

## **CRD nell'allergia alimentare: algoritmi diagnostici (Rassegna)**

Danilo Villalta

*Allergologia e Immunologia clinica, Dipartimento di medicina di laboratorio, A.O. "S. Maria degli Angeli", Pordenone*

### **INTRODUZIONE**

Il termine allergia alimentare è usato per descrivere una reazione avversa determinata da un meccanismo immuno-mediato in seguito ad introduzione di uno specifico cibo<sup>1</sup>. Recenti meta-analisi di studi nei quali l'allergia alimentare è stata dimostrata tramite test di scatenamento in doppio cieco controllato con placebo (DBPCFC) hanno evidenziato come la percentuale delle reazioni allergiche a latte, uova, pesci, arachidi si attesti su percentuali oscillanti tra l'1% e il 10,8%, quelle verso frutta e noci tra lo 0,1% e 4,3%, quelle verso altri vegetali tra 0,1% e 1,4% e quelle verso grano, soia e sesamo su percentuali inferiori all'1%<sup>2</sup>. Una recente relazione del *Centers for Disease Control and Prevention* ha evidenziato un incremento del 18% delle allergie alimentari nei bambini nel decennio 1997-2007, con una stima globale dei soggetti interessati del 3,9%<sup>3</sup>. Dai dati sopra riportati, quindi, emerge come l'allergia alimentare, che rappresenta la maggiore causa di anafilassi nei giovani, sia un fenomeno importante ed in crescita.

Da un punto di vista patogenetico essa può essere divisa nelle forme IgE-mediate e non IgE-mediate, dove le prime rappresentano di gran lunga la principale causa delle reazioni avverse di tipo immediato, responsabili dei sintomi più gravi. La sensibilizzazione può avvenire primariamente nel tratto gastrointestinale in seguito all'introduzione del cibo sensibilizzante (allergeni alimentari di classe I), oppure essere una sensibilizzazione secondaria legata all'assunzione di cibi cross-reattivi con allergeni presenti in pollini, responsabili di una sensibilizzazione primaria attraverso le vie respiratorie (allergeni alimentari di classe II). La maggior parte degli allergeni di classe I sono stabili al calore e resistenti alla digestione proteolitica, mentre quelli di classe II sono facilmente degradabili. È stato suggerito, quindi, che i principali epitopi degli allergeni di classe I siano di tipo lineare, mentre quelli degli allergeni di classe II di tipo conformazionale<sup>4</sup>.

Una accurata diagnosi delle allergie alimentari, e in particolare di quelle IgE mediate, è essenziale al fine di suggerire il comportamento dietetico atto a prevenire l'insorgenza di reazioni allergiche, che in alcuni casi possono essere anche fatali.

Oggi l'allergologo ha a disposizione una serie di test *in vivo* o *in vitro* atti a valutare le IgE specifiche verso un possibile allergene alimentare. Essi, però, spesso difettano in sensibilità, e ciò in quanto gli estratti commerciali non sono standardizzati e il loro contenuto, relativamente alle molecole allergeniche, può variare in base alle caratteristiche della fonte dell'estratto, dei processi di estrazione, purificazione e conservazione; ma soprattutto difettano in specificità, in quanto spesso non in grado di distinguere tra presenza di reattività IgE associata a manifestazioni cliniche

e quella non associata a manifestazioni cliniche. Per tale motivo il DBPCFC rimane ancora il *gold standard* nella diagnostica delle allergie alimentari, il quale, comunque, oltre al rischio di provocare reazioni gravi, è indagoso e necessita di strutture adeguate per la sua esecuzione. La possibilità di disporre di test quantitativi per IgE specifiche ha senz'altro rappresentato un passo in avanti, permettendo di stabilire livelli di predittività per vari allergeni, cioè livelli soglia sopra i quali si ha una probabilità di positività al DBPCFC del 95%, come dimostrato dagli studi di Sampson<sup>5</sup>. Tale approccio, però, non è sempre facilmente realizzabile, dal momento che i livelli sono metodo dipendenti e in letteratura sono riportati dati solo per pochi allergeni. Ogni centro, quindi, dovrebbe farsi i propri valori, ma, se ciò è possibile per le allergie più comuni, è praticamente impossibile per quelle dovute ad allergeni più rari.

