

Lo stato dell'arte della *Component Resolved Diagnosis* (CRD): cosa sono e a cosa servono i componenti molecolari (Rassegna)

Riccardo Asero

Ambulatorio di Allergologia, Clinica San Carlo, Paderno Dugnano (MI)

L'allergologia sta certamente vivendo una fase di tumultuosa crescita, in gran parte grazie all'avvento delle nanotecnologie e della biologia molecolare. Queste tecniche hanno, infatti, permesso nel tempo di identificare, sequenziare, caratterizzare e clonare un numero crescente (e tuttora in crescita) di proteine allergeniche e delle loro isoforme, e infine di produrle in laboratorio. La disponibilità di quantità relativamente elevate di molecole allergeniche purificate ha facilitato lo studio della loro reattività immunologica, ed ha recentemente portato allo sviluppo di nuovi strumenti ad uso diagnostico che si fondano sull'impiego delle singole componenti molecolari. L'insieme di queste nuove conoscenze è riassunto dal termine "proteomica allergologica".

Quali sono i vantaggi pratici delle molecole allergeniche per uso diagnostico? Quali problemi clinici permettono di risolvere?

Per comprendere appieno la potenziale importanza degli strumenti oggi disponibili, occorre sempre ricordare che, per oltre un secolo, la diagnostica allergologica si basata sull'uso dei cosiddetti "estratti" allergenici. Questi estratti sono stati viepiù migliorati e purificati nel corso del tempo e hanno dato, e tuttora danno, buona prova di sensibilità. Per tale motivo la gran parte degli allergologi clinici utilizza ancora adesso estratti allergenici commerciali per la diagnostica di routine dell'allergia respiratoria *in-vivo* e/o *in-vitro*; nel caso delle allergie alimentari gli estratti allergenici commerciali vengono validamente affiancati dai test cutanei con alimenti freschi, notevolmente più sensibili in particolare per la diagnosi ad alimenti di origine vegetale. Tuttavia, per quanto siano perfezionati e relativamente "standardizzati", gli estratti (ma anche gli alimenti freschi!) rimangono pur sempre delle miscele di proteine, allergeniche e non, di cui magari si conosce la concentrazione totale ma non quella delle singole componenti la quale può, tra le altre cose, variare da un lotto all'altro. In quanto miscele di allergeni, gli estratti non ci permettono di risolvere alcuni rebus che rappresentano allo stesso tempo l'incubo dell'allergologo clinico e uno degli aspetti più affascinanti di questa disciplina: le possibilità che si verifichino reattività crociate e la co-sensibilizzazione ad allergeni stabili e labili negli alimenti.

LE CROSS-REATTIVITA'

Le cross-reattività sono la conseguenza della presenza di proteine omologhe, altamente conservate dal punto di vista filogenetico, in fonti allergeniche distinte. Infatti, avviene abbastanza di frequente che anticorpi di classe IgE inizialmente prodotti come risposta ad un certo allergene presente in una specifica fonte (il cosiddetto "sensibilizzante primario") riconoscano epitopi omologhi presenti su fonti allergeniche distinte. Nel campo delle allergie

respiratorie questo fenomeno si osserva in contesti diversi. Un esempio è la sensibilizzazione all'allergene maggiore del polline di *Fagales*, in cui alla sensibilizzazione primaria all'allergene maggiore del polline di betulla (Bet v 1) fa seguito l'automatico riconoscimento di allergeni omologhi nei pollini di nocciolo (Cor a 1), ontano (Aln g 1), faggio, quercia e carpino ma anche in alimenti di origine vegetale quali *Rosaceae*, kiwi, noce, nocciola, *Apiaceae*, ecc. Ancora più complesso è il caso della sensibilizzazione ai cosiddetti pan-allergeni, termine con il quale si identificano polcalcine (proteine calcio-leganti presenti virtualmente nei pollini di tutte le specie vegetali), profiline (proteine del citoscheletro delle piante presenti in tutti i pollini conosciuti ma anche negli alimenti di origine vegetale), e *Lipid Transfer Protein* o LTP (presenti in un gran numero di alimenti vegetali a partire dalle *Rosaceae*). Inutile rilevare che il paziente sensibilizzato ad uno di questi allergeni ha molte probabilità di risultare reattivo *in-vivo* e *in-vitro* nei confronti di un elevato numero di fonti allergeniche distinte (mentre in realtà la proteina allergenica rilevante è solamente una).

Un altro caso complicato, che fortunatamente riguarda solamente le indagini *in-vitro*, è quello della sensibilizzazione nei confronti dei cosiddetti CCD (*Cross-reactive Carbohydrate Determinants*) residui carboidratici rappresentati in tutto il modo animale e vegetale ed in grado di confondere non poco le idee a chi deve prendere delle decisioni basandosi solamente su una indagine sierologica essendo possibile causa di "positività" *in-vitro* contemporaneamente a pollini, alimenti, e veleni di imenotteri. Il fatto che gli epitopi dei CCD siano monovalenti impedisce che i test *in-vivo* (i quali richiedono il legame delle IgE fissate ai mastociti ad un epitopo bivalente) risultino positivi. Da notare che la sensibilizzazione ai CCD riveste poca o nulla valenza clinica, a dispetto della potenziale confusione diagnostica provocata.

