

L'allergia alle arachidi

a cura della Commissione Allergia Alimentare della SIAIP

Iride Dello Iacono¹ (*coordinatore*), Loredana Chini², Maria Carmen Verga³,
Giovanna Monti⁴, Enza D'Auria⁵, Giovanni Traina⁶, Piercarlo Poli⁵,
Giovanni Simeone⁷



Parole chiave: Allergia alle Arachidi (AAr), Caratterizzazione Molecolare, Processazione ed Allergenicità, Test di Provocazione Orale (TPO), Immunoterapia Orale (OIT)

Abstract

L'Allergia alle Arachidi rappresenta una delle Allergie Alimentari più importanti, non solo per la prevalenza ma anche per la persistenza e per la potenziale gravità della reazione avversa. Solitamente essa compare in età pediatrica e nella maggior parte dei casi può persistere per tutta la vita. La reazione allergica alle arachidi può essere molto severa e tali alimenti sono responsabili della maggioranza dei decessi per anafilassi indotta da cibo. La differente incidenza e gravità delle manifestazioni cliniche dell'Allergia alle Arachidi dipende probabilmente da fattori genetici e dalle differenti abitudini culinarie nei diversi Paesi. La processazione delle proteine durante i vari metodi di preparazione, quali tostatura, bollitura, frittura, marinatura, può modificarne la allergenicità. La Commissione Allergia Alimentare della SIAIP ha ritenuto importante effettuare una revisione sui dati più recenti riguardanti la diagnostica e le opportunità terapeutiche di questa patologia.

Strategia di ricerca ed analisi della letteratura

I membri della Commissione Allergie Alimentari della SIAIP hanno effettuato un aggiornamento della ricerca bibliografica seguendo la metodologia di selezione gerarchica e di valutazione precedentemente descritta¹.

Due autori (GS e MCV), in modo indipendente, hanno effettuato la ricerca, selezionato ed analizzato i lavori.

Banche dati e motori di ricerca

BD Linee Guida: NICE, SIGN, National Guideline Clearinghouse, CMA Infobase, NZ Guideline Group, PNLG Cochrane Library; Database of Systematic Reviews (DARE); PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>;

Stringhe di ricerca:

PubMed Clinical Queries

1. Peanut allergy AND children.

¹ UOS Pediatria, Ospedale Fatebenefratelli, Benevento; ² UOSD Pediatria e Gastroenterologia Pediatrica, sez. allergologia-immunologia pediatrica, Policlinico Tor Vergata, Università di Roma Tor Vergata; ³ Pediatra di Famiglia, ASL Salerno; ⁴ Dipartimento di Scienze Pediatriche e dell'Adolescenza Ospedale Infantile Regina Margherita, Torino; ⁵ Clinica Pediatrica-Ospedale San Paolo, Università degli Studi di Milano; ⁶ UOC di Pediatria e Neonatologia -Dipartimento di Pediatria- Ospedale S. Corona, Garbagnate Milanese (MI); ⁷ Pediatra di Famiglia ASL Brindisi - Distretto di Mesagne

- a. Systematic Review
systematic[sb] AND (peanut allergy AND children)
- b. Clinical Study Categories
Filters activated: Clinical Trial, Controlled Clinical Trial, Randomized Controlled Trial, published in the last 5 years, Child: birth-18 years
2. Peanuts allergy AND processing AND oral tolerance induction
3. "Peanut Hypersensitivity"[Mesh] AND specific oral tolerance induction

Limiti:

- a. Review, Systematic Reviews, published in the last 5 years, Child: birth-18 years
- b. Clinical Trial, Controlled Clinical Trial, Randomized Controlled Trial, published in the last 5 years, Child: birth-18 years

La presente pubblicazione costituisce un aggiornamento sulle problematiche dell'allergia alle arachidi.

Introduzione

I semi di arachide (*Arachis hypogaea*), comunemente chiamati **noccioline americane**, sono un frutto ampiamente consumato nella maggior parte delle aree del mondo, essendo ricco di nutrienti e fonte di energia.

Le arachidi possono essere assunte crude o tostate, sotto forma di burro o olio di arachidi (ampiamente usato nella cucina asiatica ed indiana) o come farina di arachidi, molto utilizzata per il suo elevato contenuto proteico, pari a circa il 30% della composizione totale. I restanti costituenti dei semi di arachide sono zuccheri, amido e olio (40-50%)².

Il loro consumo, nei paesi industrializzati, negli ultimi anni è aumentato notevolmente in quanto tali semi vengono utilizzati come fonte proteica sia in prodotti dietetici, che nelle diete vegetariane e nei cibi preconfezionati³. L'allergia alle arachidi (da ora indicata come AAr) rappresenta un importante problema di salute in tutto il mondo. Essa colpisce oltre l'1% della popolazione statunitense⁴. Reazioni avverse alle arachidi ed alla frutta secca sono spesso severe e persistono a lungo nella vita; tali alimenti, inoltre, sono responsabili, approssimativamente, dell'80% delle reazioni anafilattiche fatali o quasi fatali⁵.

Questa forma di allergia comporta un carico psicologico significativo sia per gli individui allergici che per i loro familiari⁶. Benché le conoscenze sulla AAr siano in continua evoluzione, allo stato attuale ancora non sono disponibili terapie in grado di prevenire o di risolvere l'affezione. Negli ultimi anni, inoltre, sono stati pubblicati numerosi studi volti a valutare i fattori responsabili

dell'aumentata prevalenza, gli effetti della processazione di tale alimento ed i risultati della immunoterapia orale.

Prevalenza

Studi sulla prevalenza dell'AAr nei bambini ne registrano un drammatico incremento. Nel Regno Unito, tra il 1989 ed il 1996, la prevalenza di AAr nella popolazione pediatrica è raddoppiata, passando dallo 0,5 all'1%⁷. Analogamente, studi condotti negli USA, hanno dimostrato un aumento dallo 0,4 allo 0,8% nel periodo compreso tra il 1997 ed il 2002⁸.

I registri sulle anafilassi fatali da alimento vedono le arachidi implicate, quali fattori trigger, nel 59% delle morti negli Stati Uniti e nel 19% dei decessi nel Regno Unito⁹. Studi epidemiologici hanno dimostrato che la frequenza della AAr nei paesi asiatici è minore rispetto ai paesi occidentali. Inoltre, in termini di severità clinica, le anafilassi da arachide risultano essere molto più rare in Asia, laddove sia la prevalenza che la severità della AAr è minore che nelle altre parti del mondo¹⁰.

Benché i ricercatori continuino ad esplorare i fattori responsabili dello sviluppo della AAr, nessuno di essi è stato finora confermato. Alcuni di questi fattori sono strettamente correlati all'alimento stesso, quali la quantità consumata o la processazione del cibo; altri, hanno valutato l'influenza della dieta materna in gravidanza o durante l'allattamento, l'ipotesi igienica, l'esposizione alla luce solare e la vitamina D, l'uso di antiacidi o il contatto con le proteine allergizzanti attraverso vie alternative a quella orale. L'eliminazione degli allergeni alimentari, compreso le arachidi, durante la gravidanza, l'allattamento e la prima infanzia, ha decisamente fallito l'obiettivo di prevenire lo sviluppo dell'Allergia Alimentare IgE-mediata¹¹.

Sicherer et al.¹² hanno effettuato uno studio retrospettivo, caso-controllo (benché dagli AA definito di coorte longitudinale), il cui obiettivo è quello di identificare i fattori associati con la sensibilizzazione alle arachidi. Sono stati valutati 503 bambini di età compresa tra 3-15 mesi (età media 9,4 mesi) con una probabile Allergia alle Proteine del Latte Vaccino (APLV) o Allergia alle Proteine dell'Uovo (APU) e senza una precedente diagnosi di AAr. 140 bambini (27,8%) hanno mostrato un valore di IgE-specifiche per arachide (IgEs) ≥ 5 kUA/L, valore che, arbitrariamente, gli AA definiscono fortemente indicativo di AAr. L'analisi multivariata ha dimostrato che il consumo frequente di arachidi durante la gravidanza rappresenta il principale fattore associato ad una sensibilizzazione alle arachidi con valori di IgEs ≥ 5 kUA/L (OR = 2,93 CI 95% 1,76-4,88). Tale associazione si

conferma anche nei 71 bambini non allattati al seno (OR = 4,99 CI 95% 1,69-14,74 p < 0,004).

Du Toit et al.¹³ hanno valutato la diversa prevalenza della AAr tra popolazioni geneticamente simili ma geograficamente distanti, quali gli ebrei residenti in Inghilterra ed in Israele. In quest'ultimo paese i bambini introducono l'alimento precocemente e ne consumano in grande quantità (7,1 gr/mese di proteine dell'arachide tra gli 8-14 mesi di vita rispetto agli 0 gr dei bambini britannici). La prevalenza della AAr in Gran Bretagna è 1,85%, 10 volte più elevata che in Israele, dove è pari a 0,17% (P < ,001). La differenza non è attribuibile a diversità in classe sociale, corredo genetico, concomitanti malattie atopiche (asma, eczema, rinite o altro) e grado di allergenicità delle arachidi. Gli AA suggeriscono che la più bassa prevalenza sia dovuta alla precoce introduzione ed al più elevato consumo di arachidi nei primi anni di vita.

Fox et al.¹⁴, partendo dalla dimostrazione che la maggior parte dei bambini con AAr reagiscono alla prima introduzione orale dell'alimento, hanno condotto uno studio retrospettivo il quale ha suggerito che l'esposizione alle arachidi attraverso una via alternativa a quella orale sia responsabile di sensibilizzazione, mentre l'esposizione orale precoce possa facilitare la tolleranza. Nessun effetto è stato osservato circa il consumo materno di arachidi durante la gravidanza o l'allattamento, a supporto ulteriore dell'ipotesi che la sensibilizzazione possa essere il risultato della precoce esposizione ambientale.

Il trial controllato multicentrico attualmente in corso, "**Learning Early About Peanut Allergy**" (LEAP study), finalizzato ad esplorare se la precoce introduzione di alte dosi di proteine delle arachidi in lattanti ad alto rischio sia più efficace rispetto all'evitamento, potrà dare risposta a tali importanti quesiti¹⁵.

Sono molti i fattori genetici ed ambientali responsabili delle caratteristiche epidemiologiche della AAr¹⁶. Generalmente si ritiene che le discrepanze riscontrate nella AAr tra Paesi occidentali ed Asiatici sia la conseguenza dei differenti metodi di cottura che intervengono sull'allergenicità dell'alimento^{17 18}. È stato, infatti, dimostrato che la tostatura ad alta temperatura, favorendo la reazione di Maillard, aumenta l'allergenicità, il che può rendere conto della differente prevalenza della AAr osservata negli Stati Uniti ed in Cina¹⁸.

Vereda et al.¹⁹ hanno condotto, recentemente, uno studio, il cui obiettivo era quello di descrivere le caratteristiche cliniche ed immunologiche di pazienti con AAr provenienti da tre diversi Paesi (Spagna, Stati Uniti e Svezia), usando l'approccio della Component Resolved Diagnosis (CRD). Sono state innanzitutto riscontrate differenze nell'età di esordio, in quanto i pazienti spagnoli e

svedesi iniziano a manifestare sintomi di AAr intorno ai 2 anni di vita, mentre i bambini americani intorno ad 1 anno di età, confermando così quanto già riportato da altri studi²⁰. Tra i diversi fattori responsabili di questo dato, particolare importanza rivestono le differenti modalità di esposizione alle arachidi: ad esempio, i bambini americani consumano burro di arachide molto più precocemente rispetto a quelli spagnoli e svedesi.

Una storia personale di atopica, come pure una storia familiare di AAr, può incrementare il rischio individuale di sviluppare AAr. Studi in gemelli hanno dimostrato che il rischio di AAr è fortemente ereditabile. Qualora vi sia un fratello con AAr, il rischio di un secondo figlio affetto è del 64% per gemelli monozigoti e del 7% per gemelli dizigoti e per gli altri fratelli, comparato con l'1% che è, approssimativamente, il rischio della popolazione generale²¹.

Caratterizzazione degli allergeni delle arachidi

Allo stato attuale sono stati caratterizzati, dal punto di vista molecolare, 11 allergeni delle arachidi, classificati in differenti superfamiglie e famiglie² (Tab. I).