I progressi nel campo della biologia molecolare, hanno permesso, a partire dalla fine degli anni '80, di identificare, clonare e produrre, sotto forma di proteine ricombinanti, una vasta gamma di molecole allergizzanti e fra queste quelle responsabili di molte allergie alimentari. L'uso di allergeni ricombinanti (o nativi altamente purificati) al posto degli estratti allergenici rappresenta una notevole conquista in allergologia, per diversi motivi. Il primo è che esso permette di superare uno degli scogli più importanti legati all'uso di estratti allergenici, che è quello della standardizzazione, il secondo è che permette di identificare il profilo allergenico di ciascun paziente (*Component Resolved Diagnosis*, CRD); ciò non rappresenta solo un affinamento diagnostico, ma ha notevoli ripercussioni sulla predittività del rischio clinico, come verrà in seguito esemplificato.

Attualmente sono disponibili, sia sul sistema ImmunoCAP (Phadia Diagnostics, Uppsala, SW) che su *microarray*, numerose molecole responsabili di allergie alimentari. Scopo della presente rassegna è quello di tentare di proporre possibili algoritmi relativi al loro utilizzo, dopo una presentazione delle principali peculiarità di alcune fra le maggiori molecole allergeniche in campo alimentare (Tabb. 1, 2 e 3).

### **PRINCIPALI MOLECOLE RESPONSABILI DI ALLERGIE ALIMENTARI IGE MEDIATE**

#### **Molecole associate ad allergie a cibi di origine vegetale**

##### **1) Omologhi di Bet v 1**

La quasi totalità dei pazienti affetti da allergia ai pollini di betulla presenta una reattività verso Bet v 1, molecola appartenente alle *Pathogenesis-related protein* (PR)-10. Omologhi di tale proteina si trovano in molti alimenti di origine vegetale che includono le *Rosaceae* (mela, Mal d 1;

**Tabella 1**

Principali molecole allergeniche omologhe di Bet v 1 e Bet v 2 responsabili delle reazioni crociate tra polline e alimenti di origine vegetale

Molecola	Alimento	Allergene	Sintomi
<i>Pathogenesis-related protein -10 (PR-10)</i> (omologo Bet v 1)	mela	Mal d 1	In genere associata a Sindrome Orale Allergica (SOA). I cibi se cotti sono ben tollerati
	pesca	Pru p 1	
	pera	Pyr c 1	
	ciliegia	Pru av 1	
	albicocca	Pru or 1	
	arachide	Ara h 8	
	kiwi	Act d 8	
	soia	Gly m 4	
	nocciola	Cor a 1	
	sedano	Api g 1	
carota	Dau c 1		
Profilina (omologo Bet v 2)	mela	Mal d 4	In genere associata a SOA, anche se in alcuni casi sono stati segnalati reazioni più gravi dopo assunzione di melone, banana, pomodoro, kiwi, agrumi, litchi. I cibi se cotti in genere sono ben tollerati
	pesca	Pru p 3	
	pera	Pyr c 4	
	ciliegia	Pru av 4	
	arachide	Ara h 5	
	melone	Cuc m 2	
	anguria	Cit l a	
	ananas	Ana c 1	
	mandorla	Pru du 4	
	sedano	Api g 4	
	carota	Dau c 4	
	soia	Gly m 3	
	finocchio	Foe v 2	
paprica	Pap a 2		

pesca, Pru p 1; ciliegia, Pru av 1; albicocca, Pru or 1; etc), le *Apiaceae* (sedano, Api g 1; carota, Dau c 1; etc), la soia (Gly m 4), l'arachide (Ara h 8), il kiwi (Act d 8), la nocciola (Cor a1). Gli omologhi di Bet v 1 sono labili e facilmente distrutti dal calore e dalla digestione peptica<sup>6</sup> e per tale motivo i cibi che li contengono possono essere assunti se cotti o sotto forma di succo di frutta. In genere la sintomatologia legata a tale sensibilizzazione è limitata alla Sindrome Orale Allergica (SOA).