ALLERGENI STABILI E LABILI NEGLI ALIMENTI

Gli alimenti possono contenere diverse proteine allergeniche. Quelle presenti negli alimenti di origine animale sono per lo più caratterizzate da stabilità al calore e alla digestione. Per contro, gli alimenti di origine vegetale contengono proteine allergeniche sia stabili che labili (ovvero facilmente degradabili al calore e alla digestione), un fatto che può influenzare profondamente l'espressione clinica dell'allergia. Per tale motivo l'allergologo clinico punta ad identificare l'allergene responsabile della sensibilizzazione con la massima precisione; in base al risultato dell'analisi sarà in grado di fornire al paziente utili indicazioni prognostiche, di calcolare il rischio di reazioni potenzialmente severe, e deciderà se mantenere l'alimento in questione nella dieta del paziente oppure escluderlo. Da rilevare che

oltre a quest'aspetto occorrerà sempre tenere in considerazione quanto precedentemente detto per le reazioni crociate, assai frequenti nell'ambito degli allergeni alimentari.

VANTAGGI PER IL CLINICO

Alla luce di quanto precedentemente detto l'uso delle componenti molecolari si traduce in un vantaggio sia per il medico che per il paziente. In allergologia respiratoria, attraverso l'uso delle componenti allergeniche molecolari l'allergologo clinico dispone di nuovi strumenti per identificare con certezza la fonte sensibilizzante primaria nel soggetto apparentemente polisensibilizzato, e quindi per evitare la prescrizione di trattamenti iposensibilizzanti inappropriati. Nel campo dell'allergia alimentare la determinazione delle proteine coinvolte nelle reazioni avverse ad alimenti avrà una ricaduta favorevole in termini di assistenza del paziente ma anche di prevenzione perché consentirà di indagare la reattività IgE-mediata del soggetto nei confronti delle fonti allergeniche alimentari potenzialmente cross-reagenti.

APPROCCIO CORRETTO ALLA DIAGNOSTICA MOLECOLARE

L'utilizzo della diagnostica molecolare deve essere mirato. In altri termini, il richiedente deve avere chiaramente in mente quello che sta cercando e quali sono le determinazioni che gli permetteranno di ottenere l'informazione necessaria a chiudere la diagnosi. In altre parole, la richiesta di dosaggio delle IgE specifiche deve partire da una valutazione clinica e da un precedente accertamento (*in-vivo* o *in-vitro*) mediante estratti allergenici. Sono assolutamente da evitare richieste del tipo "RAST totale per...", purtroppo ancora di frequente osservazione nella pratica clinica, in quanto chiaramente suggestive di idee confuse sull'argomento. Certamente l'uso delle molecole allergeniche è di stretta competenza dello specialista allergologo.

Ad esempio, in vista di una prescrizione di immunoterapia specifica per pollini in un soggetto polisensibilizzato la determinazione delle IgE specifiche per gli 8 allergeni sensibilizzanti primari delle principali fonti stagionali (es. Phl p 1, Phl p 5, Art v 1, Amb a 1, Par j 2, Bet v 1, Cup a 1, Ole e 1) unitamente ai 2 marcatori di sensibilizzazione ai pan-allergeni (ad es. Bet v 2 e Phl p 7) fornirà la risposta al quesito clinico nella quasi totalità dei casi.

CONCLUSIONE

Questi brevi cenni introduttivi hanno illustrato alcune potenzialità della diagnostica mediante molecole allergeniche naturali o ricombinanti. La nostra comprensione della materia aumenterà di pari passo con l'aumento del numero degli allergeni identificati, clonati, e disponibili per le analisi cliniche. Inoltre, non si può escludere che in un futuro (probabilmente remoto) le molecole allergeniche singole possano finire con l'entrare anche nell'armamentario terapeutico delle allergopatie nell'ambito della cosiddetta "tailored immunotherapy".

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. **Ferreira F, Hawranek T, Gruber P, et al.** Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. *Allergy* 2004; 59: 243-67
2. **Weber RW.** Patterns of pollen cross-allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 229-39
3. **Mari A, Wallner M, Ferreira F.** Fagales pollen sensitization in a birch-free area: a respiratory cohort survey using fagales pollen extracts and birch recombinant allergens (rBet v 1, rBet v 2, rBet v 4). *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1419-28
4. **Wopfner N, Dissertori O, Ferreira F, et al.** Calcium-binding proteins and their role in allergic diseases. *Immunol Allergy Clin N Am* 2007; 27: 29-44
5. **Tinghino R, Twardosz A, Barletta B, et al.** Molecular, structural, and immunologic relationships between different families of recombinant calcium-binding pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 314-20
6. **Asero R, Monsalve R, Barber D.** Profilin sensitization detected in the office by skin prick test: a study of prevalence and clinical relevance of profilin as a plant food allergen. *Clin Exp Allergy*. 2008; 38: 1033-7
7. **Barber D, de la Torre F, Feo F, et al.** Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas. A molecular epidemiological study. *Allergy* 2008; 63: 1550-8
8. **Asero R.** Plant-food allergies: a suggested approach to allergen-resolved diagnosis in the clinical practice by identifying easily available sensitization markers. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 138: 1-11

Per corrispondenza:

Dott. Riccardo Asero
Ambulatorio di Allergologia
Clinica San Carlo
Via Ospedale 21 - 20037 Paderno Dugnano
Tel.: 0299038470 - Fax: 0299038223
e-mail: r.asero@libero.it