Alla **superfamiglia delle Cupine** appartengono proteine di deposito con differente coefficiente di sedimentazione:

- **Ara h1**, è una proteina di deposito appartenente alla famiglia delle **7S viciline**; rappresenta il 12-20% delle proteine totali contenute nelle arachidi^{22 23}; la sensibilizzazione allergica ad Ara h1 si riscontra nel 63-90% degli allergici e conferisce un rischio elevato di anafilassi. Rappresenta, pertanto, un allergene maggiore ed è la proteina delle arachidi più studiata. Essa risulta coinvolta in numerose cross-reazioni con altri legumi, principalmente con Len c1 (vicillina della lenticchia), Pis s1 (vicillina del pisello), β -conglucina della soia, Jug r2 (vicillina della noce), Ana a1 (vicillina dell'anacardo) e Cor a11 (vicillina della nocciola). Queste cross reattività sono anche responsabili di numerosi falsi positivi. Ara h1 è resistente al calore e alla digestione gastrica.
- **Ara h3** e **Ara h4** sono proteine di deposito appartenenti alla famiglia delle **11S legumine**, probabilmente 2 isomeri dello stesso allergene, riscontrati in oltre il 50% degli allergici alle arachidi. Ara h3 resiste a temperature che vanno da 70 a 92°C, tuttavia, il legame con le IgE è pepsina-labile per cui probabilmente non è in grado di sensibilizzare attraverso il tratto gastrointestinale e, conseguentemente, di causare effetti sistemici²⁴. Due dei 4 epitopi di Ara h3 sono molto simili a quelli della glicina G1 della soia, altro allergene che appartiene alle SSP delle

Tab. I. Caratterizzazione molecolare degli allergeni delle arachidi.

Superfamiglia	Famiglia	Allergene	Isoallergene	PM	Punto isoelettrico	Prevalenza	Cross-reattività		
CUPINE	7S Viciline globulina	Ara h1	Ara h 1.0101	63.5 - 64	4.55	>90%	Len c 1 Pis s 1 Conglicina della Soia Jug r 2 Ana a 1 Cor a 11		
	11S Legumine globulina	Ara h3 Ara h 4	Ara h 3.9101 Ara h 4.0101	60 60	5.5 5.5	>50% >50%	-		
PROLAMINE	Conglutine 2S albumine	Ara h 2	Ara h 2.0101 Ara h 2.0201	16.7 - 18 14.5	5.2 5	>90%	Mandorla, noce brasiliana, Ara h6		
		Ara h 6 Ara h 7	Ara h 6.0101 Ara h 7.0101 Ara h 7.0201	15.8	5.6	38% 43%			
		nsLTPs*	Ara h 9	Ara h 9.0101 Ara h 9.0201	9.8	8.9		45.2%	Pru p 3
		Profiline	Ara h 5	Ara h 5.0101	15	4.6		13%	Pru av4 Pyr c 4 Api g 4
	PRs**	Ara h 8 (o PR-10)	Ara h 8.0101 Ara h 8.0201	17	5	70%	Bet v 1		
	Oleosine	Ara h 10 Ara h 11	Ara h 10.0101 Ara h 10.0102 Ara h 11.0101	14 - 16	9.6-9.8	21%	Oleosina della soia		

*Non specific Lipid transfer proteins;

**Pathogenesis-Related Proteins

leguminose, con cui condivide le stesse caratteristiche di resistenza al calore ma non alla digestione peptica²⁵.

Alla **superfamiglia delle Prolamine** appartengono le 2S albumine o conglutine e le Nonspecific Lipid Transfer Proteins (nsLTPs).

Ara h2, **Ara h6** ed **Ara h7** sono SSP, appartenenti alla famiglia delle **2S albumine** o **conglutine**, eterodimeri composti da due catene polipeptidiche legate da ponti disolfuro, che possono mostrarsi anche sotto forme monomeriche²⁶.

- **Ara h 2** è una glicoproteina di 16,7-18 KDa, inizialmente riscontrata in estratti di arachide crudo e considerata essere il maggior allergene in conseguenza del dato che oltre il 90% dei sieri di pazienti sensibilizzati presenta IgE che la riconoscono. Questa proteina è stata identificata come l'allergene più potente delle arachidi, anche più di Ara h1, sicché una risposta IgE verso Ara h2 è predittiva di allergia clinica a tale alimento. Inoltre, è stata riconosciuta come l'allergene più importante nei bambini. Ara h2 è resistente al calore e alla digestione gastrica e la sensibilizzazione verso di essa conferisce un rischio elevato di anafilas-

si²⁷. Questo dato, tuttavia, è stato recentemente messo in discussione²⁸.

- **Ara h 6** è una 2S albumina di 14,5 KDa; la sensibilizzazione nei suoi confronti è stata riscontrata solo nel 38% degli allergici. Insieme ad Ara h2, con cui cross-reagisce, è considerato il maggior allergene nei bambini²⁷.
- **Ara h7**, è una proteina di deposito contenuta in piccole quantità nelle arachidi (0,5% del contenuto proteico totale) ed è stata poco studiata pur essendo riconosciuta nel 43% dei sieri di soggetti sensibilizzati²⁸. **Nonspecific Lipid Transfer Proteins (nsLTPs):** sono proteine deputate al trasporto di fosfolipidi ed acidi grassi tra le membrane cellulari. Sono presenti in vegetali, frutta fresca, secca e semi, ma possono riscontrarsi anche nei pollini. Le nsLTPs sono allergeni responsabili di manifestazioni severe, soprattutto quelle della pesca (Pru p3), della ciliegia (Pru av3), della mela (Mal d3) e della nocciola (Cor a8).
- **Ara h9** rappresenta la LTP dell'arachide; è una proteina di 9,8 kDa sulla quale sono stati pubblicati pochi studi, nonostante l'elevata allergenicità. La prima evidenza di Ara h9 come proteina immunologicamente

reattiva si deve ad Asero et al.²⁹ e la conferma è attribuibile a Krause et al.³⁰. Si tratta, probabilmente, dell'allergene più importante nella popolazione mediterranea e, quindi, anche italiana, atto ad identificare i pazienti con allergia all'arachide maggiormente a rischio di anafilassi.

Alla **famiglia delle Profiline** appartengono proteine altamente conservate presenti nei pollini ed in un'ampia varietà di alimenti. Esse mostrano una elevata omologia di sequenza, principalmente a livello dei domini N e C-terminali. Benché le profiline siano monomeri, sono state riportate alcune volte forme oligomeriche.

- **Ara h 5** è una proteina di 15 kDa in grado di evocare una reazione di ipersensibilità nel 13% dei pazienti. Viene considerata pertanto un allergene minore ed è stata molto meno studiata rispetto ad altri allergeni delle arachidi. Per quanto riguarda la cross-reattività, è stata dimostrata con Pru av4 (profilina della ciliegia), Pyr c4 (profilina della pera) e Api g4 (profilina del sedano)³¹.

Le **Pathogenesis-Related Proteins (PRs)** costituiscono una **famiglia proteica** con diverse attività enzimatiche, indotte da situazioni di stress e da infezioni fungine, batteriche, parassitarie o virali. Alcune di queste proteine funzionano da allergeni.

- **Ara h8**, è una proteina di 17 kDa, appartenente alla famiglia delle PR-10, parzialmente degradabile con il calore, con la processazione industriale e la digestione peptica. Essa presenta elevata cross-reattività con l'omologo della betulla Bet v1 e, per questa ragione, rappresenta il maggior allergene in pazienti allergici alle arachidi con associata pollinosi da betulla³². Solo eccezionalmente l'allergia ad Ara h8 può determinare reazioni anafilattiche.

Le **oleosine** costituiscono una **famiglia** di proteine alcaline, di basso PM (14-26 kDa) che rivestono i corpi oleosi dei semi.

- **Ara h10 e 11** sono isoallergeni appartenenti alla famiglia delle oleosine. Lo studio di Pons et al.³³ ha riportato la prima evidenza che l'oleosina delle arachidi, di 18 kDa, può reagire con le IgE sieriche di soggetti con allergia verso quest'alimento. L'oleosina, inoltre, potrebbe essere coinvolta in alcune cross-reazioni tra arachidi e soia.

Il profilo allergologico mostrato dai bambini dei diversi paesi è estremamente diverso e peculiare. Ad esempio rAra h 2 rappresenta l'allergene maggiormente responsabile di AAr negli Stati Uniti e quindi un utile candidato per la diagnosi, mentre solo il 42% dei pazienti spagnoli con AAr presenta positività per tale allergene. Diverso è il caso della Svezia dove vi è una maggiore sensibilità

per rAra h8, analogo del Bet v 1, probabilmente a causa della maggiore esposizione alla Betulla in questo Paese. Non a caso i pazienti svedesi mostrano una maggiore frequenza di sintomi allergici con i vegetali Bet v 1 correlati quali nocciole, mele e carote. La reale responsabilità di rAra h8 nel determinare i sintomi allergici è comunque ancora da dimostrare in quanto i pazienti svedesi presentano anche una polisensibilizzazione verso gli antigeni rAra h1, rAra h2 o rAra h3. Al contrario, il 60% dei pazienti provenienti dalla Spagna, sono sensibilizzati nei confronti dell'allergene rAra h9 ed un 60% di questi sono monosensibili per quest'antigene che gioca un ruolo fondamentale nella AAr del bacino del Mediterraneo. Tale positività si riscontra rispettivamente nel 2% e nel 14,3% dei bambini americani e spagnoli¹⁹.

Ci può essere anche un alto grado di cross-reattività tra le arachidi ed altre proteine vegetali, attraverso un meccanismo IgE-mediato³⁴. Essendo l'arachide un legume, condivide proteine omologhe con altri membri appartenenti alla famiglia delle leguminose come piselli, fagioli, carrube, ceci, trifoglio, lupini e lenticchie¹⁹. Alcuni studi hanno dimostrato che dal 38% al 79% degli individui con reazioni cliniche ad un unico legume mostrano IgE positive per le altre leguminose anche se solo il 5% dei pazienti con allergia alle arachidi presenta un test di provocazione orale positivo per altri legumi³⁴. Un'apprezzabile cross-reattività vi è anche tra le arachidi e la frutta a guscio con un tasso di co-allergia che arriva fino al 2,5%²⁰. Anche se la cross-reattività è stata nella maggior parte dei casi documentata dai test in vitro, e di solito non provoca gravi sintomi clinici, i pazienti con allergia alle arachidi dovrebbero essere consapevoli di tale rischio³⁴.

Meccanismi patogenetici

Il meccanismo immunitario che sottende la risposta verso le proteine delle arachidi non si discosta da quello che l'organismo mette in atto nei confronti di tutti gli allergeni alimentari e rappresenta il risultato di una complessa interazione tra l'alimento, da una parte, ed un gran numero di cellule effettrici ed i loro mediatori, dall'altra. La maggior parte delle reazioni allergiche acute nei confronti dei semi delle arachidi è dovuta al legame degli anticorpi IgE con gli specifici recettori ad alta affinità (FcεRI) espressi sulle mastcellule e sui basofili. I sintomi evidenti quali orticaria o angioedema, sono, spesso, la diretta conseguenza del legame tra le proteine delle arachidi e le IgEs adese alla superficie delle cellule effettrici. Tale interazione, antigene-specifica, stimola una serie di eventi che conducono al rilascio di mediatori cellulari

e citochine, quali istamina, prostaglandine, leucotrieni e fattori attivanti le piastrine ³⁶.

Altre evidenze supportano il ruolo centrale dei basofili, piuttosto che delle mastocellule, nell'AA IgE-mediata in quanto i basofili di pazienti con AA e Dermatite Atopica (AD) presentano un aumentato rilascio di istamina che ritorna ai valori normali dopo l'allontanamento dalla dieta dell'alimento in causa ³⁷. Inoltre, il tumor necrosis factor (TNF), l'interleukina-5 (IL-5) e le chemochine prodotte nel sito locale di reazione comportano il reclutamento e l'attivazione degli eosinofili ³⁸.

Le manifestazioni allergiche alimentari non sono solo dipendenti da una risposta umorale ma possono essere la diretta conseguenza di meccanismi cellulari implicati. Il primo impatto di un allergene alimentare, generalmente, si verifica a livello della superficie della mucosa del tratto gastro-intestinale. Si pensa che le proteine alimentari che siano catturate da cellule epiteliali specializzate, le cellule M, trasferite a speciali cellule dendritiche, le cellule presentanti l'antigene, e processate all'interno in frammenti peptidici presentati sulla superficie cellulare nel contesto delle molecole del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC) di classe II. I peptidi vengono presentati alle cellule naive T helper (Th) mediante l'interazione del complesso MHC/T cell receptor da cui derivano il priming e l'attivazione dei Th. Da qui hanno origine, a cascata, tutti gli eventi umorali e cellulari che conducono all'AAr. Nei soggetti a rischio di sviluppare malattie allergiche la stimolazione dei Th risulta in una attivazione di citochine che, a loro volta, stimolano i B linfociti a sintetizzare IgEs nei confronti delle proteine delle arachidi durante la fase di sensibilizzazione della risposta immune. I linfociti Th2 iniziano, pertanto, a produrre varie interleuchine, tra cui IL-4, IL-9, IL-5 e IL-13. Le proteine allergeniche delle arachidi, in soggetti affetti da AAr, stimolano i linfociti Th2, ma, in bambini che hanno superato la loro AAr e che, quindi, hanno acquisito la tolleranza verso l'alimento, le cellule stimulate sono i Th1, analogamente a quanto accade dopo stimolazione con antigeni alimentari non allergenici. L'osservazione che lo stesso alimento possa stimolare cellule Th con differenti fenotipi cellulari fa presupporre che i fattori legati all'ospite siano importanti e che la tolleranza alimentare in pazienti non atopici o la risoluzione dell'allergia alimentare negli atopici si realizzi allorché si sviluppa una risposta Th1 (IFN γ e TNF α elevati ed IL-4, IL-5 ed IL-13 basse). Lo switch verso una risposta Th2, osservato negli atopici, può manifestarsi precocemente nella vita quale risultato di una suscettibilità genetica e di una esposizione intrauterina ³⁹. Recentemente è stato dimostrato che mutazioni del gene della filaggrina con secondaria disfunzione della barriera

epiteliale sono associate significativamente ad AAr, il che indicherebbe un ruolo importante di tale difetto di barriera nella patogenesi dell'affezione ⁴⁰.

