

RIAP

immunologia
pediatrica
rivista
Allergologia



Organo Ufficiale della Società Italiana di Allergologia ed Immunologia Pediatrica

Direttore Editoriale e Scientifico

Alberto E. Tozzi

Comitato di Redazione

Giuseppe Baviera, Clementina Canessa, Bianca Lattanzi,
Marina Macchiaiolo, Umberto Pelosi, Neri Pucci

Direttore Responsabile

Patrizia Alma Pacini

Segreteria Scientifica

Manuela Moncada

Editore

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

Copyright by

Società Italiana di Allergologia ed Immunologia Pediatrica



CONSIGLIO DIRETTIVO SIAIP

Presidente

Luciana Indinnimeo

Past President

Francesco Paravati

Vice Presidente

Michele Miraglia del Giudice

Tesoriere

Iride Dello Iacono

Consiglieri

Fabio Cardinale, Stefano Miceli Sopo,
Giuseppe Pingitore, Daniele Radzik

Segretario

Salvatore Barberi

Revisori dei conti

Rachele Antignani, Gian Luigi Marseglia

05

ottobre 2010 • anno XXIV

www.riap.it



EDITORIALE

1

NEWS



2

ASMA

Rinosinusite e asma: le ragioni di un concetto unitario

Laura Bardeggia, Paride Palumbo, Fernando Maria de Benedictis

3



ALLERGIE

La diagnostica molecolare in allergologia

Claudia Alessandri, Enrico Scala, Danila Zennaro, Rosetta Ferrara, Maria Livia Bernardi, Adriano Mari

11



La diagnosi di allergia alla nocciola

a cura della Commissione Diagnostica della SIAIP

Mauro Calvani, Riccardo Asero, Marcello Bergamini, Stefania La Grutta, Neri Pucci

21

IMMUNOLOGIA

Immunoterapia specifica e qualità di vita

a cura della Commissione Immunoterapia Specifica della SIAIP

Sergio Arrigoni, Salvatore Barberi, Annamaria Bianchi, Lucia Caminiti, Giovanna De Castro, Guglielmo Scala, Salvatore Tripodi

33



I difetti primitivi dei fagociti: dal sospetto diagnostico alla terapia

a cura della Commissione Immunologia della SIAIP

Baldassarre Martire, Fabio Cardinale, Carlo Capristo, Michele Fiore, Silvana Martino, Viviana Moschese, Annarosa Soresina

40



Autori stranieri o argomenti internazionali



Relazione medico-famiglie o punto di vista delle famiglie



Autore/i di età inferiore a 40 anni



Revisione sistematica



Materiale iconografico



Critical Appraised Topic



Contributo originale



Caso clinico



Commissione SIAIP

La consapevolezza del cambiamento

Come già riferito nella mia presentazione al 12° Congresso Nazionale SIAIP di Bari, nell'Aprile ultimo scorso, stiamo assistendo ad una svolta culturale circa il "diritto alla salute", giustamente considerato un diritto fondamentale di tutti i cittadini.

Per tanti anni si è parlato di Welfare State, cioè di Stato che assiste, che cura la malattia, ed il cittadino era "assistito", fruitore delle cure, "utente" del Servizio Sanitario. Oggi è più appropriato parlare di Welfare Community, cioè di "comunità" che con i propri comportamenti e grazie alle conquiste mediche e scientifiche, protegge il proprio benessere sia con la terapia che con la prevenzione e l'educazione-promozione della salute.

La crescente importanza della sanità nello sviluppo economico solleciterà un cambiamento degli attuali sistemi sanitari. Sarebbe infatti curioso che il principale settore produttivo e occupazionale delle economie del XXI Secolo continuasse ad essere organizzato in maniera dissimile rispetto al normale funzionamento degli altri settori produttori di servizi.

È molto probabile che si assisterà al passaggio dai sistemi sanitari attuali, a modelli che diano al consumatore la possibilità di decidere quale servizio acquistare e a quali condizioni.

Si tratta di una trasformazione per il momento lenta, che risente sia dell'attuale congiuntura economica che di interessi forti, talvolta in contrapposizione tra di loro.

Noi medici, con il nostro ruolo di difensori della salute e di distributori di risorse economiche, siamo i protagonisti di questo scenario: la nostra azione deve essere soprattutto coerente con i bisogni dei nostri pazienti, altrimenti ne perderemo il senso.

Ritengo fondamentale che la SIAIP sia presente non solo nella professione medica, ma anche nella formazione di una cittadinanza attiva in cui il medico diventa "partner" del paziente, e quest'ultimo, grazie ai suoi comportamenti, attore di prevenzione ed educazione sanitaria.

Parfrasando il titolo di un famoso film, *Il Paradiso può attendere*, la Salute invece non può attendere: il primo se possibile va rinviato, anche lungamente, la seconda deve essere ricercata, anche in via preventiva, conservata integra e riacquistata al più presto in caso di perdita.

A questo dibattito la SIAIP deve dare il suo contributo.

È solo l'inizio di un entusiasmante cammino da fare insieme.

Un caro saluto da Luciana Indinnimeo



a cura di [Manuela Moncada](#)



Recent advances in the understanding of genetic defects of neutrophil number and function

Si tratta di una revisione molto aggiornata sulle neutropenie e sui difetti funzionali dei neutrofili, che comprende le ultime scoperte nel settore della genetica di queste malattie rare. È interessante scoprire che le mutazioni finora scoperte alla base della neutropenia severa congenita, seppur a carico di geni diversi, comportano tutte un'alterazione dei meccanismi di apoptosi mediati dal sistema delle chaperonine che è alla base della mancata progressione attraverso l'iter maturativo dei neutrofili. Un altro dato degno di nota è il ruolo del gene WAS nelle neutropenie congenite: questo è classicamente mutato nella sindrome di Wiskott–Aldrich o X-linked trombocitopenia; sono state scoperte ben 4 diverse mutazioni attivanti che causano invece una forma di neutropenia X-linked (XLN), con un fenotipo totalmente differente dalla sindrome di Wiskott–Aldrich. Anche in questo caso, la mutazione sembra aumentare l'apoptosi dei neutrofili. Tra le cause di alterata funzione dei neutrofili, da segnalare infine i difetti a carico dei meccanismi di signaling dei Toll Like receptors (TLR), in particolare quello di IRAK-4, che comporta alterazione nella migrazione, adesione e burst respiratorio. Si tratta quindi di un settore d'indagine in grande sviluppo, che promette in futuro buoni risultati in tema di test diagnostici e di strategie terapeutiche.

Gerben Bouma,¹ Phil J. Ancliff,² Adrian J. Thrasher^{1,3} and Siobhan O. Burns
Br J Haematol. 2010 Aug 31.

Le linee guida della ALPS



La Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) è una condizione caratterizzata da quadro linfoproliferativo non maligno con linfadenopatia, epatosplenomegalia che generalmente migliorano con l'età; sviluppo di malattie autoimmuni col tempo – generalmente non presenti alla diagnosi (in particolare citopenia autoimmune)-, aumentato rischio di sviluppare linfomi Hodgkin e non-Hodgkin. Anche se si tratta di una condizione rara, è molto importante sospettarla in un bambino in presenza di una linfadenopatia persistente, in quanto all'inizio il quadro è molto simile a quello di un linfoma. In realtà ne esistono varie forme a diversa prognosi, che sono dovute a difetti diversi geneticamente determinati del meccanismo dell'apoptosi cellulare; ciò spiega l'enorme proliferazione linfocitaria e lo sviluppo di autoimmunità dovuta all'immunodisregolazione. Questo lavoro è l'ultima revisione delle linee guida della diagnosi di ALPS ed è il risultato della revisione dei criteri diagnostici formulati nel 1999 dal National Institutes of Health (NIH), a cui hanno partecipato i maggiori esperti di ALPS americani, europei e australiani.

Oliveira JB, Bleesing JJ, Dianzani U et al. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome: report from the 2009 NIH International Workshop. Blood. 2010 Jun 10.

Rinosinusite e asma: le ragioni di un concetto unitario

Laura Bardeggia, Paride Palumbo, Fernando Maria de Benedictis



Parole chiave: rinite, sinusite, asma

Abstract

Negli ultimi anni si è progressivamente affermato il concetto che la rinite allergica, la sinusite e l'asma non sono da considerarsi malattie distinte, ma piuttosto rappresentano l'espressione di un identico processo patologico, essenzialmente di natura infiammatoria, in distretti differenti dell'apparato respiratorio. I meccanismi alla base dei rapporti tra rinite, sinusite e asma non sono ancora perfettamente chiari, ma una visione unitaria di queste tre condizioni trova sostegno in ambito epidemiologico, fisiopatologico e terapeutico.

Introduzione

La rinite allergica è tra le dieci cause più frequenti di visite ambulatoriali e, pur manifestandosi generalmente in forma non grave, in età pediatrica può alterare in misura significativa la vita sociale, la frequenza e il rendimento scolastico e l'attività ludico-sportiva. Sinusite ed asma si associano frequentemente alla rinite allergica e queste tre condizioni rappresentano nel complesso un importante problema di salute con impatto socioeconomico non trascurabile per la comunità in termini di visite mediche, terapie farmacologiche e ospedalizzazioni^{1,2}.

Negli ultimi anni si è progressivamente affermato il concetto che la rinite allergica, la sinusite e l'asma siano da considerarsi come espressione di un identico processo di natura infiammatoria in distretti differenti dell'apparato respiratorio. I meccanismi alla base non sono ancora perfettamente chiari, ma diversi dati epidemiologici, anatomici, immunologici, fisiopatologici

e clinici depongono per una visione unitaria di queste tre condizioni³.

In questo articolo saranno presi in esame i principali aspetti che legano le entità cliniche descritte.

Epidemiologia

Asma e rinite allergica coesistono frequentemente nello stesso paziente⁴. La prevalenza della rinite allergica è compresa fra il 10 ed il 25% nella popolazione generale⁵ e può raggiungere il 95% tra gli asmatici⁶. Tale ampia variabilità è in funzione della metodica di indagine adottata a scopo diagnostico (questionario o valutazione clinica) e dal setting (ambulatorio territoriale o centro specialistico) in cui i dati vengono rilevati⁷.

La rinite frequentemente precede l'asma, mentre in circa il 25% dei casi le due condizioni esordiscono

Dipartimento di Pediatria, Ospedale Specializzato Materno-Infantile "Salesi", Ancona

debenedictis@ospedaliriuniti.marche.it

Gli Autori dichiarano di non avere alcun conflitto di interesse rispetto agli argomenti trattati nell'articolo.

simultaneamente⁸. L'ipotesi che la rinite costituisca un fattore di rischio per asma, inizialmente suggerita da studi trasversali, è stata successivamente confermata da diverse osservazioni longitudinali. Guerra et al.⁹ hanno evidenziato che la rinite in età infantile rappresenta un significativo fattore di rischio per lo sviluppo di asma in età adulta indipendentemente dallo stato atopico e che tale rischio aumenta in presenza di sinusite. Il Copenhagen Allergy Study ha dimostrato come l'associazione tra rinite e asma sia particolarmente evidente in presenza di sensibilizzazione ad allergeni perenni¹⁰. L'European Community Respiratory Health Survey ha seguito 6461 pazienti per un periodo di 9 anni e ha dimostrato che il rischio di asma in soggetti con rinite è circa quattro volte superiore rispetto ai controlli; l'effetto è particolarmente evidente in caso di sensibilizzazione ad allergeni perenni¹¹. Uno studio longitudinale su una coorte seguita dall'età di 7 anni fino a 44 anni ha inoltre evidenziato che la rinite allergica in età infantile aumenta da 2 a 7 volte il rischio di incidenza di asma nella preadolescenza, adolescenza e età adulta e di 3 volte il rischio di persistenza in età adulta di asma presente nell'infanzia¹². Diverse osservazioni cliniche indicano che l'asma è di solito più grave nei pazienti con rinite sintomatica rispetto a quelli in cui la rinite è lieve o assente¹³.

L'associazione tra sinusite e asma rappresenta un evento frequente e conosciuto da lungo tempo. Dati recenti suggeriscono che tale legame è in realtà dipendente dalla consensuale presenza di rinite allergica¹⁴.

Immunopatologia

L'infiammazione gioca un ruolo critico nella patogenesi della rinite allergica e dell'asma. Numerosi studi indicano che il processo infiammatorio presenta so-

Secondo lo European Community Respiratory Health Survey il rischio di asma in soggetti con rinite è circa quattro volte superiore rispetto ai soggetti senza rinite.

miglianze importanti tra queste due condizioni, relativamente alla risposta immunologica (reazione tipo I e reazione tipo IVa2) e all'infiltrato flogistico (cellule e mediatori coinvolti), ma anche alcune differenze riguardo al grado dell'infiammazione, quali l'integrità dell'epitelio e la mancanza di ispessimento della membrana basale nella rinite allergica in contrasto con la fragilità epiteliale e la deposizione di collagene subepiteliale nell'asma^{15 16}.

Il termine rinosinusite è da preferire a quello abituale di sinusite, in quanto rinite e sinusite costituiscono spesso un *continuum* della stessa condizione patologica¹⁷. Per molto tempo si è ritenuto che l'infezione rinosinusale costituisse un fattore aggravante l'asma. Negli anni '90 è emerso il concetto che queste due condizioni cliniche potessero essere legate da un comune processo infiammatorio¹⁸. Questa ipotesi iniziale è stata supportata dai risultati di diversi studi che hanno individuato un comune infiltrato flogistico con componente eosinofila a livello dei seni paranasali e dei bronchi^{19 20}. Gli eosinofili svolgono un ruolo patogenetico centrale nel processo infiammatorio: possono infatti contribuire al danno epiteliale attraverso il rilascio di mediatori e la secrezione di citochine e chemochine proinfiammatorie. Le cellule epiteliali rilasciano citochine e chemochine in grado a loro volta di attrarre gli eosinofili, determinando in tal modo un ciclo di eventi che consente il mantenimento e la progressione della flogosi¹⁶. Poiché l'eosinofilia è presente sia nella sinusite allergica che in quella non allergica²¹⁻²³, oltre alle interazioni IgE-dipendenti potrebbero essere coinvolti altri meccanismi in grado di attrarre gli eosinofili nel sito dell'infiammazione²⁴.

Fisiopatologia

L'affinità anatomico-funzionale tra naso e seni paranasali è sostenuta da numerosi elementi, quali il coinvolgimento pressoché costante dei seni paranasali durante un comune raffreddore²⁵ e il contemporaneo interessamento della mucosa del naso e dei seni paranasali dopo provocazione nasale con allergene negli individui sensibili²⁶.

L'interpretazione attuale dei meccanismi fisiopatologici alla base della rinosinusite attribuisce grande importanza all'ostruzione del complesso ostio-meatale²⁷, una regione anatomica localizzata a livello del meato medio che rappresenta il punto di confluenza del flusso mucociliare proveniente dai seni mascella-

Il processo infiammatorio della rinite allergica e dell'asma presenta somiglianze nella risposta immunologica e nell'infiltrato flogistico, ma è diverso per quanto riguarda il grado dell'infiammazione dell'epitelio.

ri, frontali ed etmoidali anteriori. Diverse condizioni patologiche (anomalie e varianti anatomiche delle strutture nasali, allergie, ipertrofia adenotonsillare, fibrosi cistica, reflusso gastroesofageo, discinesia ciliare, ipersensibilità all'aspirina, ecc.) possono favorire l'ostruzione dei seni ed il ristagno delle secrezioni aumentando il rischio di sinusite. La rinite allergica rappresenta il fattore predisponente di sinusite più comune in età pediatrica²⁸.

Nel corso degli anni sono stati ipotizzati numerosi meccanismi in grado di spiegare le correlazioni tra rinosinusite e asma. L'ipotesi di un *riflesso seno-naso-bronchiale* che esita in una broncoostruzione mediata dal vago è antica²⁹. Le prove addotte nel corso degli anni a favore o contro tale ipotesi possono essere motivate dalla necessità di una soglia critica di gravità del coinvolgimento nasale affinché sia evocata una risposta bronchiale.

L'*aspirazione nell'albero bronchiale* di muco proveniente dalle vie aeree superiori è stato più volte proposta come possibile legame patogenetico tra rinosinusite e asma. Questo meccanismo è stato recentemente posto in discussione, in quanto un tracciante radioattivo applicato nei seni mascellari di pazienti con sinusite non è stato successivamente rilevato nelle vie aeree inferiori³⁰.

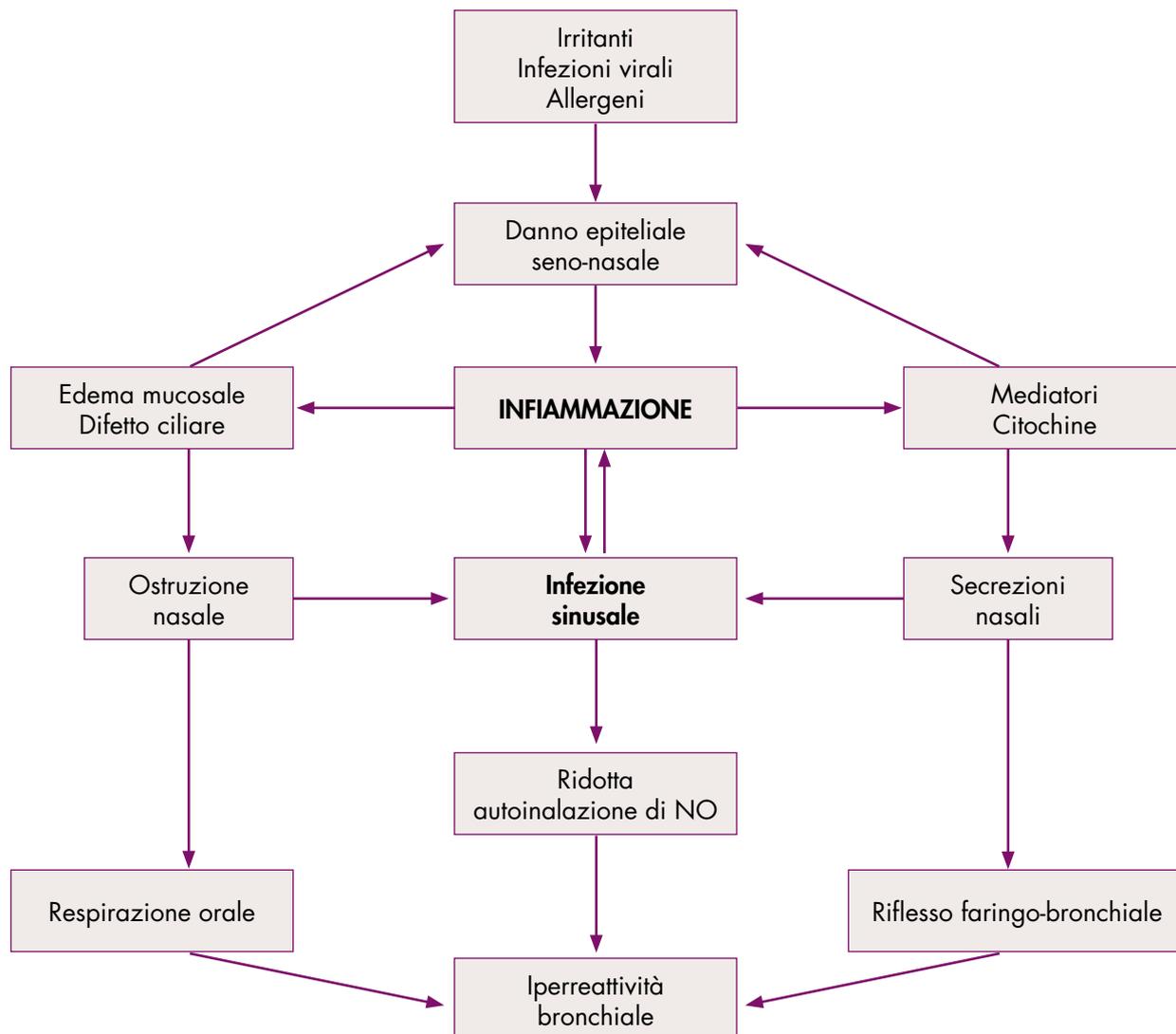
Il ruolo della *iperreattività delle vie aeree* in corso di sinusite è stato enfatizzato da alcuni ricercatori. Studi sperimentali³¹ e clinici³² hanno ipotizzato che tale fenomeno sia conseguente a un riflesso faringo-bronchiale attivato da materiale infiammatorio proveniente dai seni paranasali. L'iperreattività bronchiale potrebbe essere aumentata dal pattern di respirazione prevalentemente orale secondaria all'ostruzione nasa-

le³³. Un ruolo patogenetico a riguardo potrebbe essere svolto dall'ossido nitrico³⁴. La quantità di questo gas espirato dal naso è infatti notevolmente ridotta nei bambini con sinusite mascellare, ma raggiunge valori normali dopo appropriata terapia antibiotica. Poiché l'ossido nitrico ha un effetto di modulazione sul tono bronchiale, l'iperreattività delle vie aeree riscontrabile nella sinusite potrebbe dipendere dalla ridotta autoinalazione del gas proveniente dai seni paranasali.

Le più recenti acquisizioni scientifiche attribuiscono importanza al *processo infiammatorio* comune della mucosa nasale e bronchiale. Braunstahl et al.³⁵ hanno effettuato biopsie prima e dopo stimolazione nasale specifica in soggetti con rinite allergica e hanno dimostrato un aumento degli eosinofili e dell'espressione delle molecole di adesione nella mucosa delle vie respiratorie inferiori. Allo stesso modo, elementi evocativi di un'infiammazione sono stati evidenziati a livello della mucosa nasale dopo challenge bronchiale segmentario in pazienti allergici³⁶.

Alla luce di quanto discusso, è stato proposto un modello fisiopatologico che prevede l'interazione tra diversi meccanismi nei rapporti tra vie aeree superiori e inferiori (Fig. 1). Irritanti ambientali o agenti infettivi possono avviare il processo infiammatorio danneggiando le cellule epiteliali. L'infiammazione provoca edema della mucosa ed alterazioni del movimento ciliare in grado di interferire con il naturale drenaggio delle secrezioni dalle cavità paranasali favorendo l'infezione. L'effetto sulla mucosa nasale delle citochine e dei mediatori di flogosi determina aumento delle secrezioni che contribuisce all'instaurarsi del processo infettivo. L'infiammazione peggiora l'iperreattività bronchiale mediante il riflesso faringo-bronchiale, la

Negli anni sono stati ipotizzati numerosi meccanismi in grado di spiegare le correlazioni tra rinosinusite e asma. Tra questi, attualmente si dà importanza al processo infiammatorio comune della mucosa nasale e bronchiale.



Modificato da de Benedictis et al.³⁷

Fig. 1. Modello fisiopatologico di interazione fra vie aeree superiori e inferiori.

respirazione prevalentemente orale e la ridotta autoinalazione di ossido nitrico³⁷.

Funzionalità polmonare

Il legame tra vie aeree superiori e inferiori è ulteriormente supportato dalla presenza di anomalie della funzionalità respiratoria in soggetti affetti da rinite allergica. Infatti questi pazienti manifestano rispetto ai controlli una maggiore prevalenza di iperreattività bronchiale³⁸ ed anomalie spirometriche delle vie aeree periferiche, soprattutto se la rinite è di lunga durata e è presen-

te sensibilizzazione agli acari^{39 40}. Un recente studio su 221 bambini in età scolare ha inoltre evidenziato una significativa correlazione tra pervietà nasale dopo somministrazione di decongestionante topico e pervietà bronchiale dopo inalazione di beta2-agonista, portando ulteriori elementi a sostegno di una comune comorbidità tra vie aeree superiori ed inferiori⁴¹.

Terapia

Nel corso degli anni c'è stato molto interesse nel cercare di verificare se il trattamento della rinite e/o

della sinusite fosse in grado di migliorare il controllo dell'asma. Il legame fra vie aeree superiori ed inferiori è in parte confermato dai risultati degli studi clinici.

La somministrazione di steroidi intranasali nei pazienti con rinite allergica e asma non solo è efficace sui sintomi nasali, ma migliora anche i sintomi asmatici⁴²⁻⁴³, i test di funzionalità polmonare⁴⁴ e l'iperreattività bronchiale indotta dallo sforzo⁴⁵. Nei pazienti con rinite allergica stagionale ed asma, gli steroidi nasali preven- gono inoltre l'aumento dell'iperreattività bronchiale du- rante la stagione dei pollini⁴⁶⁻⁴⁷. Poiché solo un'esigua percentuale di farmaco somministrato per via nasale è riscontrabile a livello polmonare, gli effetti sull'asma sono verosimilmente da attribuire al miglioramento del- la respirazione nasale indotto dalla terapia topica^{36,36}. L'effetto positivo evidenziato dai precedenti studi non è stato confermato da un recente studio controllato⁴⁸. L'azione sulle vie aeree inferiori degli steroidi nasali è verosimilmente dose-dipendente⁴⁹.

In uno studio retrospettivo su 4944 adolescenti e adul- ti con asma e consensuale rinite i pazienti che aveva- no ricevuto un trattamento per la rinite avevano meno ospedalizzazioni e meno visite di emergenza per asma rispetto agli altri (1,3% vs 6,6%)⁵⁰. In uno studio caso-controllo su pazienti in età pediatrica ed adulti con comorbidità rinite-asma il trattamento della rinite riduceva il rischio di gravi esacerbazioni asmatiche di circa il 50%: l'effetto era particolarmente evidente con l'uso di steroidi intranasali ed era aumentato dal- la somministrazione consensuale di antistaminici⁵¹.

Un studio recente ha valutato l'efficacia di un tratta- mento alternativo per 6 settimane di pazienti adulti con comorbidità rinite-asma. Il gruppo sperimentale inalava fluticasone propionato (500 mcg/die) con il naso attraverso una maschera facciale applicata ad un distanziatore; il gruppo controllo inalava la stessa dose di fluticasone per via orale e assumeva anche uno spray nasale di fluticasone (200 mcg/die): non sono state evidenziate differenze tra i due gruppi rela- tivamente alla gravità dell'asma, la rinometria acusti- ca, la funzionalità polmonare e l'ossido nitrico esala- to⁵². Questa modalità alternativa di trattamento andrà comunque confermata da ulteriori studi.

La presenza di istamina e di leucotrieni nel liquido di lavaggio broncoalveolare degli asmatici⁵³⁻⁵⁴ e nel liquido di lavaggio nasale dei rinitici⁵⁵⁻⁵⁶ è stata ri- petutamente evidenziata, suggerendo il ruolo di que- sti composti come importanti mediatori della flogosi nelle vie aeree⁵⁷. Gli antistaminici rappresentano la terapia di prima linea della rinite allergica⁵⁸; nei pa-

zienti allergici con sinusite acuta questi farmaci pos- sono risultare efficaci quando aggiunti al trattamento antibiotico⁵⁹. Gli antistaminici non hanno un ruolo nel trattamento dell'asma, ma possono migliorare i sinto- mi nasali nei pazienti con rinite consensuale⁶⁰⁻⁶¹. Gli antileucotrieni migliorano i sintomi nasali in bambini con rinite allergica stagionale⁶² e perenne⁶³, ma non sono superiori agli antistaminici⁶⁴. Possono inoltre ri- sultare utili nel trattamento della rinosinusite ed asma da ipersensibilità all'aspirina in cui la produzione di leucotrieni è molto elevata⁶⁵.

Diversi studi hanno infine documentato che il tratta- mento medico⁶⁶⁻⁶⁷ o chirurgico⁶⁸⁻⁷⁰ della sinusite in pazienti con asma consensuale è in grado di indurre un miglioramento clinico dell'asma e di ridurre le ne- cessità farmacologiche. L'effetto positivo sembra esse- re particolarmente evidente nei pazienti con storia di intolleranza all'aspirina⁷¹. L'esperienza in età pedia- trica è molto modesta e meritevole di specifici studi controllati in futuro.