## 2) Profilina

La profilina è una molecola di PM di circa 15 kDa, presente in tutte le cellule eucariote e altamente cross-reattiva. Pazienti sensibilizzati a tale molecola (Bet v 2, betulla; Phl p 12, logliarello; Ole e 2, olivo; etc), presentano reattività cutanea verso praticamente tutti i pollini, nonché presenza di IgE verso un largo numero di alimenti vegetali quali le *Apiaceae*, *Rosaceae*, nocciola, pomodoro, agrumi, melone anguria, banana, zucchini, etc<sup>7</sup>. Le profiline sono anch'esse facilmente distrutte dai succhi gastrici, ma in genere sono più stabili al calore rispetto a Bet v 1. In genere la sensibilizzazione alla profilina si traduce sul piano clinico in SOA, anche se sono stati descritte reazioni più severe con il melone, il pomodoro e gli agrumi, il litchi, la banana.

## 3) Lipid Transfer Proteins

Le *Lipid Transfer Proteins* (LTP) sono piccole molecole di 9-10 kDa, stabili al calore e alla digestione peptica, appartenenti alle PR-14<sup>8</sup>. Sono molecole altamente conservate e ampiamente distribuite nel regno vegetale. Esse sono state inizialmente identificate come allergene nelle *Rosaceae* (pesca, Pru p 3; mela, Mal d 3; prugna, Pru d 3; albicocca, Pru or 3, etc.), ma molecole con alta omologia a quelle contenute nelle *Rosaceae*, dove le molecole si concentrano quali esclusivamente nella buccia, sono poi state identificate anche in specie botaniche non correlate (nocciola, Cor a 8; castagna, Cas s 8; noce Jug r 3; pomodoro, Lyc e 3; grano, Tri a 14; mais, Zea m 4; uva, Vit v 1). Per la loro resistenza al calore e alla digestione peptica esse, a differenza delle PR-10 e delle profiline, possono associarsi a manifestazioni cliniche importanti e la via di sensibilizzazione primaria è quella intestinale. In Italia e nel Sud Europa l'alimento attraverso cui avviene la sensibilizzazione in genere è la pesca, anche se tali soggetti possono manifestare reazioni sistemiche anche dopo ingestione di alimenti appartenenti a specie botaniche non strettamente correlate quali, noci, nocciole, castagna, mais, orzo, uva, arachidi, senape, pomodoro, riso e altri alimenti ancora. E' stato dimostrato da Asero et al.<sup>9</sup> che in questo caso il livello di Pru p 3 (LTP della pesca) è in genere elevato.

## Component Resolved Diagnosis (CRD): l'utilizzo dei componenti molecolari nella diagnostica allergologica *in vitro*

**Tabella 2**

Principali molecole allergeniche associate ad allergie primariamente indotte da alimenti di origine vegetale

Molecola	Alimento	Allergene	Sintomi
<i>Lipid Transfer Proteins (LTP)</i>	pesca	Pru p 3	Sintomi sistemici anche gravi, sia con cibi crudi che cotti
	mela	Mal d 3	
	prugna	Pru d 3	
	ciliegia	Pru av 3	
	albicocca	Pru or 3	
	pera	Pyr c 3	
	uva	Vit v 1	
	nocciola	Cor a 8	
	noce	Jug r 3	
	castagna	Cas s 8	
	pomodoro	Lyc e 3	
	grano	Tri a 4	
	mais	Zea m 4	
arachide	Ara h 9	Sintomi sistemici anche gravi, sia con cibi crudi che cotti.	
lampone	Rub i 3		
2S Albumine	noce		Jug r 1
	noce brasiliana		Ber e 1
	arachide		Ara h 2, h 6, h 7
	anacardio		Ana o 3
	sesamo		Ses i 1
	senape		Sin a 1
	pecan	Car i 1	
rapa	Bra r 1 a		
<i>Vicilin-like proteins</i>	arachide	Ara h 1	Sintomi sistemici anche gravi, sia con cibi crudi che cotti.
	nocciola	Cor a 11	
	noce	Jug r 2	
	anacardio	Ana o 1	
	sesamo	Ses i 1	
	lenticchia	Len c 1	
<i>Legumin-like proteins</i>	pisello	Pis s 1	Sintomi sistemici anche gravi, sia con cibi crudi che cotti.
	arachide	Ara h 3	
	nocciola	Cor a 9	
	anacardio	Ana o 2	
	noce	Jug r 4	
<i>Thaumatococcus-like proteins (TLP)</i>	lupino	Lup a 11 S	Significato clinico ancora poco chiaro (SOA?)
	pesca	Pru p 2	
	mela	Mal d 2	
	ciliegia	Pru av 2	
	kiwi	Act d 2	
Gliadine	uva	Vit v TLP	Anafilassi esercizio-indotta
	Gliadina $\omega$ 5	Tri a 19	