Manifestazioni cliniche

Le manifestazioni cliniche con cui l'AAr può presentarsi comprendono uno spettro di sintomi, mediati dalle IgE, che coinvolgono principalmente la cute ed il tratto gastrointestinale: orticaria, angioedema, prurito, nausea e vomito, dolori o crampi addominali e diarrea. Sintomi oculari e respiratori IgE-mediati spesso accompagnano i sintomi cutanei e gastrointestinali ma raramente ricorrono in maniera isolata ⁴¹⁻⁴³. L'anafilassi rappresenta la manifestazione IgE-mediata più severa, che implica un coinvolgimento multi-sistemico ⁴⁴⁻⁴⁵. È stata descritta, anche per l'arachide, l'anafilassi cibo-dipendente esercizio-indotta ⁴⁶.

L'età media della diagnosi di AAr nei bambini è, approssimativamente, di 14-18 mesi. I sintomi si manifestano dopo la prima ingestione di arachidi nel 75% di questi pazienti. La maggior parte delle reazioni iniziali coinvolgono la cute, approssimativamente una metà il tratto respiratorio ed un terzo il tratto gastrointestinale ⁴⁷. Nello studio di Sicherer ⁴⁸, nel 31% delle reazioni iniziali erano coinvolti due organi e nel 21% la reazione era sistemica.

I soggetti affetti da AAr, tipicamente, non presentano reazioni fatali alla prima ingestione e coloro che manifestano reazioni fatali o quasi-fatali, in genere, soffrono di asma ⁴⁶. È noto da tempo, infatti, che l'asma, soprattutto se scarsamente controllata, si associa all'esito fatale di una reazione allergica alimentare e che, viceversa, la copresenza di una allergia alle arachidi peggiora la gravità dell'asma nei bambini ⁴⁶. Solo il 5% dei pazienti presenta una monosensibilizzazione ⁴⁶.

La reazione allergica alle arachidi può essere precipitosa o manifestarsi da diversi secondi fino a 2 ore dopo l'esposizione. Più del 95% dei sintomi inizia entro 20 minuti dal contatto. Quantità estremamente piccole di proteine possono indurre sintomi soggettivi e oggettivi, molto meno di quante se ne trovano in un sola arachide che ha circa 200 mg di proteine. Sintomi soggettivi possono manifestarsi già con 100 mcg di proteine, mentre sintomi oggettivi si manifestano con dosi di 2 mg. La reazione allergica può essere bifasica in 1/3 dei casi con ricorrenza dei sintomi 1-8 ore dopo la risoluzione delle manifestazioni iniziali ⁴⁶.

Rispetto ad altre forme di Allergia Alimentare, l'AAr è persistente; si risolve, infatti, solo nel 20% dei casi in età scolare ⁴⁹.

Processazione delle arachidi ed allergenicità

Studiare l'impatto della processazione sulle proprietà allergeniche degli alimenti risulta inevitabilmente difficile poiché il cibo, per sua natura, è alquanto complesso nella composizione. La manipolazione degli alimenti è comparsa precocemente, nella storia dell'uomo, quale mezzo efficace per la conservazione (essiccamento, affumicatura, marinatura, salatura, ecc.) ma anche come strumento per rendere il cibo commestibile, rimuovendo le tossine ed i fattori anti nutritivi. La maggior parte di questi procedimenti può alterare la struttura e le proprietà delle proteine alimentari secondo modalità ancora scarsamente definite, le quali possono influenzare la capacità di una data proteina di agire come allergene, di sensibilizzare un individuo o di evocare una reazione allergica⁵⁰.

Anche per le arachidi, sono stati condotti numerosi studi volti a valutare eventuali modifiche della allergenicità proteica, in conseguenza della applicazione di varie metodiche di processazione.

Koppelman et al. hanno isolato e purificato **Ara h1**, il principale allergene delle arachidi e, impiegando tecniche spettroscopiche e biochimiche, hanno, per primi, valutato i cambiamenti sulla struttura proteica indotti **dall'alta temperatura**. La struttura secondaria di Ara h1 è ad α -elica per il 31%, a struttura β per il 36% ed ha una struttura random coil, particolarmente termostabile, per il 33%. Ad una temperatura compresa tra 83 ed 87°C Ara h1 non subisce modifiche conformazionali nella struttura secondaria; pur tuttavia, al di sopra di 80°C si realizza una perdita di ellitticità per estesa aggregazione di materiale ed aumento della struttura β . Gli AA concludono che Ara h1 è un allergene termostabile anche quando c'è una piccola modifica della struttura⁵¹.

Lo studio di van Boxtel et al.⁵² ha valutato gli effetti del **trattamento termico, dell'acidificazione e della digestione peptica** sull'allergenicità di **Ara h3 e di Ara h1**. Il legame con le IgEs di **Ara h3** non varia con la processazione termica né con le variazioni di pH. La digestione peptica, invece, si completa, essenzialmente, nei primi 60 minuti e, portando alla formazione di peptidi di 9 kDa, annulla la capacità di legame con le IgEs. Il legame con le IgEs di **Ara h1** non varia, ugualmente, con la processazione termica, né con le variazioni di pH; la digestione peptica di Ara h1 si completa, tuttavia, in tempi più lunghi (dopo 10 minuti appare ancora inalterata) e conduce alla formazione di peptidi più grandi, di 28 kDa che conservano la capacità di legame con le IgEs. La conclusione degli AA è che Ara h3, essendo pepsina-labile, non è in grado di indurre sensibilizzazione attraverso il tratto

gastrointestinale e, pertanto, non può causare reazioni sistemiche. Ara h1, al contrario, è pepsina ed acido-resistente e, pertanto, può indurre reazioni sistemiche.

Nel 2011 Blanc et al. hanno condotto un interessante studio, volto a verificare se **la tostatura, la bollitura delle arachidi o la reazione di Maillard** siano in grado di modificare l'allergenicità di **Ara h1**, verso il quale il 55-95% dei pazienti allergici alle arachidi, è sensibilizzato.

Utilizzando sieri e cellule mononucleate periferiche di 35 pazienti allergici alle arachidi, gli AA hanno valutato gli effetti del trattamento termico sulla struttura allergenica e sulla capacità di legare le IgEs, sulla potenza nello stimolo al rilascio di istamina, sull'abilità di indurre la proliferazione T-cellulare e la produzione di citochine. Sottoposto a bollitura a 100°C per 15 minuti, H-Ara h1 subisce idrolisi, con perdita parziale della struttura secondaria e formazione di aggregati ramificati. Ciò comporta una ridotta capacità di legare le IgEs, confermata dall'aumento della IC₅₀, ossia la concentrazione di allergene in grado di inibire al 50%, quale competitore, il legame IgE/ ac anti-IgE o il rilascio di istamina e dalla compromessa capacità di indurre il rilascio dei mediatori, anche se in misura inferiore rispetto alla diminuzione del legame con le IgEs.

Ara h1 glicato, G-Ara h1, ottenuto mediante bollitura in presenza di glucosio, si comporta in maniera simile, formando, tuttavia, polipeptidi di massa maggiore (> 200 kDa) con aumento delle β -strutture intermolecolari e analogo produzione di aggregati proteici. Sia H-Ara h1 che G-Ara h1 conservano la reattività T-cellulare dell'antigene nativo N-Ara h1.

R-Ara h1, ottenuto mediante tostatura, mostra un elevato grado di denaturazione, riduzione delle strutture α -elica, aumento delle β -strutture e formazione di aggregati più globulari e compressi, di diametro minore (7-8 nm). R-Ara h1, dal punto di vista allergenico, si comporta come G-Ara h1.

In conclusione, gli aggregati di Ara h1 ottenuti con la bollitura sono morfologicamente distinti da quelli ottenuti con la tostatura ed hanno un'attività allergenica minore. La glicazione non ha alcun effetto addizionale sull'allergenicità di Ara h1, comparata con la sola cottura. Questi dati, associati a quelli già pubblicati sulla ridotta attività allergenica di Ara h2/Ara h6 con la bollitura, supportano l'ipotesi che tale mezzo di processazione sia in grado di ridurre l'allergenicità delle arachidi⁵³.

Vissers et al. hanno condotto uno studio²⁷ il cui obiettivo è quello di stabilire gli effetti del trattamento termico utilizzato nel processo **di tostatura** sull'allergenicità di **Ara h1** e di un mix delle 2S albumine delle arachidi, **Ara h2/6**.

Le proteine vengono purificate a partire da arachidi cru-

de, surgelate a -70°C , liofilizzate e sottoposte per 20 minuti a 145°C ("roasted") **in assenza o in presenza di glucosio**, per valutare il ruolo della reazione di Maillard; quindi, le proteine solubili vengono estratte. Si ottengono, pertanto, tre campioni:

- N (Native);
- R + g (roasted + glucosio);
- R - g (roasted senza glucosio).

I sieri ottenuti da 12 pazienti allergici alle arachidi, ben caratterizzati, vengono usati per valutare il legame degli allergeni con le IgE e la loro capacità di degranulare. Vengono testate 4 diluizioni di siero (1:20-30-40-50) per 3 concentrazioni di estratto di arachide (0,01, 0,1 e -1 $\mu\text{g/ml}$).

La popolazione di controllo non è precisata né per numero, né per età. Si tratta, comunque, di soggetti non allergici, privi di IgEs sieriche.

Lo studio dimostra che il riscaldamento a bassa umidità causa idrolisi sia di Ara h 1 che di Ara h2/6. Tuttavia, al contrario di Ara h 2/6, Ara h1 solubile R + g forma aggregati più ampi. La capacità di legare le IgE di Ara h1 è diminuita dalla cottura di 9.000 volte per R+g e di 3,6 volte per R-g; tuttavia, comparata con N Ara h1, la loro capacità di indurre il rilascio dei mediatori è aumentata. La capacità di legare le IgE di Ara h 2/6 è ugualmente diminuita dalla cottura, di 22 volte per R+g e di 600-700 volte per R-g. Anche la capacità di degranulazione è ridotta. La presenza di glucosio, durante la cottura, modera significativamente questa riduzione.

Tali osservazioni possono avere importanti implicazioni sulla **Component Resolved Diagnosis (CRD)** e dimostrano l'importanza di valutare l'effetto della processazione non solo sul legame IgE ma anche sulla capacità di degranulazione.

I risultati di questo studio sono limitati alle proteine testate ma, pur rappresentando un utile contributo, certamente la CRD non è in grado di sostituire il gold standard per la diagnosi, rappresentato dal Test di Provocazione Orale (TPO).

Lo stesso gruppo di Vissers, sempre nel 2011, ha condotto un ulteriore studio per valutare l'effetto del **riscaldamento e della glicazione** sulla allergenicità delle 2 S albumine delle arachidi.

Ara h2/6 vengono purificate da arachidi non tostate e conservate a -20°C (N-Ara h2/6); quindi, vengono riscaldate per 15' a 110°C (H-Ara h2/6) in assenza o in presenza di glucosio (G-Ara h2/6).

Usando cellule mononucleate provenienti dal sangue periferico ed i sieri di pazienti allergici alle arachidi, vengono valutate la potenza proliferativa cellulare, la reattività IgE e la capacità di degranulazione dei basofili. N-Ara h 2/6 presentano una struttura α -elica monome-

rica (16 KDa). Il riscaldamento a 110°C risulta in una estesa degranulazione, nell'idrolisi e nell'aggregazione proteica: si formano oligomeri e solo il 20% resta con una struttura monomerica. Benché non venga osservato alcun effetto della processazione sulla reattività T-cellulare, il calore riduce la reattività IgE e, di conseguenza, la funzionalità di Ara h 2/6. Al contrario, R-Ara h 2/6 conservano la struttura, la reattività e la funzionalità di N-Ara h2/6 il che spiega la potenza allergenica di queste proteine ⁵⁴.