Bibliografia

- 1 ARIA Workshop Report. *Allergic rhinitis and its impact on asthma*. J Allergy Clin Immunol 2001;108:S147-336.
- 2 Thomas M, Kocevar VS, Zhang Q, et al. *Asthma-related health care resource use among asthmatic children with and without concomitant allergic rhini- tis*. Pediatrics 2005;115:129-34.
- 3 de Benedictis FM, Bush A. *Rhinosinusitis and asth- ma. Epiphenomenon or causal association?* Chest 1999;115:550-6.
- 4 Simons FE. *Allergic rhinobronchitis: the asthma-allergic rhinitis link*. J Allergy Clin Immunol 1999;104:534-40.
- 5 Asher MI, Montefort S, Björkstén B, et al. *Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys*. Lancet 2006;368:733-43.
- 6 Kapsali T, Horowitz E, Diemer F, et al. *Rhinitis is ubiq- uitous in allergic asthmatics*. J Allergy Clin Immunol 1997;99:S138.
- 7 Togias A. *Rhinitis and asthma: Evidence for respi- ratory system integration*. J Allergy Clin Immunol 2003;111:1171-83.
- 8 Leynaert B, Bousquet J, Neukirch C, et al. *Perennial rhinitis: an independent risk factor for asthma in non- atopic subjects. Results from the European Communi-*

- ty Respiratory Health Survey. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:301-4.
- 9 Guerra S, Sherrill D, Martinez F, et al. *Rhinitis as an independent risk factor for adult-onset asthma*. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:419-25.
 - 10 Linneberg A, Nielsen N, Frolund L, et al. *The link between allergic rhinitis and allergic asthma: a prospective population based study. The Copenhagen Allergy Study*. *Allergy* 2002;57:1048-52.
 - 11 Shaaban R, Zureik M, Soussan D et al. *Rhinitis and onset of asthma: a longitudinal population-based study*. *Lancet* 2008;372:1049-57.
 - 12 Burgess JA, Walters EH, Byrnes GB, et al. *Childhood allergic rhinitis predicts asthma incidence and persistence to middle age: a longitudinal study*. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:863-9.
 - 13 Busse W. *Epidemiology of rhinitis and asthma*. *Eur Respir Rev* 1997;7:284-5.
 - 14 Lombardi E, Stein RT, Wright AL, et al. *The relation between physician-diagnosed sinusitis, asthma, and skin test reactivity to allergens in 8-year-old children*. *Pediatr Pulmonol* 1996;22:141-6.
 - 15 Devalia JL, Bayram H, Rusznak C, et al. *Mechanisms of pollution-induced airway disease: in vitro studies in the upper and lower airways*. *Allergy* 1997;52:S45-51.
 - 16 Baraniuk JN. *Pathogenesis of allergic rhinitis*. *J Allergy Clin Immunol* 1997;96:S763-72.
 - 17 Clement PAR, Bluestone C, Gordts F, et al. *Management of rhinosinusitis in children*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:31-4.
 - 18 Zimmerman B, Stringer D, Feanny S, et al. *Prevalence of abnormalities found by sinus x-rays in childhood asthma: Lack of relation to severity of asthma*. *J Allergy Clin Immunol* 1987;80:268-73.
 - 19 Harlin SL, Ansel DG, Lane SR. *A clinical and pathologic study of chronic sinusitis: the role of the eosinophil*. *J Allergy Clin Immunol* 1988;81:867-75.
 - 20 Newman LJ, Platts-Mills TAE, Philips CD, et al. *Chronic sinusitis: relationship of computed tomographic findings to allergy, asthma, and eosinophilia*. *JAMA* 1994;271:363-7.
 - 21 Demoly P, Crampette L, Mondain M, et al. *Assessment of inflammation in noninfectious chronic maxillary sinusitis*. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:95-108.
 - 22 Hamilos DL, Leung DYM, Wood R, et al. *Evidence for distinct cytokine expression in allergic versus nonallergic chronic sinusitis*. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:537-44.
 - 23 al Ghamdi K, Ghaffar O, Small P, et al. *IL-4 and IL-13 expression in chronic sinusitis: relationship with cellular infiltrate and effect of topical corticosteroid treatment*. *J Otolaryngol* 1997;26:160-6.
 - 24 Baroody FM, Hughes CA, McDowell P, et al. *Eosinophilia in chronic childhood sinusitis*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;121:1396-402.
 - 25 Gwaltney JM, Philips CD, Milner RD, et al. *Computed tomographic study of the common cold*. *N Engl J Med* 1994;330:25-30.
 - 26 Pelikan Z, Pelikan-Filipek M. *Role of nasal allergy in chronic maxillary sinusitis: diagnostic value of nasal challenge with allergen*. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:484-91.
 - 27 Lusk RP, Stankiewicz JA. *Pediatric rhinosinusitis*. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;116:S53-7.
 - 28 Gungor A, Corey JP. *Pediatric sinusitis: a literature review with emphasis on the role of allergy*. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;116:4-15.
 - 29 Sluder G. *Asthma as a nasal reflex*. *JAMA* 1919;73:589-91.
 - 30 Bardin PG, Van Hearnden BB, Joubert JR. *Absence of pulmonary aspiration of sinus contents in patients with asthma and sinusitis*. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:82-8.
 - 31 Irvin CG. *Sinusitis and asthma: an animal model*. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:521-33.
 - 32 Bucca C, Rolla G, Scappaticci E, et al. *Extrathoracic and intrathoracic airway responsiveness in sinusitis*. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:52-9.
 - 33 Shturman-Ellstein R, Zeballos RJ, Buckley JM, et al. *The beneficial effect of nasal breathing on exercise-induced bronchoconstriction*. *Am Rev Respir Dis* 1978;118:65-73.
 - 34 Baraldi E, Azzolin NM, Biban P, et al. *Effect of antibiotic therapy on nasal nitric oxide concentration in children with acute sinusitis*. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1680-3.
 - 35 Braunstahl G-J, Overbeek S, KleinJan A, et al. *Nasal allergen provocation induces adhesion molecules expression and tissue eosinophilia in upper and lower airways*. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:469-76.
 - 36 Braunstahl G-J, Overbeek SE, Fokkens WJ, et al. *Segmental bronchoprovocation in allergic rhinitis patients affects mast cell and basophil numbers in nasal and bronchial mucosa*. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:858-65.
 - 37 de Benedictis FM, Miraglia del Giudice M Jr, Severini S, Bonifazi F. *Rhinitis, sinusitis and asthma: one linked airway disease*. *Pediatr Respir Rev* 2001;2:358-64.
 - 38 Choi SH, Kim do K, Yoo Y, et al. *Comparison of deltaFVC between patients with allergic rhinitis with air-*

- way hypersensitivity and patients with mild asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;98:128-33.
- 39 Ciprandi G, Pistorio A, Cirillo I. *Impact of allergic rhinitis on asthma: effects on spirometric parameters.* *Allergy* 2008;63:255-60.
- 40 Ciprandi G, Capasso M. *Association of childhood perennial allergic rhinitis with subclinical airflow limitation.* *Clin Exp Allergy* 2010;40:398-402.
- 41 Chawes BL, Kreiner-Moller E, Bisgaard H. *Upper and lower airway patency are associated in young children.* *Chest* 2010;137:1332-7.
- 42 Welsh PW, Stricker WE, Chu C-P, et al. *Efficacy of beclomethasone nasal solution, flunisolide, and cromolyn in relieving symptoms of ragweed allergy.* *Mayo Clin Proc* 1987;62:125-34.
- 43 Mygind N, Dahl R, Nielsen LP. *Effect of nasal inflammation and of intranasal anti-inflammatory treatment on bronchial asthma.* *Respir Med* 1998;92:547-9.
- 44 Watson WTA, Becker AB, Simons FER. *Treatment of allergic rhinitis with intranasal corticosteroids in patients with mild asthma: Effect on lower airway responsiveness.* *J Allergy Clin Immunol* 1993;91:97-101.
- 45 Henriksen JM, Wenzel A. *Effect of an intranasally administered corticosteroid (budesonide) on nasal obstruction, mouth breathing, and asthma.* *Am Rev Respir Dis* 1984;130:1014-8.
- 46 Corren J, Adinoff AD, Buchmeier AD, et al. *Nasal beclomethasone prevents the seasonal increase in bronchial responsiveness in patients with allergic rhinitis and asthma.* *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:250-6.
- 47 Foresi A, Pelucchi A, Gherson G, et al. *Once daily intranasal fluticasone propionate reduces nasal symptoms and inflammation but also attenuates the increase in bronchial responsiveness during the pollen season in allergic rhinitis.* *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:274-82.
- 48 Nathan RA, Yancey SW, Waitkus-Edwards K, et al. *Fluticasone propionate nasal spray is superior to montelukast for allergic rhinitis while neither affects overall asthma control.* *Chest* 2005;128:1910-20.
- 49 Pelucchi A, Chiapparino A, Mastropasqua B, et al. *Effect of intranasal azelastine and beclomethasone dipropionate on nasal symptoms, nasal cytology, and bronchial responsiveness to methacholine in allergic rhinitis in response to grass pollens.* *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:515-23.
- 50 Crystal-Peters J, Neslusan C, Crown WH, et al. *Treating allergic rhinitis in patients with comorbidity asthma: the risk of asthma-related hospitalizations and emergency department visits.* *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:57-62.
- 51 Corren J, Manning BE, Thompson SF, et al. *Rhinitis therapy and the prevention of hospital care for asthma: a case control study.* *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:415-9.
- 52 Ribeiro de Andrade C, Chatkin JM, Fiterman J, et al. *Unified disease, unified management: Treating allergic rhinitis and asthma with nasally inhaled corticosteroid.* *Respir Med* 2010;104:1577-80.
- 53 Casale TB, Wood D, Richerson HB, et al. *Direct evidence of a role for mast cells in the pathogenesis of antigen-induced bronchoconstriction.* *J Clin Invest* 1987;80:1507-11.
- 54 Busse WW. *The role of leukotrienes in asthma and allergic rhinitis.* *Clin Exp Allergy* 1996;26:868-79.
- 55 Naclerio RM, Baroody FM, Togias AG. *The role of leukotrienes in allergic rhinitis: a review.* *Am Rev Respir Dis* 1991;143:S91-5.
- 56 Bousquet J, Vignola AM, Campbell AM, et al. *Pathophysiology of allergic rhinitis.* *Int Arch Allergy Immunol* 1996;110:207-18.
- 57 Meltzer EO. *Role for cysteinyl leukotriene receptor antagonist therapy in asthma and their potential role in allergic rhinitis based on the concept of "one linked airway disease".* *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;84:176-87.
- 58 Simons FER. *Advances in H1-antihistamines.* *N Engl J Med* 2004;251:2203-17.
- 59 Braun JJ, Alabert JP, Quiniou M, et al. *Adjunct effect of loratadine in the treatment of acute sinusitis in patients with allergic rhinitis.* *Allergy* 1997;52:650-5.
- 60 Grant JA, Nicodemus CF, Findlay SR, et al. *Cetirizine in patients with seasonal allergic rhinitis and concomitant asthma: prospective, randomized, placebo-controlled trial.* *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:923-32.
- 61 Corren J, Harris AG, Aaronson D, et al. *Efficacy and safety of loratadine plus pseudoephedrine in patients with seasonal allergic rhinitis and mild asthma.* *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:71-8.
- 62 Razi C, Bakirtas K, Turktas I, et al. *Effect of montelukast on symptoms and exhaled nitric oxide levels in 7- to 14-year-old children with seasonal allergic rhinitis.* *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;97:767-74.
- 63 Chen ST, Lu KH, Sun HL, et al. *Randomized placebo-controlled trial comparing montelukast and cetirizine for treating perennial allergic rhinitis in children aged 2-6 yr.* *Pediatr Allergy Immunol* 2006;17:49-54.
- 64 Di Lorenzo G, Pacor ML, Pellitteri ME, et al. *Randomized placebo controlled trial comparing fluticasone aqueous nasal spray in mono-therapy, fluticasone plus cetirizine, fluticasone plus montelukast and cetirizine plus montelukast for seasonal allergic rhinitis.* *Clin Exp Allergy* 2004;34:259-67.

- ⁶⁵ Cowburn AS, Sladek K, Soja J, et al. *Overexpression of leukotriene C4 synthase in bronchial biopsies from patients with aspirin-intolerant asthma.* J Clin Invest 1998;101:834-46.
- ⁶⁶ Rachelefsky GS, Katz RM, Siegel SC. *Chronic sinus disease with associated reactive airway disease in children.* Pediatrics 1984;73:526-9.
- ⁶⁷ Friedman R, Ackerman M, Wald E, et al. *Asthma and bacterial sinusitis in children.* J Allergy Clin Immunol 1984;74:185-9.
- ⁶⁸ Juntunen K, Tarkkanen J, Makinon J. *Caldwell Luc operation in the treatment of childhood bronchial asthma.* Laryngoscope 1984;94:249-51.
- ⁶⁹ Nisioka GJ, Cook PR, Davis WE, et al. *Functional endoscopic sinus surgery in patients with chronic sinusitis and asthma.* Otolaryngol Head Neck Surg 1994;110:494-500.
- ⁷⁰ Park AH, Lau J, Stankiewicz J, et al. *The role of functional endoscopic sinus surgery in asthmatic patients.* J Otolaryngol 1998;27:275-80.
- ⁷¹ Awad OG, Fasano MB, Lee JH, et al. *Asthma outcomes after endoscopic sinus surgery in aspirin tolerant versus aspirin induced asthmatic patients.* Am J Rhinol 2008; 22:197-203.

La diagnostica molecolare in allergologia

Claudia Alessandri, Enrico Scala, Danila Zennaro, Rosetta Ferrara,
Maria Livia Bernardi, Adriano Mari



Parole chiave: **allergene, allergene ricombinante, biologia molecolare, panallergene**

Allo scopo di accostare il pediatra all'affascinante universo dell'allergologia molecolare, inizia con questo articolo una serie di brevi revisioni monografiche con l'intento di poter fornire chiavi di lettura semplici e utili per l'interpretazione dei test molecolari in allergologia.

I temi trattati comprenderanno:

- 1) Introduzione all'allergologia molecolare.
- 2) Profiline, Bet v 1 like proteins, Polcalcine.
- 5) LTP, Tropomiosine, Parvalbumine.
- 7) Proteine del Latte Vaccino, Proteine dell'Uovo, Proteine della Carne.
- 8) Seed Storage Proteins, Chitinasi e Allergeni del Latice.
- 9) Come s'interpreta un test molecolare e come si consulta un database di allergologia molecolare.

Abstract

L'identificazione e la purificazione degli allergeni è essenziale per condurre studi strutturali ed immunologici atti a comprendere in qual modo queste molecole possano indurre la produzione di IgE specifiche. Gli sviluppi nelle tecniche di biologia molecolare hanno condotto alla produzione di allergeni ricombinanti con caratteristiche costanti, che consentono la determinazione di IgE specifiche dirette contro varie fonti allergeniche, come ad esempio pollini, acari, ecc. La presenza di allergeni simili in fonti allergeniche diverse è alla base del meccanismo della cross reattività. La diagnostica molecolare permette di interpretare al meglio alcuni casi di polisensibilizzazione, osservati in precedenza con i test cutanei e i test in vitro eseguiti con estratti allergenici.

Introduzione all'allergologia molecolare

L'inizio della diagnostica allergologica può esser fatto risalire alla scoperta dell'esistenza di IgE specifiche nel siero di alcuni pazienti allergici nel 1967 e alla successiva immissione in commercio di test basati sull'uso di estratti allergenici. Circa vent'anni dopo, nel 1987, è stato clonato il primo allergene ricombinante, il Der p 1^{1 2}.

Tenendo presente la frase formulata da uno dei maggiori esperti di diagnostica allergologica "La diagnosi della malattia allergica inizia e termina con la storia clinica del paziente e con l'esame obiettivo"³ sarà qui condotta una breve rassegna dei test allergologici disponibili, esaminando i pro e i contro di ognuno di essi. In primo luogo è opportuno puntualizzare cosa significhino: "fonte allergica", "estratto allergenico" ed "allergene"⁴.

Centro di Allergologia Molecolare, IDHRCCS, Roma

c.alessandri@idi.it

Gli Autori dichiarano di non avere alcun conflitto di interesse rispetto agli argomenti trattati nell'articolo.

Fonte allergenica

Con questo termine s'indica il contenitore materiale degli allergeni es.: il cane, l'uovo, il latte sono fonti allergeniche, non allergeni, come spesso siamo soliti far riferimento.

Allergeni

Gli allergeni sono proteine, glicoproteine o apteni coniugati a carrier, con peso molecolare tra 5 e 150 kDa, e punto isoelettrico compreso tra 2-10⁵. Ogni allergene proveniente da acari, pollini, ecc. può presentare un elevato numero di determinanti antigenici o epitopi (multivalenza immunologica). È chiamata "epitopo" quella sequenza aminoacidica riconosciuta da uno specifico anticorpo (IgE, IgG, ecc.). Non esistono, come erroneamente spesso si è portati a dire, delle IgE specifiche per il latte (fonte allergenica) o per la caseina (proteina allergenica del latte), ma esistono IgE specifiche dirette verso i determinanti epitopici della caseina o di altre proteine allergeniche contenute nel latte. Gli epitopi possono essere "lineari" (sequenza di aminoacidi contigui riconosciuti dalle IgE sulla struttura primaria dell'antigene) o "conformazionali" (sequenza di aminoacidi non contigui definiti dalla struttura tridimensionale della proteina) (Fig. 1). Il numero e il tipo di epitopi conformazionali che caratterizzano ciascuna proteina allergenica è scarsamente conosciuto, mentre è assai più semplice comparare la sequenza primaria di un allergene mediante algoritmi di ricerca disponibili in Allergome (AllergomeAligner, www.allergome.org/script/tools.php?tool=blaster) o BLAST in UniProt (www.uniprot.org).

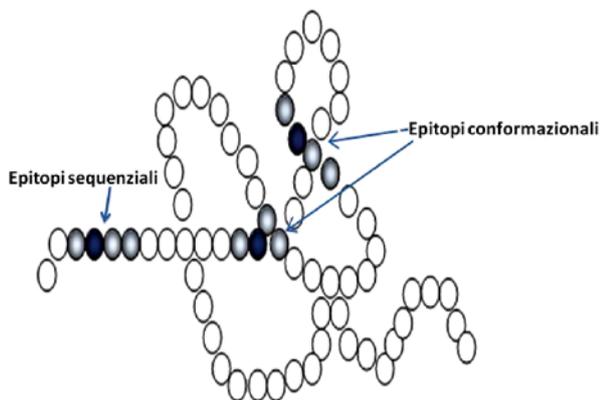


Fig. 1. Epitopi conformazionali e sequenziali.

I ripiegamenti strutturali di una molecola proteica sono di primaria importanza nel meccanismo della sensibilizzazione immunologica e nella relativa risposta anticorpale. Molte proteine allergeniche, se sottoposte al calore o all'azione di enzimi proteolitici, come avviene durante la preparazione dei cibi o durante il processo digestivo, subiscono modificazioni con conseguente perdita degli epitopi conformazionali e possibile smascheramento di epitopi lineari.

Seguendo queste premesse ad esempio, gli allergeni alimentari sono stati suddivisi in due classi⁶:

Allergeni alimentari di classe 1, costituiti da proteine resistenti alla digestione e al calore, in grado di comportarsi da allergeni sensibilizzanti ("sensitizers") a livello gastrointestinale. In questa classe troviamo ad esempio le maggiori proteine allergeniche del latte, dell'uovo, del pesce, dei crostacei e di alcuni vegetali.

Allergeni alimentari di classe 2, costituiti da proteine non resistenti al calore e alla digestione, generalmente incapaci di provocare sintomi sistemici. Sono presenti nei vegetali, ma anche in alimenti di derivazione animale (proteine termolabili del latte, della carne, dell'uovo) e causano sintomi per lo più localizzati al cavo orale (sindrome orale allergica) in quanto, successivamente degradati a livello gastrico, perdono il loro potere antigenico. I sintomi compaiono previa sensibilizzazione ad allergeni omologhi contenuti nei pollini, ("non-sensitizing elicitors"). Questo fenomeno, definito "cross-reattività", ma meglio identificato con il termine di co-riconoscimento⁷ spiega come mai alcuni pazienti possano presentare reazioni anche severe assumendo alimenti allergizzanti mai prima ingeriti.

I ripiegamenti strutturali di una molecola proteica sono di primaria importanza nel meccanismo della sensibilizzazione immunologica e nella relativa risposta anticorpale.

L'allergenicità di una singola proteina, pertanto, dipende:

- a) Dai determinanti antigenici (epitopi) riconosciuti da anticorpi specifici tramite il loro sito combinatorio (paratopo). Il riconoscimento dell'epitopo da parte delle IgE avviene in ragione di almeno 6-8 aminoacidi posti in sequenza lineare e deve esistere almeno il 35% d'identità tra due proteine diverse affinché possano essere cross reattive⁸.
- b) Dalla conformazione spaziale dell'allergene al momento della sua esposizione a una cellula deputata a presentare l'antigene, quali il macrofago, le cellule dendritiche o i linfociti B.
- c) Dall'avidità (grado di reazione) tra IgE ed epitopi che trae origine, a sua volta, dalla somma del numero degli epitopi allergenici presenti sulla molecola (valenza), dalle dimensioni e dalla conformazione della molecola.
- d) Dalla "maturazione dell'affinità". Nel corso della risposta immune umorale, infatti, si può assistere all'aumento dell'affinità degli anticorpi nei confronti dei determinanti epitopici.

Tutto questo può comportare che un paziente che produce IgE verso componenti di una determinata fonte biologica non necessariamente abbia sintomi nei confronti di allergeni potenzialmente cross reattivi, anche in presenza di test cutanei (SPT) o IgE specifiche positive per quegli allergeni^{9 10}.

Estratti allergenici

Gli estratti allergenici comunemente impiegati per la diagnostica di laboratorio in vivo (SPT) e in vitro (RAST, ELISA ecc.) provengono da fonti allergeniche definite (cane, acari, polline di graminacee, ecc.).

La qualità di questi estratti è migliorata sempre più nel corso degli anni, presentando però svantaggi e limiti difficilmente eliminabili. Gli svantaggi sono legati agli stessi processi d'estrazione, che causano: perdita di alcune proteine allergeniche, acquisizione di proteine da fonti ignote, differente concentrazione e composizione proteica tra un lotto e un altro. Solo da poco tempo negli estratti sono quantizzate ($\mu\text{g}/\text{ml}$) le concentrazioni delle proteine allergeniche maggiori, ma non le minori che potrebbero essere addirittura assenti¹¹. L'assenza o la scarsa concentrazione di proteine allergeniche nell'estratto può causare false negatività durante la diagnosi e inefficacia delle terapie iposensibilizzanti se le proteine contenute nell'estratto non

sono presenti alle concentrazioni necessarie a indurre desensibilizzazione. Sono ora in commercio estratti allergenici contenenti proteine naturali purificate per SPT: Pho d 2 (palma da dattero)¹², Pru p 3¹³. Occorre tuttavia ancora una standardizzazione ufficiale di questi prodotti che pur dichiarando la presenza dell'allergene, non documentano la sua riproducibilità, l'eventuale presenza d'isoforme, la completa assenza di altre proteine¹⁴.

Gli SPT, pur rappresentando un'insostituibile strumento diagnostico in grado di riprodurre in vivo una reazione IgE mediata, non sono in grado di fornire una stima quantitativa delle IgE¹⁵, non sono esenti da rischi di anafilassi^{16 17}, non sono graditi ai bambini.

I risultati degli SPT possono variare non solo in funzione del tipo di estratto allergenico impiegato, ma anche del tipo di lancetta, dell'abilità e della precisione dell'operatore. Ugualmente i risultati delle IgE specifiche in vitro per estratti variano in base all'estratto impiegato, alla metodica impiegata (CAP, Immulite, CARLA ecc.) e non sono pertanto comparabili tra di loro¹⁸. A queste variabili, che possono essere definite esame dipendenti, si devono aggiungere quelle legate alla sintomatologia clinica, all'età del paziente, al momento in cui sono eseguiti gli accertamenti (esordio della malattia o follow-up), alla prevalenza dell'allergia nella popolazione studiata^{19 20}. Il limite insuperabile consiste nell'impossibilità di stabilire, in un paziente che mostra una polisensibilizzazione agli SPT o alle IgE specifiche in vitro, se la polisensibilizzazione sia dovuta a co-sensibilizzazione (sensibilizzazione a molecole distinte e uniche di diverse fonti allergeniche) o a un meccanismo di co-riconoscimento (sensibilizzazione a diverse fonti allergeniche contenenti molecole omologhe)⁷.

Si possono ottenere risultati falsamente positivi o negativi in presenza di^{3 20}: alti livelli di IgE totali

I risultati delle IgE specifiche in vitro per estratti variano in base all'estratto impiegato e alla metodica impiegata, e non sono pertanto comparabili tra di loro.

(> 2000 UI/l), legami monovalenti delle IgE [es. per presenza di determinanti cross reattivi dei carboidrati (CCD)]²¹, supplementazione di allergeni ricombinanti all'estratto²², basso livello di IgE specifiche in rapporto alle IgE totali²⁰, produzione locale di IgE specifiche e loro assenza in circolo²⁰, scarsa presenza dell'allergene nell'estratto²⁰.

Allergeni molecolari

Negli ultimi anni sono stati caratterizzati a livello molecolare 1785 allergeni (<http://www.allergome.org/script/statistic.php>, ultimo accesso 4 settembre 2010).

Il processo d'identificazione e caratterizzazione delle fonti allergeniche ha portato alla produzione e commercializzazione di allergeni naturali purificati o prodotti con tecnologia del DNA ricombinante. In tal modo la produzione dei reagenti, base della diagnostica allergologica, può essere standardizzata, quantificata (peso in grammi), può generare grandi quantità di allergeni, introdurre mutazioni sito specifiche per creare ipoallergeni, può clonare isoforme. Le molecole ricombinanti hanno una sensibilità superiore al 70% nel mimare la fonte allergica, sensibilità che cresce proporzionalmente all'impiego della combinazione del maggior numero di proteine allergeniche provenienti dalla stessa fonte allergica^{23 24}. Purtroppo l'impiego di allergeni molecolari ricombinanti in vivo (es. SPT) è consentito previa registrazione del preparato come farmaco.

Nomenclatura e classificazione degli allergeni molecolari

Le molecole allergeniche sono divise in "genuins", vere marcatrici di una determinata fonte (es. Ole e 1 è la proteina marcatrice dell'allergia al polline dell'olivo e delle altre Oleaceae) e in "panallergeni", proteine condivise da fonti allergeniche anche tassonomicamente tra loro non correlate, responsabili di apparenti polisensibilizzazioni ai test eseguiti con estratti (es. la profilina è un panallergene condiviso da pollini e alimenti vegetali, il suo riconoscimento da parte di un paziente allergico ai pollini causerà positività a tutti i tipi di pollini e alimenti vegetali testati, senza che necessariamente il paziente accusi sintomi alla loro esposizione).

La nomenclatura degli allergeni molecolari è definita in questo modo: le prime tre lettere indicano il ge-

nere, seguite da una singola lettera per la specie e infine da un numero indicante l'ordine cronologico di purificazione dell'allergene: es. Bet v 1, *Bet* (genere: *Betullaceae*) v (specie: *verrucosa*) 1 (ordine arbitrario di registrazione)²⁵.

Si usano i termini di:

- *Isoallergeni*: equivalenti alle isoforme proteiche in generale, indicano forme molecolari multiple dello stesso allergene proveniente dallo stesso organismo con un'estesa, ma non obbligatoria, cross-reattività. Hanno in genere un peso molecolare molto simile, la stessa struttura terziaria e la stessa funzione biologica e hanno almeno il 67% d'identità nella sequenza aminoacidica. Ad esempio di Bet v 1 si conoscono 31 isoallergeni con identità di sequenza tra il 73 e il 98%. Gli isoallergeni s'identificano aggiungendo un punto e un numero addizionale es. Bet v 1.01 fino a Bet v 1.31.
- *Varianti allergeniche*: sono forme alternative della stessa proteina che mostrano un numero limitato di sostituzioni aminoacidiche. Varianti sono state descritte per Der p 1, Der p 2, Amb a 1, Cry j 1 e Bet v 1. Per indicarle si aggiungono altri due numeri al nome dell'isoallergene, es. Bet v 1.0101. I primi due numeri distinguono l'isoallergene e gli altri due la variante (Bet v 1 allergene, Bet v 1.01 isoallergene, Bet v 1.0101 variante).

Con la produzione di allergeni naturali purificati o prodotti con tecnologia del DNA ricombinante, la produzione dei reagenti può essere standardizzata, quantificata, può generare grandi quantità di allergeni, introdurre mutazioni sito specifiche per creare ipoallergeni, può clonare isoforme.

Il microarray per la determinazione delle IgE

All'inizio degli anni novanta è stata intrapresa l'applicazione delle microtecnologie in medicina ed in particolare nel campo della genomica²⁶. Quest'ultima ha subito un'enorme evoluzione nei successivi 15 anni, portando il numero di geni, la cui espressione è esplorabile mediante microarray genomico, da poche centinaia a diverse decine di migliaia²⁷.

In allergologia l'ISAC (Immuno Solid-phase Allergen Chip, VBC-Genomics, Vienna, Austria) costituisce il primo esempio di test multiplo, microarray, per la valutazione simultanea delle IgE specifiche per moleco-

le allergiche purificate, naturali o ricombinanti. In questo momento l'ISAC è costituito da 103 allergeni provenienti da 43 fonti allergiche quali polline di erbe, graminacee, alberi, epiteli di animali, alimenti, veleni d'insetto, muffe (Tab. I). Il test utilizza una minima quantità di siero, 20 µl, permettendo, se necessario, il ricorso a sangue capillare con trascurabile stress per il paziente pediatrico. Ciò costituisce un enorme vantaggio in pediatria poiché per ogni singola determinazione di IgE specifiche, eseguita tramite estratto allergenico o allergene molecolare, sono necessari invece 50 µl di siero.

Per evidenziare il legame antigene-anticorpo tra le IgE

Tab. I. ImmunoCAP ISAC® Allergen Components CRD 103.