### 4) 2S Albumine

Le 2S albumine sono piccole proteine globulari eterodimere di deposito costituite da due subunità legate da ponti disolfuro. Esse sono molto stabili e rappresentano uno degli allergeni maggiori della noce brasiliana (Ber e 1),

della noce (Jug r 1), dell'anacardio (Ana o 3), della senape (Sin a 1), del sesamo (Ses i 1), del seme di girasole, nonché dell'arachide (Ara h 2, h 6, h 7) e della nocciola. La comparazione delle sequenze aminoacidiche delle 2S albumine di vari semi hanno evidenziato identità del 48%

**Tabella 3**  
Principali molecole allergeniche degli alimenti di origine animale

Alimento	Molecola	Allergene	Resistenza al calore
Latte	$\alpha$ -lattoalbumina	Bos d 4	No
	$\beta$ -lattoglobulina	Bos d 5	No alle alte temperature; Si alla pastorizzazione
	BSA	Bos d 6	No
	immunoglobuline	Bos d 7	
	caseina	Bos d 8	Si
	lattoferrina	Bos d lactoferrin	Parziale
Uovo	ovomucoide	Gal d 1	Si
	ovalbumina	Gal d 2	Si, ma perde parte della allergenicità dopo trattamento al calore
	ovotrasferrina	Gal d 3	No
	lisozima	Gal d 4	Si a 80°C per 2'
Crostacei		Pen a 1	
		Pen m 1	
	tropomiosina	Pan s 1	Si
		Hom a 1	
		Cha f 1	
	arginin-kinasi	Pen m 2	Si
	catena leggera della miosina	Lit v 3	Si
Mitili		Cra g 1	Si
Cefalopodi	tropomiosina	Tod p 1	
Gasteropodi		Tur c 1	
Pesci		Gad c 1	Si
	parvalbumina	Cyp c 1	
		Sal s 1	

tra Ber e 1 e Jug r 1, e dal 34% a oltre il 52% tra Ber e 1 e 2S albumine di altre piante<sup>10,11</sup>, ma ancora relativamente poco è conosciuto circa la cross-reattività clinica. Sono comunque state descritte cross-reattività tra sesamo e semi di papavero<sup>12</sup>, tra semi di girasole e senape<sup>13</sup>, tra noce e nocciola<sup>14</sup>. Pazienti affetti da tale sensibilizzazione possono manifestare reazioni severe.

### 5) Vicilin-like e legumin-like proteins (Cupine)

Alla categoria delle *vicilin-like* appartengono gli allergeni maggiori dell'arachide (Ara h 1), della nocciola (Cor a 11), della noce (Jug r 2), dell'anacardio (Ana o 1), del sesamo (Ses i 3), della lenticchia (Len c 1), mentre a quelle delle *legumin-like* appartengono alcuni allergeni dell'arachide (Ara h 3), della nocciola (Cor a 9), dell'anacardio (Ana o 2), della noce (Jug r 4). Tali proteine sono estremamente resistenti al calore e alla digestione peptica e nel caso dell' Ara h1 è stato dimostrato che le arachidi cotte al forno hanno un contenuto di tale molecola di 22 volte superiore a quello dell'arachide non cotta<sup>15</sup>. Pazienti affetti da sensibilizzazione a tali molecole possono manifestare reazioni molto gravi. Cross-reattività cliniche sono state dimostrate tra arachide, lenticchia, piselli e lupino, mentre infrequente è la cross-reattività tra arachidi e noci<sup>16,17</sup>.

### 6) Thaumatin-like proteins

Le *Thaumatin-Like Proteins* (TLP) sono molecole di 30kDa appartenenti alle PR-5. Sono state identificate come allergene in molti tipi di frutta (pesca, Pru p 2; mela, Mal d 2; kiwi, Act d 2; ciliegia, Pru av 2; uva, Vit v TLP). Non è ancora ben conosciuto il reale ruolo clinico della sensibilizzazione a tali molecole, dal momento che sono rare le monosensibilizzazioni. Nonostante, comunque, si tratti di molecole resistenti all'azione delle proteasi e al calore, i pazienti con tali sensibilizzazioni sembrano presentare solo SOA<sup>7</sup>.