Uno studio molto recente ha indagato l'influenza **dell'idrolisi enzimatica** sull'allergenicità dell'estratto proteico di arachidi tostate. L'idrolisi viene ottenuta con l'impiego di 2 enzimi per alimenti, una **endoproteasi (Alcalase) ed una esoproteasi (Flavourzyme)** e si valuta l'immunoreattività verso l'estratto ed i campioni di idrolisi. I risultati dell'immunoblot e dell'ELISA mostrano una importante riduzione della reattività IgE di **Ara h1, Ara h2 ed Ara h3** nei primi 30 minuti di idrolisi con Alcalase. Al contrario, il trattamento con Flavourzyme causa un incremento della reattività IgE determinata con ELISA dopo 30 minuti e conduce ad una inibizione della reattività IgE del 65% alla fine dell'esame (300 minuti).

Pertanto, l'idrolisi con endoproteasi è in grado di ridurre la reattività IgE della frazione proteica solubile di arachidi tostate maggiormente rispetto all'idrolisi con esoproteasi ⁵⁵.

È noto che abitudini alimentari locali e metodi di cottura possono influenzare la prevalenza dei vari tipi di AA; partendo da questo assunto, Kim et al. hanno voluto valutare gli effetti di diverse condizioni di **pH** sui principali allergeni delle arachidi per spiegare la bassa prevalenza delle AAr in Corea. Le arachidi vengono impregnate per una notte intera in aceto commerciale (pH = 2,3) o in soluzioni di acido acetico a pH 1,0, 3,0 e 5,0. Estratti di proteine del siero di sette pazienti con livelli di IgEs per le arachidi > 15 KUA/L vengono analizzati mediante SDS-PAGE e, tramite densitometro, viene quantificata l'allergenicità di ogni proteina. Lo studio dimostra che l'allergenicità di **Ara h1** viene ridotta dal trattamento con acido acetico a pH, 3,0 o 5,0 e non è più rilevabile dopo trattamento a pH = 1,0 e con aceto commerciale.

Ara h2 resta sostanzialmente invariato dopo trattamento con acido acetico a pH = 5,0 e diminuisce dopo trattamento con pH 1,0, 2,5 e 3,0. L'allergenicità di **Ara h3 ed Ara h6** resta invariata a pH = 3 e 5 e diminuisce dopo trattamento con acido acetico a pH = 1,0 o aceto commerciale. L'intensità del legame delle IgE con Ara h1, Ara h2 ed Ara h3, risulta significativamente ridotto dopo il trattamento con acido acetico a pH 1,0 e 3,0 o con aceto commerciale. Questi dati suggeriscono che il trattamento con acido acetico a diversi valori di pH in-

fluenza l'allergenicità delle arachidi e giustifica la bassa frequenza di AAr in Corea, laddove le arachidi vengono abitualmente trattate con aceto comune ⁵⁶.

Kim ha ulteriormente valutato la risposta IgE verso Ara h2, considerato il maggior allergene delle arachidi in bambini coreani, in relazione a vari gradi e tipi di cottura, con l'obiettivo di verificare se la diversa prevalenza ed il differente grado di severità della AAr tra Paesi Occidentali ed Asia potesse essere giustificato dai metodi di processazione impiegati. Estratti di arachidi tostate sono state incubate con campioni di siero di 42 bambini con livelli di IgEs > o = 15 kUA/L per valutare il legame con Ara h1, Ara h2 ed Ara h3. La gravità clinica è determinata con uno score variabile da 0 a 5. È stata valutata la reattività di un pool sierico di 7 pazienti verso estratti allergenici di proteine rispettivamente bollite, tostate, fritte e in salamoia. La maggior parte dei campioni sierici reagiscono con Ara h1 (76,2%) ed Ara h3 (78,6%) delle arachidi crude, mentre solo il 53% dei pazienti ha IgEs verso Ara h2. Il legame con Ara h1 scompare con la frittura o l'acidificazione, diminuisce con la bollitura, aumenta con la tostatura. Il legame delle IgE con Ara h2 è prevalente in pazienti con reazioni più gravi. Non è in relazione alla quantità, aumenta con la tostatura, mentre si riduce significativamente dopo trattamento con acido acetico. Il legame delle IgE con Ara h3 non cambia o aumenta con ogni tipo di cottura, mentre è praticamente assente con l'acidificazione.

Gli AA concludono che Ara h2 è un importante allergene, in grado di predire i sintomi clinici, ma nei bambini coreani è meno presente che in quelli occidentali. Questi dati possono essere attribuiti in parte ai differenti metodi di cottura ed alle diverse abitudini dietetiche nei vari paesi ⁵⁷.

Diagnosi

La diagnosi di AAr deve essere posta correttamente considerato che essa implica importanti conseguenze sul piano dietetico e della qualità della vita dei pazienti ⁵⁸. L'anamnesi deve rappresentare sempre il punto di partenza per determinare se una particolare reazione avversa sia correlabile ad AAr. Aspetti chiave della storia clinica sono rappresentati dall'intervallo di tempo compreso tra l'esposizione e l'inizio dei sintomi, le manifestazioni cliniche della reazione, la durata dei sintomi, la risposta al trattamento d'emergenza e la ricorrenza della reazione all'esposizione verso l'alimento in questione ⁵⁹. Ci sono casi in cui la storia clinica è chiara di per sé e, pertanto, il ruolo dei test diagnostici è soprattutto quello di effettuare una valutazione quantitativa basale per la successiva

sorveglianza del paziente allergico. Tuttavia, allorché la storia è meno chiara, i test possono essere utili per svelare una possibile sottostante allergia.

Le scelte che si offrono al clinico sono rappresentate dagli **Skin Prick Tests (SPTs)** con estratto di arachide commercialmente disponibile ed i **Prick by Prick (PbP)** con arachidi fresche o burro di arachidi, oppure la determinazione di **IgE-specifiche (IgEs)** per arachidi mediante ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Sweden).

Occorre ribadire il concetto che la presenza di uno SPT/PbP positivo o di IgEs per arachidi non indica che il soggetto avrà certamente una reazione quando mangerà l'alimento ^{59 60}, specie in bambini con dermatite atopica ⁶⁰. Il gold standard per la diagnosi, come per le altre forme di AA, è costituito dal **Test di Provocazione Orale (TPO)** eseguito in doppio cieco contro placebo (DBPCFC). Nella pratica clinica, tuttavia, ci si può accontentare di un TPO in aperto o in singolo cieco (SBOFC) ⁵⁹.

Numerosi studi hanno cercato di determinare il valore diagnostico sia degli SPTs che delle IgEs per arachidi.

Sporik et al. ⁶¹ hanno effettuato SPTs e TPO per arachidi a 92 bambini, il 20% dei quali aveva meno di 2 anni di età. In questa coorte, un diametro medio del pomfo ≥ 8 mm in bambini di età superiore ai 2 anni corrisponde ad un Valore Predittivo Positivo (VPP) del 100%. Wainstein et al. ⁶² hanno eseguito uno studio simile dimostrando che nessun bambino con un diametro medio del pomfo ≥ 15 mm aveva un TPO negativo; il VPP di un diametro medio ≥ 8 mm è, in questo lavoro, del 78%. Tali differenze nel VPP di analoghe determinazioni di SPTs dimostrano l'importante limitazione di questa indagine nel predire l'esito del TPO, correlata soprattutto alla differente prevalenza della AAr, sicuramente più bassa nella popolazione generale rispetto alle coorti dei due studi citati, provenienti entrambe da centri allergologici di terzo livello.

Maaloney et al. ⁶³ hanno valutato l'utilità del dosaggio delle IgEs (ImmunoCAP) per arachidi, oltre che per frutta secca e semi, nella diagnosi di allergia verso questi alimenti. Sono stati arruolati 324 pazienti, di età compresa tra 2,4 mesi e 40,2 anni (media 6,1 anni) con storia di AAr e di allergia a frutta secca e semi. La diagnosi viene posta sulla base della storia clinica e della presenza di IgEs, Skin Prick test o entrambi. La maggior parte degli arruolati (il numero non è definito) non ha mai effettuato TPO per conferma della diagnosi. I soggetti vengono classificati sulla base della storia clinica e degli esami in:

- pazienti con diagnosi positiva per allergia;
- pazienti con diagnosi negativa per allergia;
- pazienti con diagnosi inconclusiva, qualora, indipendentemente dalla storia clinica e dal risultato dei tests, siano in grado di tollerare gli alimenti.

A tutti i soggetti arruolati vengono determinate le IgEs e, mediante modelli di regressione logistica, vengono calcolate curve logaritmiche che, a seconda dei valori di sensibilità delle IgEs, permettono di ottenere una diagnosi di Allergia Alimentare (AA) con una probabilità compresa tra il 90 ed il 95%. Per quanto riguarda le arachidi, un valore di 13 kUA/L quale decision point, ha una sensibilità del 60%, una specificità del 96%, un VPP del 99% ed un VPN del 35%.

Il limite più grande di questo studio è che l'arruolamento non viene effettuato sulla base di un TPO e, pertanto, non si è certi che la popolazione inclusa sia costituita realmente da soggetti allergici. La ricerca delle IgEs è stata eseguita a pazienti che hanno una espressività varia dell'AAr ed inoltre i risultati dei pazienti con diagnosi inconclusiva sono stati esclusi dai calcoli finali. Dallo studio risulta comunque che, per valori di IgEs per arachide molto bassi, viene riportata ugualmente una probabilità di reazione clinica elevata.

Lo studio di Johannsen et al.⁶⁴ si pone l'obiettivo di determinare l'utilità degli SPTs e delle IgEs per arachidi misurate con fluorescent-enzyme-immunoassays (FEIA) nell'identificare sia i soggetti con AAr che i tolleranti in una popolazione di sensibilizzati in età prescolare. Vengono arruolati 49 bambini di età inferiore ai 5 anni, sensibilizzati verso le arachidi (SPT ≥ 2 mm o IgEs $\geq 0,35$ kUA/L) ma con reattività clinica sconosciuta per non aver mai assunto l'alimento, i quali sono sottoposti a TPO in aperto fino a raggiungere una dose totale di 11g. 24/49 bambini, pari al 49%, presenta un challenge positivo, definito come la presenza di una reazione IgE-mediata durante le 2 ore di osservazione. Uno SPT > 7 mm corrisponde ad una sensibilità dell'83% e ad un VPN dell'84%. Un valore di IgEs > 2 kUA/L mostra una sensibilità del 79% ed un VPN dell'80%. La combinazione dei due risultati incrementa la sensibilità del 96% ed il VPN del 95%, con una probabilità solo del 5% di fallire un TPO.

Gli AA concludono che almeno la metà dei pazienti sensibilizzati e senza una storia di precedente ingestione di arachidi è in grado di tollerare l'alimento.

Il limite maggiore di questo studio è la mancanza di un gruppo di controllo di pazienti non sensibilizzati alle arachidi; inoltre, la popolazione arruolata è altamente selezionata e non corrisponde certamente alla popolazione generale. Nonostante tali limitazioni, i risultati dello studio hanno delle significative implicazioni nella pratica clinica; infatti gli SPTs e la determinazione delle IgEs possono aiutare ad identificare quel sottogruppo di pazienti che presenta una maggior probabilità di avere un TPO negativo, ovvero di tollerare l'alimento.

In genere i metodi diagnostici (SPTs ed IgEs) sono prodotti a partire da estratti naturali che contengono sia molecole allergeniche che non allergeniche. La composizione dell'estratto dipende dalla provenienza del materiale fresco e dalle procedure di estrazione, purificazione e conservazione. Ciò porta ad un elevato grado di variabilità ed alla difficoltà di standardizzazione. La costituzione di allergeni ricombinanti, al contrario, comporta la produzione di reagenti standardizzati, biochimicamente caratterizzati e che possono essere prodotti su larga scala.

Astier et al.⁶⁵ hanno realizzato uno studio volto a valutare il VPP degli SPTs usando non l'estratto naturale del commercio, bensì i tre maggiori ricombinanti allergenici delle arachidi, Ara h1, Ara h2 ed Ara h3 in una popolazione costituita da 30 pazienti allergici alle arachidi e 30 controlli senza AA. Ai pazienti vengono determinate anche le IgEs per arachidi con metodo ELISA. Tutti i pazienti con AAr mostrano SPT positivi per rAra h2; 40% reagiscono ad rAra h1 e 27% ad rAra h3. Nessun soggetto di controllo reagisce verso qualche allergene ricombinante. La monosensibilizzazione verso rAra h2 si osserva nel 53% dei pazienti; il diametro medio del pomfo ed il valore delle IgEs non risultano correlati alla gravità della malattia; tuttavia, i pazienti con monosensibilizzazione verso rAra h2 presentano uno score di severità della malattia significativamente più basso rispetto ai polisensibilizzati ed un più basso livello di IgEs verso estratto di arachide e verso rAra h2. Gli AA concludono che gli SPTs verso gli allergeni ricombinanti appaiono essere sicuri ed un efficace test diagnostico. La co-sensibilizzazione verso rAra h1, rAra h2 ed rAra h3 è predittiva delle reazioni più gravi.