		Molecola	Organismo	Code*	Funzione
PIANTE	Graminacee	Cyn d 1	<i>Cynodon dactylon</i>	266	Grass group 1
		Phl p 1	<i>Phleum pratense</i>	550	Grass group 1
		Phl p 2	<i>Phleum pratense</i>	3419	Grass group 2
		Phl p 4	<i>Phleum pratense</i>	557	Berberine bridge enzyme
		Phl p 5	<i>Phleum pratense</i>	559	Grass group 5
		Phl p 6	<i>Phleum pratense</i>	3420	Grass group 5
		Phl p 7	<i>Phleum pratense</i>	3422	Calcium binding protein
		Phl p 11	<i>Phleum pratense</i>	3415	Ole e 1 related protein
		Phl p 12	<i>Phleum pratense</i>	3416	Profilin
		Amb a 1	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	24	Pectate lyase
		Art v 1	<i>Artemisia vulgaris</i>	753	Defensin
		Art v 3	<i>Artemisia vulgaris</i>	59	Lipid transfer protein
		Erbe	Par j 2	<i>Parietaria judaica</i>	508
	Sal k 1		<i>Salsola kali</i>	617	Pectin methylesterase
	Mer a 1		<i>Mercurialis annua</i>	3375	Profilin
	Bet v 1		<i>Betula verrucosa</i>	90	PR-10 protein
	Bet v 2		<i>Betula verrucosa</i>	3136	Profilin
	Bet v 4		<i>Betula verrucosa</i>	3138	Calcium binding protein
	Aln g 1		<i>Alnus glutinosa</i>	3055	PR-10 protein
	Cor a 1.0101		<i>Corylus avellana</i>	233	PR-10 protein
	Cry j 1		<i>Cryptomeria japonica</i>	248	Pectate lyase
	Alberi		Cup a 1	<i>Cupressus arizonica</i>	256
		Ole e 1	<i>Olea europaea</i>	482	Group 1oleacee
		Ole e 2	<i>Olea europaea</i>	490	Profilin
		Pla a 1	<i>Platanus acerifolia</i>	3425	Putative invertase inhibitor
		Pla a 2	<i>Platanus acerifolia</i>	573	Polygalacturonase
	ANIMALI	Cane	Can f 1	<i>Canis familiaris</i>	3169
Can f 2			<i>Canis familiaris</i>	3170	Lipocalin
Can f 3			<i>Canis familiaris</i>	176	Serum albumin
Cavallo		Equ c 3	<i>Equus caballus</i>	335	Serum albumin
Gatto		Fel d 1	<i>Felis domesticus</i>	12	Uteroglobulin
		Fel d 2	<i>Felis domesticus</i>	346	Serum albumin
		Fel d 4	<i>Felis domesticus</i>	3281	Lipocain
Topo		Mus m 1	<i>Mus musculus</i>	478	Lipocain

segue

continua Tab. I

		Molecola	Organismo	Code *	Funzione	
ARTROPODI (Crostacei, Insetti, Acari)	Acari	Der f 1	<i>Dermatophagoides farinae</i>	3242	Cysteine protease	
		Der f 2	<i>Dermatophagoides farinae</i>	302	NPC2 family	
		Der p 1	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	310	Cysteine protease	
		Der p 2	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	316	NPC2 family	
		Der p 10	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	3258	Tropomyosin	
		Eur m 2	<i>Euroglyphus maynei</i>	341	NPC2 family	
	Ape	Api m 1	<i>Apis mellifera</i>	45	Phospholipase A2	
		Api m 4	<i>Apis mellifera</i>	48	Melittin	
	Scarafaggi	Bla g 1	<i>Blattella germanica</i>	137	Cockroach group 1	
		Bla g 2	<i>Blattella germanica</i>	3140	Aspartic protease	
		Bla g 4	<i>Blattella germanica</i>	3141	Calycin	
		Bla g 5	<i>Blattella germanica</i>	3142	Glutathione S-transferase	
		Blag 7	<i>Blattella germanica</i>	1182	Tropomyosin	
	Anisakis	Ani s 1	<i>Anisakis simplex</i>	3079	Animal Kunitz serine protease inhibitor	
		Ani s 3	<i>Anisakis simplex</i>	3081	Tropomyosin	
	Gamberi	Pen a 1	<i>Penaeus Atzecus</i>	3398	Tropomyosin	
		Pen i 1	<i>Penaeus indicus</i>	527	Tropomyosin	
		Pen m 1	<i>Penaeus monodon</i>	972	Tropomyosin	
	FUNGHI	<i>Alternaria</i>	Alt a 1	<i>Alternaria alternata</i>	11	
			Alt a 6	<i>Alternaria alternata</i>	3063	Enolasi
<i>Aspergillus</i>		Asp f 1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	3107		
		Asp f 2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	3115	Fibrinogen Binding Protein	
		Asp f 3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	3121	Peroxisomal Protein	
		Asp f 4	<i>Aspergillus fumigatus</i>	3122	Mn Superoxidase Dismutase	
		Asp f 6	<i>Aspergillus fumigatus</i>	3124	Mannitol Dehydrogenase	
<i>Cladosporium</i>		Cla h 8	<i>Cladosporium herbarum</i>	3207		
LATICI		rHev b 1	<i>Hevea brasiliensis</i>	3310	Rubber helongation factor	
		rHev b 3	<i>Hevea brasiliensis</i>	3314	Small rubber particle protein	
		rHev b 5	<i>Hevea brasiliensis</i>	3316		
		rHev b 6	<i>Hevea brasiliensis</i>	392	Hevein	
		rHev b 8	<i>Hevea brasiliensis</i>	403	Profilin	
ALIMENTI	Latte di mucca	Bos d 4	<i>Bos domesticus</i>	163	Alfa-lactalbumin	
		Bos d 5	<i>Bos domesticus</i>	164	Beta-lactoglobulin	
		Bos d 6	<i>Bos domesticus</i>	165	Serum albumin	
		Bos d 8	<i>Bos domesticus</i>	167	Casein	
		Bos d lactoferrin	<i>Bos domesticus</i>	1065	Transferrin	
	Uovo di gallina	Gal d 1	<i>Gallus domesticus</i>	359	Ovomucoid	
		Gal d 2	<i>Gallus domesticus</i>	360	Ovoalbumin	
		Gal d 3	<i>Gallus domesticus</i>	361	Ovotransferrin	
		Gal d 5	<i>Gallus domesticus</i>	363	Serum albumin	
	Pesce	Cyp c 1	<i>Cyprinus carpio</i>	263	Parvalbumin	
		Gad c 1	<i>Gadus callarias</i>	264	Parvalbumin	
	Sedano	Api g 1	<i>Apium graveolens</i>	40	PR-10 protein	
	Carota	Dau c 1	<i>Daucus carota</i>	287	PR-10 protein	
	Kiwi	Act d 1	<i>Actinidia deliciosa</i>	1	Cysteine protease	
		Act d 2	<i>Actinidia deliciosa</i>	747	Thaumatococin like protein	
		Act d 5	<i>Actinidia deliciosa</i>	2821	Kiwellin	
		Act d 8	<i>Actinidia deliciosa</i>	3546	PR 10 protein	
	Mela	Mal d 1	<i>Malus domestica</i>	1454	PR 10 protein	

segue

continua Tab. 1

		Molecola	Organismo	Code*	Funzione
ALIMENTI	Pesca	Pru p 1	<i>Prunus persica</i>	602	PR 10 protein
		Pru p 3	<i>Prunus persica</i>	603	Lipid transfer protein
	Anacardio	Ana o 2	<i>Anacardium</i>	3077	Legumin-like protein
	Arachide	Ara h 1	<i>Arachis hypogaea</i>	50	7S Globulin (vicilins)
		Ara h 2	<i>Arachis hypogaea</i>	51	Storage protein (conglutinin)
		Ara h 3	<i>Arachis hypogaea</i>	52	11S Globulin (legumins)
		Ara h 8	<i>Arachis hypogaea</i>	3100	PR 10 protein
	Noce brasiliana	Ber e 1	<i>Bertholletia excelsa</i>	3134	Storage protein (2S albumin)
	Nocciola	Cor a 1.0401	<i>Corylus avellana</i>	239	PR-10 protein
		Cor a 8	<i>Corylus avellana</i>	3219	Lipid transfer protein
		Cor a 9	<i>Corylus avellana</i>	246	11S Globulin (legumins)
	Soia	Gly m 4	<i>Glycine max</i>	3297	PR-10 protein
		Gly m 5	<i>Glycine max</i>	5816	7S globulin (vicilins)
		Gly m 6	<i>Glycine max</i>	5821	11S Globulin (legumins)
	Sesamo	Ses i 1	<i>Sesamum indicum</i>	624	Storage protein (2S albumin)
	Grano	Tri a 18	<i>Triticum aestivum</i>	650	Agglutinin Isolectin 1
		Tri a gliadin	<i>Triticum aestivum</i>	3677	Crude gliadin
		Tri a 19.0101	<i>Triticum aestivum</i>	3502	ω - gliadin
		Tri a aA_TI	<i>Triticum aestivum</i>	1051	α -amilase/trypsin inhibitors

* Code: è il codice di riferimento della molecola presente su Allergome (www.allergome.org.)

specifiche presenti nel siero del paziente e gli antigeni coniugati a una fase solida posta su un vetrino (chip), sono impiegati anticorpi anti-IgE umane resi fluorescenti (Figg. 2a, 2b). La fluorescenza è successivamente misurata da uno scanner dotato di sorgente d'eccitazione laser (Fig. 2c). Un software di densitometria analizza quindi l'immagine, e fornisce i risultati del test in funzione dell'intensità di fluorescenza rilevata su ogni singolo spot (Fig. 2d).

Per eseguire il test sono necessarie circa cinque ore. I risultati sono elaborati sotto forma di classi

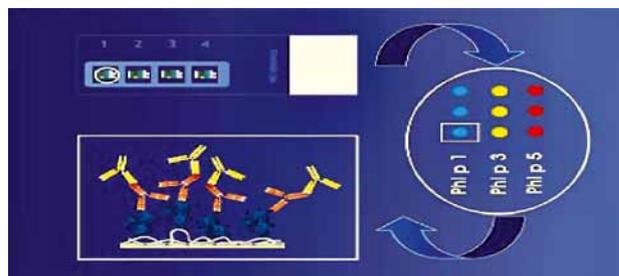


Fig 2b. Reazione antigene anticorpo.

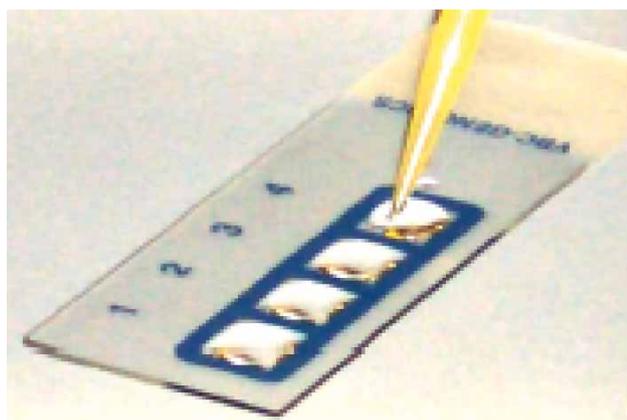


Fig. 2a. Distribuzione del siero sul vetrino.



Fig 2c. Misurazione della fluorescenza.

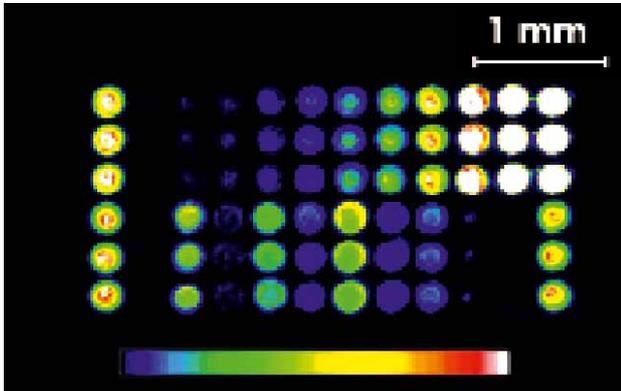


Figura 2d. Immagine test ISAC.

ISAC (assente-basso-medio-alto) e unità ISU fornendo una determinazione delle IgE di tipo semiquantitativo in base ad una specifica curva di riferimento. Il sistema è dotato di elevata affidabilità diagnostica poiché ogni molecola è testata in triplicato. Vari studi hanno dimostrato come i risultati basati su ISAC e FEIA (fluorescence enzyme immunoassay) siano significativamente correlati ($r = 0,72-0,99$)²⁸⁻³⁰ o come in alcuni casi ISAC possa vantare maggiore sensibilità e specificità³¹⁻³³, possedendo il più alto valore predittivo negativo rispetto a qualsiasi altro test impiegato nella diagnostica allergologica³.

Il test è altresì in grado di misurare IgE specifiche in presenza di alti livelli di IgE, dove ad esempio il CAP in singleplex, sia per estratti che per molecole, fallisce presentando problemi di binding non specifico³⁴.

Nel fare gli SPT si esegue un test in multiplex (più di un allergene testato sullo stesso braccio) usando un gruppo di estratti allergenici considerati statisticamente più rilevanti³⁵. A volte, caso per caso, in base all'anamnesi, si testano altre fonti allergeniche. Tuttavia la suddivisione degli allergeni in "maggiori" e "minori" è arbitraria, circoscritta a studi epidemiologici condotti in singoli paesi su un limitato campione di pazienti. Solo lo studio di vaste popolazioni, abitanti in più parti del mondo, esposte a fonti allergeniche disparate, a condizioni climatiche e di vita diverse, potrà portare a dichiarare quali siano realmente gli allergeni maggiori e minori e quale importanza epidemiologica rivestano. Può capitare, inoltre, che, a causa di un'anamnesi frettolosa o per dimenticanza da parte dello stesso paziente, sia omesso o completamente ignorato il racconto dell'esposizione

a determinate fonti allergeniche. La biologia molecolare e la "Component Resolved Diagnosis"^{36 37} consentono invece di allestire array di proteine sempre più completi, atti a mimare tutte le fonti allergeniche a cui l'organismo umano è esposto. Il test molecolare in multiplex ha un costo meno elevato rispetto agli altri esami. Le informazioni apportate in unica seduta rendono inutili successive ricerche e approfondimenti diagnostici.

In questi ultimi quattro anni presso il Centro di Allergologia Molecolare dell'IDI di Roma sono stati esaminati e raccolti su uno specifico database (InterAll, Allergy Data Laboratories s.c., Latina, Italy), i dati clinici relativi a circa 50.000 pazienti con problematiche allergologiche, provenienti da tutto il territorio nazionale. I primi dati statistici, relativi a un gruppo di 23.000 pazienti testati mediante una tecnologia in multiplex per 75 molecole allergeniche, sono stati pubblicati recentemente³⁸.

La nostra esperienza, fondata su una delle più ampie casistiche mai apparse in letteratura, ci permette di affermare che la diagnostica allergologica molecolare, condotta usando un sistema in multiplex (allergen microarray) rappresenta un mezzo diagnostico scarsamente invasivo, più economico rispetto ad altre metodiche, in grado di fornire all'allergologo molecolare un preciso profilo di sensibilizzazione del singolo paziente e una precisa valutazione epidemiologica della popolazione studiata.

(L'ISAC costituisce il primo esempio di test multiplo, microarray, per la valutazione simultanea delle IgE specifiche per molecole allergeniche purificate, naturali o ricombinanti, e attualmente è costituito da 103 allergeni provenienti da 43 fonti allergeniche).

In conclusione di questa prima parte possiamo affermare che:

- le molecole rappresentano l'evoluzione della diagnostica allergologica;
- il microarray è un comodo, veloce ed economico strumento diagnostico;
- gli allergologi molecolari dovranno compiere una grande mole di lavoro per giungere a una più vasta conoscenza e individuazione delle molecole allergeniche esistenti in natura e agli esatti meccanismi che ne regolano il riconoscimento;
- la diagnostica allergologica molecolare richiede idonee conoscenze da parte dell'allergologo pediatrico, per essere applicata alla clinica.

Bibliografia

- ¹ Stewart GA, Simpson RJ, Thomas WR, et al. *Physicochemical characterization of a major protein allergen, Der p 1, from the house dust mite, Dermatophagoides pteronyssinus. Amino acid analysis and circular dichroism studies.* Int Arch Allergy Appl Immunol 1987;82:444-6.
- ² Harwanegg C, Laffer S, Hiller R, et al. *Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy.* Clin Exp Allergy 2003;33:7-13.
- ³ Hamilton RG, Williams PB. *Human IgE antibody serology: A primer for the practicing North American allergist/immunologist.* J Allergy Clin Immunol 2010;126:33-8.
- ⁴ Mari A. *When does a protein become an allergen? Searching for a dynamic definition based on most advanced technology tools.* Clin Exp Allergy 2008;38:1089-94.
- ⁵ Singh S, Taneja B, Salvi SS, et al. *Physical properties of intact proteins may predict allergenicity or lack thereof.* PLoS ONE 2009;4:e6273.
- ⁶ Sampson HA. *9. Food allergy.* J Allergy Clin Immunol 2003;111(Suppl 2):S540-7.
- ⁷ Ferreira F, Hawranek T, Gruber P, et al. *Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic.* Allergy 2004;59:243-67.
- ⁸ Hauser M, Egger M, Wallner M, et al. *Molecular Properties of Plant Food Allergens: A Current Classification into Protein Families.* Open Immunol J 2008;1:1-12.
- ⁹ Lack G. *New developments in food allergy: Old questions remain.* J Allergy Clin Immunol 2004;114:127-30.
- ¹⁰ Roberts G, Lack G. *Relevance of inhalational exposure to food allergens.* Curr Opin Allergy Clin Immunol 2003;3:211-5.
- ¹¹ Akkerdaas JH, Wensing M, Knulst AC, et al. *How accurate and safe is the diagnosis of hazelnut allergy by means of commercial skin prick test reagents?* Int Arch Allergy Immunol 2003;132:132-40.
- ¹² Asturias JA, Ibarrola I, Fernandez J, et al. *Pho d 2, a major allergen from date palm pollen, is a profilin: cloning, sequencing, and immunoglobulin E cross-reactivity with other profilins.* Clin Exp Allergy 2005;35:374-81.
- ¹³ Gamboa PM, Caceres O, Antepara I, et al. *Two different profiles of peach allergy in the north of Spain.* Allergy 2007;62:408-14.
- ¹⁴ Asero R, Jimeno L, Barber D. *Preliminary results of a skin prick test-based study of the prevalence and clinical impact of hypersensitivity to pollen panallergens (polcalcin and profilin).* J Investig Allergol Clin Immunol 2010;20:35-8.
- ¹⁵ Purohit A, Laffer S, Metz-Favre C, et al. *Poor association between allergen-specific serum immunoglobulin E levels, skin sensitivity and basophil degranulation: a study with recombinant birch pollen allergen Bet v 1 and an immunoglobulin E detection system measuring immunoglobulin E capable of binding to Fc epsilon RI.* Clin Exp Allergy 2005;35:186-92.
- ¹⁶ Pitsios C, Dimitriou A, Stefanaki EC, et al. *Anaphylaxis during skin testing with food allergens in children.* Eur J Pediatr 2010;169:613-5.
- ¹⁷ Codreanu F, Moneret-Vautrin DA, Morisset M, et al. *The risk of systemic reactions to skin prick-tests using food allergens: CICBAA data and literature review.* Allerg Immunol (Paris) 2006;38:52-4.
- ¹⁸ Wang J, Godbold JH, Sampson HA. *Correlation of serum allergy (IgE) tests performed by different assay systems.* J Allergy Clin Immunol 2008;121:1219-24.
- ¹⁹ McCann WA, Ownby DR. *The reproducibility of the allergy skin test scoring and interpretation by board-certified/board-eligible allergists.* Ann Allergy Asthma Immunol 2002;89:368-71.
- ²⁰ Matsson PNJ, Hamilton RG, Esch RE, et al. *Analytical Performance Characteristics and Clinical Utility of Immunological Assays for Human Immunoglobulin E (IgE) Antibodies and Defined Allergen Specificities.* Approved Guideline – Second Edition. CLSI document I/LA20-A2 2009;29:1-145.
- ²¹ Mari A, Ooievaar-de Heer P, Scala E, et al. *Evaluation by double-blind placebo-controlled oral challenge of the clinical relevance of IgE antibodies against plant glycans.* Allergy 2008;63:891-6.
- ²² Sicherer SH, Dhillon G, Laughery KA, et al. *Caution: The Phadia hazelnut ImmunoCAP (f17) has been supplemented with recombinant Cor a 1 and now detects Bet v 1-specific IgE, which leads to elevated values for persons with birch pollen allergy.* J Allergy Clin Immunol 2008;122:413-4.
- ²³ Ballmer-Weber BK, Scheurer S, Fritsche P, et al. *Component-resolved diagnosis with recombinant allergens in patients with cherry allergy.* J Allergy Clin Immunol 2002;110:167-73.
- ²⁴ Fernandez-Rivas M, Gonzalez-Mancebo E, Rodriguez-Perez R, et al. *Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population.* J Allergy Clin Immunol 2003;112:789-95.
- ²⁵ Chapman MD. *Allergen nomenclature.* Clin Allergy Immunol 2008;21:47-58.
- ²⁶ Schena M, Sharon D, Davis RW, et al. *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray.* Science 1995;270:467-70.

- ²⁷ Seliger H. *Introduction: array technology - an overview.* *Methods Mol Biol* 2007;381:1-36.
- ²⁸ Ott H, Folster-Holst R, Merk HF, et al. *Allergen microarrays: a novel tool for high-resolution IgE profiling in adults with atopic dermatitis.* *Eur J Dermatol* 2010;20:54-61.
- ²⁹ Ott H, Schroeder C, Raulf-Heimsoth M, et al. *Microarrays of Recombinant Hevea brasiliensis Proteins: A Novel Tool for the Component-Resolved Diagnosis of Natural Rubber Latex Allergy.* *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010;20:129-38.
- ³⁰ Zennaro D, Palazzo P, Pomponi D, et al. *Retrospective comparative analysis of skin test and IgE reactivity to extracts, and singleplexed or multiplexed allergenic molecules.* *Allergy* 2007;62(S83):S153.
- ³¹ Nicolaou N, Poorafshar M, Murray C, et al. *Allergy or tolerance in children sensitized to peanut: Prevalence and differentiation using component-resolved diagnostics.* *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:191-7.
- ³² Ebo DG, Hagendorens MM, Knop KJ, et al. *Component-resolved diagnosis from latex allergy by microarray.* *Clin Exp Allergy* 2010;40:348-58.
- ³³ Ebo DG, Bridts CH, Verweij MM, et al. *Sensitization profiles in birch pollen-allergic patients with and without oral allergy syndrome to apple: lessons from multiplexed component-resolved allergy diagnosis.* *Clin Exp Allergy* 2010;40:339-47.
- ³⁴ Zennaro D, Scala E, Pomponi D, et al. *Defining IgE specificities in reported cases of IPEX syndrome by means of ISAC proteomic microarray system.* *Allergy* 2008;63(S88):S41.
- ³⁵ Bousquet PJ, Burbach G, Heinzerling LM, et al. *GALLEN skin test study III: Minimum battery of test inhalent allergens needed in epidemiological studies in patients.* *Allergy* 2009;64:1656-62.
- ³⁶ Suck R, Nandy A, Weber B, et al. *Rapid method for arrayed investigation of IgE-reactivity profiles using natural and recombinant allergens.* *Allergy* 2002;57:821-4.
- ³⁷ Valenta R, Twaroch T, Swoboda I. *Component-resolved diagnosis to optimize allergen-specific immunotherapy in the Mediterranean area.* *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007;17(Suppl 1):36-40.
- ³⁸ Scala E, Alessandri C, Bernardi ML, et al. *Cross-sectional survey on immunoglobulin E reactivity in 23 077 subjects using an allergenic molecule-based microarray detection system.* *Clin Exp Allergy* 2010;40:911-21.

La diagnosi di allergia alla nocciola

a cura della Commissione Diagnostica della SIAIP

Mauro Calvani ¹ (coordinatore), Riccardo Asero ², Marcello Bergamini ³,
Stefania La Grutta ⁴, Neri Pucci ⁵



Parole chiave: allergia alimentare, diagnosi, nocciola

Abstract

La nocciola è la noce più frequentemente responsabile di reazione allergica generalizzata e di anafilassi in Italia. D'altra parte la sua allergia può manifestarsi anche solo con una sindrome allergica orale, caratterizzata da prurito o bruciore orale alla loro ingestione o ancora non è infrequente il riscontro di una sensibilizzazione allergica (positività negli SPT o della ricerca delle IgE specifiche) in bambini che apparentemente la assumono o l'hanno assunta senza evidenti problemi. Scopo dell'articolo è di dare un alcune indicazioni pratiche sull'approccio diagnostico da effettuare nel sospetto di allergia alla nocciola, e di fornire alcune informazioni utili per individuare il più corretto impiego delle recenti indagini diagnostiche che permettono la ricerca delle molecole allergeniche.

Introduzione

La nocciola appartiene alla famiglia delle noci, che costituiscono un gruppo di alimenti di particolare importanza da un punto di vista allergologico, poiché la loro allergia sembra spesso persistente negli anni e si associa frequentemente a reazioni gravi ¹. Sono infatti di gran lunga la causa più frequente di decesso per anafilassi da alimenti in età pediatrica negli USA ², ma sono una causa frequente di reazioni allergiche gravi anche in Italia. Nella casistica pubblicata alcuni anni fa da Novembre, le noci costituivano la terza causa più frequente di anafilassi, dopo i pesci e il latte, responsabili di 7/54 (13%) degli episodi (uno dei sette era causato dalle nocciole) ³. Il recente studio

epidemiologico italiano condotto dalla Commissione per le Allergie Alimentari, Anafilassi e Dermatite Atopica della Società Italiana di Immunologia e Allergologia Pediatrica ha dimostrato una importanza ancora maggiore per le noci e in particolare per le nocciole: le noci erano, dopo il latte, la seconda causa più frequente di reazione allergica generalizzata e/o anafilassi da alimenti, responsabili di 32/191 (16,7%) degli episodi e la nocciola costituiva tra tutte le noci la causa più frequente, responsabile di circa il 40% dei casi. (Fig. 1).

L'elevata frequenza di allergia alle nocciole è giustificata probabilmente dal loro elevato consumo: l'Italia difatti è prima al mondo nel consumo domestico di

¹ UOC di Pediatria ed Ematologia pediatrica, Ambulatorio Pediatrico-Allergologico, Azienda Ospedaliera "S. Camillo-Forlanini", Roma;

² Ambulatorio di Allergologia, Clinica "San Carlo", Paderno Dugnano, Milano; ³ Pediatra di famiglia, Ferrara; ⁴ UO Ambiente e Salute, ARPA Sicilia, Palermo; ⁵ UO di Allergologia, Ospedale "A. Meyer", Firenze



Fig. 1. Alimenti causa di anafilassi o reazione allergica generalizzata in una casistica italiana di 191 bambini.

nocciole e seconda nella produzione solo alla Turchia⁴. Il loro valore nutrizionale elevato e il gusto particolarmente attraente, giustificano la loro presenza nelle abitudini dietetiche dei bambini, in specie dopo i primi anni di vita. Sono infatti spesso contenute nelle merendine, nei dolci o nei gelati, nelle torte, nei biscotti, nei cereali per colazione, nelle creme (la Nutella!), o possono essere consumate come tali.

D'altra parte non infrequentemente possono essere responsabili solo di una sindrome allergica orale, caratterizzata da prurito o bruciore orale alla loro ingestione, in specie negli adolescenti o negli adulti, o ancora la sensibilizzazione allergica (positività negli SPT o nella ricerca delle IgE specifiche) può essere riscontrata in bambini che apparentemente le assumono o le hanno assunte senza evidenti problemi. Non infrequente è inoltre, negli allergici alle nocciole, il riscontro di allergia o sensibilizzazione allergica nei confronti di altre noci o semi, il che complica la gestione diagnostica e terapeutica. Difatti gli allergici alle nocciole hanno una maggiore probabilità (incidenza riportata tra il 23% e il 68% nei diversi studi) di essere sensibilizzati e di avere reazioni cliniche anche verso altre noci e/o alle arachidi, seppure queste derivino da famiglie botaniche differenti⁵⁻⁹.

I recenti progressi forniti dalla biologia molecolare hanno permesso di ampliare le nostre conoscenze sulla composizione allergenica delle nocciole e comprendere i motivi delle diverse manifestazioni cliniche, oltre che delle frequenti cross reattività. Scopo di questo articolo è dare un alcune indicazioni pratiche sull'approccio diagnostico da effettuare nel sospetto di allergia alla nocciola, e fornire alcune informazioni utili per individuare il più corretto impiego delle re-

centi indagini diagnostiche che permettono la ricerca delle molecole allergeniche.

La diagnosi di allergia alla nocciola

L'allergia alla nocciola è essenzialmente un'allergia IgE mediata e può manifestarsi con qualunque manifestazione clinica IgE mediata, dalla sindrome allergica orale, caratterizzata da prurito o bruciore della lingua e della mucosa orale, subito dopo l'assunzione dell'alimento, all'orticaria-angioedema fino alle reazioni allergiche generalizzate e alla anafilassi. In questi ultimi casi la reazione allergica può evidenziarsi con sintomi dell'apparato respiratorio (rinite e/o asma), dell'apparato gastrointestinale (dolore addominale, vomito o diarrea) e di quello cardiovascolare (tachicardia, ipotensione, shock).

La diagnosi di allergia alla nocciola si basa su:

- 1) una storia clinica di un recente quadro clinico compatibile con una reazione allergica, insorto entro pochi minuti, alcune ore dall'assunzione delle nocciole o di alimenti che contengono le nocciole;
- 2) la dimostrazione della sensibilizzazione allergica, mediante gli Skin Prick Test (SPT) o la ricerca delle IgE specifiche, nei confronti delle nocciole o delle molecole allergeniche delle nocciole.

Se la storia clinica è suggestiva (insorgenza di sintomi obiettivi tipici) di una o meglio più recenti reazioni avverse, insorte immediatamente (entro 2 ore) dall'ingestione dell'alimento, specie se assunto in modo isolato, in presenza di IgE specifiche per la nocciola, o per le molecole più frequentemente correlate al quadro clinico osservato, magari a titolo elevato, è possibile con ragionevole certezza emettere una diagnosi di allergia alla nocciola¹⁰. Qualora non sussistano queste condizioni, per avere una maggiore certezza diagnostica, è necessario ricorrere al test di provocazione orale. Allo stesso modo, se la reazione si è verificata da oltre un anno, in presenza di IgE specifiche per la nocciola, laddove la nocciola sia stata esclusa dalla dieta, è necessario ricorrere ad un test di provocazione orale prima di reintrodurla liberamente nella dieta.