### Molecole associate ad allergie a cibi di origine animale

#### 1) Proteine del latte bovino

Il latte bovino contiene oltre 40 proteine, molte delle quali possono essere allergeniche. L'80% di esse è rappresentato dalla caseina (Bos d 8), mentre il restante 20% è rappresentato dalle siero proteine, fra cui le principali sono la  $\beta$ -lattoglobulina (Bos d 5) (10%), la  $\alpha$ -lattoalbumina (Bos d 4) (5%), le immunoglobuline (Bos d 7) (3%), la albumina serica bovina (BSA) (Bos d 6) (1%), la lattoferrina (presente in tracce). Caseina,  $\beta$ -lattoglobulina e  $\alpha$ -lattoalbumina sono ritenuti gli allergeni maggiori del latte, anche se altre proteine presenti in quantità minori, quali

immunoglobuline, lattoferrina e BSA rivestono un ruolo importante in quanto dal 35 al 50% dei soggetti con allergia al latte presentano una sensibilizzazione verso tali molecole e, in una percentuale dei casi, sono le uniche molecole verso le quali è presente risposta IgE<sup>18</sup>.

La caseina (Bos d 8) comprende una famiglia di proteine, delle quali le più importanti sono  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ - e  $\gamma$ -caseina, le quali concorrono a formare le micelle di caseina, dove la parte più interna è idrofobica e quella esterna idrofila. Le proteine della caseina sono degradate dalla digestione proteolitica, ma sono altamente resistenti al calore e quindi ai processi di pastorizzazione o di ebollizione e ciò è dovuto al fatto che i principali epitopi sono lineari e non conformazionali. Essa rappresenta uno dei maggiori allergeni del latte e dei suoi derivati, e per il fatto che la caseina e i caseinati sono molto utilizzati nell'industria alimentare come additivo in salse, zuppe, stufati, condimenti per insalate, glasse per prodotti da forno, etc., è un potenziale allergene nascosto in molti preparati. Esiste un alto grado di cross-reattività tra latte di mucca e latte di capra e pecora e ciò è ascrivibile alla omologia di sequenza delle caseine, in particolare delle  $\alpha$ -caseine<sup>19</sup> che presentano omologie superiori all'85%.

La  $\alpha$ -lattoalbumina (Bos d 4) è una proteina di 14,2 kDa, monomeric, globulare e legante il  $Ca^{++}$ , la quale presenta 2 domini strutturali,  $\alpha$  e  $\beta$ . E' la principale proteina del latte materno e, oltre ad essere la principale fonte proteica per il lattante, è una sub-unità della lattosio-sintetasi e alcuni suoi prodotti di digestione sembrano rivestire importanza nella maturazione del sistema immunitario. Gli epitopi sono conformazionali, anche se in alcuni pazienti è stata riportata capacità legante le IgE dopo digestione con tripsina, suggerendo un possibile ruolo anche di epitopi lineari<sup>20</sup>. La  $\alpha$ -lattoalbumina è scarsamente resistente al calore.

La  $\beta$ -lattoglobulina (Bos d 5) è una proteina di 18 kDa, che nel latte si trova sotto forma di dimero di 36 kDa il quale interagisce con la caseina durante i processi di trattamento al calore. E' una proteina relativamente resistente all'idrolisi acida e alle proteasi intestinali, appartenente alla famiglia delle lipocaline alle quali appartengono altri allergeni animali, quali la proteina urinaria maggiore del topo (Mus m 1), l'allergene principale del cavallo (Equ c 1) e uno degli allergeni della Blatella (Bla g 4)<sup>21</sup>. Tale proteina non è presente nel latte della specie umana, ma può essere ancora presente nelle formule parzialmente idrolizzate. Studi relativi alla reattività IgE verso tale molecola hanno dimostrato come ci siano parecchi epitopi antigenici, almeno tre dei quali rappresentano gli epitopi immunodominanti. In genere essi sono di tipo lineare, rappresentati in alcuni casi da brevi sequenze e in altri da sequenze più lunghe<sup>22</sup>. Il calore modifica l'allergenicità della molecola in dipendenza dal grado di riscaldamento. In genere la pastorizzazione non è in grado di inibire l'allergenicità. Va segnalato che in alcuni casi è stata descritta la comparsa di nuovi siti allergenici dopo trattamento al calore dovuti o allo smascheramento di siti nascosti nella molecola nativa o alla presenza di nuovi epitopi legati alla reazione chimica con altre molecole presenti nell'alimento<sup>23</sup>. La capacità di legare le IgE, infine, appare decisamente diminuita in alcuni derivati del latte acidificati, come lo yogurt<sup>24</sup>. Una cross-reattività relativa a Bos d 5 è stata dimostrata tra il latte di renna e il latte bovino<sup>25</sup>.