Lo studio di Astier, tuttavia, presenta dei bias metodologici. Allorquando si valuta il valore diagnostico di un test, nel nostro caso gli SPTs con allergeni ricombinanti, occorre un confronto in cieco con il gold standard per la diagnosi, rappresentato dal TPO. DBPCFC è stato eseguito solo in 18 dei 30 pazienti definiti "allergici" ed in nessuno dei 30 controlli definiti "non allergici alle arachidi". I risultati del test, pertanto, non essendo correlati al gold standard, non sono in grado di condizionare la decisione se eseguire o meno il TPO, mancando i dati di sensibilità, specificità, VPP, Valore Predittivo Negativo (VPN) e Rapporto di Verosimiglianza (RV).

Nicolaou et al.⁶⁶ hanno condotto uno studio il cui obiettivo è stabilire l'utilità della CRD nella diagnosi di AAr. In una coorte di 933 bambini (popolazione non selezionata arruolata alla nascita, c.d. coorte MAAS, Manchester Asthma and Allergy Study), all'età di 8 anni vengono identificati, mediante SPTs e la ricerca delle IgEs, 110 bambini (11,8%) sensibilizzati alle arachidi. Di questi, 19 non vengono sottoposti a challenge (17 per mancan-

za di consenso); dodici, con una storia convincente di reazione alla esposizione e con IgEs ≥ 15 kUA/L e/o SPTs ≥ 8 mm vengono definiti allergici senza eseguire TPO. Dei rimanenti 79, 45 sono sottoposti a challenge in aperto e 34 a DBPCFC; 7 bambini mostrano ≥ 2 sintomi obiettivi al challenge e vengono etichettati affetti da AAr; 66 bambini, con challenge negativo, sono definiti tolleranti; per 6 bambini il TPO è considerato inconcludente. La prevalenza della AAr tra i bambini sensibilizzati viene stimata essere del 22,4% (95% CI, 14,8-32,3%). Usando la CRD per i principali allergeni delle arachidi, Ara h1, Ara h2, Ara h3 ed Ara h8, si riscontrano importanti differenze nel pattern allergologico tra i bambini con AAr (i 17 arruolati nella coorte + 12 bambini reclutati ex novo negli ospedali locali) ed i tolleranti (52 dei 66, poiché 14 non acconsentono al prelievo ematico). Ara h2 risulta il più importante predittore di AAr. Gli AA concludono che la maggioranza dei bambini sensibilizzati alle arachidi non sono affetti da AAr; la CRD può essere uno strumento utile per porre diagnosi di allergia clinica. Lo studio presenta alcuni errori metodologici: DBPCFC è stato eseguito in meno della metà dei pazienti e dei 29 definiti allergici, solo in 7 è stato effettuato ed in aperto. Inoltre, il test indice, nel nostro caso la CRD, è stata determinata solo dopo l'esecuzione del gold standard. In conclusione lo studio non consente una valutazione chiara dell'utilità della CRD nella diagnosi di AAr, sia perché non è stato effettuato in tutti i pazienti il confronto con il gold standard, sia perché i risultati non vengono espressi con i valori di sensibilità, specificità, VPP, VPN, RV, ma con il Random Forest Model.

Analogo obiettivo si sono posti Codreanu et al.⁶⁷ con uno studio volto a verificare il valore diagnostico di un set di tests in vitro costituito dalle IgEs per estratto di arachide e per gli antigeni ricombinanti Ara h1, Ara h2, Ara h3, Ara h6, Ara h7 ed Ara h8. I pazienti arruolati sono suddivisi in tre gruppi:

- 166 etichettati affetti da AAr;
- 61 sensibilizzati ai pollini ma senza AAr;
- 10 soggetti di controllo, senza alcuna manifestazione atopica.

Il 79% dei pazienti del secondo gruppo sono risultati sensibilizzati alle arachidi, pur tollerandole. Al contrario, nei soggetti del primo gruppo, combinando i risultati delle IgEs per estratto di arachide ed Ara h2 /Ara h6, si è riscontrata una sensibilità del 98% ed una specificità dell'85% nei confronti del DBPCFC, ad una dose soglia di 0,10 KU/L. Se il cut-off per Ara h2 si eleva a 0,23 KU/L la specificità sale al 96% con una riduzione della sensibilità al 93%. Gli AA concludono che, nonostante la validità dei tests ematici studiati, il gold standard per la diagnosi di AAr resta il DBPCFC.

Anche questo studio non consente una valutazione chiara dell'utilità delle IgEs nella diagnosi di AAr poiché presenta alcuni bias. Il confronto con il DBPCFC non è stato effettuato in tutti i pazienti dei tre gruppi ed anche nel gruppo di pazienti dichiarati affetti da AAr, il gold standard è stato effettuato solo in 85/166 soggetti. Inoltre i risultati sono stati espressi con i valori di sensibilità, specificità, ma non come VPP, VPN, RV. Le figure non correlano chiaramente con i risultati riportati. I criteri diagnostici stessi non sono rigorosi, tanto è vero che gli AA esprimono dubbi sulla validità del DBPCFC così come loro stessi hanno stabilito di determinarlo. Lo studio consente solo di verificare dei profili di sensibilizzazione.

Il quesito diagnostico dello studio di Glaumann et al.⁶⁸ è quello di valutare la soglia di sensibilità allergica dei basofili (CD-sens) e delle IgEs verso le componenti allergiche delle arachidi rispetto al DBPCFC in una popolazione pediatrica. 38 bambini con sospetta AAr sono stati sottoposti a DBPCFC. Sono stati analizzati CD-sens per arachide ed Ara h2, come pure le IgEs per arachide, Ara h1, Ara h2, Ara h3, Ara h8 ed Ara h9. 25 bambini sono risultati positivi al DBPCFC ed il 92% di questi hanno mostrato CD-sens positivo per arachide ed Ara h2. I bambini con DBPCFC positivo hanno presentato un valore di CD-sens per arachide più elevato (mediana 1,3; range 0,4-29, n = 21) se comparato con bambini con DBPCFC negativo (mediana 0; range 0-0,5, n = 13). Tutti i bambini con CD-sens negativo sono risultati negativi al challenge. Un DBPCFC positivo corrisponde anche ad aumentati livelli di IgEs per Ara h1, Ara h2 ed Ara h3, comparati con quelli con un challenge negativo ($P < 0,0001$). Manca, tuttavia, un gruppo di controllo di non sensibilizzati. Gli AA concludono che la specificità del CD-sens, in questo studio è del 100% e, pertanto, la negatività del test esclude AAr.

Lo studio riporta solo le percentuali di pazienti con positività del DBPCFC, del CD-sens e delle IgEs, ma non sono state calcolate le correlazioni con il gold standard e, pertanto, mancano i risultati di sensibilità, specificità, VPP, VPN e RV. L'analisi statistica non ha previsto gli aggiustamenti per i tests multipli. L'unico risultato con alta specificità è risultato il CD-sens (100% CD-sens negativi sono negativi anche al DBPCFC). Per tali motivi lo studio non consente una valutazione chiara dell'utilità del CD-sens e delle IgEs per singoli componenti allergiche nella diagnosi di AAr e, per quanto riguarda la specificità così elevata del CD-sens, il risultato andrebbe almeno replicato in un secondo studio, correttamente condotto, prima che tale indagine, riservata a Centri allergologici di III livello, possa essere impiegata nella pratica clinica. Allo scopo di determinare la riproducibilità e, quindi, la validità, del TPO, quale gold standard per la diagnosi di

AAr, Glaumann et al., hanno condotto un ulteriore studio impiegando la stessa popolazione precedentemente arruolata⁶⁹, selezionando, tuttavia, per motivi etici, solo i 27/38 bambini che non avevano avuto reazioni gravi al DBPCFC. Nell'arco di un mese questi pazienti sono stati sottoposti a DBPCFC e ad un terzo challenge in SBOFC. 13 bambini (48%) non hanno mostrato alcuna reazione al challenge. 14 hanno reagito al verum sia in DBPCFC che in SBOFC, ma non al placebo. Solo 2 di questi bambini, tuttavia, hanno presentato reazioni alla stessa dose soglia e con la stessa intensità; tutti gli altri hanno mostrato reazioni a dosi soglia differenti e con diverso grado di score sintomatologico: la scala di graduazione utilizzata è, in questo studio, quella, piuttosto arbitraria, impiegata da Astier⁶⁵. Gli AA concludono che la riproducibilità del TPO, quale risultato positivo/negativo è del 100%, ma non lo è altrettanto per quanto attiene alla dose evocante la reazione avversa ed al grado di intensità dei sintomi.

Manca, come nel trial precedente, il gruppo di controllo di non allergici o non sensibilizzati. Per tali motivi i risultati dello studio non sono validi.

Uno studio pilota di Peeters et al.⁷⁰ ha valutato se sono osservabili differenze di alcuni biomarkers (lattato, creatinina e glutamina, tirosina, triptofano) nel plasma e nella saliva di soggetti con AAr e nei soggetti sani, tramite spettroscopia con Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) con successiva analisi multivariata, sia prima che dopo un TPO con arachidi. Vengono arruolati 12 soggetti con AAr, tutti diagnosticati con DBPCFC ed 11 soggetti tolleranti; età media della popolazione 25,4 anni. Il test viene applicato a tutti i soggetti arruolati ed i risultati vengono espressi sotto forma di score e, pertanto, non è possibile calcolare sensibilità, specificità del test e RV. Vengono osservate chiare differenze negli scores dell'analisi RMN nella saliva dei soggetti di entrambi i gruppi, sia prima che dopo l'ingestione di arachidi ($p < 0,01$). Tale risultato non è confermato nel plasma il che potrebbe essere dovuto al fatto che tali metaboliti sono presenti in maggiore concentrazione nella saliva, rispetto al plasma, in cui andrebbero incontro ad una maggiore diluizione.

Sono necessari ulteriori studi che valutino l'eventuale beneficio aggiuntivo del dosaggio di tali biomarkers nella saliva di soggetti con allergia alla arachidi per la diagnosi di allergie alimentari, rispetto a prick test, dosaggio IgE specifiche e, soprattutto, rispetto al gold standard, rappresentato dal DBPCFC.

In conclusione, quasi tutti gli studi finalizzati ad identificare test diagnostici per l'AAr alternativi al TPO (gold standard) presentano errori metodologici tali da invalidarne i risultati.

Per nessuno dei test proposti (valori di cut-off di SPT, IgEs, CRD, CD-sens, biomarkers) sono soddisfatti i criteri minimi di validità:

1. confronto con il gold-standard;
2. conferma dei risultati con un 2° studio indipendente.

Ad oggi, quindi, la diagnosi di AAr deve essere confermata con il TPO, ad eccezione dei casi con anamnesi positiva di reazione anafilattica.

Terapia

Le Linee Guida (LG) ufficiali^{71,72} stabiliscono, a tutt'oggi, che la principale terapia della AA consiste nell'eliminazione dalla dieta degli alimenti responsabili dei sintomi. Tuttavia, considerato il grande uso di alimenti contenenti arachidi, tracce possono essere presenti in cibi apparentemente privi dell'allergene, a causa di erronee etichettature o di contaminazioni sia del materiale crudo che processato⁷³. La frequenza di reazioni avverse agli alimenti in conseguenza di una contaminazione non è conosciuta precisamente e limitate informazioni esistono anche sulla dose minima necessaria a provocare una reazione allergica. Per la determinazione di questi allergeni nascosti sono state applicate numerose tecniche analitiche, come riportato da Wen et al.⁷³.

Nelle forme di AA IgE-mediate, negli ultimi decenni, sono diventati sempre più frequenti i tentativi di indurre la tolleranza alimentare mediante la Immunoterapia Orale (OIT) che consiste nella somministrazione graduale e progressiva di un alimento, partendo da piccole dosi e cercando di arrivare a una quantità di cibo predeterminata oppure alla dose massima tollerata dal paziente. Questo metodo, che ha lo scopo di indurre desensibilizzazione e poi, nel tempo, favorire la tolleranza verso l'alimento, può essere effettuato mediante la via orale e prende il nome di Desensibilizzazione Orale per Alimenti o Induzione Specifica della Tolleranza Orale (DOPA o SOTI) o la via sublinguale, sul modello di quella applicata nelle allergie per inalanti⁷⁴.

Nel 1997 Nelson et al.⁷⁵ effettuarono il primo tentativo di trattamento di pazienti affetti da Allergia IgE-mediate alle arachidi mediante Immunoterapia Specifica con estratto acquoso, per via sottocutanea. Furono arruolati 12 pazienti di cui la metà furono sottoposti al trattamento immunoterapico costituito da una iniziale fase rush, seguita da iniezioni settimanali di mantenimento per un anno. Fu dimostrato un incremento della dose soglia al DBPCFC eseguito dopo 6 settimane e dopo un anno di terapia, oltre ad una riduzione del diametro medio del pomfo agli SPT con arachide. La terapia, tuttavia, fu gravata da un elevato numero di reazioni sistemiche

nella maggior parte dei pazienti, anche durante la fase di mantenimento e, pertanto, la via sottocutanea fu rapidamente abbandonata.