SPT e determinazione delle IgE specifiche

In generale, sia gli SPT che la ricerca delle IgE specifiche nei confronti della nocciola, presentano un'ottima

L'allergia alla nocciola è essenzialmente un'allergia IgE mediata e le sue manifestazioni vanno dalla sindrome allergica orale, subito dopo l'assunzione dell'alimento, all'orticaria-angioedema fino alle reazioni allergiche generalizzate e alla anafilassi.

sensibilità, ovvero risultano frequentemente positive nei soggetti che hanno manifestazioni reazioni cliniche alla ingestione della nocciola, ma una bassa specificità, ovvero risultano non infrequentemente negativi anche in soggetti che assumono le nocciole senza evidenti reazioni cliniche.

Ortolani ha effettuato uno studio su 86 pazienti (età 14-64 anni, mediana 30 anni) con sospetta allergia alla nocciola. Di questi, 66 riferivano una sindrome allergica orale, 9 disturbi gastrointestinali e 11 reazioni sistemiche. La storia clinica e gli SPT o la determinazione delle IgE specifiche avevano un'ottima sensibilità e un ottimo potere predittivo positivo (PPV) (la storia aveva un PPV di 0,93, gli SPT di 0,92, il prick by prick di 0,94 e il CAP (considerato positivo se $> 0,7$ kU/l) di 0,92. D'altra parte la specificità e il potere predittivo negativo (NPV) erano molto bassi (0,039 per gli SPT, 0,14 per il Prick by Prick e 0,05 per il CAP).

La sensibilità non assoluta è dovuta principalmente al fatto che la preparazione di un estratto diagnostico di un allergene alimentare, sia per SPT che per la determinazione delle IgE specifiche, è complessa e difficile, e non sempre consente la presenza di tutte le molecole allergeniche. Infatti, per quanto riguarda la nocciola, ma lo stesso vale un po' per tutti gli allergeni vegetali, alcune molecole allergeniche, come ad es. il Cor a 2, sono piuttosto labili, e ciò le rende suscettibili di essere modificate o degradate dai vari procedimenti necessari alla creazione dell'estratto. Diversi studi hanno mostrato importanti variazioni nel contenuto allergenico degli estratti di differenti case produttrici e in alcuni

casi è stata segnalata una scarsa presenza o talora l'assenza di alcuni allergeni importanti^{11 12}. D'altra parte è possibile sviluppare sensibilizzazioni allergiche senza necessariamente avere un quadro clinico all'ingestione dell'alimento, tanto più se le molecole allergeniche verso cui si è sensibilizzato sono labili e quindi vengono modificate dalla digestione stessa.

I cut-off diagnostici della Nocciola

Ho et al. hanno analizzato 906 pazienti allergici alle noci, tra cui nocciola, mandorla, anacardo, brasil nut, e ricercato un cut-off diagnostico nei confronti del challenge. Nella loro casistica un SPT di ≥ 8 mm aveva un valore predittivo positivo del 95% per la nocciola, la noce e l'anacardo¹³. Un risultato sovrapponibile è stato ottenuto da Clark e Ewan che hanno evidenziato come solo il 3% di circa 1000 bambini ed adulti allergici alle noci (tra cui nocciola, noce, mandorla, brasil nut) erano in grado di tollerare la noce verso la quale avevano un SPT con diametro ≥ 8 mm. Nello stesso studio solo il 5% di coloro che avevano un valore di IgE specifiche > 15 kU/L tollerava le noci (tra cui le nocciole) e le arachidi¹⁴. Tali valori andrebbero adattati alla prevalenza della malattia nella popolazione cui si intende applicare il cut-off. Questo perché diminuendo la prevalenza dell'allergia, come è assai probabile succeda se il test viene impiegato al di fuori di un ambulatorio specialistico, diminuisce anche il valore predittivo. In pratica, un dato cut-off che si rivela predittivo nel 95% dei casi in una popolazione selezionata ad elevata prevalenza della allergia, può divenire predittivo solo nel 50-60% se applicato in una popolazione generale con una prevalenza più bassa¹⁵.

Diversamente dalle arachidi o dalla noce, per la ampia dispersione dei valori, non è stato possibile invece proporre un cut-off diagnostico per la nocciola¹⁶.

Allergeni e molecole allergeniche

Negli ultimi anni vi è stato un vertiginoso aumento delle conoscenze sulla composizione molecolare degli alimenti, per molti dei quali ormai si conoscono le molecole allergeniche più rilevanti.

Anche grazie a queste conoscenze, è oggi possibile dosare la presenza di IgE specifiche non solo nei confronti degli estratti allergenici, che sono costituiti da

miscele più o meno purificate di proteine allergeniche, ma anche nei confronti delle singole molecole allergeniche. Per poter usare al meglio queste indagini diagnostiche e interpretarne correttamente le risposte, è necessario acquisire alcune conoscenze di base.

Qualunque proteina può costituire una fonte allergenica. Alcune proteine sono specifiche di alcuni alimenti o inalanti e la sensibilizzazione allergica verso una di queste proteine comporta una risposta allergica solo verso quelle particolari sostanze. Queste sono dette sensibilizzazioni primarie. Altre proteine invece sono presenti in diversi alimenti o inalanti. La sensibilizzazione allergica verso queste proteine, dette panallergeni, costituisce la base della cross reattività. Quando la iniziale sensibilizzazione allergica avviene attraverso la via gastrointestinale, come ad es. avviene per la allergia al latte o alle proteine dell'uovo, gli allergeni vengono definiti di 1° tipo mentre quando la sensibilizzazione allergica avviene inizialmente nei confronti di un allergene respiratorio e poi si estende, per la somiglianza antigenica, ad un alimento, come avviene ad es. per molti allergeni di origine vegetale, gli allergeni vengono definiti di 2° tipo. Questo spiega perché, in seguito al verificarsi di una allergia respiratoria, a causa di una cross reattività tra pollini ed alimenti, possa insorgere una allergia alimentare.

È possibile acquisire informazioni sulle famiglie delle proteine allergeniche e sulle molecole allergeniche in diversi siti su Internet, come il sito ufficiale della "International Union of Immunological Societies" che contiene il database della nomenclatura degli allergeni (<http://www.allergen.org>) o su altri database quali Allergome (<http://www.allergome.org>) o Allfam (<http://www.meduniwien.ac.at/allergens/allfam/>).

Oggi è possibile dosare la presenza di IgE specifiche non solo nei confronti degli estratti allergenici, costituiti da miscele di proteine allergeniche, ma anche nei confronti delle singole molecole allergeniche.

Le cross reattività

È ben noto infatti che l'allergia ad alcuni alimenti o inalanti si accompagna con una certa frequenza alla sensibilizzazione o all'allergia anche verso altri alimenti o inalanti, che in qualche modo gli "somigliano". La "somiglianza" deriva da una omologia nella struttura primaria degli aminoacidi, ma anche dalla simile struttura tridimensionale. Secondo l'OMS una proteina può essere considerata potenzialmente cross reattiva con un'altra se presenta una omologia in almeno 6 aminoacidi contigui, o una somiglianza di almeno il 35% in un gruppo di 80 aminoacidi. Altri autori hanno suggerito che una omologia per 8 aminoacidi sembra più appropriata, riducendo la frequenza di falsi positivi¹⁷.

Il problema della cross reattività è particolarmente importante per i vegetali, dato che alcune famiglie di proteine cross reattive (panallergeni), sono particolarmente diffuse in tutto il mondo vegetale, indipendentemente dalla loro origine tassonomica. A oggi si conoscono almeno 28 gruppi di panallergeni. Alcuni appartengono in specie alla categoria delle Pathogenesis Related Proteins (PRP), proteine la cui sintesi è indotta nei vegetali da stimoli esogeni, quali i patogeni o diversi stress ambientali. Le PRP a loro volta comprendono numerose famiglie, cui appartengono diverse molecole di cui si parlerà, come ad es. le Lipid Transfer Protein (LTP) e le proteine omologhe della Bet v 1. Altre proteine invece, come la profillina e le Seed Storage Proteins (SSP), sono comuni a molti vegetali in quanto esplicano una funzione biologica comune (enzimi, proteine di trasporto, proteine strutturali, ecc.)¹⁸.

Le molecole allergeniche delle nocciole

A oggi sono state isolate e caratterizzate diverse molecole allergeniche nella nocciola (Tab. I).

Il *Cor a 1.04* è un allergene maggiore, (le isoforme Co A1.01, 1.02, 1.03 si riscontrano nel polline del nocciolo) e appartiene alla famiglia delle PRP (PR10). È un analogo del *Bet v 1*, con il quale mostra una identità dell'85%. È una proteina termolabile, il che spiega il fatto che sia frequentemente responsabile solo di una sindrome orale allergica. L'arrostitimento riduce molto l'allergenicità delle nocciole come dimostrato dal fatto che solo 5/17 dei soggetti allergici al *Cor a 1* o al *Cor a 2* hanno manifestato una sindrome

Tab. I. Molecole allergeniche della nocciola.

Molecole allergeniche	kDa		Quadro clinico	SPT	CAP per nocciola (f17)	CAP (singole molecole)	ISAC CRD 103
Cor a 1.04	17.4	PR10 (Bet V1 like)	SOA	Si	Si	Si	Si
Cor a 2	14	Bet V2 (Profillina)	SOA	Variabile	Si	No	No
Cor a 8	9,4	LTP	Possibili reazioni gravi	Variabile	Si	Si	Si
Cor a 9	32, 35, 40	11 s globulina	Possibili reazioni gravi (rare)	?	Si	No	Si
Cor a 11	47	Vicillina	Possibili reazioni gravi (rare)	?	Si	No	No
Cor a 12		Oleosina	?	?	Si	No	No
Cor a 13		Oleosina	?	?	Si	No	No
Cor a 14		2s albumina	?	?	Si	No	No

allergica orale in seguito alla ingestione di nocciole arrostiti¹⁹.

Il Cor a 2 è un allergene minore, una *Profillina (analoga del Bet v 2)*, anch'essa molto sensibilizzante ma non frequentemente presente e scarsamente importante da un punto di vista clinico. Non sono mai state segnalate reazioni gravi nei suoi confronti ma solo sindrome allergica orale²⁰.

Il Cor a 8 è una *LTP*, allergene importante perché responsabile di reazioni gravi soprattutto in Europa, ma anche solo di sindrome allergica orale²¹. È una proteina di 9 kd e come le altre LTP è molto resistente alla digestione peptica e parzialmente alla cottura.

Il Cor a 9 è una *11S globulin*, appartenente alla famiglia delle SSP. Manifestazioni allergiche causate dal Cor a 9 sono state segnalate soprattutto negli USA. La sensibilizzazione per il Cor a 9 veniva riscontrata in 12/14 (86%) individui con gravi manifestazioni allergiche alla nocciola²². Un recente studio europeo ha dimostrato che la sensibilizzazione per il Cor a 9 sembra frequente anche nel primo anno di vita: era presente in 12/20 bambini con dermatite atopica di un anno di età sensibilizzati alla nocciola, mentre nessuno di questi bambini era sensibilizzato al Cor a 1 e al Cor a 8. L'importanza clinica di questa precoce sensibilizzazione è sconosciuta così come la via di sensibilizzazione, dato che la gran parte dei genitori riferiva di non aver mai somministrato nocciole ai bambini (cutanea, intrauterina?)²³ D'altra parte un altro studio europeo ha mostrato che la sensibilizzazio-

ne per il Cor a 9 viene riscontrata in percentuali simili nei soggetti con allergia alla nocciola e nei soggetti di controllo affetti da pollinosi per il nocciolo²⁴.

Il Cor a 11 è una *Vicillin like protein*, appartenente alla famiglia delle SSP²⁵. È un allergene minore, ma può essere responsabile di reazioni gravi, in quanto è una proteina resistente alla digestione ed alla cottura²⁶.

Scarse sono le conoscenze sul significato clinico e sulla frequenza di sensibilizzazione alle *oleosine*, una nuova classe di allergeni proteici associate agli oli²⁷, o alle cross reactive carbohydrate determinants (CCD), alcune strutture carboidratiche presenti anche nelle nocciole²⁸.

Il Cor a 14 è una *2S albumina*, isolata di recente, appartenente alla famiglia delle SSP.

L'approccio molecolare nell'allergia alla nocciola

Dato che le singole molecole allergeniche della nocciola sono state associate prevalentemente a quadri clinici differenti, è possibile che un "approccio molecolare" possa risultare utile alla diagnosi e alla successiva gestione di un bambino con allergia alle nocciole.

In questo senso, per quanto riguarda l'allergia alla nocciola, gli SPT sono di scarso aiuto. Gli estratti commerciali infatti sono realizzati con l'estratto crudo della nocciola e la composizione dell'estratto è

espressa in quantità del contenuto proteico (PNU/ml) o in peso/volume. Il processo di preparazione degli estratti allergenici comporta spesso la degradazione e la inattivazione delle molecole allergeniche labili mentre non è in grado di modificare quelle più stabili. Per tale motivo è ipotizzabile che gli estratti di Nocciola contengano il Cor a 8, il Cor a 9 e il Cor a 11, mentre potrebbero non contenere allergeni labili, come il Cor a 2. Tuttavia questa ipotesi è smentita da alcuni studi: Akkerdaas ha studiato la composizione degli estratti per SPT della nocciola, e ha dimostrato che esistono molte differenze nella composizione nei 9 estratti studiati: il Cor a 1 era presente, anche se la sua concentrazione variava da 0,6 a 32 mcg/ml nei vari estratti e il Cor a 8 era virtualmente assente nel 30% degli estratti, e la sua concentrazione variava di oltre 100 volte^{29 30}. Per avere ulteriori informazioni sulla composizione molecolare degli estratti diagnostici per SPT, abbiamo chiesto a quattro tra le principali case produttrici di diagnostici per SPT (Allergopharma, ALK, Lofarma, Stallergen) quale fosse la composizione molecolare dei loro estratti diagnostici, ma nessuna è stata in grado di confermare la presenza e tanto meno la quantità delle singole componenti allergeniche della nocciola nei diagnostici.

Circa la composizione molecolare dell'estratto per la ricerca delle IgE specifiche sieriche, abbiamo interrogato la Phadia, la casa produttrice dei diagnostici più frequentemente utilizzati nei vari studi della letteratura. La casa ha risposto che gli estratti allergenici utilizzati per l'immuno CAP sono sottoposti a ripetuti controlli di qualità proprio allo scopo di controllare che tutte le componenti allergeniche siano rappresentate ed espresse nelle giuste quantità. In teoria quindi

Poiché le molecole allergeniche della nocciola sono associate a quadri clinici differenti, un “approccio molecolare” potrebbe essere utile alla diagnosi di un bambino con allergia alle nocciole.

l'immuno CAP dovrebbe contenere tutte le molecole allergeniche conosciute e nelle giuste dosi. In effetti lo sforzo di migliorare l'efficacia diagnostica nei confronti della nocciola è documentato in letteratura. In passato diversi studi avevano mostrato che la sensibilità dell'immuno CAP per la nocciola (f17), pur ottima, non era assoluta, dato che il test risultava negativo in alcuni soggetti allergici alla nocciola^{31 32}. Per tale motivo alcuni anni fa la Phadia ha esplorato la possibilità di arricchire l'estratto del commercio con il Cor a 1.0401, dimostrando un miglioramento della sensibilità diagnostica³³ e quindi cambiando in tal senso dal maggio 2007 la composizione del diagnostico. E questo miglioramento della sensibilità diagnostica dell'estratto della nocciola della Phadia è stato confermato anche da studi più recenti²⁴. Tuttavia poiché il Cor a 1 è responsabile solo di sindrome allergica orale e non di sintomi sistemici, alcuni autori hanno affermato che questo arricchimento, pur utile nell'aumentare la sensibilità diagnostica nei confronti dei soggetti che manifestano una sindrome allergica orale in seguito alla assunzione di nocciola, possa essere poco utile invece, aumentando i falsi positivi, legati probabilmente alla sensibilizzazione per il Bet v 1 della Betulla, in specie nei casi di sospetta allergia alimentare severa per la nocciola³⁴.

Per tale motivo per effettuare un “approccio molecolare” alla diagnosi di allergia alla nocciola è necessario effettuare la determinazione delle singole molecole allergeniche. Questa ricerca si può effettuare sia come determinazione di una singola molecola, ad es. con l'immuno CAP, che con un Microarray proteomico (ISAC), indagine che consente la determinazione di un pannello preconstituito di 103 molecole. A oggi tuttavia è possibile dosare solo alcune delle molecole allergeniche conosciute e in particolare per quanto riguarda la nocciola, è possibile dosare con l'immuno CAP solo il Cor a 1 e il Cor a 8 mentre nell'ISAC sono presenti il Cor a 1, il Cor a 8 e il Cor a 9, mentre non è possibile dosare, né con l'ISAC, né con l'immuno CAP il Cor a 2, il Cor a 11, il Cor a 14 e le oleosine.

Efficacia diagnostica del dosaggio delle singole molecole allergeniche

Alcuni studi hanno indagato l'efficacia diagnostica del dosaggio del Cor a 8 nella diagnosi dell'allergia alla nocciola.

La ricerca delle singole molecole allergeniche si può effettuare sia come determinazione di una singola molecola, ad es. con l'immuno CAP, che con un Microarray proteomico (ISAC), che consente la determinazione di un pannello preconstituito di 103 molecole.

Schocker ha studiato 26 soggetti con allergia alle nocciole. Di questi, 10 avevano presentato anafilassi, 6 angioedema e 2 orticaria e 8 sindrome allergica orale. 7/10 dei soggetti con anafilassi erano monosensibilizzati al Cor a 8, e d'altra parte la stessa sensibilizzazione era riscontrabile in altri 9 soggetti affetti solo da sindrome allergica orale o orticaria e angioedema³⁵.

Nello studio di Skamstrup Hansen³⁶ reazioni severe erano riportate in 5/16 (31%) dei soggetti con sensibilizzazione al Cor a 8 e in 2/41 (5%) di quelli non sensibilizzati al Cor a 8. D'altra parte una sensibilizzazione al Cor a 8 era riscontrabile in 5/7 (71%) dei soggetti con anafilassi e in 11/52 (21%) di quelli con reazioni allergiche più lievi.

Pastorello ha studiato 72 pazienti allergici alla nocciola, di cui 7 affetti da anafilassi grave e 65 affetti da sindrome allergica orale, di cui 59 manifestava sintomi solo a carico della bocca, 3 sintomi anche gastrointestinali e 5 anche lievi sintomi sistemici. 63/65 dei soggetti con SOA dimostravano di essere sensibilizzati al Cor a 1 e in percentuale minore anche ad altre bande allergeniche. Tutti i soggetti con anafilassi grave erano sensibilizzati al Cor a 8. Il Cor a 1 e anche una banda del Cor a 2 venivano completamente inibiti all'immunoblotting e da 1 mg di polline di betulla³⁷.

Flinterman ha ricercato la sensibilizzazione verso il Cor a 1, il Cor a 2 e il Cor a 8 per mezzo del RAST e dell'immunoblotting in una popolazione di bambini

allergici alla nocciola residenti in una area con presenza di Betulla. Le reazioni cliniche venivano confermate al DBPCFC in 8/28 dei bambini. La stessa ricerca veniva effettuata in un altro gruppo di 191 bambini sensibilizzati alla nocciola, non sottoposti a test di provocazione orale. Nella sua popolazione, tutti i bambini con DBPCFC positivo con sintomi obiettivi presentavano la positività per il Cor a 8, mentre il Cor a 8 risultava positivo solo in 1/20 dei bambini con DBPCFC negativo o con sindrome allergica orale (Sensibilità = 100%; Specificità = 94,4%; VPP = 88,9%; Rapporto di Verosimiglianza per Test Positivo = 18). I bambini con reazioni cliniche obiettive inoltre riconoscevano un numero maggiore di proteine della nocciola (7 vs 2.5) ed erano più spesso sensibilizzati ad altre noci rispetto a quelli con reazioni negative al test di provocazione³⁸.

Non ci risulta nessuno studio che abbia indagato specificamente la efficacia diagnostica del Cor a 9.

Possibili impieghi della diagnostica molecolare

Mentre nella gestione di una allergia respiratoria la diagnostica molecolare ha indubbiamente un ruolo importante, ad es. nell'individuare i soggetti potenzialmente candidati alla immunoterapia specifica, il suo ruolo nelle allergie alimentari è più complesso e meno definito.

Il riscontro occasionale di una sensibilizzazione allergica per la nocciola in un bambino che non ha una storia di allergia alimentare alla nocciola potrebbe derivare da una sensibilizzazione verso una molecola effettivamente in grado di dare una reazione allergica anche grave ad una successiva ingestione della nocciola (ad es. il Cor a 8), oppure alla sensibilizzazione verso una molecola in grado di dare solo eventualmente una sindrome allergica orale, spesso come conseguenza di una sensibilizzazione ad un allergene aerogeno (ad es. il Cor a 1). In questo caso, un "approccio molecolare" alla diagnosi permette di fare un piccolo passo avanti nella gestione clinica. Il Nocciolo (*Corylus avellana*) appartiene insieme a Betulla, Ontano e Carpino alla famiglia delle betulacee. I pollini del Nocciolo cross reagiscono ampiamente con quelli delle altre betulacee ma anche con le nocciole, il che giustifica il frequente riscontro di sensibilizzazione alla nocciola in bambini o adulti allergici al nocciolo. Responsabili di questa cross reattività

sono soprattutto il Cor a 1 e il Cor a 2. Per questo motivo, nei paesi dove sono diffuse le betulacee la cross reattività tra i pollini e le noci sembra essere la causa principale di allergia alle nocciole, almeno negli adulti, mentre nei paesi in cui le betulacee sono meno diffuse (ad es. la Spagna) è probabile che la sensibilizzazione avvenga primitivamente attraverso la via gastrointestinale³⁹.

Nel caso invece in cui il bambino abbia sviluppato una reazione clinica grave alla ingestione di nocciole, è possibile porre la diagnosi già sulla base della concordanza tra storia clinica e evidenza di sensibilizzazione allergica agli SPT o alla determinazione delle IgE specifiche. In questo caso la ricerca delle molecole allergeniche è poco utile alla diagnosi, ma potrebbe essere utile per la previsione di possibili cross reattività con altri alimenti. Infatti, dato che la cross reattività tra gli alimenti potrebbe dipendere più dalla classe molecolare di appartenenza degli allergeni che dalla origine tassonomica degli alimenti stessi, conoscere la molecola allergenica verso cui si è sensibilizzati potrebbe fornire altre informazioni utili ad individuare delle possibili cross reattività. Tuttavia in questo caso la situazione si complica molto. Infatti, se venissimo a sapere che il nostro bambino è allergico ad es. al Cor a 8, l'elenco delle molecole allergeniche che presentano una omologia o per le quali sia dimostrata una cross reattività è veramente lungo (Tab. II). E la cosa non è molto diversa se venissimo a sapere che è sensibilizzato ad es. al Cor a 9, alle profilline, ecc. Questa informazione potrebbe essere utile per spiegare o per ricercare in modo più approfondito nella anamnesi eventuali disturbi correlati al contatto con quegli allergeni, ma richiede indubbiamente una notevole competenza specifica, oltre che molto tempo a disposizione. Inoltre, sapere che è possibile una cross reattività verso una o più molecole contenute in altri alimenti, non autorizza a togliere quegli alimenti dalla dieta del nostro bambino se apparentemente tollerati, ed è discusso se sia opportuno farlo persino se a questi risultasse sensibilizzato.

Infine, è stato ipotizzato che conoscere la classe di appartenenza della molecola allergenica (ad es LTP o Vicillina) potrebbe risultare utile nella gestione delle cross reattività, ad esempio tra le noci. (Tab. III) Tuttavia questa affermazione ha diversi limiti.

Ad esempio, appartenere alla stessa classe non significa necessariamente rischiare una cross reattività: ad esempio non esiste cross reattività tra Ara h 1 e Jug r 2, o tra Ara h 1 e Ana o 1, pur essendo tutte

delle *Vicilline*⁴⁰. Comunque, per quanto riguarda la Vicillina della Nocciola, il Cor a 11, essa presenta una identità di sequenza del 35% con la vicillina della Arachide (Ara h 1). Inoltre Beyer ha dimostrato che 2 degli epitopi leganti le IgE dell'Ara h 1 presentano una somiglianza del 66% e del 44% con il Cor a 11 e 4 su 5 degli aminoacidi necessari al legame con le IgE sono identici.

Allo stesso modo, sebbene le 2S *albumine* abbiamo una elevata analogia strutturale, le cross reattività sembrano poco comuni nell'ambito di questa famiglia. Moreno ha analizzato le cross reattività mediate antisiero policlonale contro le 2S albumine e ha dimostrato che la cross reattività tra le 2S albumine di alcune noci (nocciola, mandorla, pecan, anacardo, noce) ma anche legumi (arachide e pisello) sono scarse. Questi dati supportano il fatto che allergeni con simile conformazione, non necessariamente siano cross reattivi⁴¹. Una certa cross reattività sembra tuttavia esistere tra le 2S albumine della noce e della mandorla⁴². Il Cor a 9 ha una identità del 50% circa con la analoghe 11S *globuline* della arachide e della soia. In particolare un epitopo legante le IgE dell'Ara h 3 riconosce una omologia del 67% con il Cor a 9 e la restante parte della molecola non sembra rilevante ai fini del legame con le IgE⁴³.

Per quanto riguarda le LTP, proteine di 9-10 kd altamente conservate e distribuite in tutto il mondo vegetale, esse presentano un variabile grado di omologia (dal 35 al 95%) anche tra vegetali non botanicamente correlati. È stato ipotizzato che il Pru p 3 la, LTP della pesca, possa costituire la LTP primariamente sensibilizzante nei pazienti dell'area del mediterraneo^{44 45}. Nei soggetti allergici alla LTP della pesca è frequente una sensibilizzazione allergica anche per altre LTP delle rosacee e delle noci e in una casistica di adulti la allergia alla nocciola veniva riscontrata in tutti i soggetti allergici alla LTP della pesca⁴⁶. Per questo motivo, e anche per la elevata cross reattività tra LTP della pesca e della nocciola, è stato proposto che riscontrare una positività dello SPT con l'estratto commerciale di pesca, che conterrebbe LTP ma non Seed Storage Proteins, possa essere utile per orientare il sospetto diagnostico, nei soggetti con importante reazione allergica alla nocciola, verso la LTP della nocciola (il Cor a 8) e non verso le Seed Storage Proteins (Cor a 9, Cor a 11, Cor a 14). Tuttavia la cross reattività tra la LTP della pesca e quella della nocciola non è affatto assoluta. Nella casistica di Schocker, costituita da 26 soggetti allergici alla nocciola con SPT e PP

Tab. II. Omologia di sequenza e cross reattività riportate per le principali molecole allergeniche della nocciola.