La BSA (Bos d 6) è una proteina di 67 kDa, labile al calore che rappresenta uno degli allergeni maggiori della carne di manzo e uno degli allergeni minori del latte vaccino. Esiste un'alta cross-reattività tra BSA del latte vaccino e le albumine ovine, suine, caprine e del cervo, mentre essa è decisamente più bassa con le albumine di cavallo, coniglio e pollo. Anche albumine presenti nell'epitelio di cane (Can f 3) e gatto (Fel d 2) possono cross-reagire con BSA. E' stato quindi suggerito che pazienti allergici al latte con sensibilizzazione a BSA è opportuno che evitino l'assunzione di carni crude, nonché di tenere in casa cani e gatti<sup>26</sup>.

La lattoferrina (Bos d lattoferrina) è una glicoproteina legante il ferro di 76 kDa, la quale ha un ampio spettro di azioni anti-infettive e anti-infiammatorie e rappresenta un componente fondamentale delle difese mucosali; per questo è particolarmente concentrata nel colostro. E' parzialmente termostabile e resistente alla digestione proteasica<sup>18</sup>.

## **2) Proteine dell'uovo**

Le molecole responsabili dell'allergia all'uovo si trovano localizzate nell'albume, anche se sono stati descritti alcuni casi di reazione a molecole presenti nel tuorlo. Il 55% del bianco d'uovo è composto di ovalbumina, ma altre molecole quali la conalbumina (ovotrasferrina) (12%), l'ovomucoide (11%), l'ovomucina (3.5%) e il lisozima (3.5%) sono presenti in quantità significative. La molecola più frequentemente causa di sensibilizzazione è rappresentata, secondo uno studio condotto da Aabin e coll.<sup>27</sup>, dalla conalbumina (53%), seguita dall'ovomucoide (38%), dalla ovalbumina (32%) e dal lisozima (15%). Esiste comunque una cross-reattività tra conalbumina, ovomucoide e lisozima e tra ovalbumina e apovitellina I, una proteina del tuorlo. Va comunque tenuto presente che alcuni studi possono essere inficiati dal fatto che alcune preparazioni commerciali di proteine allergeniche del bianco d'uovo possono essere contaminate da tracce di altre proteine, a causa di una non ottimale purificazione.

L'ovomucoide (Gal d 1), uno degli allergeni maggiori è una proteina altamente glicosilata di 28 kDa, i cui epitopi antigenici sono prevalentemente conformazionali. Tale molecola è resistente al calore (100°C per 1 ora), all'urea e alle proteasi digestive e ciò è ancora più vero negli infanti dove la scarsa secrezione peptica e il pH più elevato rende scarsamente digeribile la molecola (l'intervallo di pH ottimale per la digestione della molecola è tra 1,5 e 2,5)<sup>28</sup>. Per tali caratteristiche l'ovomucoide può scatenare reazioni allergiche anche gravi, sia con uovo crudo che cotto, in soggetti ad esso sensibilizzati. La sensibilizzazione può avvenire sia per ingestione, che per inalazione o contatto cutaneo. Nei 2/3 dei casi in cui l'allergia si presenta nella prima infanzia scompare con la crescita. Molti studi condotti per valutare il ruolo predittivo delle sensibilizzazioni alle varie molecole allergizzanti dell'uovo hanno evidenziato come la persistenza di altri valori di IgE specifiche rivolte verso l'ovomucoide siano predittivi della persistenza dell'allergia, anche se ciò non è vero in termini assoluti. Studi più recenti<sup>29</sup>, utilizzando la SPOT *membrane technology* o il *peptide microarray*, hanno evidenziato come i soggetti con persistenza dell'allergia abbiano IgE rivolte verso alcuni epitopi selettivi della molecola, ma tali metodologie non sono ancora disponibili nella pratica clinica.