Hofmann et al.⁷⁶, nel 2009, hanno condotto uno studio con l'obiettivo di verificare la sicurezza di un protocollo di OIT per arachide costituito da una fase di iniziale incremento della dose, seguita da una fase di build-up e, quindi, da un ulteriore incremento a casa. Sono stati arruolati 28 pazienti di età compresa tra 1 e 16 anni, sulla base di una storia clinica di reazioni avverse all'alimento entro 60 minuti dalla ingestione associata a SPT positivi e/o IgEs per arachide, omettendo l'esecuzione di un DBPCFC diagnostico. Sono stati esclusi gli anafilattici. 20/28 pazienti arruolati hanno completato tutte e tre le fasi dello studio; la maggior parte delle reazioni, soprattutto sintomi addominali ed a carico delle vie aeree inferiori, si sono avute durante la fase iniziale piuttosto che durante le due successive fasi dello studio, benché due pazienti, che pure poi hanno completato lo studio, sono stati trattati con epinefrina durante la fase domiciliare. Lo studio conclude che la OIT rappresenta una terapia promettente per l'allergia alle arachidi, con un buon profilo di sicurezza.

Nello stesso anno Clark et al.⁷⁷ hanno condotto un trial clinico in aperto, non randomizzato, privo di un gruppo di controllo, il cui obiettivo era quello di valutare l'efficacia e la tollerabilità della OIT in 4 pazienti, di età compresa tra 9 e 13 anni, affetti da AAR confermata da storia clinica di reazione avversa alla ingestione, SPT e IgEs positive ed una dose soglia al DBPCFC compresa tra 5-50 mg di alimento. Uno di questi bambini aveva mostrato anafilassi durante il challenge. Tutti e 4 i pazienti arrivano alla fine delle due settimane di terapia e tollerano al TPO 800 mg di arachide. Durante l'OIT nessun sintomo significativo viene riportato dai pazienti. Nel TPO finale, in aperto, solo un paziente, sviluppa lievi dolori addominali.

Jones et al.⁷⁸ hanno realizzato un trial clinico multicentrico, in aperto, senza un gruppo di controllo, il cui obiettivo era quello di valutare l'efficacia clinica ed i cambiamenti immunologici associati alla OIT in una popolazione di 39 pazienti di età compresa tra 1 e 16 anni. Criteri di inclusione erano una storia di reazioni IgE-mediate alle arachidi, SPT per arachidi >3 mm, IgEs >15 KU/L (>7 KU/L se l'ultimo episodio si era verificato nei 6 mesi precedenti l'arruolamento). Erano esclusi i pazienti anafilattici. L'intervento consisteva nella somministrazione di proteine dell'arachide predosate e veicolate con un alimento a scelta del paziente, secondo un protocollo costituito da una prima fase di incremento della dose in ospedale, seguita da una fase di build-up con incrementi bisettimanali, sempre effettuati in ospedale ed una terza

fase di mantenimento domiciliare. Al termine veniva ripetuto il TPO. 29/39 arruolati completarono tutte e tre le fasi (perdita al follow-up del 25%); di questi, 27 furono in grado di ingerire 3,9 g di proteine delle arachidi al challenge finale; 36/39 pazienti presentarono eventi avversi, soprattutto sintomi respiratori a carico delle alte vie aeree. Dopo sei mesi di trattamento si riducevano significativamente il diametro medio del pomfo agli SPT e l'attivazione dei basofili; dopo 12-18 mesi si rilevava anche riduzione delle IgEs ed incremento delle IgG4. La secrezione di IL-10, IL-5, IFN- γ e TNF- α dai monociti circolanti incrementava in un arco di tempo di 6-12 mesi. La validità dei risultati è inficiata dalla mancata randomizzazione e dalla assenza di un gruppo di controllo, oltre che dalla eccessiva perdita al follow-up e dalla presenza di criteri diagnostici non rigorosi.

Blumchen et al.⁷⁹, nel 2010, hanno condotto un ulteriore studio volto a valutare l'efficacia e la sicurezza della OIT in bambini con AAR. Sono stati arruolati 23 bambini, di età compresa tra 3,2 e 14,3 anni, con AAR confermata da DBPCFC, i quali sono stati sottoposti ad OIT con arachidi arrosite mediante un protocollo rush per 7 giorni. Nel caso in cui non fosse stata raggiunta una dose protettiva di almeno 0,5 g di arachide, i pazienti continuavano con una fase build-up, con incrementi bisettimanali, fino al raggiungimento di almeno 0,5 g di arachide con una successiva fase di mantenimento per 8 settimane. Seguiva un periodo di evitamento per due settimane e, quindi, un DBPCFC durante il quale i pazienti riuscirono a tollerare una mediana di 1 g di arachide (range 0,25-4 g) rispetto a 0,19 g al TPO iniziale. Già durante la fase rush si registrava un drop out dei pazienti. Durante la fase di mantenimento 14/22 bambini riuscivano a raggiungere la dose target, ma 7/22 sospendevano il protocollo. Solo il 61% degli arruolati completava tutte e tre le fasi del protocollo. Il trattamento portava ad un significativo incremento delle IgG4s ed una riduzione della IL-5, IL-4 ed IL-2 da parte dei monociti circolanti.

Un ulteriore trial clinico, in aperto, non randomizzato e senza gruppo di controllo, è stato condotto da Anagnostou et al.⁸⁰ con l'obiettivo di testare l'efficacia e la sicurezza di un nuovo protocollo di OIT. Sono stati arruolati 22 pazienti, di età compresa tra 4 e 18 anni, in cui la diagnosi di AAR, sospettata sulla base di storia clinica, SPT ed IgEs, è stata confermata dal challenge. Dopo una prima fase di incremento della dose fino ad 800 mg di polvere di arachide, segue una fase di mantenimento di 30 settimane. 19/22 pazienti (86%) hanno tollerato dosi complessive di 800 mg; 2/22 (9%) hanno tollerato, rispettivamente, 200 e 400 mg. 19/22 dei pazienti arruolati hanno sviluppato sintomi sia durante la fase di induzione che di mantenimento, benché moderati e ben

controllati da antistaminici per os e beta 2-stimolanti per aerosol. Nessun ricorso all'adrenalina iniettabile. Al TPO dopo 6 settimane dalla dose di mantenimento 12/19 (63%) non hanno mostrato sintomi mentre 7/19 (37%) hanno avuto sintomi lievi o moderati (dolori addominali, eritema del viso, angioedema lieve). Al TPO, dopo 30 settimane, 14/18 soggetti (78%) non hanno mostrato alcun sintomo, mentre 4/18 hanno presentato sintomi lievi o moderati. Gli AA concludono sulla sicurezza e tollerabilità del loro protocollo comparato con i protocolli rush. Punti deboli del trial sono la mancanza di un gruppo di controllo e la numerosità campionaria bassa.

Varshney et al.⁸¹ hanno finalmente condotto il primo RCT, in doppio cieco multicentrico, sulla OIT in bambini affetti da AAR, con l'obiettivo primario di valutarne l'efficacia e la sicurezza. Sono stati arruolati 28 bambini di età compresa tra 1-16 a. con storia suggestiva di reazione IgE-mediata entro 60 minuti dall'ingestione, associata a SPT > 3 mm rispetto al controllo negativo ed IgEs > 15 kU/l (> 7 kU/l se l'ultimo episodio si era verificato nei sei mesi precedenti). Non è stato eseguito un TPO diagnostico. Sono stati esclusi pazienti anafilattici, bambini con asma moderato-severo o con dermatite atopica scarsamente controllata e quelli non in grado di interrompere la terapia continuativa con antistaminici. I soggetti erano randomizzati 2:1 a ricevere farina di arachide o placebo. Il protocollo era costituito da una prima fase di progressivo incremento, effettuata in ospedale, il primo giorno, partendo da una dose di 0,1 mg di proteine delle arachidi e raddoppiando, ogni 30 minuti, fino a raggiungere una dose di 6 mg o fino alla comparsa di sintomi. Erano esclusi dal trattamento i soggetti che non tolleravano una dose minima di 1,5 mg. Seguiva, quindi, una fase di build-up con aumenti del 50-100% ogni 2 settimane fino a 75 mg e del 25-33% fino a 4.000 mg. Durante la terza fase, di mantenimento, i bambini assumevano 4.000 mg/die per un mese e, quindi, ritornavano alla 48^a settimana per un DBPCFC che veniva condotto fino ad una dose cumulativa di 5.000 mg di proteine. Dei 28 bambini arruolati, 19 sono stati sottoposti ad OIT e 3 sono stati persi al follow-up per la comparsa precoce di eventi avversi. Dei 16 rimanenti, tutti hanno effettuato il DBPCFC finale ingerendo la massima dose cumulativa di 5.000 mg, mentre il gruppo placebo ha ingerito una dose mediana cumulativa di 280 mg. Il gruppo dei trattati mostrava una riduzione del diametro medio del pomfo agli SPT ($p < 0,001$), IL-5 ($p = 0,01$) ed IL-13 ($p = 0,02$) ed un aumento delle IgG4s ($p < 0,001$). Inoltre, i pazienti trattati mostravano un iniziale incremento delle IgEs per arachidi ($p < 0,01$) senza un significativo cambiamento rispetto ai valori basali al momento del challenge. Infine, i soggetti trattati, presentavano un incremento del rappor-

to FoxP3 hi: FoxP3 intermediate CD4+ CD25+ T cell al momento del challenge ($p = 0,04$).

Nurmatov et al.⁸² nel 2012, hanno pubblicato la prima Cochrane sulla OIT in bambini con AAR con il quesito specifico di valutarne le prove di efficacia, con un rigoroso studio della qualità dei lavori, basato sulla applicazione del metodo "Assessment of Risk of Bias". L'unico trial incluso nella revisione è stato quello di Varshney 2011, ritenuto ben condotto, anche se su una popolazione scarsa di bambini provenienti da soli due centri. Gli AA concludono sulla insufficiente evidenza in termini di efficacia a lungo termine, sicurezza e vantaggioso rapporto costi-benefici della OIT in questi pazienti.

Prickett et al.⁸³, nel 2013, hanno condotto una ricerca di laboratorio su adulti con AAR, a rischio di anafilassi, volta ad identificare e sintetizzare epitopi di Ara h1 ed Ara h2 in grado di realizzare un legame specifico T-cellulare, per indurre desensibilizzazione senza attivare reazioni IgE-mediate. L'obiettivo era quello di condurre una OIT più sicura. Linee cellulari T (TCL) Ara h1s CD4+ venivano generate da monociti circolanti di soggetti con AAR. Un totale di 145 Ara h1s TCL venivano generate da 18 soggetti con AAR e con differenti HLA. Le TCL riconoscevano 69 peptidi di 20 aminoacidi di Ara h1; nove di questi monomeri, contenenti gli epitopi più frequentemente riconosciuti, erano selezionati ed il loro riconoscimento confermato in altri 18 soggetti con AAR. Gli AA concludono che peptidi corti di Ara h1 riconosciuti da TCL Ara h1s CD4+ possono rappresentare i nuovi candidati per una OIT più sicura. Lo studio necessita di ulteriori conferme. Esaminiamo, ora, i due studi più importanti sulla Immunoterapia Sublinguale (SLIT) in pazienti con AAR.

Kim et al.⁸⁴ hanno condotto un RCT in doppio cieco contro placebo con l'obiettivo di valutare la sicurezza, l'efficacia clinica ed i cambiamenti immunologici prodotti dalla SLIT in bambini con AAR. Sono stati reclutati 18 pazienti di età compresa tra 1 ed 11 anni (età media 5,8 a) con storia clinica di reazione, entro 60 minuti dall'ingestione ed IgEs per arachidi > 7 kU/L. I soggetti non effettuavano un TPO iniziale. Il protocollo consisteva di una prima fase di incremento della dose ed una seconda fase di mantenimento di ulteriori 6 mesi, seguite da un DBPCFC. Tutti i 18 pazienti arruolati hanno completato lo studio, 11 nel gruppo attivo e 7 nel gruppo placebo. Durante il DBPCFC finale il gruppo dei trattati è stato in grado di ingerire una quantità di proteine delle arachidi 20 volte maggiori rispetto al gruppo placebo (dose cumulativa mediana di 1-710 mg *versus* 85 mg; $p = 0,011$). Solo l'11,5% dei soggetti del gruppo attivo ha presentato sintomi orofaringei durante la SLIT, risolti con l'assunzione di antistaminico. Nessuno ha adoperato l'adrenalina. Le IgEs per arachidi hanno subito un

incremento nei primi 4 mesi e poi progressivamente si sono ridotte nei successivi 8 mesi, mentre le IgG4 sono aumentate durante tutti i 12 mesi di SLIT. Inoltre i livelli di IL-5 si sono ridotti dopo i 12 mesi. In conclusione la SLIT è risultata essere in grado di indurre desensibilizzazione in bambini con AAr con evidenti cambiamenti immunologici. Ulteriori studi sono necessari per verificare se essa è anche in grado di indurre una tolleranza a lungo termine.

