazione la cui rilevanza clinica va poi verificata con un corretto percorso diagnostico (vedi cap. allergia alimentare e allergia ad inalanti).

Esami in vitro

- Test di *screening* per atopìa: si possono richiedere per dirimere un problema allergico e per decidere se inviare il paziente verso un iter allergologico o escludere un problema di atopìa. Tra questi il *Phadiatop infant* può essere utilizzato nei bambini fino ai 4 anni in quanto comprende prevalentemente allergeni alimentari (tra i principali il latte e le sue frazioni – lattoalbumina, lattoglobulina e caseina – uovo, pesce, arachide, soia) e alcuni allergeni inalanti (tra cui graminacee, epiteli di cane e gatto, acari, parietaria, ambrosia, ulivo, betulla). È un test qualitativo che esprime i risultati come positivi (atopia) o negativi (non atopìa), che richiede ulteriori approfondimenti diagnostici.
- IgE specifiche l'accuratezza diagnostica del dosaggio delle sIgE è buona, ma si limita ad indicare la presenza di una sensibilizzazione che va poi correlata con la storia clinica del paziente.

Indicazioni

- Dermatite atopica con terapia in atto.
- SPT negativi o dubbi, che non concordano con storia clinica.
- Assunzione di antistaminici o terapia steroidea continuativa per via sistemica o locale in sede di esecuzione.
- In patologie cutanee tali da impedire l'esecuzione degli SPT.

Allergeni da richiedere

- Le sIgE possono essere ricercate per alimenti ed inalanti, ricordando sempre che il dosaggio quantitativo indica solo la avvenuta sensibilizzazione; per gli allergeni alimentari va poi dimostrato con il TPO l'eventuale effettivo ruolo etiologico.

- *ImmunoCAP Rapid*: qualora i dati preliminari fossero confermati, il test può essere utilizzato sia per escludere un problema allergico che per identificare gli allergeni responsabili in caso di sensibilizzazione.

Bibliografia

- Hill DJ, Heine RG, Hosking CS. *The diagnostic value of skin prick testing in children with food allergy*. *Pediatr Allergy Immunol* 2004;15:435-41.
- Fiocchi A, Besana R, Rydén AC, et al. *Differential diagnosis of IgE-mediated allergy in young children with wheezing or eczema symptoms using a single blood test*. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004;93:328-33.

Orticaria ed angioedema

L'orticaria è un'eruzione cutanea caratterizzata dalla comparsa di lesioni eritemato-pomfoidi, fugaci, migranti e pruriginose dovute ad edema del derma superficiale. Quando l'edema interessa gli strati più profondi del derma, il sottocute e le sottomuose, si definisce angioedema. Le due condizioni condividono le basi eziopatogenetiche e istologiche, e, pur potendosi manifestare isolatamente, spesso si associano nella sindrome orticaria-angioedema (SOA). La diagnosi clinica è agevole, mentre più complessa è la diagnosi eziologica, che in oltre il 60% non viene riconosciuta. Solo nel 15-20% delle orticarie è dimostrabile una sensibilizzazione allergica e gli allergeni più frequentemente in causa sono alimenti o farmaci. Una volta dimostrata la sensibilizzazione, è tuttavia imprescindibile ai fini della diagnosi, la dimostrazione della esistenza del nesso causale che viene confermato dal preciso e identificabile rapporto temporale tra assunzione di alimento e comparsa di orticaria. Questo stesso rapporto temporale deve essere dimostrabile anche quando si sospetta un ruolo patogenetico per i farmaci, gli additivi (sodio benzoato o eritrosina), le punture o morsi di insetto o nella orticaria da contatto (ad esempio dopo esposizione a sostanze chimiche o dopo contatto con sostanze proteiche quali alimenti, derivati da piante, ecc.).

Esami in vitro

- IgE specifiche Il dosaggio in vitro delle sIgE è indicato come esame di primo livello da preferire agli STP, quando l'orticaria è in atto, in quanto l'orticaria è caratterizzata da iperreattività cutanea e gli SPT danno risultati poco attendibili.

Indicazioni

- Orticaria in atto.
- SPT negativi o dubbi, che non concordano con storia clinica.
- Assunzione di antistaminici o terapia steroidea continuativa per via sistemica o locale in sede di esecuzione.
- In patologie cutanee tali da impedire l'esecuzione degli SPT.

Allergeni da richiedere

- Le sIgE possono essere ricercate per alimenti e farmaci.