Nocciola	Bet v 1 Cor a 1	Profiline Cor a 2	LTP Cor a 8	11S globuline Cor a 9	Vicilline Cor a 11	2S globuline Cor a 14
Omologia di sequenza	Act c 8, Act d 8, Aln g 1, Api g 1, Ara h 8, Aspa o 17 kDa, Bet v 1, Car b 1, Cas s 1, Cat r 17 kDa, Dau c 1, Fag s 1, Fra a 1, Gly m 4, Mal d 1, Pet c 1, Prua r 1, Pru av 1, Pru p 1, Pyr c 1, Que a 1, Rub i 1, Tar o 18 kDa	Ama r 2, Amb a 8, Ana c 1, Api g 4, Ara h 5, Ara t 8, Art v 4, Bet v 2, Beta v 2, Bra n 8, Bra ni 8, Cap a 2, Che a 2, Cit la 2, Cit s 2, Cro s 2, Cuc m 2, Cuc m 3, Cyn d 12, Dau c 4, Fra a 4, Gly m 3, Hel a 2, Hev b 8, Hom s profilin, Hor v 12, Hum i 2, Lil i 12, Lit c 1, lyc e 1, lyc e 2, Mal d 4, Man i 3, Mer a 1, Mus a 1, Mus xp 1, Nic t 8, Ole e 2, Ory s 12, Par j 3, Pet c 2, Phl p 12, Pho d 2, Prua v 4, Pru du 4, Pyr c 4, Ric c 8, Sal k 4, Sin a 4, Tri a 12, Zea m 12	Amb a 6, Ara h 9, Art v 3, Art v 3, Aspa o 1, Bra r 3, Cas s 8, Cit l 3, Cit s 3, Dau c 3, Fra a 3, Hel a 3, Hev b 12, Hor v 14, Jug r 3, Lac s 1, Len c 3, Lyc e 3, Mal d 3, Mor n 3, Ole e 7, Ory s 14, Par j 1, Par i 2, Pha v 3, Pla a 3, Pru ar 3, Pru av 3, Pru d 3, Pru du 3, Pru p 3, Pyr c 3, Rub i 3, Sin a 3, Tri a 14, Vit v 1, Zea m 14	Ana o 1, Ana o 2, Ana o 2, Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, Ara h 7, Ber e 1, Ber e 2, Bra j 1, Bra n 1, Bra r 1, Bra r 1, Bra n 1, Bra r 1, Cae pu, Car i 1, Cor a 9, Cor a 11, Fag e 1, Fag e 10 kDa, Fag e 2, Gly m 6, Gly m 2s albumin, Gly m 6, Hel a 2s albumin, Jug n 1, Jug n 2, Jug r 1, Jug r 2, Jug r 4, Len c 1, Lup a 1, Lup a delta conglutinin, Lup a gamma conglutinin, Pis s 1, Pis s 2, Pis v 1, Pis v 2, Ric c 1, Ric c 3, Ses i 1, Ses i 2, Ses i 6, Ses i 7, Sin a 1, Sin a 2, tri fg 1, tri fg 3	Ana o 1, ana o 2, Ana o 3, Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, Ara h 7, Ber e 1, Ber e 2, Bra j 1, Bra n 1, Bra r 1, Cae pu, Car i 1, Cor a 9, Fag e 1, Fag e 10 kDa, Fag e 2, Gly ms albumin, Gly m 6, Gly m 6, Gly m Bd60K, Hel a 2s albumin, Jug n 1, Jug n2, Jug r 1, Jug r 2, Jug r4, Len c 1, Lup a 1, Lup a delta conglutinin, Lup a gamma conglutinin, Pis s 1, Pis s 2, Pis v 1, Pis v 2, Ric c 1, Ric c 3, Ses i 1, Ses i 2, Ses i 6, Ses i 7, Sin a 1, Sin a 2, Tri fg 1, Tri fg 3	-
Cross reattività	Act c 8, Act d 8, Aln g 1, Api g 1, Ara h 8, Aspa o 17 kDa, Bet v 1, Car b 1, Cas s 1, Cic c 1, Cor a 1, Cor s 1, Cum c 1, Dau c 1, Dio k 17 kDa, Foe v 1, Gly m 4, Mal d 1, Man i 14 kDa, Mat c 17 kDa, Pap s 17 kDa, Pim a 1, Pru av 1, Pur c 1, Que a 1, Vig r 1	Act c 9, Aln g 2, Amb a 8, Amb t 8, Ana c 1, Api g 4, Ara h 5, Art v 4, Aspa o 4, Bet v 2, Beta v 2, Cap a 2, Car b 2, Cas s 2, Cat r 2, Che a 2, Cit la 2, Cit s 2, Cor s 2, Cuc m 2, Cuc Ma 2, Cuc p2, Cuc s2, Cum c 2, Cup s 8, Cyn d 12, Dag g 12, Dau c 4, Dio k 4, Fag s 2, Foe v 2, Fra a 4, Fra e 2, Hel a 2, Gly m 3, Hel a 2, Hev b 8, Hom s profilin, Lig v 2, Lit c 1, Lol p 12, lyc e 1, Mal d 4, Mal g 4, Man i 3, Mer a 1, Mus xp 1, Ole e 2, pap s2, Par j 3, Phl p 12, Pho d 2, Pim a 2, Pla a 8, Prua av 4, Pru p 4, Pyr c 4, Que a 2, Ric c 8, Rob p 2, Sal k 4, Sola t 8, Syr v 2, Tri a 12	All c 3, Ara h 9, Art v 3, Aspa o 1, Can s 3, Cas s 8, Cit l 3, Cit s 3, Dau c 3, Jur g 3, Lac s 1, Lyc e 3, Mal d 3, Ory s 14, Pha v 3, Pla a 3, Pru av 3, Pru d 3, Pru du 3, Pun g 3, Tri a 14, vac m 3, Vit v 1	Jug r 4, Ses i 6	-	-

Da Allergome, accesso il 4 settembre 2010.

Tab. III. Principali molecole allergeniche nelle noci e nelle arachidi.

	LTP	SSP 11S globuline	SSP Vicilline	SSP 2S albumine	Bet v 1	Bet v 2	Oleosine e altri
Nocciola	Cor a 8	Cor a 9	Cor a 11	Cor a 14	Cor a 1	Cor a 2	Cor a 12 Cor a 13
Noce	Jug r 3	Jug r 4	Jug r 2	Jug r 1		Jug r	
Mandorla	Pru du 8	Pru du 11 s globulin		Pru du 2 s albumin		Pru du 4	Pru du conglutinin Pru du 5
Pistacchio		Pis v 2 Pis v 5	Pis v 3	Pis v 1			Pis v 4 (superossido dismutasi)
Anacardo			Ana o 1 Ana o 2	Ana o 3			
Castagna	Cas s 8				Cas s 1	Cas s 2	Cas s 5 (chitinasi, hevein like)
Pinolo							Pin P
Brasil Nut		Ber e 2		Ber e 1			
Pecan				Car i 1			
Sesamo		Ses i 6 Sex i 7	Ses i 3	Ses i 1 Ses i 2		Ses i 8	Ses i 4 Ses i 5
Arachide	Ara h 9	Ara h 3	Ara h 1	Ara h 2 Ara h 6 Ara h 7	Ara h 8	Ara h 5	Ara h 4 (glicinina)

positivi per la nocciola, 20 risultavano sensibilizzati al Cor a 8. Di questi 20 solo 9 (45%) avevano uno SPT positivo per la pesca (quindi per il Pru p 3). E d'altra parte 3 su 6 dei rimanenti, non sensibilizzati al Cor a 8, presentavano uno SPT positivo per la pesca³⁵. Allo stesso modo, nella casistica di Flinterman dei 9 bambini che risultavano positivi al Cor a 8, solo 2 presentavano una positività per il Pru p 3, mentre al contrario il Pru p 3 risultava positivo in 1 su 19 dei bambini con negatività per il Cor a 8³⁸. D'altra

parte ciò può essere spiegato dal fatto che la LTP della nocciola presenta il più alto grado di somiglianza con la LTP della mandorla (62%), della mela (61%), della ciliegia (61%) della pesca (59%)⁴⁷.

Altre informazioni utili alla gestione delle cross reattività vengono da studi clinici. Maloney ha studiato le cross reattività in una popolazione di 324 pazienti con allergia alle arachidi, alle noci e ai semi. Lo studio ha mostrato che la sensibilizzazione alla nocciola si associava fortemente a quella per la mandorla, moderatamente a quella per il sesamo e il pistacchio e solo debolmente a quella per le arachidi¹⁶.

I pollini del Nocciolo cross reagiscono ampiamente con quelli delle altre betulacee ma anche con le nocciole, il che giustifica il frequente riscontro di sensibilizzazione alla nocciola in bambini o adulti allergici al nocciolo.

In conclusione

Da quanto esposto sopra si evince la necessità di iniziare l'iter diagnostico di allergia alla nocciola mediante l'esecuzione degli SPT, il test più semplice e meno costoso, che presenta inoltre una elevata sensibilità, associando eventualmente un Prick by Prick con l'alimento fresco. La ricerca delle IgE specifiche non sembra aggiungere molto in termini di sensibilità e/o specificità, e dovrebbe quindi essere impiegata nei casi in cui non vi è concordanza tra la storia clinica e la risposta degli SPT, o qualora vi sia una controin-

dicazione alla esecuzione degli SPT (dermografismo, estesa dermatite, ecc.).

Allo stesso modo il dosaggio delle molecole allergeniche dovrebbe essere preso in considerazione solo come un completamento diagnostico, in quanto possibile a oggi solo per alcune molecole. In particolare, la positività per il Cor a 8 sembrerebbe in grado di individuare una categoria di soggetti particolarmente a rischio di reazioni allergiche severe, anche se le evidenze relative a tale associazione sono, al momento, modeste e alquanto imprecise. D'altra parte, l'impossibilità ad oggi di dosare tutte le molecole, limita di fatto la possibilità di orientarsi verso la classe molecolare di appartenenza alle LTP e alle 11S globuline.

Bibliografia

- 1 Sampson HA, Mendelson L, Rosen JP. *Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents*. N Engl J Med 1992;327:380-4.
- 2 Bock SA, Muñoz-Furlong A, Sampson HA. *Fatalities due to anaphylactic reactions to foods*. J Allergy Clin Immunol 2001;107:191-3.
- 3 Novembre E, Cianferoni A, Bernardini R, et al. *Anaphylaxis in children: clinical and allergologic features*. Pediatrics 1998;101:1-8.
- 4 Tous Marti J. *World hazelnut production 2001*. Available at: <http://www.aoi.com.au/acotanc/papers/tous-1/author-n-test.htm>. Accessed august 18, 2010.
- 5 Ewan PW, Clark AT. *Long-term prospective observational study of patients with peanut and nut allergy after participation in a management plan*. Lancet 2001;357:111-5.
- 6 Ewan PW. *Clinical study of peanut and nut allergy in 62 consecutive patients: new features and associations*. Br Med J 1996;312:1074-8.
- 7 Fleischer DM, Conover-Walker MK, Matsui EC, et al. *The natural history of tree nut allergy*. J Allergy Clin Immunol 2005;116:1087-93.
- 8 Skolnick HS, Conover-Walker MK, Koerner CB, et al. *The natural history of peanut allergy*. J Allergy Clin Immunol 2001;107:367-74, 1998;102:e6.
- 9 Sicherer SH, Burks AW, Sampson HA. *Clinical features of acute allergic reactions to peanut and tree nuts in children*. Pediatrics 1998;102:e6.
- 10 Calvani M, Galli E, Martelli A, et al. *Come si dovrebbe fare e valutare il test di provocazione orale per alimenti secondo le Commissioni della Società Italiana di Allergologia e Immunologia Pediatrica (SIAIP)*. Norme pratiche di comportamento. RIAP 2009;(Suppl 3):1-23.
- 11 Akkerdaas JH, Wensing M, Knulst AC, et al. *In vitro and in vivo characterization of hazelnut skin prick test extracts*. Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M 2003;95:96.
- 12 Akkerdaas JH, Wensing M, Knulst AC, et al. *How accurate and safe is the diagnosis of hazelnut allergy by means of commercial skin prick test reagents?* Int Arch Allergy Immunol 2003;132:132-40.
- 13 Ho MH, Heine RG, Wong W, et al. *Diagnostic accuracy of skin prick testing in children with tree nut allergy*. J Allergy Clin Immunol 2006;117:1506-8.
- 14 Clark AT, Ewan PW. *Interpretation of tests for nut allergy in one thousand patients, in relation to allergy or tolerance*. Clin Exp Allergy 2003;33:1041-5.
- 15 Calvani M, Zappalà D, Panella V. *Novità in allergologia pediatrica*. Prospettive in Pediatria 2007;37:165-77.
- 16 Maloney JM, Rudengren M, Ahlstedt S, et al. *The use of serum-specific IgE measurements for the diagnosis of peanut, tree nut, and seed allergy*. J Allergy Clin Immunol 2008;122:145-51.
- 17 Breiteneder H, Clare Mills EN. *Molecular properties of food allergens*. J Allergy Clin Immunol 2005;115:14-23.
- 18 Breiteneder H, Ebner C. *Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens*. J Allergy Clin Immunol 2000;106:27-36.
- 19 Skamstrup Hansen K, Ballmer Weber BK, Luttkopf D, et al. *Roasted hazelnuts – allergenic activity evaluated by double-blind, placebo controlled, food challenge*. Allergy 2003;58:132-38.
- 20 Hirschwehr R, Valenta R, Ebner C, et al. *Identification of common allergenic structures in hazel pollen and hazelnuts: a possible explanation for sensitivity to hazelnuts in patients allergic to tree pollen*. J Allergy Clin Immunol 1992;90:927-36.
- 21 Pastorello EA, Vieths S, Pravettoni V, et al. *Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results*. J Allergy Clin Immunol 2002;109:563-70.
- 22 Beyer K, Grishina G, Bardina L, et al. *Identification of an 11S globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut-induced systemic reactions*. J Allergy Clin Immunol 2002;110:517-23.
- 23 Verweij MM, Hagendorens MM, De Knop KJ, et al. *Young infants with atopic dermatitis can display sensitization to Cor a 9, a 11s legumin like seed-storage protein from hazelnut (Corylus havelana)* Pediatr Allergy Immunol 2010 Jun 23. [Epub ahead of print].
- 24 Skamstrup Hansen K, Ballmer-Weber BK, Sastre J, et al. *Component-resolved in vitro diagnosis of*

- hazelnut allergy in Europe. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:1134-41.
- 25 Lauer I, Foetisch K, Kolarich D, et al. *Hazelnut (Corylus avellana) vicilin Cor a 11: molecular characterization of a glycoprotein and its allergenic activity.* *Biochem J* 2004;383:327-34.
- 26 Beyer K. *Characterization of allergenic food proteins.* *Curr Opin Allergy Immunol* 2003;3:189-97.
- 27 Akkerdaas JH, Schocker F, Vieths S, et al. *Cloning of oleosin, a putative new hazelnut allergen, using a hazelnut cDNA library.* *Mol Nutr Food Res* 2006;50:18-23.
- 28 Lauer I, Foetisch K, Kolarich D, et al. *Hazelnut (Corylus avellana) vicilin Cor a 11: molecular characterization of a glycoprotein and its allergenic activity.* *Biochem J* 2004;383:327-34.
- 29 Akkerdaas JH, Wensing M, Knulst AC, et al. *How accurate and safe is the diagnosis of hazelnut allergy by means of commercial skin prick test reagents? Int Arch Allergy Immunol* 2003;132:132-40.
- 30 Akkerdaas JH, Wensing M, Knulst AC, et al. *In vitro and in vivo characterization of hazelnut skin prick test extracts.* *Arb paul erlich Inst Bundesamt Impstoffe Frankf AM* 2003;94:87-95.
- 31 Ortolani C, Ispano M, Pastorello E, et al. *Comparison of results of skin prick tests (with fresh foods and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome.* *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:683-90.
- 32 Wensing M, Penninks AH, Hefle SL, et al. *The range of minimum provoking doses in hazelnut-allergic patients as determined by double-blind, placebo-controlled food challenges.* *Clin Exp Allergy* 2002;32:1757-62.
- 33 Andersson K, Ballmer-Weber BK, Cistero-Bahima A, et al. *Enhancement of hazelnut extract for IgE testing by recombinant allergen spiking.* *Allergy* 2007;62:897-904.
- 34 Sicherer SH, Dhillon G, Laughery KA, et al. *The Phadia hazelnut ImmunoCAP (f17) has been supplemented with recombinant Cor a 1 and now detects Bet v 1-specific IgE, which leads to elevated values for persons with birch pollen allergy.* *J Allergy Clin Immunol* 2008;2:414e.
- 35 Schocker F, Luttkopf D, Scheurer S, et al. *Recombinant lipid transfer protein Cor a 8 from hazelnut: A new tool for in vitro diagnosis of potentially severe hazelnut allergy.* *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:141-7.
- 36 Skamstrup Hansen K, Ballmer Weber BK, Sastre J, et al. *Component-resolved in vitro diagnosis of hazelnut allergy in Europe.* *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:1134-41.
- 37 Pastorello EA, Vieths S, Pravettoni V, et al. *Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results.* *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:563-70.
- 38 Flinterman AE, Akkerdaas JH, den Hartog CF, et al. *Lipid transfer protein-linked hazelnut allergy in children from a non-Mediterranean birch-endemic area.* *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:423-8.
- 39 Roux KH, Teuber SS, Sathe SK. *Tree nut allergens.* *Int Arch Allergy Immunol* 2003;131(4):234-44.
- 40 De Leon MP, Glaspole IN, Drew AC, et al. *Immunological analysis of allergenic cross-reactivity between peanut and tree nuts.* *CI Exp Allergy* 2003;33:1273-80.
- 41 Moreno FJ, Clemente A. *2S Albumin Storage Proteins: What Makes them Food Allergens? Open Biochem J* 2008;2:16-28.
- 42 Poltronieri P, Cappello MS, Dohmae N. *Identification and characterisation of the IgE-binding proteins 2S albumin and conglutin gamma in almond (Prunus dulcis) seeds.* *Int Arch Allergy Immunol* 2002;128:97-104.
- 43 Beyer K, Grishina G, Bardina L, Grishin A, Sampson HA. *Identification of an 11S globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut-induced systemic reactions.* *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:517-23.
- 44 Asero R, Mistrello G, Amato S, et al. *Peach fuzz contains large amounts of lipid transfer protein: is this the cause of the high prevalence of sensitization to LTP in Mediterranean countries? Allergy Immunol (Paris)* 2006;38:118-21.
- 45 Hartz C, Lauer I, del Mar San Miguel Moncin M, et al. *Comparison of IgE-binding capacity, cross-reactivity and biological potency of allergenic non-specific lipid transfer proteins from peach, cherry and hazelnut.* *Int Arch Allergy Immunol* 2010;153:335-46.
- 46 Asero R. *Detection and clinical characterization of patients with oral allergy syndrome caused by stable allergens in Rosaceae and nuts.* *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;83:377-83.
- 47 Frauke Schocker Luttkopf D, Scheurer S, Petersen A, et al. *Cloning and sequencing of the lipid transfer protein from hazelnut (Corylus avellana).* [Poster] 8th International Symposium on Problems of Food Allergy 2001, ch 11-13, Venice.

Immunoterapia specifica e qualità di vita

a cura della Commissione Immunoterapia Specifica della SIAIP

Sergio Arrigoni, Salvatore Barberi¹, Annamaria Bianchi², Lucia Caminiti³,
Giovanna De Castro⁴, Guglielmo Scala⁵, Salvatore Tripodi⁶ (coordinatore)



Parole chiave: QoL, Questionari, ITS, SCIT, SLIT

Abstract

Negli ultimi anni uno dei principali obiettivi dell'immunoterapia specifica (ITS) è anche il miglioramento della Qualità di Vita (QoL) dei pazienti ed alcuni questionari sono stati predisposti a tal fine, sia generici sia specifici. Gli studi, recentemente sempre più numerosi, hanno per lo più considerato popolazioni adulte, valutando la QoL come outcome secondario. In campo pediatrico le segnalazioni sono al momento sporadiche, quasi tutte in senso positivo, con qualche tentativo di dare alla valutazione della QoL uno spazio sempre maggiore (outcome primario). Da segnalare spesso la discrepanza tra il miglioramento della QoL grazie all'ITS, e gli esiti primari (score clinico-farmacologico, test funzionali) non differenti statisticamente tra gruppo attivo e controllo.

Introduzione

Clinici e ricercatori hanno riconosciuto negli ultimi anni l'importanza di considerare la dimensione "soggettiva" delle malattie, per avere una visione globale del paziente e determinare gli effetti delle terapie sul complessivo stato di benessere. Questo sviluppo ha portato alla necessità clinica di andare oltre il limite della "medicina centrata sulla malattia" e raggiungere la più ampia prospettiva della "medicina centrata sul paziente"¹. Il termine "qualità della vita" è stato coniato 50 anni fa negli USA e trova fondamento nella definizione WHO di salute definita come "uno stato di completo benessere fisico, mentale e sociale"².

Nel 1990 Schipper ha definito la qualità di vita (QoL) come "la descrizione degli effetti funzionali di una malattia e della sua terapia sul paziente così come percepiti dal paziente stesso", e come tale è ormai universalmente riconosciuta³.

Questa definizione comprende una serie di aspetti soggettivi della malattia, non sempre strettamente correlati con i parametri clinici e funzionali.

Si tratta di un concetto astratto, complesso, multidimensionale atto a definire la soddisfazione individuale in relazione a diverse aree che il paziente ritiene importanti per la propria vita.

La sua valutazione può quindi aiutare a definire un

U.O.C di Pediatria, Ospedale M.Melloni, Milano; ¹ U.O.C. di Pediatria, Ospedale Sant'Andrea, Seconda Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università "La Sapienza", Roma; ² U.O.C. di Pediatria, Ospedale Mazzoni, Ascoli Piceno; ³ U.O. Allergologia Pediatrica, Policlinico Universitario, Messina; ⁴ Clinica Pediatrica, Università "La Sapienza", Roma; ⁵ U.O.S.D. Allergologia, Loreto Crispi, Napoli; ⁶ Servizio Dipartimentale Allergologia Pediatrica, Ospedale Sandro Pertini, Roma

approccio più individualizzato, considerando aspetti che non riguardano solo il miglioramento clinico della malattia.

La determinazione della QoL è particolarmente indicata nelle malattie croniche, quindi anche le malattie allergiche respiratorie infantili, che richiedono terapie a lungo termine ed hanno un importante impatto sulla famiglia nel suo complesso.

Le linee guida internazionali tendono a recepire con lentezza le indicazioni della letteratura, ed in particolare l'ultima revisione GINA non pone particolare accento sulla valutazione della QoL (sia in generale, sia in corso di immunoterapia)⁴.

Per contro nell'update ARIA 2008 gli autori si esprimono in modo generico ("... Quality of life has been found to be impaired in patients with asthma and allergic rhinitis ..."), senza riferimenti all'ITS⁵.

Negli ultimi anni la QoL è stata resa parte integrante di un concetto più ampio definito come "PROs" (*Patient-Reported Outcomes*). Esso si compone inoltre della percezione dei sintomi e della malattia, della soddisfazione ed aderenza al trattamento; nel suo complesso è definito come "any report coming from patients about a health condition and its treatment"^{6,7}.

Come valutare la QoL: i questionari

Negli ultimi anni sono stati realizzati questionari ("instruments") finalizzati a valutare l'impatto della patologia sull'attività quotidiana e la percezione che il paziente ha della propria malattia.

Lo sviluppo e la validazione di essi è materia di grande complessità, dove entrano in gioco fattori statistici, etici e metodologici. Dapprima è necessario creare una lista di possibili domande, sulla base della propria esperienza, della letteratura e da interviste di

Il termine "qualità della vita" trova fondamento nella definizione WHO di salute: "uno stato di completo benessere fisico, mentale e sociale"⁸.

pazienti. Quindi si opera un'accurata selezione delle domande rilevanti, formulandole in maniera adeguata e riproponendole ad un gruppo test.

Infine il questionario viene testato su un gran numero di pazienti, per definirne la validità e riproducibilità (Fig. 1).

Come descritto da Guyatt, tutti questi passi possono essere compiuti in poco tempo e con risorse limitate (efficacemente lo definisce "modello Volkswagen", accettabile per i questionari generici), o con più risorse e tempi adeguati ("modello Rolls-Royce", assolutamente necessario per quelli specifici)^{9,10}.

Ricordiamo che:

I questionari generici determinano lo stato di salute generale del paziente, confrontandolo in patologie diverse e permettono il confronto fra sani e malati.

I questionari specifici sono costruiti per investigare su una specifica malattia, popolazione e sintomo. Sono utili per confrontare pazienti con la stessa malattia in differenti momenti (ad es. prima e dopo una terapia) o differenti gruppi di pazienti con la stessa malattia. Si compongono di *dominii* (condizioni che determinano la qualità di vita di un individuo) i quali vengono poi scomposti in vari *items* (domande).

Ad ogni domanda corrispondono delle risposte alle quali viene attribuito un valore numerico, che aiuterà a determinare in modo misurabile un parametro astratto come la qualità di vita.

Ogni questionario stabilisce la propria MID (minima differenza significativa), che permette di definire la variazione numerica a cui è possibile attribuire un valore di significatività clinica.

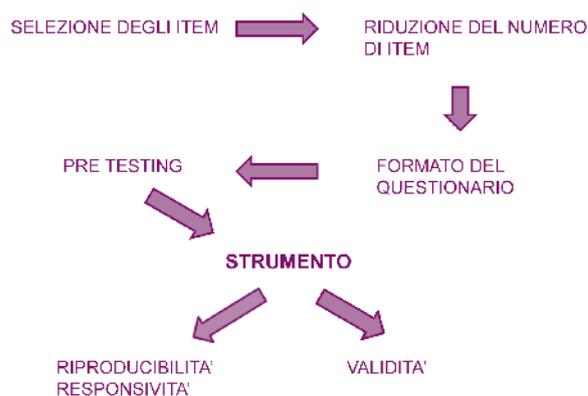


Fig. 1. Flowchart semplificata dello sviluppo e del processo di validazione dei questionari della QoL (da Guyatt et al., 1986¹⁰, mod.).

Numerosi questionari specifici sono stati proposti per valutare la QoL nell'asma e nella rinite, per la maggior parte indirizzati agli adulti.

Margaret Christie, psicologa universitaria di Londra, ha sviluppato nel 1993 il questionario CAQ (*Childhood Asthma Questionnaire*) indirizzato a bambini con asma, suddiviso per fasce d'età: il CAQ-A (4-7 anni), CAQ-B (8-11 anni), CAQ-C (12-16 anni). Esso è composto da 5 domini (aspetto psicologico, medico, domestico, sociale, educativo), per complessivi 38 items¹¹.

In ambito pediatrico l'unico validato per l'asma in italiano è quello di Juniper del 1996 (PAQLQ).

Esso può essere proposto a bambini fra 7 e 17 anni, si compone di 3 domini (sintomi, limitazione dell'attività e funzioni emotive), sviluppati in 23 items.

Viene ritenuta significativa una variazione di 0,5 (MID) su una scala di 7 punti¹².

Nel 2007 ne è stata proposta anche una versione computerizzata¹³, ma Elizabeth Juniper, tornata a Bosham dopo le esperienze canadesi alla Mc Master University di Hamilton, si è premurata di puntualizzare che i questionari al computer (come quelli tramite interviste telefoniche) possono alterare la risposta dei pazienti.

Da qui anche la necessità che i questionari validati non vengano assolutamente modificati ("... validated questionnaires and diaries are copyrighted to ensure that they are not altered, translated or adapted for another medium without permission ...")¹⁴.

Infine nel 2009 Everhart e Fiese hanno proposto la validazione di un questionario ad immagini, per bambini con asma fra i 5 ed i 7 anni¹⁵.



Elizabeth Juniper e Bosham (West Sussex).

Per quanto riguarda la rinocongiuntivite allergica in pediatria, Juniper et al. hanno proposto un questionario (PRQLQ) per bambini fra i 6 ed i 12 anni, composto da 5 domini (sintomi nasali, sintomi oculari, problemi pratici, altri sintomi ed attività), sviluppati in 23 items¹⁶.

Nel questionario dedicato agli adolescenti fra i 12 ed i 17 anni (ARQLQ) i domini sono invece 6, con la proposta di 25 items¹⁷.

Interessante, soprattutto in relazione al nuovo concetto di "united airways disease"¹⁸, appare il questionario RHINASTHMA. Esso permette di proporre un unico strumento a pazienti adulti con sintomi concomitanti di rinite ad asma¹⁹.

Lavori "dedicati" in letteratura

Negli ultimi anni è progressivamente aumentato il numero di lavori in cui è stata valutata la QoL nella rinite e soprattutto nell'asma allergico (Fig. 2).

È sempre stata considerata come outcome secondario, come anche indicato e ribadito in recenti raccomandazioni internazionali²⁰⁻²² non potendo mai risultare come singolo outcome²³.

Essa infatti comprende un ampio spettro degli aspetti soggettivi della malattia, non sempre strettamente correlati con i parametri clinici e funzionali e quindi di difficile valutazione statistica²⁴.

I lavori considerati hanno chiaramente dimostrato che il benessere fisico dei pazienti, il rendimento scolastico e lavorativo, la "life satisfaction" sono compromesse dalla rinite e dall'asma allergico.

Inoltre il benessere notturno è particolarmente essenziale per permettere le comuni attività della giornata²⁵.

La qualità della vita (QoL) comprende aspetti soggettivi della malattia non sempre strettamente correlati con parametri clinici e funzionali e quindi di difficile valutazione statistica.

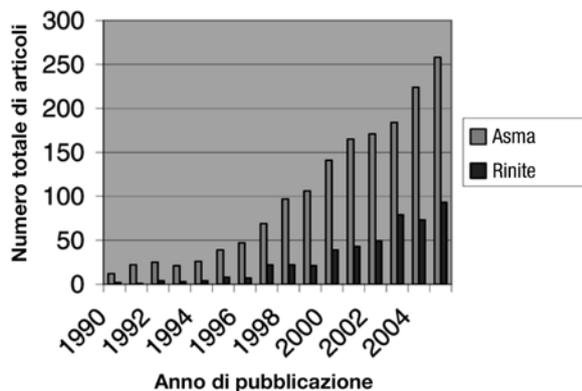


Fig. 2. Pubblicazioni asma/rinite che prendono in considerazione la qualità di vita come outcome (da Baiardini et al., 2006²⁵, mod.).

La letteratura che ha considerato con particolare riguardo, ponendo come outcome di rilievo e a volte primario, le modificazioni della qualità di vita in corso e dopo immunoterapia specifica, ha storia recente e poco sviluppata. I lavori si sono occupati prevalentemente di popolazioni adulte, utilizzando le più varie modalità di immunoterapia.

Rinite

Un pionieristico lavoro di Fell, condotto su 60 pazienti rinitici, sottoposti ad immunoterapia specifica sottocutanea (SCIT), ha dimostrato miglioramento significativo alle risposte dei questionari nel 92% dei casi dopo 4 mesi²⁶. Ma lo studio è viziato dal fatto di essere un'analisi retrospettiva su una serie di casi in assenza di un gruppo di controllo.

Nel 2001 la QoL è stata valutata, in uno studio RCT in doppio cieco metodologicamente robusto, come importante outcome in 44 pazienti adulti con rinite da graminacee severa.

A 22 pazienti è stata somministrata SCIT per 2 anni, mentre ad altri 22 è stato somministrato placebo. Per 5 dei 7 domini del RQLQ sono state registrate differenze significative (MID 0,8) in favore del gruppo trattato²⁷. Inoltre c'è stata una chiara correlazione della QoL con il miglioramento dei sintomi e del consumo dei farmaci.

Autori inglesi, tra cui il famoso Stephen Holgate, hanno voluto verificare, con uno studio rigoroso, l'effi-

cacia dell'EPD (*Enzyme potentiated desensitisation*), controversa immunoterapia proposta da Brostoff²⁸, e le eventuali modificazioni della QoL in pazienti con rinite allergica da graminacee.

La casistica di 183 pazienti adulti è stata suddivisa in 2 gruppi (attivo e placebo); in quello attivo è stata somministrata EPD in 2 sedute a distanza di 8 settimane prestagionali, mentre il gruppo di controllo ha ricevuto, con le stesse scadenze, il placebo.