L'ovalbumina (Gal d 2) è una fosfo-glicoproteina di 44

kDa, la quale, sebbene sia termo-stabile, sembra perdere una buona parte della sua allergenicità dopo trattamento al calore. Tale proteina è ben digerita dagli enzimi peptici a pH 1,5- 2,5, ma molto meno a pH superiori, per cui si ritiene, analogamente a quanto avviene per l'ovoucoide, che una ritardata maturazione delle funzioni gastriche possa essere una delle cause della persistenza della sintomatologia legata all'allergia all'uovo nell'infanzia<sup>28</sup>.

L'ovotrasferrina (Conalbumina - Gal d 3) è una glicoproteina di 66-78 kDa, che, oltre nell'albumine, si può trovare nel tuorlo e nel plasma, anche se fra le molecole derivanti dalle tre diverse fonti ci sono alcune differenze nella sequenza aminoacidica e nella glicosilazione. Solo una parziale cross-reattività esiste tra siero albumina di pollo e conalbumina. Il trattamento con il calore diminuisce di molto l'allergenicità della molecola<sup>30</sup>.

Il lisozima (Gal d 4) è una piccola molecola di 14 kDa, la quale resiste al trattamento al calore a 80°C per 2 minuti, anche se può essere inattivata a temperature più basse a pH elevati. Esso rappresenta un allergene minore dell'uovo, ma, dal momento che viene aggiunto come additivo in alcuni cibi (allergene nascosto)<sup>31</sup>, può essere causa di reazioni avverse in soggetti sensibilizzati. Può essere causa di sensibilizzazione anche in addetti dell'industria alimentare o farmaceutica dove vengono prodotte preparazioni contenenti il lisozima<sup>32</sup>.

### **3) Molecole responsabili dell'allergia al pesce**

L'allergene maggiore del pesce è la parvalbumina, una molecola legante il Ca<sup>++</sup> di 12 kDa, contenuta nei muscoli, presente in forma omologa in tutti i tipi di pesce. E' una proteina termoresistente e gastroresistente. La parvalbumina della carpa (Cyp c 1) presenta il 70% degli epitopi della parvalbumina del merluzzo (Gad c 1), del tonno e del salmone (Sal s 1). La parvalbumina purificata della carpa è stata dimostrata reagire con IgE di oltre il 95% dei soggetti allergici al pesce<sup>33</sup>, dimostrando come essa sia un ottimo marcatore di tale allergia. E' stato dimostrato come la parvalbumina dei pesci, e nello specifico quella del merluzzo (Gad c 1), condivide alcuni epitopi leganti IgE con quella della rana e ciò spiega alcuni casi di ipersensibilizzazione contemporanea a pesci e rana. Studi di RAST inibizione hanno dimostrato come, in questi casi, la sensibilizzazione primaria avvenga con la parvalbumina del pesce<sup>34</sup>.

### **4) Molecole responsabili dell'allergia ai crostacei**

L'allergia ai crostacei è una delle più comuni allergie alimentari negli adulti ed è spesso associata a reazioni severe. L'allergene maggiore di tale allergia è la tropomiosina, una molecola di 35-38 kDa, altamente conservata, stabile al calore e alla digestione, la quale costituisce sino al 20% delle proteine totali della parte edibile del crostaceo. Oltre che essere un importante allergene dei crostacei, quali gamberetti (Pen a 1), aragosta (Pan s 1, Hom a 1), Granchio (Cha f 1), la tropomiosina è un allergene anche di vari molluschi quali il calamaro (Tod p 1), la lumaca (Tur c 1), l'ostrica (Cra g 1), e altri invertebrati, quali il *Dermatophagoides pteronissinus* (Der p 10), lo scarafaggio (Per a 7, Bla g 7). La tropomiosina, quindi, può essere considerata un panallergene degli invertebrati, con alto grado di omologia e quindi di cross-reattività fra le varie specie<sup>35</sup>. Le tropomiosine dei vertebrati, al contrario, sono

molecole virtualmente prive di capacità allergenica.