Esami complementari

- Autoanticorpi anti-IgE: anticorpi anti-IgE, anti-idiotipo o anti-isotipo, sono dimostrabili in alcune forme di orticaria. Ab anti-recettori ad alta affinità per le IgE (diretti verso la subunità α) sono stati riscontrati in pazienti con orticaria cronica e potrebbero anche avere un ruolo patogenetico quando, incubate in vitro con basofili umani, sono in grado di per sé di produrre attivazione cellulare, con liberazione di istamina e di altri mediatori. Tuttavia questi test sono sofisticati e utilizzati tuttora a fini di ricerca.
- Test siero autologo: si esegue praticando delle intradermoreazioni con siero autologo. Richiede ovviamente un prelievo di sangue e la conservazione del siero che viene inoculato al medesimo paziente durante la fase attiva. Si utilizzano 50 μ l di siero da iniettare nel derma della faccia volare dell'avambraccio: il test è positivo se il volume del pomfo è ≥ 9 mm³ rispetto al controllo negativo dopo 60 minuti. Il test trova indicazione nelle forme di orticaria cronica aggiungere per evidenziare la presenza di auto-anticorpi anti-IgE.

Bibliografia

- Marsland AM. *Autoimmunity and complement in the pathogenesis of chronic urticaria*. *Curr Allergy Asthma Rep* 2006;6:265-9.
- Tosoni C, Cinquini M. *Diagnostic and therapeutic iter in chronic urticaria patients*. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006;19:265-9.
- Zuberbier T, Bindslev-Jensen C, Canonica W, et al. *EAACI/GA2LEN/EDF guideline: definition, classification and diagnosis of urticaria*. *Allergy* 2006;61:316-20.
- Zuberbier T, Bindslev-Jensen C, Canonica W, et al. *EAACI/GA2LEN/EDF guideline: management of urticaria*. *Allergy* 2006;61:321-31.

CAPITOLO V: TEST DELLA MEDICINA ALTERNATIVA E COMPLEMENTARE: COSA NON FARE

Capitolo 5

Test della Medicina Alternativa e Complementare: cosa non fare

In questo capitolo abbiamo travalicato il limite dell'esecuzione "in vitro", che caratterizza il documento generale, per fornire un panorama più ampio su una problematica molto sentita.

Si assiste ad un sempre più frequente ricorso da parte dei pazienti a test della Medicina Alternativa e Complementare, di cui poco si conosce. Questi test si propongono di identificare, con metodiche diverse dalle tradizionali, soprattutto alimenti responsabili di allergie e intolleranze alimentari. Tutte le metodologie disponibili sono poco riproducibili, non standardizzate e, soprattutto, legate alla interpretazione soggettiva dell'operatore-valutatore che spesso non è un medico. Ciò rende difficile la valutazione dei risultati. Si può affermare che ad oggi, per nessuno dei test della Medicina Alternativa e Complementare, è stata ben documentata né una soddisfacente accuratezza diagnostica, né sensibilità e specificità sufficienti. Essi pertanto non sono utili e, anzi, una decisione clinica basata su risultati ottenuti attraverso questi test può condurre alla prescrizione di diete improprie con danni sulla salute e, in ogni caso, conduce al danno, mai irrilevante, di un ritardo nella formulazione della diagnosi corretta.

Per chi volesse approfondire, di seguito sono riportati cenni sui test diagnostici della Medicina Alternativa e Complementare più utilizzati correntemente.

Test citotossico (Test di Bryan)

Questo test si basa sul principio che l'aggiunta in vitro di uno specifico allergene al sangue intero o a sospensioni leucocitarie comporti una serie di modificazioni morfologiche nelle cellule fino alla citolisi. Ne esiste una versione automatizzata che si basa sul principio del *coulter-counter* (ALCAT). Più studi, anche in doppio cieco, hanno evidenziato un elevato numero di falsi positivi e falsi negativi ed un basso tasso di riproducibilità. Le modificazioni leucocitarie osservate sono verosimilmente da imputarsi a variazioni di pH, temperatura, osmolarità e tempo di incubazione.

Analisi del capello

Viene ricercata la presenza in eccesso di alcuni metalli pesanti (mercurio, cadmio) o la carenza di oligoelementi (selenio, zinco, cromo, magnesio, manganese). Correlare ciò ad una patologia allergica è rimasto nel campo delle speculazioni. In uno studio britannico è stata valutata l'attendibilità diagnostica di questo test e del test citotossico in soggetti allergici al pesce ed in controlli sani inviando il materiale a più laboratori. Nessun laboratorio ha individuato l'allergia al pesce, mentre sono risultate indicazioni per altri alimenti ben tollerati. Un altro studio ha ottenuto simili risultati inviando a vari laboratori campioni di capelli di due persone sane.