La QoL è stata considerata fra gli outcomes primari, risultandone una differenza non significativa fra i 2 gruppi, così come non è stata trovata alcuna differenza nello score dei sintomi, nella soglia del test di provocazione congiuntivale e nell'end-point degli SPT²⁹. Finalmente nel 2003 compare un lavoro messicano che ha studiato una casistica pediatrica di rinitici allergici agli acari. Tramite il questionario PRQLQ i pazienti sono stati divisi in 2 gruppi (ITS vs terapia farmacologica) valutando e confrontando le variazioni. Dopo 6 mesi di trattamento gli indici di QoL, soprattutto per quanto riguarda i sintomi nasali, sono risultati significativamente migliorati nel gruppo sottoposto ad ITS. Il limite dello studio è che è in aperto e non randomizzato³⁰.

Ariano et al. hanno valutato nel 2006 un'ampia casistica di pazienti (452 soggetti rinitici, fra i 6 ed i 60 anni, allergici ai più comuni allergeni), sottoposti a SLIT ad alte dosi. La variazione della QoL (pre e post SLIT) è stata considerata come outcome primario. I risultati sono stati incoraggianti, con un miglioramento statisticamente significativo dopo un anno di immunoterapia, purtroppo non sono estrapolabili i soli dati pediatrici ed inoltre lo studio rappresentava una serie di casi senza gruppo di controllo³¹.

Nello stesso anno Di Rienzo ha valutato la QoL come outcome primario in uno studio in cieco, sottoponendo 34 pazienti adulti con rinite da cipresso a SLIT vs. placebo per 4 mesi con uno schema pre-costagionale.

Anche i suoi risultati hanno confermato un significativo miglioramento della QoL nei soggetti trattati, pur in assenza di una differenza significativa del SMS³².

Nel 2007 Durham ed il suo gruppo hanno studiato, per la prima volta su una grossa casistica (790 adulti), l'effetto sulla QoL di una immunoterapia pre-costagionale in "tablets" per rinite da graminacee, confrontandola con placebo e con la somministrazione di sola loratadina.

La SLIT si è dimostrata capace di modificare la QoL in modo più significativo rispetto al placebo ed all'antistaminico usato come farmaco d'emergenza³³.

Nello stesso anno è stato pubblicato un lavoro pediatrico (6-18 anni) con esito negativo, ma relativo ad uno studio condotto nell'ambito del Medico di Medicina Generale e peraltro viziato da un drop-out del 17%.

La proposta del PRQLQ e dell'ARQLQ in corso di SLIT per rinocongiuntivite da graminacee in una casistica doppio cieco contro placebo non ha dimostrato differenze degne di nota nei due gruppi³⁴.

Nel 2009 Sara Wise, otorinolaringoiatra di Charleston (South Carolina, USA) ha studiato la QoL come outcome primario, valutando pazienti adulti con rinocongiuntivite da poliallergeni sottoposti a SLIT. Il lavoro, sicuramente limitato dall'esiguità della casistica (15 soggetti) e dalla mancanza di un gruppo di controllo, ha dato esito positivo nel miglioramento di 12 su 14 items del questionario (miniRQLQ)³⁵.

Infine quest'anno, esprimendosi sul dibattuto tema della SLIT in pazienti polisensibilizzati, Ciprandi et al. hanno riscontrato, ma in uno studio in aperto e senza gruppo di controllo, un importante miglioramento della QoL in pazienti rinitici sottoposti a SLIT sia monosensibilizzata che bi-allergenica³⁶.

Asma

Pietra miliare viene considerato lo studio pubblicato da Bousquet nel 1999, in quanto per primo ha posto la QoL come significativo outcome primario. Sono stati valutati 85 pazienti (con casistica in parte pediatrica, ma con dati non estrapolabili), in un lavoro doppio-cieco contro placebo con immunoterapia specifica sublinguale (SLIT) in asmatici allergici agli acari. Ai pazienti oltre i 15 anni è stato proposto un questionario (SF20 – Short Form Health Status Survey). In tal modo 38 pazienti sono stati inclusi nell'analisi della QoL (18 nel gruppo SLIT e 20 nel gruppo placebo).

Le risposte sono state simili in entrambi i gruppi prima del trattamento ed a 11 mesi. Dopo 25 mesi tutti gli scores sono risultati più alti nel gruppo SLIT, con differenze ai limiti della significatività per lo stato mentale generale ($p = 0,07$), e significative per la percezione generale della salute ($p = 0,01$), e fastidio fisico ($p = 0,02$). Un ulteriore limite del lavoro, oltre a quello dei dati comuni tra adulti e bambini, è rappresentato dall'elevatissimo drop-out, oltre il 40%, a 25 mesi, epoca in cui si sono avuti i risultati più significativi³⁷. La necessità di protrarre la terapia per più di 1 anno per avere effetti positivi sulla QoL è stata poi conferma-

ta da un'ulteriore segnalazione del 2003, su pazienti di età compresa tra i 15 ed i 45 anni, però presentata solo come abstract al 60° congresso dell'AAAAI³⁸.

Nel 2004 l'attivissimo gruppo di allergologi pediatri di Istanbul ha confrontato l'efficacia della SLIT (16 pazienti) vs SLIT + BCG (Bacillus Calmette-Guérin) come adiuvante (16 pazienti) in bambini asmatici allergici agli acari. Lo studio è viziato da una non chiara metodica di randomizzazione, dall'essere in aperto e dal piccolo (appena 5 bambini) gruppo di controllo.

La valutazione della QoL, come outcome secondario, ha riportato un significativo miglioramento, pre-post, sovrapponibile nei 2 gruppi³⁹.

Un lavoro, in aperto e non randomizzato, condotto in soggetti adulti asmatici stagionali, confrontando le modificazioni della QoL fra trattati con SLIT e trattati con terapia farmacologica di fondo (salmeterolo+fluticasone), ha dimostrato un miglioramento in entrambi i gruppi con dati sovrapponibili⁴⁰. Nel 2007 autori francesi hanno studiato l'efficacia della SLIT come terapia aggiuntiva a profilassi ambientale ed adeguato trattamento farmacologico in bambini asmatici allergici agli acari.

Il lavoro, in doppio cieco vs. placebo, ha coinvolto 111 bambini (5-15 anni), di cui 55 hanno ricevuto SLIT e 56 placebo per 18 mesi. La QoL è stata valutata fra gli outcomes secondari, tramite questionario CAQ. A dispetto di differenze cliniche e funzionali non significative, la QoL in alcuni soggetti trattati (fra i 6 ed i 12 anni) ha manifestato un apprezzabile miglioramento nel dominio della "severità"⁴¹.

Il regime di somministrazione della SLIT può interferire con la QoL? Sembra di no.

L'assunzione di SLIT per acari, continua per 12 mesi vs intermittente (2 mesi sì, 2 mesi no), non modifica la risposta clinica, e migliora allo stesso modo la QoL, ma lo studio è in aperto e manca di un gruppo di controllo⁴².

Incoraggiante appare la recentissima segnalazione (EAACI 2010) di dati preliminari di uno studio prospettico policentrico italiano che ha studiato per 3 anni una casistica di bambini asmatici allergici agli acari. Sono stati messi a confronto due gruppi omogenei trattati con SLIT + farmaci vs solo farmaci.

La valutazione della QoL tramite PAQLQ dopo 12, 24 e 36 mesi, ha dimostrato un importante miglioramento nel gruppo trattato con SLIT, soprattutto nei domini dei sintomi e delle attività⁴³.

Siamo ansiosi di leggere il lavoro in extenso.

QoL: quale ruolo

Quando consideriamo globalmente l'effetto di un trattamento è importante tenere a mente che l'ultimo obiettivo è assicurare una Qualità di Vita quanto migliore possibile in relazione alle aspettative del paziente.

La nostra revisione dimostra che purtroppo gli studi che hanno esaminato la QoL sono poco numerosi, molto spesso viziati da limiti metodologici e particolarmente rari in ambito pediatrico.

Appare inoltre chiaro che è ancora difficile riportare i risultati dei questionari della QoL ai classici obiettivi clinici e strumentali, anche perché non sempre troviamo una vicendevole correlazione.

E questo punto lascia molto perplessi perché riesce poco comprensibile come la QoL possa essere significativamente diversa tra pazienti trattati o no con ITS, senza che ci sia alcuna corrispondente differenza significativa tra i vari score dei sintomi e/o il consumo dei farmaci.

Probabilmente sono necessari degli studi specifici per affrontare tale aspetto.

Riteniamo auspicabile che la QoL, parametro ancora poco indagato benché riconosciuto importante, venga inserito, fra gli outcomes primari per la valutazione complessiva dell'efficacia dell'ITS, soprattutto in ambito pediatrico.

Bibliografia

- 1 Baiardini I, Bousquet PJ, Brzoza Z, et al. *Recommendations for assessing Patient-Reported Outcomes and Health-Related quality of life in clinical trials on allergy: a GA²LEN taskforce position paper*. Allergy 2010;65:290-5.
- 2 World Health Organization. *Constitution of the World Health Organization. World Health Organization Handbook of Basic Documents*. 5th ed. 1952, p. 3.
- 3 Schipper H, Clinch J, Olweny CLM. *Quality of life studies: definitions and conceptual issues*. In: Spilker B, ed. *Quality of Life and Pharmacoeconomics in Clinical Trials*. Philadelphia: Lippincot-Raven 1990, pp. 11-23.
- 4 Global Initiative for Asthma (GINA). *Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Update 2009*. Available at: <http://ginasthma.com>.
- 5 Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, et al. *Allergic Rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008*. Allergy 2008;63(Suppl 86):8-160.
- 6 Braido F, Bousquet PJ, Brzoza Z, et al. *Specific recommendations for PROs and HRQoL assessment in allergic rhinitis and/or asthma: a GA²LEN taskforce position paper*. Allergy 2010;65:959-68.
- 7 Patrick DL, Burke LB, Powers JH, et al. *Patient-reported outcomes to support medical product labelling claims: FDA perspective*. Value Health 2007;10(Suppl 2):S125-37.
- 8 World Health Organization. *Constitution of the World Health Organization. World Health Organization Handbook of Basic Documents*. 5th ed. 1952, p. 3.
- 9 Passalacqua G, Baiardini I. *Quality of life in allergic rhinitis*. Clin Exp Allergy Rev 2006;6:62-6.
- 10 Guyatt GH, Bombardier C, Tugwell P. *Measuring disease specific quality of life in clinical trials*. Can Med Assoc J 1986;134:889-95.
- 11 Christie MJ, French D, Sowden A, et al. *Development of child-centered disease-specific questionnaires for living with asthma*. Psychosomatic Med 1993;55:541-8.
- 12 Juniper EF, Guyatt GH, Feeny DH, et al. *Measuring quality of life in children with asthma*. Qual life Res 1996;5:35-46.
- 13 Mussaffi H, Omer R, Prais D, et al. *Computerised paediatric asthma quality of life questionnaires in routine care*. Arch Dis Child 2007;92:678-82.
- 14 Juniper E.F. *Validated questionnaires should not be modified*. Eur Respir J 2009;34:1015-7.
- 15 Everhart RS, Fiese BH. *Development and initial validation of a pictorial quality of life measure for young children with asthma*. J Pediatr Psychol 2009;34:966-76.
- 16 Juniper EF, Howland WC, Roberts NB, et al. *Measuring quality of life in children with rhinoconjunctivitis*. J Allergy Clin Immunol 1998;101:163-70.
- 17 Juniper EF, Guyatt GH, Dolovich J. *Assessment of quality of life in adolescents with allergic rhinoconjunctivitis. Development and testing of a questionnaire for clinical trials*. J Allergy Clin Immunol 1994;93:413-23.
- 18 Passalacqua G, Ciprandi G, Canonica GW. *United airways disease: therapeutic aspects*. Thorax. 2000;55(Suppl 2):S26-7
- 19 Baiardini I, Pasquali M, Giardini A, et al. *Rhinasthma: a new specific QoL questionnaire for patients with rhinitis and asthma*. Allergy 2003;58:289-94.
- 20 Casale TB, Canonica GW, Bousquet J. *Recommendations for appropriate sublingual immunotherapy clinical trials*. J Allergy Clin Immunol 2009;124:665-70.

- 21 Canonica GW, Baena Cagnani CE, Bousquet J, et al. *Recommendations for standardization of clinical trials with allergen specific immunotherapy for respiratory allergy. A statement of World Allergy Organization (WAO) task force.* Allergy 2007;62:317-24.
- 22 Bousquet PJ, Brozek J, Bachert C, et al. *The CONSORT statement checklist in allergen-specific immunotherapy : a GA²LEN paper.* Allergy 2009;64:1737-45.
- 23 Clarke SA, Eiser C. *The measurement of health-related quality of life (QOL) in paediatric clinical trials: a systematic review.* Health Qual of Life Outcomes 2004;2:66.
- 24 Pfaar O, Clemens A, Ludger K. *Clinical outcome measures of specific immunotherapy.* Curr Opin Allergy Clin Immunol 2009;9(3):208-13.
- 25 Baiardini I, Braido F, Brandi S, et al. *Allergic diseases and their impact on quality of life.* Ann Allergy Asthma Immunol 2006;97:419-29.
- 26 Fell WR, Mabry LR, Mabry CS. *Quality of life analysis of patients undergoing immunotherapy for allergic rhinitis.* Ear Nose throat J 1997;76:528-32.
- 27 Walker SM, Pajno GB, Torres Lima M, et al. *Grass pollen immunotherapy for seasonal rhinitis and asthma: a randomized, controlled trial.* J Allergy Clin Immunol 2001;107:87-93.
- 28 Fell P, Brostoff J. *Single dose desensitisation for summer hay fever.* Eur J Clin Pharmacol 1990;38:77-9.
- 29 Radcliffe MJ, Levith GT, Turner RG, et al. *Enzyme potentiated desensitisation in treatment of seasonal allergic rhinitis: double blind randomised controller study.* BMJ 2003;327:251-4.
- 30 Moncayo Coello CV, Rosas Vargas MA, Del Rio Navarro BE, et al. *Quality of life in children with allergic rhinitis before and after being treated with specific immunotherapy (cases and controls).* Rev Alerg Mex 2003;50(5):170-5.
- 31 Ariano R, Amoroso S, Astarita C. *Quality of life in allergic rhinitis and impact of high-dose sublingual immunotherapy: a real-life study.* Clin Exp Allergy Rew 2006;6:71-3.
- 32 Di Rienzo V, Pucci S, D'Alò S. *Effects of high-dose sublingual immunotherapy on quality of life in patients with cypress-induced rhinitis: a placebo-controlled study.* Clin Exp Allergy Rew 2006;6:67-70.
- 33 Rak S, Yang WH, Pedersen MR. *Once-daily sublingual allergen-specific immunotherapy improves quality of life in patients with grass pollen-induced allergic rhinoconjunctivitis: a double-blind, randomised study.* Qual of life Res 2007;16(2):191-201.
- 34 Roder E, Berger MY, Hop WCJ, et al. *Sublingual immunotherapy with grass pollen is not effective in symptomatic youngsters in primary care.* J Allergy Clin Immunol 2007;119:892-8.
- 35 Wise SK, Woody J, Koeppe S. *Quality of life outcomes with sublingual immunotherapy.* Am J Otolaryngol 2009;30:305-11.
- 36 Ciprandi G, Incorvaia C, Puccinelli P, et al. *The POLISMAIL lesson: sublingual immunotherapy may be prescribed also in polysensitized patients.* Int J Immunopathol Pharmacol 2010;23:637-40.
- 37 Bousquet J, Scheinmann P, Guinnepain MT. *Sublingual-swallow immunotherapy (SLIT) in patients with asthma due to house-dust mites: a double-blind, placebo-controlled study.* Allergy 1999;54(3):249-60.
- 38 Roger A, Baltasar M, Marti E. *Effect of 1 year immunotherapy on asthma quality of life.* J Allergy Clin Immunol 2003;111(Suppl 2):S176.
- 39 Arikian C, Bahceciler NN, Deniz G, et al. *Bacillus Calmette-Guerin-induced interleukin-12 did not additionally improve clinical and immunologic parameters in asthmatic children treated with sublingual immunotherapy.* Clin Exp Allergy 2004;34:398-405.
- 40 Incorvaia C, Riario-Sforza GG, Pravettoni C, et al. *Effects of high-dose sublingual immunotherapy on quality of life in patients with seasonal asthma: a pilot study.* Clin Exp Allergy Rew 2006;6:74-7.
- 41 Pham-Thi N, Scheinmann P, Fadel R, et al. *Assessment of sublingual immunotherapy efficacy in children with house dust mite-induced allergic asthma optimally controlled by pharmacologic treatment and mite-avoidance measures.* Pediatr Allergy Immunol 2007;18:47-57.
- 42 Cadario G, Ciprandi G, Di Cara G, et al. *Comparison between continuous or intermittent schedules of sublingual immunotherapy for house dust mite: effects on compliance, patients satisfaction, quality of life and safety.* Int J Immunopathol Pharmacol 2008;21(2):471-3.
- 43 Fiocchi A, Bergamini B, Bernardo L, et al. *Efficacy of Specific Sublingual Immunotherapy (SLIT) on Quality of Life in asthmatic children with house dust mite respiratory allergy: a prospective, multicenter, case-controls, 36-month study.* Congress EAACI 2010. Poster session.

I difetti primitivi dei fagociti: dal sospetto diagnostico alla terapia

a cura della Commissione Immunologia della SIAIP

Baldassarre Martire¹, Fabio Cardinale² (coordinatore), Carlo Capristo³,
Michele Fiore⁴, Silvana Martino⁵, Viviana Moschese⁶,
Annarosa Soresina⁷



Parole chiave: fagociti, neutropenia, meccanismi antimicrobici

Abstract

Il panorama dei difetti congeniti dell'immunità innata e in particolare dei fagociti, si è arricchito negli ultimi anni di nuove importanti conoscenze sotto il profilo della fisiopatologia e della caratterizzazione molecolare di tali malattie. Questi progressi hanno anche portato alla identificazione di difetti fagocitari caratterizzati da una suscettibilità selettiva verso infezioni sostenute da un gruppo limitato di patogeni o da un solo agente infettivo. D'altro canto la creazione di registri nazionali di malattia, come quello delle Neutropenie e della Malattia Granulomatosa Cronica, hanno consentito di comprendere meglio la storia naturale di queste immunodeficienze e di prospettare nuove e più accurate metodologie di approccio diagnostico e terapeutico. Scopo di questo lavoro è di illustrare tali novità e di fornire alcune indicazioni per il sospetto diagnostico e la gestione integrata di questi bambini tra centro specialistico e pediatra di famiglia.

Introduzione

I fagociti (granulociti neutrofili, monociti e macrofagi) costituiscono la prima linea di difesa contro le infezioni batteriche e fungine, esplicando funzioni diverse, ordinatamente concatenate e perfettamente integrate con quelle del sistema linfocitario, e rappresentano per questo le cellule che meglio esprimono la complessità delle interazioni tra immunità innata e adattativa.

Difetti numerici di queste linee cellulari o delle loro funzioni biologiche si traducono clinicamente in un'aumentata suscettibilità alle infezioni con spiccata tendenza alla cronicizzazione e che spesso si rivelano scarsamente sensibili alla antibiotico-terapia. Le infezioni si localizzano a livello di cute, mucose e linfonodi, che costituiscono le prime barriere anatomiche all'invasione microbica: da qui possono poi

¹ U.O. Pediatria "Federico Vecchio", Dipartimento di Biomedicina dell'Età Evolutiva, Università di Bari; ² Struttura Complessa di Medicina e Pneumo-Allergoimmunologia Pediatrica, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Policlinico-Giovanni XXIII", Bari; ³ Dipartimento di Pediatria, Seconda Università di Napoli; ⁴ Pediatra di Libera Scelta, Consigliere Nazionale FIMP, Genova; ⁵ Ospedale Regina Margherita, Università di Torino; ⁶ Policlinico Tor Vergata, Università "Tor Vergata", Roma; ⁷ Clinica Pediatrica, Università di Brescia.
Con la collaborazione di Teresa Perillo, U.O. di Pediatria "Federico Vecchio", Dipartimento di Biomedicina dell'Età Evolutiva, Università di Bari

diffondersi a tutti gli altri organi. I difetti a carico delle cellule fagocitarie possono essere di tipo quantitativo o funzionale, riguardare cioè la capacità di raggiungere il focolaio d'infezione (*chemiotassi*), di fagocitare il microorganismo (*fagocitosi*) o di eliminarlo attraverso il proprio corredo enzimatico (*killing batterico*). Attualmente sono noti 29 difetti congeniti diversi della funzione e del numero dei fagociti¹. In questo gruppo di patologie sono compresi: 1) difetti del numero dei granulociti neutrofili; 2) difetti dei meccanismi antimicrobici non ossidativi come il deficit dei granuli specifici; 3) i difetti dell'attività antimicrobica di tipo ossidativo tra cui le varie forme di malattia granulomatosa cronica, il deficit di mieloperossidasi e la suscettibilità mendeliana alle infezioni da micobatteri (MSDM) e 4) i difetti della chemiotassi, che includono i deficit di adesione leucocitaria (LAD I, LAD II e LAD III) e la immunodeficienza con lper-IgE.

Principali difetti del numero dei granulociti neutrofili

Si definisce neutropenia una conta granulocitaria nel sangue periferico inferiore a $1500/\text{mm}^3$, per pazienti di età superiore a 1 anno, inferiore a $1000/\text{mm}^3$ al di sotto del primo anno di vita. Questa condizione può derivare da una ridotta produzione di granulociti a livello midollare, da un difetto della mobilizzazione dei neutrofili dal midollo osseo verso il sangue periferico o da una esagerata apoptosi.

Neutropenia Congenita Grave

La Neutropenia Congenita Grave è una immunodeficienza geneticamente eterogenea con una incidenza attualmente stimata intorno a 1:200.000, caratterizzata da un basso valore dei PMN (inferiore a $500/\text{mmc}^3$, spesso a $200/\text{mmc}^3$), esordio sintomatologico precoce con infezione ombelicale, ulcere orali, infezioni polmonari, perineali o perirettali e presentazione isolata o sindromica. Numerosi sono i geni implicati²: può essere ereditata come condizione autosomica recessiva (malattia di Kostmann) associata a mutazioni del gene *HAX1*, implicato nella down regolazione del meccanismo intrinseco mitocondriale dell'apoptosi, o come condizione autosomica dominante con mutazioni del gene *ELA2* che codifica per l'elastasi granulocitaria, proteina componente dei granuli primari. Sono state descritte mutazioni del gene *GFI1* nel dominio zinc finger, che hanno come

bersaglio *ELA2* e del recettore per il G-CSF (*CSF3R gene*). È stata recentemente identificata una nuova forma sindromica di neutropenia congenita associata a malformazioni cardiache e urogenitali, legata a mutazione del gene *G6PC3* che codifica per la subunità catalitica 3 della glucosio-6-fosfatasi. Mutazioni del gene *WASP* (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) infine, sono state identificate in maschi con *Neutropenia Congenita Grave isolata* a trasmissione X-recessiva. È ancora in gran parte sconosciuto il meccanismo responsabile della neutropenia; è stato suggerito che queste mutazioni geniche comportino l'attivazione intramidollare di meccanismi pro-apoptotici dei precursori mieloidi. L'esame del midollo rivela un arresto maturativo allo stadio promielocitico mentre l'esame dello striscio periferico mostra l'assenza parziale o completa di mielociti, metamielociti, forme a banda o neutrofili maturi, talvolta con associate monocitosi ed eosinofilia. Alcune forme di neutropenia congenita grave, in particolare quella causata da mutazione del *G-CSFR* presentano un rischio elevato di evoluzione verso sindrome mielodisplastica o leucemia mieloide. Il trattamento si basa sulla somministrazione di G-CSF che attiva la maturazione dei granulociti forzando il blocco maturativo tra lo stadio promielocitico e quello metamielocitico, ed esercita anche una azione anti-apoptotica³. Laddove vi sia disponibilità di un donatore compatibile, va preso in considerazione il trapianto di midollo osseo.

La Neutropenia Congenita Grave è una immunodeficienza geneticamente eterogenea caratterizzata da un basso valore dei PMN, esordio sintomatologico precoce con infezione ombelicale, ulcere orali, infezioni polmonari, perineali o perirettali e presentazione isolata o sindromica.

Neutropenia ciclica

Come la Neutropenia Congenita Grave, è causata da mutazioni sporadiche o ad ereditarietà autosomica dominante del gene *ELA2*, ma localizzate in posizioni diverse⁴. La neutropenia ciclica è caratterizzata da oscillazioni periodiche della conta dei neutrofili con intervalli di circa 21 giorni (il range può variare dalle 2 alle 6 settimane), nei quali la neutropenia dura in media 3-6 giorni potendo raggiungere un nadir < 200/mm³. In alcuni casi può associarsi una oscillazione dei reticolociti e della conta piastrinica o monocitosi con eosinofilia. Di solito, durante il nadir si osservano febbre, gengivostomatite, faringite e infezioni cutanee. Infezioni più gravi includono polmonite, enterocolite necrotizzante con peritonite e sepsi da *Escherichia coli* o *Clostridium perfringens*. Quando il paziente giunge all'attenzione del medico, tuttavia, la conta dei neutrofili può già essere in fase di recupero, pertanto, porre la diagnosi di neutropenia ciclica può richiedere 2-3 conte ematiche a settimana per 6 settimane, intese a osservare la periodicità del ciclo e a distinguerle dalle altre febbri periodiche senza neutropenia. Il reperto midollare durante la fase neutropenica evidenzia una ipoplasia cellulare e un arresto maturativo allo stadio del mielocita; la ciclicità dell'attività midollare è osservabile anche nella serie eritroide. Inoltre, non sembra esservi un aumentato rischio di mielodisplasia o di leucemia mieloide acuta. Per la prevenzione delle infezioni al nadir del ciclo è stato raccomandato l'impiego profilattico di G-CSF.

Difetti dei meccanismi antimicrobici di tipo non ossidativo

Deficit dei granuli secondari

Il deficit dei granuli specifici dei PMN è una rara malattia genetica causata da mutazioni del gene CAAT/enhancer binding protein ϵ (C/EBP ϵ) che codifica per un fattore di trascrizione mieloide-specifico⁵. I granuli specifici compaiono, durante la differenziazione dei precursori neutrofili, più tardivamente rispetto ai granuli azzurofilo o primari, allo stadio cioè di promielocita /mielocita e contengono principalmente lattoferrina e altri enzimi lisosomiali. La loro comparsa richiede una precisa coordinazione ed attivazione sequenziale di numerosi geni che codificano per fattori di trascrizione fra i quali GATA-1,

GATA-2, PU.1, c-myb, e vari membri della famiglia C/EBP. Le mutazioni del gene C/EBP ϵ , che è stato mappato sul cromosoma 3q21-q23, sono trasmesse quasi sempre come carattere autosomico recessivo e determinano un blocco maturativo dei granulociti allo stadio di mielociti con conseguente assenza dei granuli specifici, facilmente evidenziabile negli strisci di sangue periferico o in immunofluorescenza con anticorpi anti-lattoferrina. L'abnorme maturazione dei PMN è dimostrata anche dalla presenza di nuclei bilobati e di diverse altre anomalie delle proteine contenute nei granuli, quali la riduzione della lattoferrina, delle defensine, della transcobalmina I, delle gelatinasi e delle collagenasi anche a carico degli eosinofili e delle piastrine. La diminuzione del rilascio delle proteine contenute nei granuli piastrinici è probabilmente il motivo della diatesi emorragica osservata in alcuni pazienti. In vitro si evidenziano anche anomalie funzionali quali riduzione della chemiotassi, della fagocitosi e del killing intracellulare batterico. In conseguenza del difetto, i pazienti presentano un'aumentata suscettibilità alle infezioni batteriche soprattutto da *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

Principali difetti dei meccanismi antimicrobici di tipo ossidativo

L'esposizione dei fagociti a germi opsonizzati determina una rapida attivazione metabolica, soprattutto dello shunt degli esoso-monofosfati che si accompagna ad un incremento del consumo di ossigeno e di glucosio. Un ruolo fondamentale nel "burst respiratorio" è svolto dal sistema della nicotinamide-adenina-dinucleotide-fosfato ossidasi. Questo enzima è una flavoproteina di membrana che trasferisce elettroni dalla NADPH all'ossigeno molecolare (O₂) con formazione di ione superossido (O₂⁻), che all'interno del fagosoma si trasforma poi in acqua ossigenata (H₂O₂) e ipoclorito (HOCl) ad opera rispettivamente della superossido dismutasi e della mieloperossidasi lisosomiale. Il killing dei microrganismi fagocitati è legato alla produzione di questi prodotti reattivi dell'ossigeno che danneggiano la membrana batterica provocandone la morte. Un difetto in una qualsiasi delle componenti dell'ossidasi, come pure difetti associati alla generazione del cofattore NADPH come nei casi di grave deficit di G6PD o di glutatione sintetasi, possono causare un difetto dell'attività microbica ossigeno-dipendente.