Nel 2013 Fleisher et al.⁸⁵ hanno condotto un RCT multicentrico, in doppio cieco contro placebo, per valutare sicurezza, efficacia e cambiamenti immunologici della SLIT in soggetti con AAr. Sono stati arruolati 40 pazienti, venti per braccio di intervento, età media di 15 anni (range 12,3-36,8) con storia di AAr, SPT per arachidi > 3 mm, IgEs determinabili e positività del DBPCFC basale, condotto fino ad una dose di 2 g di polvere di arachide. Sono stati esclusi pazienti anafilattici o con asma severo. Il gruppo attivo realizzava una prima fase di 44 settimane di SLIT, in cieco, al termine della quale si effettuava un challenge fino a 5 g di proteine delle arachidi, seguita da una fase di mantenimento, in aperto ed un secondo challenge alla 68ª settimana. Il gruppo placebo, per crossover iniziava una SLIT ad un alto dosaggio a partire dalla settimana 44 fino al DBPCFC condotto con dose cumulativa di 5 g di polvere di arachide alla 88ª settimana. Dopo 44 settimane di SLIT, 14/20 soggetti (70%) rispondevano al trattamento, comparati con 3/20 (15%) del gruppo placebo (P < 0,001). Nel gruppo attivo la dose mediana cumulativa tollerata aumentava da 3,5 mg a 496 mg. Dopo 68 settimane di SLIT la dose mediana significativamente ulteriormente incrementava fino a 996 mg. La dose mediana tollerata, dopo 44 settimane di crossover, era significativamente più alta rispetto a quella basale (603 mg versus 71). 16 soggetti sottoposti a crossover sono rispondenti al trattamento con una dose mediana tollerata che si incrementa da 21 mg a 496 mg tra i responders. Tra gli effetti collaterali sono segnalati solo disturbi orofaringei ma il 63,1% dei soggetti è libero da sintomi. In conclusione lo studio dimostra che la SLIT rappresenta una modalità terapeutica sicura, in grado di indurre una modesta desensibilizzazione nella maggioranza dei pazienti.

Infine, sono stati condotti alcuni **studi sperimentali**, con l'obiettivo di verificare se sono possibili altre soluzioni, oltre alla OIT, alternative all'evitamento dell'allergene nella terapia della Aar.

Srivastava et al.⁸⁶ hanno realizzato uno studio preclinico di sperimentazione farmacologica, volto a valutare l'efficacia delle Food Allergy Herbal Formula-2 estratte con butanolo, B-FAHH (di cui sono state identificate 13 componenti) nel prevenire l'anafilassi indotta da arachidi

in un modello animale in vivo. I ratti (n = 16) vengono resi allergici alle arachidi con somministrazioni settimanali per 8 settimane. Al termine, dopo 24 ore, 8 ratti cominciano il trattamento con B-FAHF-2 per 7 settimane e 8 (controlli) ricevono acqua. Tutti sono sottoposti a challenge ad intervalli, dalla settimana 14ª alla 50ª. Inizia, quindi, un secondo ciclo di B-FAHF-2 per 10 settimane (52ª-61ª) seguito dall'ultimo challenge 4 settimane dopo (65ª). Vengono misurate istamina plasmatica, IgEs, IgG₂ e citochine. Per valutare la sicurezza si esegue la determinazione di azotemia, creatinina, ALT ed altri indici di funzionalità renale ed epatica. Inoltre viene effettuata l'analisi istologica dei principali organi da anatomopatologi in cieco. Al termine dello studio 8 topi del gruppo di controllo presentano anafilassi ai challenges dalla 14ª alla 65ª settimana. Gli 8 topi trattati risultano completamente protetti fino alla 34ª settimana, poi alcuni presentano reazioni lievi. Il secondo ciclo di trattamento li protegge completamente fino alla 65ª settimana. Il profilo di sicurezza risulta accettabile. A questo studio preclinico non sono seguiti studi clinici, i soli che possono dimostrare una reale efficacia del trattamento. La validità dei risultati, è, inoltre, inficiata dal dichiarato conflitto di interesse.

Knoll et al.⁸⁷ hanno realizzato una ricerca il cui obiettivo è valutare l'efficacia di una metodica di laboratorio utilizzando la Polymerase Chain Reaction (PCR), Targeting Induced Local Lesions in Genomes (TILLING), nell'identificare le mutazioni che alterano le caratteristiche dei semi di arachide, aumentandone la qualità e riducendone l'allergenicità. Nel nostro caso la metodica è servita per identificare le sequenze di DNA che codificano per gli epitopi di Ara h1 e Ara h2, responsabili dell'allergenicità di questi 2 antigeni. I geni sono amplificati con una specifica Polimerasi. I semi di arachide sono esposti ad 1 mutagene, ethyl methanesulfonate (EMS). Sono analizzate le piante e selezionati gli omozigoti portatori della mutazione. Con tale metodica sono state originate piante di arachidi portatrici di mutazioni genetiche tali da sintetizzare Ara h1 e Ara h2 modificati. Le Ara h2 mutate, testate in 4 soggetti allergici all'arachide, non hanno mostrato, però, un minor legame con le IgEs rispetto alle Ara h1 native. Le Ara h1 non sono state testate.

Sampson et al.⁸⁸ hanno condotto un trial randomizzato controllato in doppio cieco allo scopo di valutare l'efficacia dell'omalizumab, già approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) per la terapia dell'asma moderato-severo, nel ridurre il rischio di reazioni allergiche indotte dalle arachidi. Obiettivo primario è comparare la quantità di alimento tollerata senza sintomi prima e dopo trattamento. Dei 150 pazienti previsti solo 26 sono stati reclutati e randomizzati a ricevere l'omalizumab -17- e

il placebo -9-. La popolazione è costituita da pazienti pediatriche e non, con storia di reazione IgE-mediata alla ingestione di arachidi e SPT positivo e/o IgEs > 0,35 KUA/L. Di questi, 14 hanno completato il follow-up e sono stati analizzati; 12, pari al 31%, sono stati persi. I risultati dello studio non sono significativi e la perdita al follow-up è > 20%

Conclusioni

Le arachidi rappresentano certamente una delle più comuni fonti allergeniche alimentari, ampiamente consumate nel mondo. Pertanto è importante comprendere i complessi processi patogenetici alla base delle reazioni avverse ed investigare sulle differenti proteine allergeniche di volta in volta responsabili dei sintomi. La possibilità di denaturazione dei singoli epitopi, attraverso i vari metodi di processazione, rappresenta un fertile terreno di ricerca per quanto attiene alla diagnosi ed agli innovativi interventi terapeutici.

TAKE HOME MESSAGES

1.	Allo stato attuale sono stati caratterizzati, dal punto di vista molecolare, 11 allergeni delle arachidi.
2.	La sensibilizzazione ad Ara h1 si riscontra nel 63-90% degli allergici e conferisce un rischio elevato di anafilassi.
3.	I soggetti affetti da AAR, tipicamente, non presentano reazioni fatali alla prima ingestione e coloro che manifestano reazioni fatali o quasi-fatali, in genere, soffrono di asma.
4.	La reazione allergica può essere bifasica in 1/3 dei casi con ricorrenza dei sintomi 1-8 ore dopo la risoluzione delle manifestazioni iniziali.
5.	Rispetto ad altre forme di Allergia Alimentare, l'AAR è generalmente persistente; si risolve, infatti, solo nel 20% dei casi in età scolare.
6.	Ara h1 rappresenta un allergene termostabile e, pertanto, quando è sottoposto a processazione termica, si realizza solo una piccola modifica della struttura che non ne sopprime completamente l'allergenicità.
7.	Non è stato identificato nessun test alternativo al TPO che ci consenta di confermare o escludere l'AAR. Tranne che per i pazienti con storia di pregressa reazione anafilattica, il TPO è quindi, ancora oggi, il test gold standard necessario per diagnosticare con certezza l'allergia a questo alimento.
8.	Vi sono insufficienti evidenze in termini di efficacia a lungo termine, sicurezza e vantaggioso rapporto costi-benefici della Immunoterapia Orale (OIT) nei pazienti affetti da allergia alle arachidi.
9.	La SLIT è risultata essere in grado di indurre desensibilizzazione in bambini con AAR con evidenti cambiamenti immunologici. Ulteriori studi sono necessari per verificare se essa è anche in grado di indurre una tolleranza a lungo termine.

Bibliografia

- 1 Monti G, Verga MC, Chini L, et al. *Esofagite eosinofila in età pediatrica*. Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica 2013;27(04):3-16.
- 2 Sáiz J, Montealegre C, Marina ML, et al. *Peanut allergens: an overview*. Crit Rev Food Sci Nutr 2013;53:722-3.
- 3 Fleischer DM. *The natural history of peanut and tree nut allergy*. Curr Allergy Asthma Rep 2007;7:175-81.
- 4 Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Burks AW, et al. *Prevalence of peanut and tree nut allergy in US determined by a random digit dial telephone survey*. J Allergy Clin Immunol 1999;103:559-62.
- 5 Bock SA, Munoz-Furlong A, Sampson HA. *Fatalities due to anaphylactic reactions to food*. J Allergy Clin Immunol 2001;107:191-3.
- 6 Primeasu MN, Kagan R, Joseph L, et al. *The psychological burden of peanut allergy as perceived by adults with peanut allergy and the parents of peanut allergic children*. Clin Exp Allergy 2000;30:1135-43.
- 7 Grundy J, Matthews S, Bateman B, et al. *Rising prevalence of allergy to peanut in children: data from 2 sequential cohorts*. J Allergy Clin Immunol 2002;110:784-9.
- 8 Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Sampson HA. *Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of random digit dial telephone survey: a 5 year follow-up study*. J Allergy Clin Immunol 2003;112:1203-7.
- 9 Pumphrey RS, Gowland MH. *Further fatal allergic reactions to food in the United Kingdom, 1999-2006*. J Allergy Clin Immunol 2007;119:1018e1019.
- 10 Shek LP, Cabrera-Morales EA, Soh SE, et al. *A population-based questionnaire survey on the prevalence of peanut, tree nut, and shellfish allergy in 2 Asian populations*. J Allergy Clin Immunol 2010;126:324e331.
- 11 Hourihane JO, Aiken R, Briggs R, et al. *The impact of government advice to pregnant mothers regarding peanut avoidance on the prevalence of peanut allergy in the United Kingdom children at school entry*. J Allergy Clin Immunol 2007;119:1197-202.
- 12 Sicherer SH, Wood RA, Stablein D, et al. *Maternal consumption of peanut during pregnancy is associated with peanut sensitization in atopic infants*. J Allergy Clin Immunol 2010;126:1191-7.
- 13 Du Toit G, Katz Y, Sasieni P, et al. *Early consumption of peanuts in infancy is associated with a low prevalence of peanut allergy*. J Allergy Clin Immunol 2008;122:984-91.
- 14 Fox AT, Sasieni P, Du Toit G, et al. *Household peanut consumption as a risk factor for the development of peanut allergy*. J Allergy Clin Immunol 2009;123:417-23.
- 15 Immune Tolerance Network. About the LEAP study; 2006. http://www.leapstudy.com/study_about.html. [accessed February 2010].
- 16 Sicherer SH, Sampson HA. *Peanut allergy: emerging concepts and approaches for an apparent epidemic*. J Allergy Clin Immunol 2007;120:491e503.
- 17 Mondoulet L, Paty E, Drumare MF, et al. *Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins*. J Agric Food Chem 2005;53:4547e53.
- 18 Beyer K, Morrow E, Li XM, et al. *Effects of cooking methods on peanut allergenicity*. J Allergy Clin Immunol 2001;107:1077e81.