Test di provocazione/neutralizzazione intradermico

Il test si basa sulla somministrazione per via intradermica dell'allergene o di altre sostanze e sulla successiva osservazione del paziente per un periodo variabile tra 10'-12' per valutare la comparsa di qualsiasi tipo di sintomatologia. La seconda fase della neutralizzazione consiste in una successiva somministrazione dell'allergene immediatamente dopo la comparsa di una positività del test, nell'intento di neutralizzare l'effetto avverso. Un unico studio eseguito in doppio cieco su 8 pazienti con allergia alimentare ha riportato risultati favorevoli; molti di più, sempre in doppio cieco e con casistiche più numerose, ne hanno negato validità e riproducibilità.

Test di provocazione/neutralizzazione sublinguale

Si esegue con la procedura del test intradermico con la differenza che la via di somministrazione dell'allergene è sublinguale. Una variante del test, il DRIA TEST, prevede che alla somministrazione sublinguale dell'allergene segua una valutazione della forza muscolare per mezzo di un ergometro. Il test è considerato positivo

quando compare una riduzione della forza muscolare entro 4 minuti dall'apposizione sublinguale dell'estratto. Il *Food Allergy Committee* dell'*American College of Allergists* ha dichiarato che questo test non è in grado di discriminare l'estratto allergenico dal placebo.

Kinesiologia applicata

Questo metodo diagnostico si basa su una misurazione soggettiva della forza muscolare. Il paziente tiene in mano un contenitore di vetro chiuso che contiene l'alimento da testare, mentre con l'altra mano spinge contro la mano dell'esaminatore. Quest'ultimo, se ritiene di aver percepito una riduzione della forza muscolare del soggetto, diagnostica un'allergia o un'intolleranza nei confronti dell'alimento in questione. Se il bambino è piccolo o non collaborante il test si esegue sul genitore, con o senza il bambino in braccio. Studi eseguiti in doppio cieco hanno dimostrato che il test non è specifico né riproducibile.

Test EAV (Elettroagopuntura secondo VOLL), Vega Test, Sarm Test, Biostrengt Test

In tutti questi test si applica un potenziale elettrico alla cute e si osservano le modificazioni della resistenza cutanea in presenza dell'allergene, posto in una fiala alla concentrazione abituale o estremamente diluito e inserito nel circuito elettrico. Uno studio recente ha riportato la mancanza di riproducibilità delle osservazioni con lo stesso stimolo nello stesso individuo, e l'impossibilità a distinguere i pazienti allergici dai controlli.

Biorisonanza

Si basa sulla convinzione che l'essere umano emetta onde elettromagnetiche che possono essere buone o cattive. La terapia con biorisonanza usa un apparecchio che è in grado di filtrare le onde emesse dal paziente e rimandargliele "riabilitate". Due studi hanno dimostrato la mancanza di valore diagnostico e terapeutico della metodica.

Pulse test – Test del riflesso cardiaco-auricolare

Si basa sulla teoria che l'allergia sia in grado di modificare la frequenza cardiaca. La dose test allergenica può essere somministrata per iniezione, per bocca o per inalazione. È considerata positiva una modificazione di almeno 10 battiti/minuto in un intervallo di tempo non precisato. Non esiste un razionale per l'uso di questo test, né, soprattutto, studi che abbiano valutato la sua accuratezza. Analogo per principio e per mancanza di studi è il Test del riflesso cardiaco-auricolare, in cui l'alimento viene posto alla distanza di 1 cm dalla cute: il riflesso auricolare-cardiaco dovrebbe determinare una modificazione del polso radiale.

Iridologia

È una tecnica che permetterebbe di stabilire il livello di salute di un soggetto tramite l'osservazione dell'iride con un iridoscopio. Una recente revisione sistematica dei lavori pubblicati su tale metodo ha concluso che non dispone di valutazioni scientifiche sufficienti per avallarne l'utilizzo come strumento diagnostico.

Bibliografia

- Beyer K, Teuber S. *Food allergy diagnostics: scientific and unproven procedures*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:261-6.
- Niggeman B, Gruber C. *Unproven diagnostic procedures in IgE mediated allergic diseases*. *Allergy* 2004;58:806-8.
- Senna GE, Passalacqua G, Lomberdi C, et al. *AAITO Position Paper: Controversial and unproven diagnostic procedures for food allergy*. *Allergie Immunologie* 2004;36:139-45.