Malattia Granulomatosa Cronica

Rappresenta il prototipo dei difetti funzionali dei neutrofili e può essere causata dal difetto di ciascuna delle quattro subunità proteiche formanti la NADPH-ossidasi, che può essere assente, ridotta o funzionalmente difettiva e ciò spiega l'eterogeneità genotipica della malattia. Il complesso molecolare NADPH ossidasi è costituito da 4 subunità: due molecole, *p22phox* (subunità α) e *gp91phox* (subunità β), che formano il complesso denominato citocromo *b558*, costitutivamente indovato sulla membrana cellulare e su quella di specifici granuli e vescicole secretorie del granulocita neutrofilo: questo complesso contiene due gruppi eme e due gruppi FAD necessari per il trasporto degli elettroni dall'NADPH citoplasmatico all'O₂ contenuto nel fagosoma. Altre due proteine, rispettivamente di 47 e 67 kDa, sono presenti esclusivamente nel citoplasma; una terza proteina, *p40 phox* presente nel citosol è coinvolta nella stabilizzazione del complesso *p47/p67phox* nei fagociti a riposo. In seguito all'attivazione cellulare, che può essere indotta da una serie di stimoli (microorganismi o peptidi batterici opsonizzati, frazione C5a del complemento, ecc.) le vescicole secretorie si fondono con la membrana plasmatica del fagocita e ciò determina il passaggio del citocromo *b558* sulla membrana cellulare del fagocita. Nello stesso tempo anche le proteine citosoliche *p47* e *p67 phox*, dopo essere state fosforilate, traslocano sulla membrana plasmatica, dove interagiscono con il complesso *b558* determinando così il definitivo assemblaggio del complesso enzimatico NADPH in grado di svolgere la piena attività ossidasica.

Nel processo di traslocazione sono coinvolte altre proteine di basso peso molecolare "GTP-binding proteins" appartenenti alla famiglia *rac*: in particolare *rac1*, che si lega al complesso delle proteine citosoliche *p47*, *p67* e *p40 phox*. Un'altra proteina di basso peso molecolare *rap1A* localizzata in associazione al citocromo *b558* sulla membrana dei granuli e delle vescicole secretorie, è coinvolta nella regolazione dell'attività ossidasica⁶.

Nel 70% circa dei casi la CGD è causata da una mutazione del gene che codifica per la subunità *gp91 phox*, localizzato sul braccio corto del cromosoma X (Xp21.1). Le varianti autosomiche recessive sono invece causate da mutazioni del gene per la subunità *p22 phox* che mappa sul braccio lungo del cromosoma 16 (16q24), circa il 5% dei casi, oppure dei geni per *p47 phox* o *p67 phox* che mappano rispettivamente sul braccio lungo del cromosoma 7 (7q11.23)

e sul braccio lungo del cromosoma 1 (1q25) e che rappresentano rispettivamente il 20% e il 5% circa di tutti i casi di CGD⁷. Di recente è stata identificata la prima mutazione a carico di *NCF4*, gene che codifica per la subunità proteica *p40phox*⁸.

La malattia esordisce in genere molto precocemente: l'età media all'esordio dei sintomi è di 1 anno. La forma X recessiva ha generalmente un esordio più precoce di quella autosomica recessiva che in alcuni casi può manifestarsi anche in età adulta⁹. Tutti gli organi possono essere interessati; tuttavia le infezioni più frequenti interessano i polmoni, i linfonodi e la cute.

Caratteristiche peculiari dell'infezione sono l'elevata frequenza, il tipo di agente eziologico e l'evoluzione granulomatosa delle lesioni infiammatorie. Questi granulomi, costituiti da cellule giganti e macrofagi infarciti di lipidi, provocano distruzione dei parenchimi e determinano frequentemente stenosi del tratto gastrointestinale o urinario, tali da richiedere correzione chirurgica.

La diffusione dell'infezione è facilitata dal fatto che i leucociti, che hanno fagocitato ma non ucciso i microorganismi nella sede dell'infezione primitiva, possono di fatto trasportarla a distanza interessando rene, muscoli, pericardio, SNC ed altri organi.

Va segnalato che, a fronte della aspecificità del quadro clinico, alcune manifestazioni, quali le infezioni da Aspergillo, le piodermiti recidivanti, l'ascenso granulomatoso epatico e l'osteomielite, indirizzano fortemente il sospetto verso la diagnosi di malattia granulomatosa cronica. I patogeni più frequentemente in causa sono germi catalasi positivi, in grado di

La Malattia Granulomatosa Cronica esordisce in genere molto precocemente. Caratteristiche peculiari dell'infezione sono l'elevata frequenza, il tipo di agente eziologico e l'evoluzione granulomatosa delle lesioni infiammatorie.

degradare la quota di H_2O_2 da essi stessi prodotta: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, vari ceppi di *Pseudomonas*, saprofiti quali *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter*, *Burkholderia Cepacia*, e funghi, soprattutto *Aspergillus spp.* e *Candida spp.* La diagnosi della malattia granulomatosa cronica si basa sullo studio in citofluorimetria con DHR123 del burst respiratorio granulocitario, valutando la generazione di superossido e dei metaboliti intermedi dell'ossigeno.

Deficit di mieloperossidasi (MPO)

Costituisce il più frequente difetto funzionale dei granulociti con una incidenza che varia da 1:2000 a 1:4000 rispettivamente per il deficit parziale e totale¹⁰. La malattia si trasmette con modalità autosomica recessiva, ma mutazioni nel gene codificante per MPO che mappa sul braccio lungo del cromosoma 17 sono state identificate solo in un modesto numero di soggetti affetti, suggerendo che altri loci genici possano determinare indirettamente un deficit di MPO. Il suo riscontro è per lo più occasionale ed è legato all'analisi di espressione dell'enzima che viene effettuata da molte macchine conta-globuli per l'esecuzione automatica dell'esame emocromocitometrico. La mieloperossidasi viene espressa dai granulociti in una fase precoce di maturazione da mieloblasto a promielocita e contribuisce insieme ad altre proteine ad attività antimicrobica come lisozima e defensine, a costituire i granuli primari dei granulociti. L'attività antimicrobica dell'enzima dipende dalla capacità di sintetizzare acido ipoclorico a partire dal perossido d'idrogeno generato dai granulociti attivati per effetto della NADPH ossidasi. Questa condizione risulta essere quasi sempre asintomatica o si manifesta come aumentata suscettibilità a infezioni cutanee da candida. Ciò potrebbe essere dovuto alla presenza di una residua attività enzimatica specie nei granulociti eosinofili o ad un più efficiente burst respiratorio granulocitario reso possibile dall'assenza di HOCl che normalmente inattiva le ossidasi cellulari. Deficit acquisiti di MPO possono realizzarsi in corso di leucemia mieloide, linfoma di Hodgkin, sideropenia e diabete mellito.

Suscettibilità mendeliana alle infezioni da micobatteri (MSDM)

Le cellule della linea monocitaria giocano un ruolo fondamentale nella difesa contro le infezioni da patogeni intracellulari. Dopo l'ingresso di questi patogeni nell'organismo segue la loro captazione e fagocitosi

da parte dei monociti e delle cellule dendritiche che così attivate sono in grado di produrre IL-12. Questa interagendo con il suo recettore espresso sulle cellule T e NK, innesca una serie di eventi biochimici che portano alla trascrizione dei geni inducibili dall'IL12, in particolare IFN- γ . La risposta ad interferon-gamma è mediata da un recettore, costituito da due subunità (IFN- γ R1 ed R2) che costituiscono un eterodimero; a seguito del legame della citochina con il recettore si ha attivazione delle chinasi Jak-1 e Jak-2, associate al complesso recettoriale; queste, a loro volta fosforilano le proteine di trasduzione di segnale STAT-1. Dopo la dimerizzazione STAT-1 migra nel nucleo e attiva una cascata di eventi di trascrizione nucleare e attivazione cellulare che si traducono nell'espressione di enzimi come la sintetasi dell'ossido nitrico inducibile (NOS₂) e quindi la sintesi di ossido nitrico, i cui metaboliti sono estremamente tossici per i patogeni intracellulari. L'importanza della IL-12 e del IFN- γ nella difesa contro microorganismi intracellulari, è testimoniata dalla descrizione di pazienti con infezioni gravi e disseminate da questi patogeni, in particolare micobatteri e salmonelle, che presentano mutazioni in quattro geni diversi che codificano per queste due citochine o per i loro recettori¹¹. Queste mutazioni definiscono una condizione nota come MSDM che comprende un gruppo di malattie a trasmissione autosomica recessiva. Le mutazioni note riguardano il gene IFNGR1 o IFNGR2 codificanti rispettivamente per la subunità 1 e 2 del recettore del IFN- γ e possono impedire la sintesi della proteina o causare la produzione di una proteina disfunzionale. Nelle forme clinicamente severe la diagnosi si basa sull'analisi citofluorimetrica di espressione delle catene del recettore per interferon-gamma o su test funzionali; per la diagnosi genetica definitiva occorre l'analisi di sequenza dei due geni. La malattia si manifesta con infezioni sostenute da micobatteri non tubercolari o dopo vaccinazione antitubercolare con bacillo di Calmette-Guerin (BCG); questi patogeni che generalmente causano infezioni limitate ai linfonodi o alla cute, nei pazienti affetti da MSDM sono invece causa di infezioni disseminate, con epatosplenomegalia ed osteomieliti ad esito frequentemente fatale. Quadri clinici simili ma a prognosi più benigna sono stati osservati in pazienti con difetti a carico di geni che codificano per la subunità p40 della IL-12, per la catena β 1 del suo recettore e di STAT-1¹². La precisa caratterizzazione del difetto genetico influenza notevolmente la prognosi e modifica l'approccio terapeutico. Infatti nei pazienti con forme cliniche se-

vere, sostenute da mutazioni dei geni codificanti per il recettore per interferon-gamma, il trattamento di scelta è il trapianto di midollo osseo. Nelle forme in cui siano coinvolti i geni che codificano per IL-12 o per il suo recettore, è opportuno invece ricorrere alla somministrazione di interferon-gamma, in quanto la risposta alla citochina è completamente conservata.

Principali difetti funzionali (chemiotassi)

*Difetti delle proteine di adesione*¹³.

Configurano il prototipo dei difetti correlati alle funzioni di membrana dei monociti-macrofagi: i granulociti, funzionalmente competenti ed in numero normale, non sono in grado di raggiungere i siti d'infezione. Si formano così ascessi cutanei "freddi", necrotizzanti e senza formazione di pus, con estese perdite di sostanza e rischio incombente di sepsi. I germi più frequentemente in causa sono *Stafilococchi* e *Pseudomonas*. La malattia, nella forma ad espressività completa, è rapidamente fatale, se non s'interviene con misure di profilassi antimicrobica e antifungina.

Deficit di adesione leucocitaria (LAD) è una rara immunodeficienza primitiva a trasmissione autosomica recessiva; di questa malattia sono note tre forme, distinguibili sia geneticamente che clinicamente. *Il LAD di tipo I* è dovuto a difetti di espressione e/o funzione di CD18, la subunità comune alle $\beta 2$ -integrine espressa esclusivamente dai leucociti. Affinché CD18 possa essere trasportato sulla membrana deve associarsi ad una delle tre subunità alfa delle integrine a costituire un eterodimero. Il complesso CD11a/CD18 ($\alpha 1/\beta 2$), noto come LFA-1, partecipa al processo di adesione stabile dei leucociti all'endotelio legando ICAM-1, molecola di superficie espressa sulle cellule endoteliali; attraverso questo processo, i leucociti possono iniziare il processo di extravasazione e migrazione verso il sito infiammatorio. Inoltre CD18 si associa a CD11b a formare Mac-1, capace di legare fibronectina e il frammento C3b inattivato del complemento, contribuendo così ai processi di adesione e fagocitosi. La funzione del terzo complesso costituito da CD11c e CD18, non è ancora del tutto chiarita. Questa stretta associazione tra CD18 e le tre subunità _ comporta che i pazienti con LAD-1 presentino mancata espressione sulla membrana delle cellule leucocitarie di tutte e tre le subunità α oltre che della subunità $\beta 2$. Il deficit di questa molecola codificata

dal gene ITG82(21q22.3) determina un difetto presoché generalizzato nell'adesione leucocitaria e nella migrazione di queste cellule nei siti di infiammazione. Il LAD-1 nella sua forma classica si manifesta entro i primi mesi di vita con ritardata caduta del cordone ombelicale ed infezioni cutanee caratterizzate dalla scarsa formazione di pus e frequente esito in cicatrici. È sempre riscontrabile marcata leucocitosi (con conta leucocitaria anche superiore a 50000/mm³), che contrasta con la guarigione lenta delle ferite e la scarsa formazione di pus; in età giovanile è frequente il riscontro di una severa paradontopatia.

La *LAD-II* (disordine congenito di glicosilazione) è una rara malattia a trasmissione autosomica recessiva caratterizzata da leucocitosi e periodontite ma non si osserva ritardo nella caduta del cordone ombelicale e la suscettibilità alle infezioni è meno marcata che nel LAD-I. Inoltre i soggetti affetti presentano ritardo mentale e ritardo di crescita oltre che fenotipo gruppo-ematico Bombay. Alla base della malattia vi è un difetto della sintesi di glicoproteine contenenti il monosaccaride fucosio. Tra queste, il Sialil Lewis-X (CD15s) è espresso sui leucociti e funziona da ligando per le selectine espresse sull'endotelio (L-selectina, P-selectina, E-selectina). Il deficit di CD15s sulla membrana dei leucociti affetti da LAD-II determina un difetto nella fase di interazione debole (rolling) tra leucociti ed endotelio che è mediata dalle selectine. La base genetica del LAD-II è stata identificata in un difetto a carico della proteina trasportatrice il GDP-fucosio nel complesso del Golgi (FUCT1). Per il trattamento del LAD-II è stata proposta la somministrazione di fucosio efficace nel migliorare il grado di glicosilazione delle proteine.

La diagnosi differenziale fra LAD-I e LAD-II si basa sull'analisi citofluorimetrica dell'espressione di CD18 e su test di adesione granulocitaria a cellule endoteliali attivate. I granulociti di pazienti con LAD-I non esprimono o esprimono bassi livelli di CD18 sulla superficie cellulare e aderiscono male alle cellule endoteliali. I granulociti dei pazienti con LAD-II esprimono normalmente CD18, ma mostrano un'anomala adesione a cellule endoteliali attivate da IL-1. Anticorpi diretti contro la Sialil-Lewis X possono essere usati in citofluorimetria per la quantificazione della proteina. Una nuova variante autosomica recessiva del difetto di adesione leucocitaria è stata recentemente identificata: *LAD-III*. Le alterazioni funzionali e il quadro clinico sono simili alla LAD-I, con associata una particolare tendenza emorragica legata a un difetto di aggregazione piastrinica. Il difetto genetico interessa

una proteina Rap-1 coinvolta nella attivazione delle β integrine dei neutrofili ma anche dei linfociti T e delle piastrine e codificata dal gene *KINDLIN3*.

Immunodeficienza con Iper-IgE (HIES)

Sotto il profilo nosologico questa malattia è stata di recente inserita nell'ambito dei difetti primitivi dei fagociti¹, anche se la sua patogenesi come vedremo è eterogenea e investe numerosi aspetti della funzione linfocitaria. Il difetto molecolare riguarda il "pathway" biochimico JAKs-STATs costituito da numerose molecole proteiche coinvolte nella trasmissione del segnale dalla membrana cellulare al nucleo e quindi nel controllo di molte importanti funzioni cellulari.

Si conoscono attualmente 2 varianti genetiche: in entrambe le forme sono costanti IgE sieriche elevatissime, eosinofilia, dermatite, ed infezioni ricorrenti (soprattutto di cute e polmoni); per la diagnosi è sempre indispensabile lo score clinico di Grimbacher¹⁴.

HIES Autosomica Dominante da mutazione di STAT3¹⁵

STAT3 rappresenta una molecola chiave nella trasmissione e trascrizione del segnale da parte di moltissime citochine e fattori di crescita ed ha la capacità di attivare differenti set di geni in molteplici tipi cellulari. Mutazioni in eterozigosi di STAT3 sono presenti in circa il 75% dei pazienti con AD-HIES. Tutte le manifestazioni tipiche della "Sindrome di Giobbe" sono presenti in questa forma:

Dermatite, compare in genere nei primi due mesi di vita: è una dermatite cronica papulo-pustolosa e pruriginosa legata alla colonizzazione della cute da parte degli *Stafilococchi aureus* e *coagulasi-negativi* con formazione di noduli cutanei-sottocutanei scarsamente dolenti e tendenti alla colliquazione: "ascessi freddi", oggi meno frequenti grazie alla profilassi antisettica e antibiotica.

IgE sieriche elevate: > 2.000 UI/ml dopo i 5 anni di vita, spesso con picchi molto più alti. In età adulta il livello tende a scendere entro i limiti della norma. Le IgE sono policlonali e rivolte con titoli altissimi sia contro antigeni di *S. aureus* e *Candida* sia contro i più svariati antigeni e allergeni. Nonostante i livelli straordinari di IgE e l'intensa positività del prick test verso molti antigeni, c'è una paradossale assenza di manifestazioni cliniche di ipersensibilità di tipo "reaginic" (anafilassi, orticaria, angioedema, asma allergico). Questo paradosso è tipico della AD-HIES con

mutazione di Stat3 ma non delle AD-HIES variants.

Gravi infezioni ricorrenti: soprattutto a carico di cute e polmoni e causate principalmente da miceti, stafilococchi e altri batteri extracellulari piogeni. Caratteristica della forma di HIES da deficit di STAT3 è una abnorme modalità di riparazione del processo di flogosi del tessuto polmonare ("lung aberrant healing") con formazione di bronchiectasie e soprattutto di pneumatoceli che a loro volta predispongono a sovrainfezioni da batteri gram-negativi.

Manifestazioni extra-immunologiche: ritenzione dei denti decidui, alterazioni scheletriche, osteopenia e fragilità ossea, iperlassità ligamentosa.

HIES Autosomica Recessiva (AR-HIES)

È una forma molto rara e grave, caratterizzata da sopravvivenza molto ridotta e precoce mortalità. Sono assenti le manifestazioni extra-immunologiche e la tendenza alla formazione di pneumatoceli, tratto quest'ultimo che consente di differenziare fenotipicamente questa forma dalla HIES STAT3 mutata. Si caratterizza invece per una particolare suscettibilità alle infezioni virali, a patologie autoimmuni e alle manifestazioni vasculo-emorragiche a livello del sistema nervoso centrale.

La maggior parte delle HIES autosomico recessive sono causate da mutazioni di *DOCK8* gene localizzato sul cromosoma 9p che codifica per una proteina (dedicator della citochinesi 8) implicata nella regolazione del citoscheletro dell'actina, come recentemente dimostrato da uno studio multicentrico internazionale¹⁶. Il fenotipo clinico di questi pazienti è caratterizzato da infezioni polmonari e virali severe, in particolare da herpes virus e da mollusco contagioso, eczema atopico, oltre che eosinofilia e Iper-IgE.

In un unico paziente giapponese è stata identificata una mutazione in omozigosi del gene *tyk2* codificante per la tirosin-kinasi 2¹⁷.

Patogenesi delle alterazioni immunologiche delle HIES¹⁸

- 1) I meccanismi che determinano livelli altissimi di IgE sieriche in tutte le forme di HIES sono ancora in gran parte sconosciuti; l'ipotesi principale resta quella di una produzione di citochine con effetto soppressivo sulla produzione di IgE, in particolare l'IFN- γ , prodotto da T linfociti e cellule NK sotto lo stimolo di IL-21, citochina a sua volta Th-17 e STAT3-dipendente.
- 2) Sotto stimolo antigenico (batteri Gram+, Gram- e miceti) i linfociti Th-17 inducono la produzione di

molecole ad attività chemiotattica verso neutrofili e macrofagi e l'attivazione della ossido-nitrico sintetasi (NOS), enzima provvisto di importante azione anti-stafilococcica. Questo meccanismo sottenderebbe al ben noto deficit di chemiotassi della Sindrome di Giobbe, con gli "ascessi freddi" e la torpidità delle lesioni polmonari croniche e alla suscettibilità alle infezioni da stafilococchi.

- 3) DOCK 8 appartiene ad una famiglia di proteine espresse in vari organi (placenta, polmone, rene e pancreas) che regolano la migrazione, l'adesione e la crescita cellulare. Il deficit di DOCK8 è responsabile della alterazione delle funzioni effettrici delle cellule T e della differenziazione dei linfociti Th17.
- 4) Il deficit di TYK2 comporta nei T-linfociti e macrofagi un grave difetto di risposta a molte citochine: le mutazioni in omozigosi di TYK2 determinano un'alterazione della trasmissione del *pathway* dell'IL-23, che predispone alle infezioni da batteri extracellulari, dell'IFN- γ che giustifica la suscettibilità alle infezioni da virus, e dell'IL-12 che spiega le infezioni da germi intracellulari (micobatteri). L'alterazione della trasmissione del segnale dell'IL-6 e attraverso IL22 con conseguente ridotta produzione di β -defensina, spiega l'assenza dei tipici segni della infiammazione acuta.

Difetti della fagocitosi

I difetti della fagocitosi sono di solito secondari a infezioni, farmaci, alcool e malattie sistemiche. I difetti primitivi sono rari, frequentemente riconducibili al difetto di opsonizzazione secondario a ipogammaglobulinemia o al deficit congenito di frazioni del complemento. Il deficit primitivo della β *actina*, malattia ereditaria a trasmissione autosomica dominante estremamente rara, comporta un difetto di polimerizzazione di questa proteina e della organizzazione del citoscheletro cellulare con conseguente alterazione della motilità e della fagocitosi¹⁹. Si associa a bassa statura e ritardo mentale.

Diagnosi differenziale dei difetti dei fagociti

Al sospetto di deficit a carico dei fagociti si perviene di fronte a soggetti con infezioni precoci e spesso gravi, di origine batterica e fungina, che tendono

all'ascessualizzazione o alla disseminazione sistemica; molti difetti fagocitari possono tuttavia presentare una grande variabilità clinica (Fig. 1). L'anamnesi infettivologica deve fornire importanti suggestioni riguardanti il numero, il tipo, la sede delle infezioni e la risposta alla terapia antiinfettiva. La conoscenza dei patogeni causa di infezione poi, consente da sola di orientare in maniera corretta l'iter diagnostico verso specifici difetti dei fagociti (Tab. I). L'esame clinico può differenziare caratteristiche diagnostiche come il parziale albinismo oculocutaneo nella *sindrome di Chediak-Higashi*, la facies tipica della sindrome da Iper-IgE o la bassa statura e le alterazioni scheletriche di alcune forme di neutropenia sindromica come la *Shwachman-Diamond*. Le valutazioni di laboratorio devono procedere secondo un insieme di test mirati diretti verso specifiche malattie, sulla base delle caratteristiche cliniche del caso e sulla prevalenza di ciascun difetto. L'emocromo sarà immediatamente di ausilio, rivelando una neutropenia o una neutrofilia; tanto la CGD quanto soprattutto il LAD decorrono con neutrofilia (Fig. 2). La presenza di granuli giganti nel citoplasma consente di sospettare la sindrome di Chediak-Higashi mentre l'assenza di granuli dovrà suggerire il difetto primitivo dei granuli specifici. La persistenza della neutropenia una volta superato l'episodio infettivo acuto richiede che venga esplorata la possibilità di una forma cronica severa, possibilmente congenita. Occorre tuttavia ricordare che la neutropenia acquisita (anticorpo-mediata, farmaco-indotta o post-infettiva) è di gran lunga più comune delle forme congenite, e richiede solo il monitoraggio dell'emocromo fino alla risoluzione. Il recidivare delle infezioni

Tab. I. Microrganismi associati a specifici difetti fagocitari.

Microrganismi	Disordini specifici
Aspergillus	CGD
Micobatterio atipico	Micobatteriosi atipica
Bacillo Calmette-Guerin (BCG) – disseminato	CGD, micobatteriosi atipica
Burkholderia cepacia	CGD
Candida – invasiva	CGD
Candida – muco cutanea	Sindrome da Iper-IgE, Deficit MPO
Serratia marcescens	CGD
Staphylococcus aureus	CGD, Neutropenia, Iper-IgE
Batteri catalasi positivi	CGD

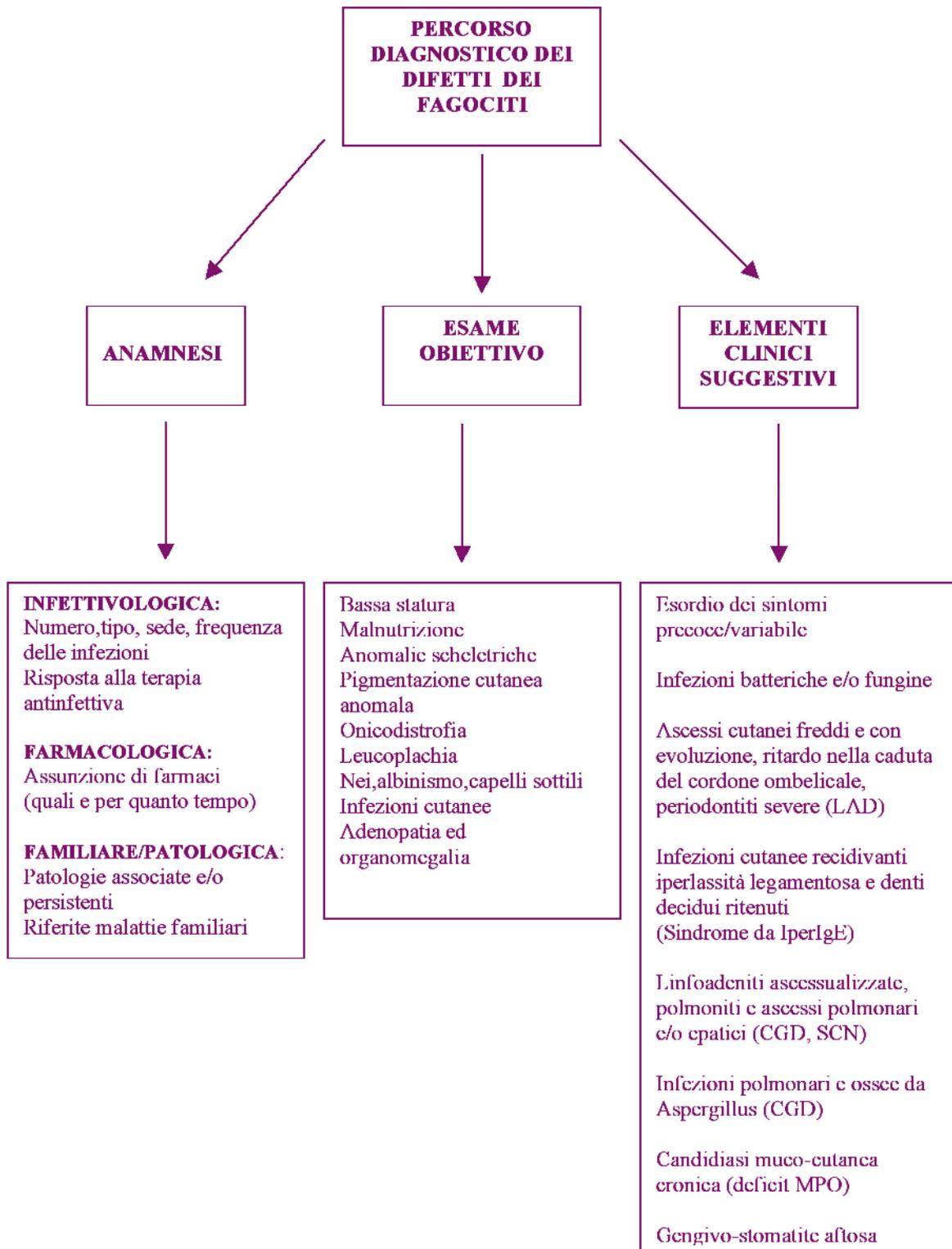


Fig. 1. Percorso diagnostico dei difetti dei fagociti.

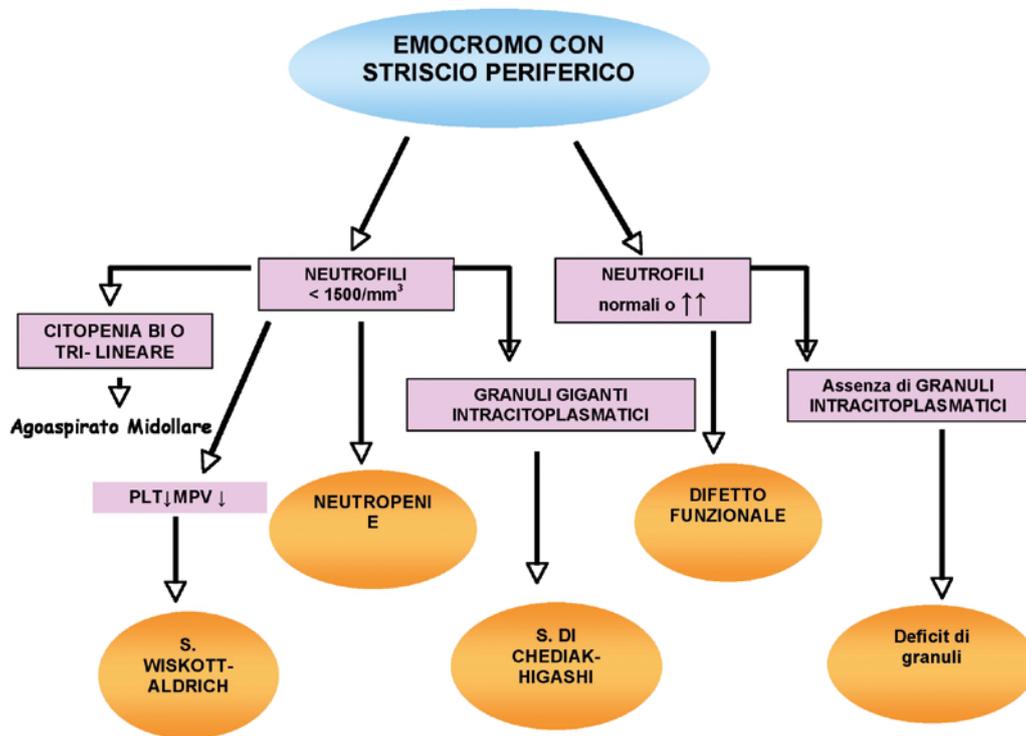


Fig. 2. Indagini di laboratorio nei difetti primitivi dei fagociti.

in un bambino nel quale sia stata documentata una neutropenia poi regredita, suggerisce l'opportunità di una conta seriata bisettimanale dei granulociti neutrofili per 6 settimane necessaria per stabilire la diagnosi di neutropenia ciclica. L'esame del midollo osseo è indicato nel caso di sospetta neutropenia cronica congenita clinicamente severa, o quando siano interessate altre linee emopoietiche; il reperto di un arresto maturativo della serie mieloide allo stadio di promielocita, confermerà la diagnosi.