- 19 Vereda A, van Hage M, Ahlstedt S, et al. *Peanut allergy: Clinical and immunological differences among patients from 3 different geographic regions.* J Allergy Clin Immunol 2011; 127:603-7.
- 20 Burks AW. *Peanut allergy.* Lancet 2008;371:1538-46.
- 21 Sicherer SH, Sampson HA, Burks AW. *Peanut and soy allergy: a clinical and therapeutic dilemma.* Allergy 2000;55:515-21.
- 22 Chassaigne H, Brohee M, Norgaard JV, et al. *Investigation on sequential extraction of peanut allergens for subsequent analysis by ELISA and 2D gel electrophoresis.* Food Chem 2007;105:1671-81.
- 23 Koppelman SJ, Wensing M, Ertmann M, et al. *Relevance of Ara h 1, Ara h 2 and Ara h 3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h 2 is the most important peanut allergen.* Clin Exp Allergy 2004;34:583-90.
- 24 Boldt A, Fortunato D, Conti A, et al. *Analysis of the composition of an immunoglobulin E reactive high molecular weight protein complex of peanut extract containing Ara h 1 and Ara h 3/4.* Proteomics 2005;5:675-86.
- 25 van Boxtel EL, van den Broek LA, Koppelman SJ, et al. *Legumin allergens from peanuts and soybeans: effects of denaturation and aggregation on allergenicity.* Mol Nutr Food Res 2008;52:674-8.
- 26 Flinterman A, van Hoffen E, Jager CFD, et al. *Children with peanut allergy recognize predominantly Ara h 2 and Ara h 6, which remains stable over time.* Clin Exp Allergy 2007;37:1221-8.
- 27 Vissers YM, Iwan M, Adel-Patient K, et al. *Effect of roasting on the allergenicity of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2/6: the necessity of degranulation assays.* Clin Exp Allergy 2011;41:1631-42.
- 28 Petersen A, Krause S, Latendorf T, et al. *Identification of Ara h 7 in peanut extract.* Allergy 2009;64 (Suppl.90):109.
- 29 Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, et al. *Immunological cross-reactivity between lipid transfer proteins from botanically unrelated plant-derived foods: a clinical study.* Allergy 2002;57:900-6.
- 30 Krause S, Reese G, Randow S, et al. *Lipid transfer protein (Ara h 9) as a new peanut allergen relevant for a mediterranean allergic population.* J Allergy Clin Immunol 2009;124:771-8.
- 31 Kleber-Janke T, Cramer R, Scheurer S, et al. *Patient-tailored cloning of allergens by phage display: Peanut (Arachis hypogaea) profilin, a food allergen derived from a rare mRNA.* J Chromatogr 2001;B756: 295-305.
- 32 Mittag D, Akkerdaas J, Ballmer-Weber BK, et al. *Ara h 8, a Bet v1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy.* J Allergy Clin. Immunol 2004;114:1410-7.
- 33 Pons L, Chery C, Romano A, et al. *The 18 kDa peanut oleosin is a candidate allergen for IgE-mediated reactions to peanuts.* Allergy 2002;57:88-93.
- 34 Husain Z, Schwartz RA. *Peanut allergy: an increasingly common life-threatening disorder.* J Am Acad Dermatol 2012;66:136-43.
- 35 Sicherer SH. *Clinical update on peanut allergy.* Ann Allergy Asthma Immunol 2002;88:350-61; quiz 361-2, 394.
- 36 Lee LA, Burks AW. *New insights into diagnosis and treatment of peanut food allergy.* Front Biosci (Landmark Ed) 2009;14:3361-71.
- 37 Sampson HA, Broadbent KR, Bernhisel-Broadbent J. *Spontaneous release of histamine from basophils and histamine-releasing factor in patients with atopic dermatitis and food hypersensitivity.* N Engl J Med 1989;321:228-32.
- 38 Gleich GJ. *Mechanisms of eosinophil-associated inflammation.* J Allergy Clin Immunol 2000;105:651-63.
- 39 Turcanu V, Maleki SJ, Lack G. *Characterization of lymphocyte responses to peanuts in normal children, peanut-allergic children and allergic children who acquired tolerance to peanuts.* J Clin Invest 2003;111:1065-1072.
- 40 Brown S, Asai Y, Cordell HJ, et al. *Loss-of-function variants in the flaggrin gene are a significant risk factor for peanut allergy.* J Allergy Clin Immunol 2011;127:661-7.
- 41 Bock SA, Atkins FM. *Patterns of food hypersensitivity during sixteen years of double-blind, placebo-controlled food challenges.* J Pediatr 1990;117:561-7.
- 42 Bock SA, Lee WY, Remigio LK, et al. *Studies of hypersensitivity reactions to foods in infants and children.* J Allergy Clin Immunol 1978;62:327-34.
- 43 Sampson HA. *Update on food allergy.* J Allergy Clin Immunol 2004;113:805-19.
- 44 Brown SG. *Clinical features and severity grading of anaphylaxis.* J Allergy Clin Immunol 2004;114:371-6.
- 45 Sampson HA. *Anaphylaxis and emergency treatment.* Pediatrics 2003;111:1601-8.
- 46 Hourihane JO. *Peanut allergy.* Pediatr Clin N Am 2011;58:445-58.
- 47 Sicherer SH, Furlong TJ, Munoz-Furlong A, et al. *A voluntary for peanut and tree nut allergy: characteristics of the first 5149 registrants.* J Allergy Clin Immunol 2001;108:128-32.
- 48 Sicherer SH, Burks AW, Sampson HA. *Clinical features of acute allergic reactions to peanut and tree nuts in children.* Pediatrics 1998;102:e6.
- 49 Fleischer DM. *The natural history of peanut and tree nut allergy.* Curr Allergy Asthma Rep 2007;7:175-81.
- 50 Mills ENC, Mackie AR. *The impact of processing on allergenicity of food.* Curr Opin Allergy Clin Immunol 2008;8:249-53.
- 51 Koppelman SJ, Bruijnzeel-koomen CA, Hessing M, et al. *Heat-induced conformational changes of Ara h 1, a major peanut allergen, do not affect its allergenic properties.* J Biol Chem 1999;274:4770-7.
- 52 van Boxtel EL, van den Broek LA, Koppelman SJ, et al. *Legumin allergens from peanuts and soybeans: effects of denaturation and aggregation on allergenicity.* Mol Nutr Food Res 2008;52:674-82.
- 53 Blanc F, Vissers YM, Adel-Patient K, et al. *Boiling peanut Ara h 1 results in the formation of aggregates with reduced allergenicity.* Mol Nutr Food Res 2011;55:1887-94.
- 54 Vissers YM, Blanc F, Skov PS, et al. *Effect of heating and glycation on the allergenicity of 2S albumins (Ara h 2/6) from peanut.* PLoS One 2011;6:e23998. doi: 10.1371/journal.pone.0023998. Epub 2011 Aug 25.
- 55 Cabanillas B, Pedrosa MM, Rodríguez J, et al. *Influence of enzymatic hydrolysis on the allergenicity of roasted peanut protein extract.* Int Arch Allergy Immunol 2012;157:41-50.
- 56 Kim J, Lee J, Seo WH, et al. *Changes in major peanut allergens under different pH conditions.* Allergy Asthma Immunol Res 2012;4:157-60.

- ⁵⁷ Kim J, Lee JY, Han Y, et al. *Significance of Ara h 2 in clinical reactivity and effect of cooking methods on allergenicity.* Ann Allergy Asthma Immunol 2013;110:34-8.
- ⁵⁸ Byrne AM, Malka-Rais J, Burks AW, et al. *How do we know when peanut and tree nut allergy have resolved, and how do we keep it resolved?* Clin Exp Allergy 2010;40:1303-11.
- ⁵⁹ Bernstein IL, Li JT, Bernstein DI, et al. *Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter.* Ann Allergy Asthma Immunol 2008;100:S1-148.
- ⁶⁰ Eigenmann PA, Sicherer SH, Borkowski TA, et al. *Prevalence of IgE-mediated food allergy among children with atopic dermatitis.* Pediatrics 1998;101:E8.
- ⁶¹ Sporik R, Hill DJ, Hosking CS. *Specificity of allergen skin testing in predicting positive open food challenges to milk, egg and peanut in children.* Clin Exp Allergy 2000;30:1540-6.
- ⁶² Wainstein BK, Yee A, Jelley D, et al. *Combining skin prick, immediate skin application and specific-IgE testing in the diagnosis of peanut allergy in children.* Pediatr Allergy Immunol 2007;18:231-9.
- ⁶³ Maloney JM, Rudengren M, Ahistedt 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.
- ⁶⁴ Johannsen H, Nolan R, Pascoe EM, et al. *Skin prick testing and peanut-specific IgE can predict peanut challenge outcomes in preschoolchildren with peanut sensitization.* Clin Exp Allergy 2011;41:994-1000.
- ⁶⁵ Astier CA, Morisset M, Roitel O, et al. *Predictive value of skin prick tests using recombinant allergens for diagnosis of peanut allergy.* J Allergy Clin Immunol 2006;118:250-6.
- ⁶⁶ 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.
- ⁶⁷ Codreanu F, Collignon O, Roitel O, et al. *A novel immunoassay using recombinant allergens simplifies peanut allergy diagnosis.* Int Arch Allergy Immunol 2011;154:216-26.
- ⁶⁸ Glaumann S, Nopp A, Johansson SG, et al. *Basophil allergen threshold sensitivity, CD-sens, IgE-sensitization and DBPCFC in peanut-sensitized children.* Allergy 2012;67:242-7.
- ⁶⁹ Glaumann S, Nopp A, Johansson SG, et al. *Oral peanut challenge identifies an allergy but the peanut allergen threshold sensitivity is not reproducible.* PLoS One 2013;8:e53465.
- ⁷⁰ Peeters KA, Lamers RJ, Penninks AH, et al. *A search for biomarkers as diagnostic tools for food allergy: a pilot study in peanut-allergic patients.* Int Arch Allergy Immunol 2011;155:23-30.
- ⁷¹ Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, et al. *Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: summary of the NIAID-sponsored expert panel report.* Nutr Res 2011;31:61-75.
- ⁷² *Food allergy in children and young people: diagnosis and assessment of food allergy in children and young people in primary care and community settings. centre for clinical practice at NICE (UK).* London: National Institute for Health and Clinical Excellence (UK); 2011 Feb.
- ⁷³ Wen H, Borejsza-Wysocki W, DeCory TR, et al. *Peanut allergy, peanut allergens and methods for the detection of peanut contamination in food products.* Compr Rev Food Sci Food Safety 2007;6:47-58.
- ⁷⁴ Wang J, Sampson HA. *Oral and sublingual immunotherapy for food allergy.* Asian Pac J Allergy Immunol 2013;31:198-209.
- ⁷⁵ Nelson HS, Lahr J, Rule R, et al. *Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract.* J Allergy Clin Immunol 1997;99(6 Pt 1):744-51.
- ⁷⁶ Hofmann AM, Scurlock AM, Jones SM, et al. *Safety of a peanut oral immunotherapy protocol in peanut allergic children.* J Allergy Clin Immunol 2009;124:286-91.
- ⁷⁷ Clark AT, Islam S, King Y, et al. *Successful oral tolerance induction in severe peanut allergy.* Allergy 2009;64:1218-20.
- ⁷⁸ Jones SM, Pons L, Roberts JL, et al. *Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy.* J Allergy Clin Immunol 2009;124:292-300.
- ⁷⁹ Blumchen K, Ulbricht H, Staden U, et al. *Oral peanut immunotherapy in children with peanut anaphylaxis.* J Allergy Clin Immunol 2010;126:83-91.
- ⁸⁰ Anagnostou K, Clark A, King Y, et al. *Efficacy and safety of high-dose peanut oral immunotherapy with factors predicting outcome.* Clin Exp Allergy 2011;41:1273-81.
- ⁸¹ Varshney P, Jones SM, Scurlock AM, et al. *A randomized controlled study of peanut oral immunotherapy: clinical desensitization and modulation of the allergic response.* J Allergy Clin Immunol 2011;127:654-60.
- ⁸² Nurmatov U, Venderbosch I, Devereux G, et al. *Allergen-specific oral immunotherapy for peanut allergy.* Cochrane Database Syst Rev 2012;9:CD009014.
- ⁸³ Prickett SR, Voskamp AL, Phan T, et al. *Ara h 1 CD4+ T cell epitope-based peptides: candidates for a peanut allergy therapeutic.* Clin Exp Allergy 2013;43:684-97.
- ⁸⁴ Kim EH, Bird JA, Kulis M, et al. *Sublingual immunotherapy for peanut allergy: clinical and immunologic evidence of desensitization.* J Allergy Clin Immunol 2011;127:640-6.
- ⁸⁵ Fleischer DM, Burks AW, Vickery BP, et al. *Sublingual immunotherapy for peanut allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial.* J Allergy Clin Immunol 2013;131:119-27.
- ⁸⁶ Srivastava K, Yang N, Chen Y, et al. *Efficacy, safety and immunological actions of butanol-extracted FAHF-2 on peanut anaphylaxis.* Clin Exp Allergy 2011;41:582-91.
- ⁸⁷ Knoll JE, Ramos ML, Zeng Y, et al. *TILLING for allergen reduction and improvement of quality traits in peanut (Arachis hypogaea L.).* BMC Plant Biol 2011;11:81. doi: 10.1186/1471-2229-11-81.
- ⁸⁸ Sampson HA, Leung DY, Burks AW, et al. *A phase II, randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled oral food challenge trial of Xolair (omalizumab) in peanut allergy.* J Allergy Clin Immunol 2011;127:1309-10.e1.