Capitolo 6

Prospettive future, i microarray

La tecnologia del *microarray* rappresenta uno dei progressi più importanti in campo diagnostico allergologico degli ultimi anni e si avvale della sinergia tra nanotecnologie e la recente produzione di tutte le molecole allergeniche più comuni attraverso la tecnologia del DNA ricombinante. In pratica un panel di molecole allergeniche ricombinanti o purificate vengono incubate con il siero del paziente in esame permettendo l'identificazione a livello molecolare del profilo anticorpale IgE del paziente stesso. Nel Dicembre 2003 è stata commercializzata in Eu-

ropa una metodologia altamente innovativa per il dosaggio delle sIgE contro allergeni comuni. Tale metodica costituisce un avanzamento sotto 3 aspetti fondamentali: 1) offre risultati riferiti alla reazione contro numerose singole molecole allergeniche (e non più miscele o estratti) (Tab. I); 2) utilizza volumi di siero minimi (20 microlitri) ricavabili da un semplice prelievo di sangue capillare e corrispondenti minimi volumi di reattivi; 3) è il primo di una nuova generazione di test, definiti *protein-microarrays*, che presumibilmente sostituiranno progressivamente

Tabella 1 – Allergeni disponibili su un allergen chip.

Fel d 1	rPhl p 1
Can f 1	rPhl p 2
Can f 3 (Dog albumin)	rPhl p 5
rMal d 1.8	rPhl p 6
Alpha-Amylase	rPhl p 7
Beta-Amylase	rHev b 1
rDau c 1	rHev b 10
rApi g 1	rHev b 11
Gal d 1 (Ovomucoid)	rHev b 3
Gad 2 (Ovoalbumin)	rHev b 5
Gad 3 (Conalbumin)	rHev b 6
Gal d 4 (Lysozym)	rHev b 7
Alpha-Casein	rHev b 8
Beta-Casein	rHev b 9
Bos d 4 (Alpha-Lactalbumin)	Der f 1
Bos d 5 (Beta-Lactoglobulin A)	Der f 2
Bos d 5 (Beta-Lactoglobulin B)	Der p 1
Bos d 6 (Bovine serum albumin)	Der p 2
Bos d 7 (IgG bovine)	rAlt a 1
Bos d 8 (Casein)	rAlt a 2
Bos d Lactoferrin	rAln g 1
Kappa-Casein	rBet v 1a
rAmb a 1	rBet v 1d
rAra h 1	rBet v 2
Tri a 18 (Lectin/Agglutinin)	rCor a 1
Tri a 19 (Gliadin)	rArt v 1



Figura 1 – Un esempio di lettura del test ISAC.

gran parte dei test immunoenzimatici esistenti, interessando molte altre branche della medicina (es.: autoimmunità, malattie infettive).

Il test utilizza come supporto un normale vetrino portaoggetti opportunamente trattato al quale sono coniugate in modo ordinato ed altamente riproducibile singole molecole allergeniche. Esso prevede una manualità ridotta e di facile e relativamente rapida (5 ore) esecuzione. La lettura richiede uno scanner a fluorescenza ed i risultati ottenuti, valutati con

controlli interni ed esterni al test sono migliorabili in termini di riproducibilità ed accuratezza quando si utilizza un preparatore automatico in luogo della procedura manuale (Fig. 1). Il test appare di sicuro interesse ed effettivamente ad elevatissimo contenuto innovativo.

La disponibilità nella fase solida di singole molecole allergeniche purificate o ottenute con la tecnologia del DNA ricombinante permette di discriminare i soggetti polisensibili "veri" reattivi a molti distinti allergeni, da quelli "falsi", reattivi contro i cosiddetti pan-allergeni. Ad esempio, un soggetto reattivo solamente contro il der p 10 (tropomiosina) risulta ai test cutanei sensibile non solo agli acari della polvere, ma anche ai molluschi ed ai crostacei. Verrebbe quindi considerato un polisensibile, quando in realtà sarebbe solo un monosensibile.

In generale, l'applicazione dei protein *microarrays* in Pediatria permette di avanzare verso un'"Allergologia Molecolare", di alta specializzazione, propedeutica all'introduzione di immunoterapie innovative. Dal punto di vista metodologico, tuttavia, la validazione dei nuovi test è in corso in diversi gruppi e laboratori e va effettuata utilizzando come "*gold standard*" le migliori metodiche classiche esistenti. Le prime proposte vedono questi esami come test di 3° livello, da effettuarsi per approfondire la diagnostica di particolari sottogruppi di pazienti già sottoposti ai test immunoenzimatici classici.