I test richiesti per la diagnosi dei difetti funzionali dovrebbero essere discussi con un esperto del settore ed eseguiti in laboratori specializzati (Fig. 3). In generale, l'indicazione è quella di fare un test per CGD virtualmente in tutti i casi di sospetto difetto fagocitario, in particolare di fronte a infezioni gravi con tendenza all'ascensualizzazione o alla localizzazione profonda (Tab. II), essendo questa malattia molto eterogenea nelle sue manifestazioni cliniche. I dati pubblicati del Registro Italiano infatti dimostrano che un terzo dei pazienti con CGD riceve la diagnosi dopo il quinto anno di vita e che il ritardo medio della diagnosi è di oltre 3 anni dall'esordio dei sintomi⁹. Lo studio del burst respiratorio granulocitario viene eseguito in citofluorimetria con

Tab. II. Campanelli d'allarme che devono far pensare ad una Malattia Granulomatosa Cronica.

Infezione da <i>Aspergillus spp.</i> a qualsiasi età
Infezione da <i>Serratia marcescens</i> a qualsiasi età
Osteomielite
Linfadenite da Stafilococco
Ascenso epatico
Ostruzione delle vie digestive e/o urinarie da flogosi granulomatosa

Nell'anamnesi infettivologica, la conoscenza dei patogeni causa di infezione consente da sola di orientare in maniera corretta l'iter diagnostico verso specifici difetti dei fagociti.

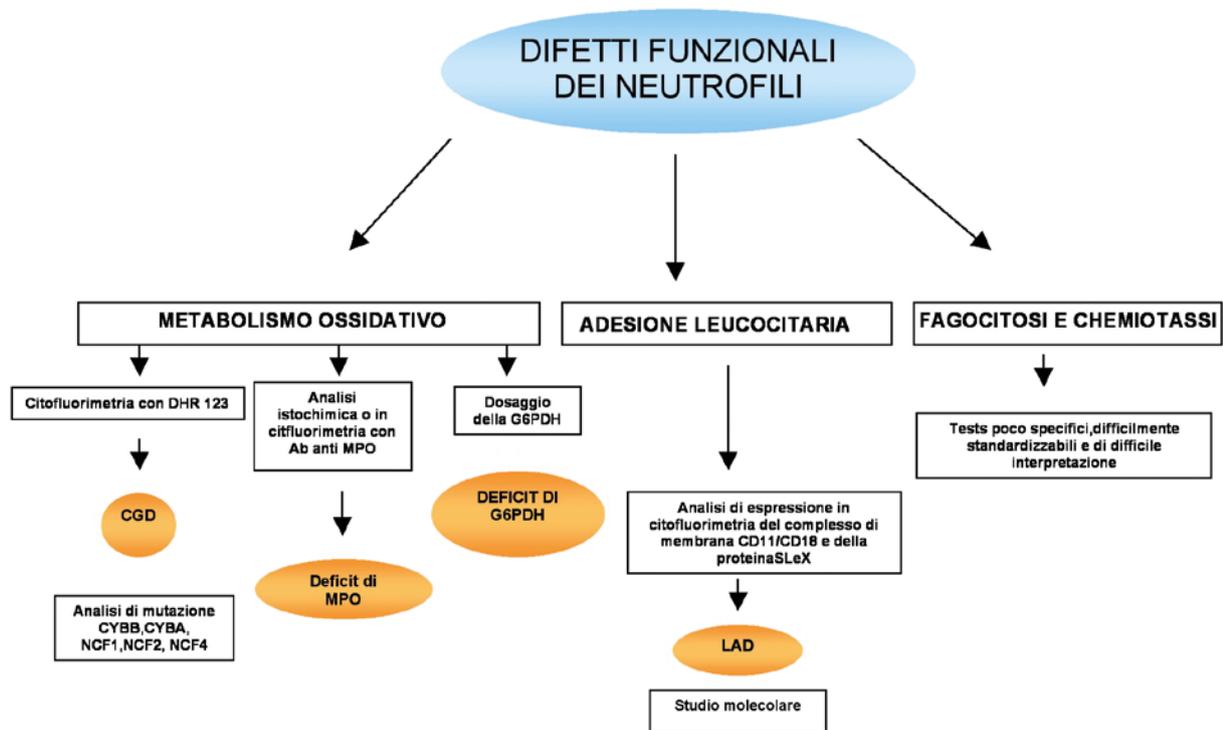


Fig. 3. Iter diagnostico dei difetti funzionali dei fagociti.

DHR123, valutando la generazione di superossido e dei metaboliti intermedi dell'ossigeno.

La diagnosi di LAD di tipo 1 si basa su dati clinici suggestivi e sul riscontro di una marcata leucocitosi neutrofila marcatissima; la conferma è data dalla dimostrazione in citofluorimetria dell'assenza della glicoproteina CD18. Nel più raro LAD tipo 2, la mancata espressione di Sialil-Lewis X (CD15) sulla super-

Per molte delle patologie descritte è possibile eseguire l'analisi di mutazione, cioè la ricerca del difetto genico della malattia, che rappresenta il gold standard della diagnosi e che consente anche di eseguire una diagnosi prenatale.

ficie dei neutrofili e il riscontro del fenotipo Bombay all'analisi del gruppo eritrocitario confermerà la diagnosi.

Pazienti con eczema intrattabile associato ad accessi freddi ricorrenti devono essere indagati per confermare una sindrome da Iper-IgE. In questo caso saranno dimostrabili, elevati livelli di IgE totali e specifiche verso *S. Aureus* e *Candida*, deficit di sottoclassi IgG e vari difetti dell'attività T linfocitaria, in particolare dei Th17.

Di scarsa utilità pratica risultano lo studio della fagocitosi e della chemiotassi in quanto si tratta di test poco specifici, difficilmente standardizzabili e spesso di difficile interpretazione.

Per molte delle patologie summenzionate è oggi possibile eseguire l'analisi di mutazione cioè la ricerca del difetto genico della malattia, che rappresenta il gold standard della diagnosi e che consente anche di eseguire una diagnosi prenatale.

Tutti i test discussi sopra sono incentrati su singoli disturbi, generalmente causati da una o più mutazioni genetiche trasmesse tramite ereditarietà mendeliana classica. È probabile tuttavia che future valutazioni dei difetti dell'immunità innata coinvolgano analisi

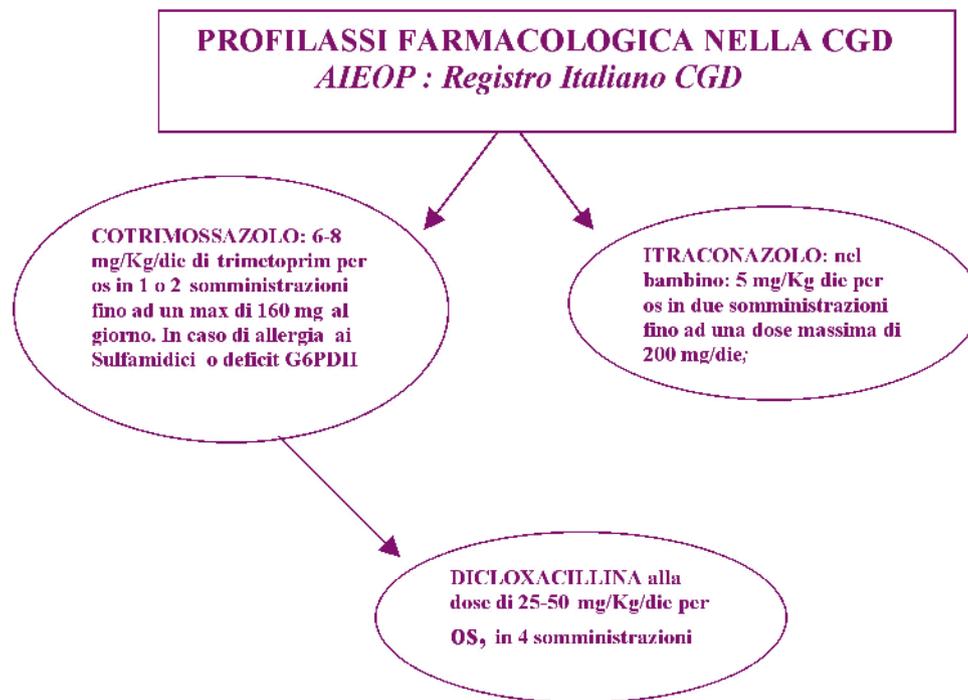


Fig. 4. Profilassi farmacologica nella CGD.

simultanee di molti singoli polimorfismi di nucleotidi (SNPs), sia all'interno che all'esterno di regioni codificanti del genoma umano. Diversi specifici SNPs sono già stati associati a suscettibilità alle infezioni meno severe, ma probabilmente più comune dei difetti riconosciuti dei fagociti.

Elementi di terapia

Il trattamento dei pazienti con difetto dei fagociti richiede alcune misure di carattere generale ed altre più specifiche diverse secondo il tipo di patologia. In ogni caso l'obiettivo fondamentale è quello di prevenire gli episodi infettivi mediante l'adozione di misure d'igiene e norme comportamentali scrupolose (Tab. III). Una rigorosa e continuativa profilassi antimicrobica e antifungina, deve essere osservata dai pazienti con CGD (Fig. 4), LAD, Iper-IgE (Tab. IV) e con granulocitopenia severa congenita. In quest'ultimo caso è indicata la terapia con il G-CSF che induce la proliferazione e la differenziazione dei progenitori mieloidi in granulociti neutrofili maturi consentendo di ridurre la frequenza e la gravità degli episodi infettivi (Fig. 5). Nella maggior parte dei difetti primitivi dei fagociti non è compromes-

sa la risposta anticorpale agli antigeni vaccinali e quindi questi, con l'eccezione del BCG (Bacillo di Calmette Guerin) per i pazienti affetti da Malattia Granulomatosa Cronica e MSDM, possono essere somministrati in conformità con l'abituale protocollo vaccinale.

Tab. III. Norme igieniche-comportamentali per i pazienti con difetti primitivi dei fagociti.

Curare l'igiene personale e in particolare quella del cavo orale: lavare i denti due volte al giorno con perossido di idrogeno e pasta dentifricia al bicarbonato, usare collutorio per ridurre la possibilità di gengiviti.
Lavare profondamente ogni taglio o abrasione con acqua e sapone, proseguire con un antisettico ed infine risciacquare con perossido di idrogeno.
Assumere antibiotici prima e dopo qualsiasi trattamento ortodontico.
Prevenzione della stipsi.
Profilassi vaccinale tranne BCG.
È possibile frequentare la scuola, evitando tuttavia il contatto con bambini palesemente ammalati.
Non utilizzare campi da gioco con truciol di legno ma con superficie liscia o ghiaia.
Evitare di avere fiori freschi e piante in casa, la muffa spesso cresce nel terreno.
Informare immediatamente il proprio medico in ogni caso di febbre.

Tab. IV. Profilassi antimicrobica nelle HIES.

Modalità	Indicazioni	Farmaci
Profilassi	Dermatite	Bagni quotidiani o a giorni alterni in soluzione di Ipoclorito di Sodio 0.07%, nuoto in piscine clorate
Profilassi	Infezioni batteriche	Amoxicillina-Ac. Clavulanico 50 mg/kg/die
Profilassi	Infezioni Fungine	Itraconazolo sciroppo 5 mg/kg/die

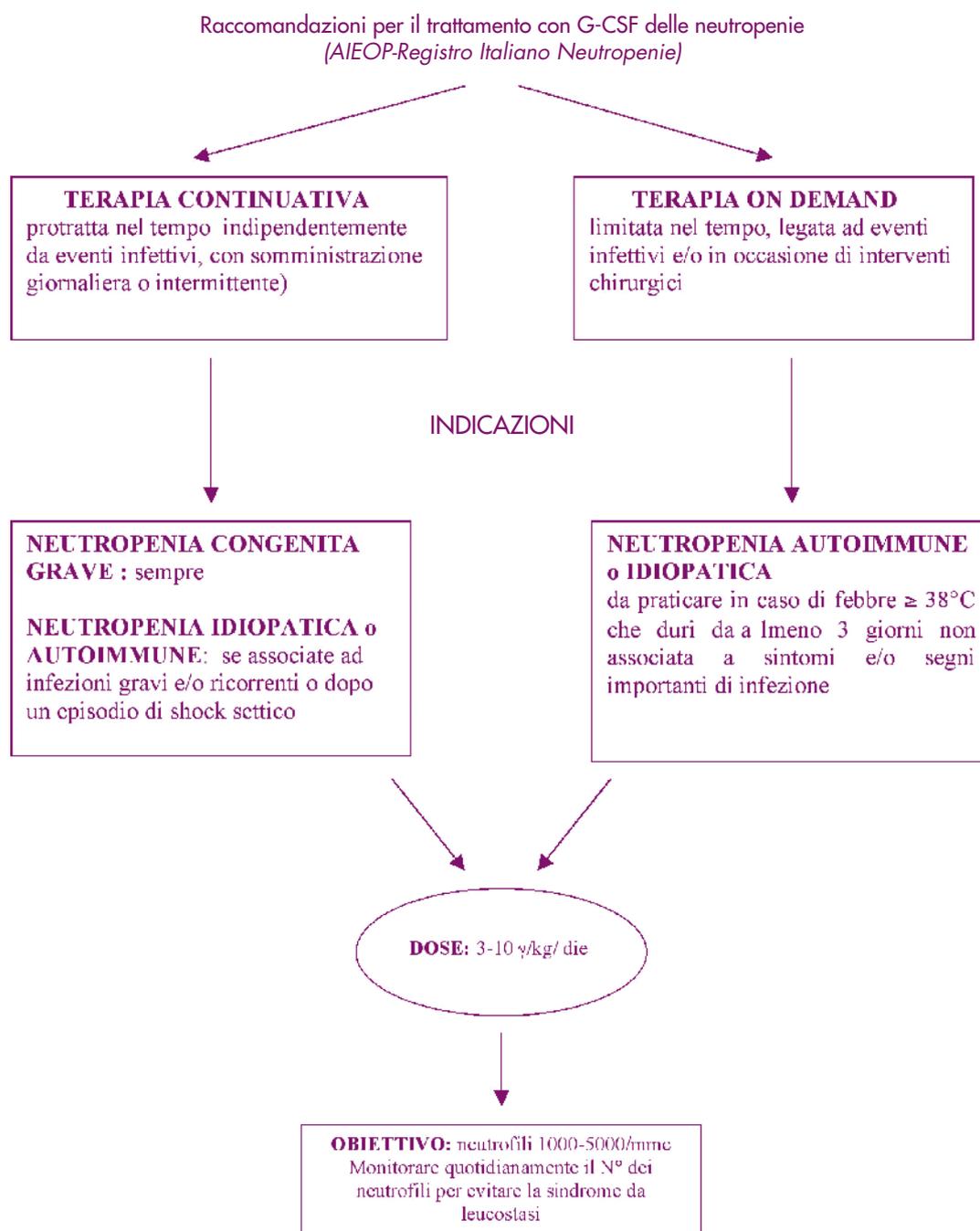


Fig. 5. Raccomandazioni per il trattamento con G-CSF delle neutropenie.

Criteria generali per il trattamento degli episodi infettivi

Ogni episodio infettivo deve essere considerato come potenzialmente pericoloso; è quindi corretto adottare misure d'intervento tempestive e aggressive, che vanno comunque associate a una valutazione approfondita delle condizioni cliniche del soggetto. È necessario fare ogni sforzo per isolare il microorganismo in causa, con particolare attenzione all'Aspergillo, mediante indagini sierologiche, colturali e biotiche.

Una notazione che va tenuta nella massima considerazione per una pianificazione razionale dell'antibiototerapia in caso di Malattia Granulomatosa Cronica, riguarda l'utilizzo di farmaci attivi su patogeni intracellulari e quindi in grado di attraversare la membrana cellulare del fagocita e di concentrarsi all'interno delle cellule. Solo alcuni antibiotici hanno questa capacità, quali *rifampicina*, *teicoplanina*, *azitromicina*, *linezolid* per i batteri Gram+; *ciprofloxacina*, *fosfomicina*, *cotrimossazolo* per i batteri Gram-. La terapia deve essere proseguita a lungo anche in presenza di un significativo miglioramento degli indici di flogosi e delle condizioni cliniche del paziente, con l'intento di eradicare definitivamente l'infezione.

Terapia empirica del paziente con neutropenia febbrile

Le linee guida AIEOP per la terapia empirica del paziente con neutropenia febbrile²⁰ prevedono l'associazione di almeno due antibiotici attivi su Gram+ e Gram-. La scelta dello schema di terapia empirica iniziale dovrebbe essere basata su dati epidemiologici locali riguardanti il tipo di patogeno più frequentemente isolato. Sulla scorta di questi dati e a parità di efficacia clinica, deve essere privilegiata l'opzione terapeutica di minor tossicità e minor costo.

I protocolli di terapia antibiotica empirica usati più comunemente sono (Fig. 6):

Associazione ceftazidime+amikacina. Questa associazione rimane probabilmente ancora quella da preferire in centri con elevata incidenza di infezioni da *Pseudomonas spp.*
Associazione piperacillina-tazobactam+amikacina. L'utilizzo di questa associazione può essere consigliabile invece in centri con frequenti infezioni da streptococchi o enterococchi.

Uso dei glicopeptidi

Parecchi studi in pazienti pediatrici ed adulti hanno dimostrato che l'aggiunta routinaria di un antibiotico glicopeptidico (vancomicina o teicoplanina) al protocollo di terapia antibiotica empirica non è indicata, se non in centri con elevata incidenza di infezioni da stafilococchi meticillino-resistenti ed in situazioni cliniche di alta probabilità di infezione da Gram-positivi: è questo il caso del paziente portatore di catetere venoso centrale a permanenza.

Modifiche della terapia iniziale

Le indicazioni alla modifica della terapia antibiotica empirica nel paziente non responsivo alle terapie di prima scelta sono poco chiare ed i comportamenti non sono unanimi.

Qualunque modifica della terapia antibiotica dovrebbe basarsi su obiettivi segni di peggioramento clinico o suggestivi di una eziologia non coperta dagli antibiotici somministrati (cellulite perianale, tiifite, ecc.), e non sulla semplice persistenza di febbre, specie se di entità moderata (37-38,5°C). In ogni caso modifiche della terapia empirica iniziale non dovrebbero essere effettuate prima di almeno 4 giorni di trattamento a meno che i dati microbiologici non lo giustifichino. In mancanza di segni e sintomi clinici specifici e di indicazioni microbiologiche, la sola modifica empirica di terapia antibiotica accettata da tutti i maggiori esperti consiste nell'aggiunta di un farmaco antifungino.

Aggiunta di antifungini

Sulla base di studi clinici (peraltro eseguiti su casistiche assai limitate) è divenuta pratica corrente, in pazienti persistentemente febbrili (> 38°C) e neutropenici (< 500 PMN/mmc) privi di documentazione di infezione, il somministrare empiricamente un farmaco antifungino dopo un periodo variabile di terapia antibatterica di solito 4-5 giorni). Il farmaco generalmente impiegato è l'amfotericina B ma la durata della terapia rimane imprecisata.

Durata del trattamento

Comunemente, la durata della terapia antibiotica nel paziente neutropenico affetto da un'infezione documentata non dovrebbe essere inferiore ai 10-14 giorni. Per i pazienti con febbre di origine sconosciuta le opzioni sono meno chiare. In questo caso è preferibile proseguire la terapia per 4 giorni dopo lo sfebbramento, con un minimo di 7 giorni di trattamento totale.

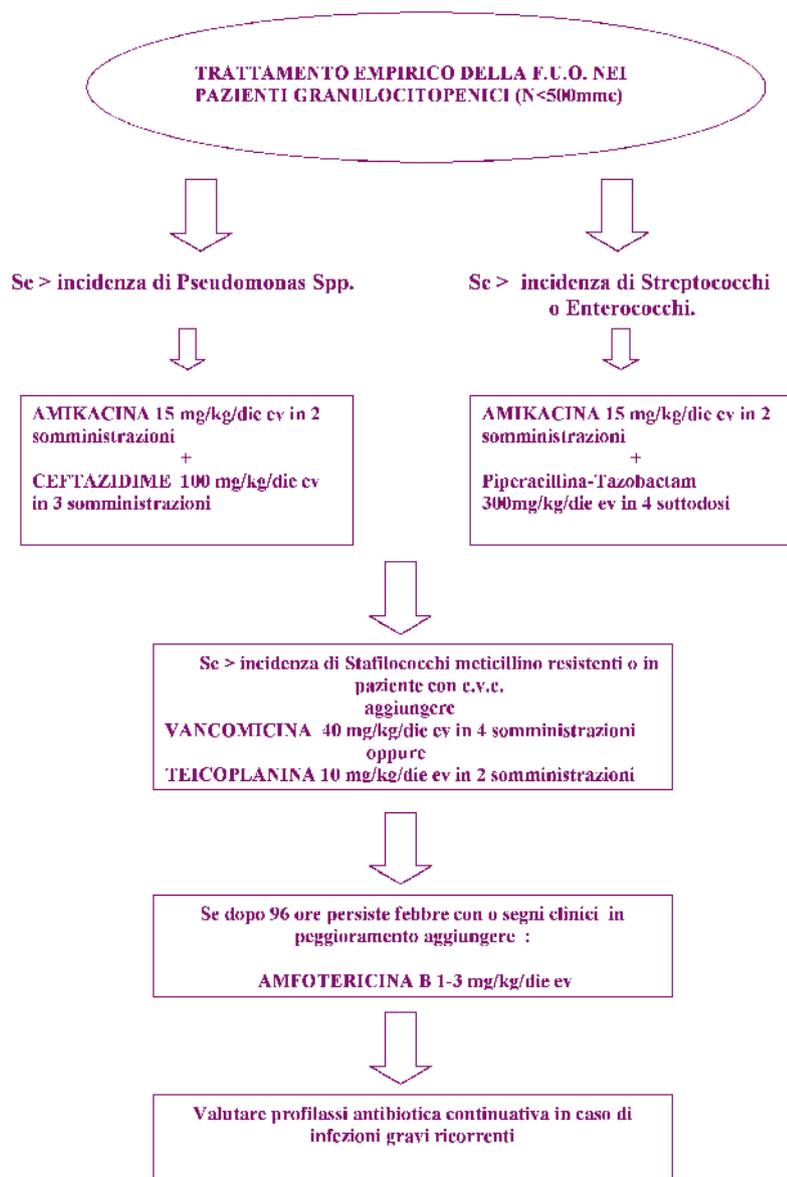


Fig. 6. Linee guida AIEOP per la terapia empirica del paziente con neutropenia febbrile.

Prospettive di cura definitiva

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche da donatore HLA-identico rappresenta ad oggi l'unica possibilità di cura definitiva per alcune di queste malattie, come la CGD (Tab. V) e la Neutropenia congenita grave (Tab. VI)^{21 22}. La terapia genica, cioè la possibilità già adottata per altre immunodeficienze primitive, di curare la malattia attraverso la somministrazione di cellule staminali autologhe contenenti una copia sana del gene alterato, rappresenta sul piano teorico una strategia tera-

Tab. V. Raccomandazioni AIEOP-IPINET per il trapianto di cellule staminali emopoietiche nella malattia granulomatosa cronica.

Il trapianto da donatore HLA identico familiare o non correlato è efficace nella cura della CGD e rappresenta una valida alternativa al trattamento convenzionale.

Le probabilità di successo sono maggiori se il trapianto è effettuato prima dell'adolescenza e comunque prima che si instaurino danni d'organo permanenti (< rischio GVHD).

Anche i pazienti con infezione attiva o complicanze infiammatorie croniche sono eleggibili al trapianto, sia pure con un maggior rischio di complicazioni infettive e di GVHD.

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche da donatore HLA-identico rappresenta ad oggi l'unica possibilità di cura definitiva per alcune di queste malattie, come la CGD e la Neutropenia congenita grave.

Tab. VI. Indicazioni al trapianto di cellule staminali ematopoietiche nelle neutropenie congenite gravi (AIEOP-Registro Italiano Neutropenie).

1. Mancata risposta al trattamento con G-CSF
2. Necessità di dosi elevate di G-CSF (> 20 γ /Kg/die)
3. Mutazione isolata del recettore del G-CSF
4. Displasia morfologica e anomalie citogenetiche

peutica promettente in particolare per la CGD, essendo in questo caso implicati geni che codificano per proteine metaboliche non coinvolte nei processi di proliferazione cellulare. La sicurezza di questo approccio tuttavia, è stata di recente messa in discussione in seguito all'insorgenza di proliferazione leucemica in 5 pazienti affetti da X SCID²³ e di mielodisplasia in 2 pazienti con CGD²³. Tale procedura ad oggi deve pertanto essere considerata ancora oggetto di studi sperimentali.

Bibliografia

- 1 International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary Immunodeficiencies - Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, et al. *Primary immunodeficiencies: 2009 update*. J Allergy Clin Immunol 2009;124:1161-78.
- 2 Schäffer AA, Klein C. *Genetic heterogeneity in severe congenital neutropenia: how many aberrant pathways can kill a neutrophil?* Curr Opin Allergy Clin Immunol 2007;7:481-94.
- 3 Ward AC, Dale DC. *Genetic and molecular diagnosis of severe congenital neutropenia*. Curr Opin Hematol 2009;16:9-13.

- 4 Horwitz MS, Duan Z, Korkmaz B, et al. *Neutrophil elastase in cyclic and severe congenital neutropenia*. Blood 2007;109:1817-24.
- 5 Halene S, Gaines P, Sun H, et al. *C/EBPepsilon directs granulocytic-vs-monocytic lineage determination and confers chemotactic function via Hlx*. Exp Hematol 2010;38:90-103.
- 6 Segal BH, Leto TL, Gallin JL, et al. *Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease*. Medicine 2000;79:170-200.
- 7 Di Matteo G, Giordani L, Finocchi A, et al. IPINET (Italian Network for Primary Immunodeficiencies). *Molecular characterization of a large cohort of patients with Chronic Granulomatous Disease and identification of novel CYBB mutations: an Italian multicenter study*. Mol Immunol 2009;46:1935-41.
- 8 Matute JD, Arias AA, Wright NA, et al. *A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity*. Blood 2009;114:3309-15.
- 9 Martire B, Rondelli R, Soresina A, et al.; IPINET. *Clinical features, long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with Chronic Granulomatous Disease: an Italian multicenter study*. Clin Immunol 2008;126:155-64.
- 10 Lanza F. *Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency*. J Mol Med 1998;76:676-81.
- 11 Mansouri D, Adimi P, Mirsaeidi M, et al. *Inherited disorders of the IL-12-IFN-gamma axis in patients with disseminated BCG infection*. Eur J Pediatr 2005;164:753-7.
- 12 Gollob JA, Veenstra KG, Jyonouchi H, et al. *Impairment of STAT activation by IL-12 in a patient with atypical mycobacterial and staphylococcal infections*. J Immunol 2000;165:4120-6.
- 13 Etzioni A. *Genetic etiologies of leukocyte adhesion defects*. Curr Opin Immunol. 2009;21:481-6.
- 14 Grimbacher B, Schäffer AA, Holland SM, et al. *Genetic linkage of hyper-IgE syndrome to chromosome 4*. Am J Hum Genet 1999;65:735-44.
- 15 Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, et al. *Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome*. Nature 2007;448:1058-62.
- 16 Engelhardt KR, McGhee S, Winkler S, et al. *Large deletions and point mutations involving the dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) in the autosomal-recessive form of hyper-IgE syndrome*. J Allergy Clin Immunol. 2009;124:1289-302.
- 17 Minegishi Y, Saito M, Morio T, et al. *Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multi-*

ple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. *Immunity* 2006;25:745-55.

- 18 Freeman AF, Holland SM. *Clinical Manifestations, etiology, and pathogenesis of the Hyper IgE syndromes*. *Pediatr Res* 2009;65:32R-37R.
- 19 Miralles F, Visa N. *Actin in transcription and transcription regulation*. *Curr. Opin. Cell Biol* 2006;18:261-6.
- 20 Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica Comitato scientifico di disciplina infezioni. *Linee guida per il trattamento delle complicanze infettive in oncologia pediatrica: terapia empirica della neutropenia febbrile*. Disponibile al sito www.aieop.it.
- 21 Seger RA. *Hematopoietic stem cell transplantation for chronic granulomatous disease*. *Immunol Allergy Clin North Am* 2010;30:95-208.
- 22 Thachil J, Caswell M, Bolton-Maggs PH, et al. *Non-myeloablative transplantation for severe congenital neutropenia*. *Pediatr Blood Cancer* 2008;50:20-1.
- 23 Kohn DB, Sadelain M, Glorioso JC. *Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID*. *Nat Rev Cancer* 2003;3:477-88.
- 24 Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, et al. *Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease*. *Nat Med* 2010;16:198-204.