Se la tropomiosina sembra essere la causa della maggior parte delle reazioni allergiche ai crostacei, una quota di pazienti con reazioni allergiche dopo ingestione di tali alimenti, non presentano IgE rivolte verso la tropomiosina. Di recente sono state individuate almeno altre due molecole allergeniche, una delle quali è l'arginin-kinasi (Pen m 2)<sup>36</sup> e un'altra è una proteina di 20 kDa, identificata come la catena leggera della miosina e codificata come Lit v 3<sup>37</sup>. Quest'ultima è stata dimostrata avere cross-reattività con molecole omologhe contenute nella *Blatella germanica* e negli acari<sup>37,38</sup>.

## **ESEMPI DI ALGORITMI DIAGNOSTICI UTILIZZANTI LA CRD**

Dopo aver descritto le caratteristiche delle principali molecole allergeniche responsabili delle reazioni avverse ad alimenti si procederà con alcuni esempi del loro utilizzo nella pratica clinica, sia (a) partendo da un riscontro laboratoristico di positività ad un estratto, sia (b) da una specifica condizione clinica.

### **a) Definizione del profilo allergologico, tramite utilizzo di molecole allergeniche, partendo da un riscontro laboratoristico di positività all'estratto allergenico**

#### **1) Positività all'estratto di nocciola (f17)**

Tale positività può avere un diverso significato clinico in base alla molecola che ne è all'origine. Utilizzando solo poche molecole quali una PR-10 (Bet v 1 o Cor a 1), una profilina (Bet v 2 o Phl p 12) e una LTP (Cor a 8) è possibile definire con buona probabilità i fattori di rischio per il paziente. I soggetti che risulteranno positivi per PR-10 e/o profilina sono sensibilizzati primariamente a pollini, i quali, assumendo la nocciola, o non avranno alcun sintomo o presenteranno una SOA, ma solo assumendo il frutto crudo, non tostato. I pazienti con positività a profilina in genere hanno reazioni con una gamma più estesa di frutta e/o verdure. I soggetti, invece, in cui la positività alla nocciola è data da LTP (Cor a 8), sono in genere primariamente sensibilizzati alla nocciola e possono manifestare reazioni gravi in seguito ad assunzione di tale frutto, sia crudo che arrostito o tostato. Con il sistema in *microarray Immuno-Sorbent Allergen Chip* (ISAC) è possibile dosare anche le IgE rivolte verso Cor a 9, legumina anch'essa associata a reazioni potenzialmente gravi, anche con nocciole tostate. La negatività per tutte le molecole sopra riportate, invece, fa ipotizzare reattività per altre molecole non ancora disponibili in diagnostica, quali le oleosine o Cor a 11 (*vicilin-like*).

#### **2) Positività all'estratto di pesca (f95) o di altra frutta appartenente alle Rosaceae**

Analogamente a quanto descritto sopra per la nocciola è importante distinguere se si tratta di reazione crociata con pollini o una sensibilizzazione primaria legata a LTP (Pru p 3). Anche in tal caso, l'uso di sole tre molecole (Bet v 1, Bet v 2, Pru p 3) è in grado di definire il profilo allergologico del paziente. Coloro che risultano positivi a Pru p 3 possono accusare manifestazioni sistemiche, oltre alla SOA, anche con frutta cotta e con succhi di frutta. Dal

momento che tale allergene si trova nella parte del frutto vicino alla buccia, la frutta responsabile dei sintomi teoricamente potrebbe essere assunta se ben sbucciata, ma ciò non ha valore assoluto. Oltre a reazioni con frutta della famiglia delle *Rosaceae* chi è sensibilizzato a LTP (Pru p 3) può accusare sintomi dopo assunzione di vegetali appartenenti a famiglie diverse dalle *Rosaceae*, quali noce, mais, pomodoro, orzo (birra), riso ed altri ancora, in particolare se il livello delle IgE è elevato<sup>9</sup>.

### **3) Positività all'estratto di gambero (f24)**

Il quesito primario che ci si pone è se il paziente è primariamente sensibilizzato al gambero o se si tratta di cross-reattività legata a sensibilizzazione primaria agli acari. La determinazione delle IgE specifiche per la tropomiosina (Pen a 1 o Der p 10) in associazione a Der p 1 e Der p 2 può dare risposta a tale quesito diagnostico. Soggetti con sola positività a Pen a 1 o Der p 10 sono primariamente sensibilizzati ai crostacei e quindi possono avere reazioni gravi in seguito alla assunzione di tale alimento, ma anche di mitili, seppia o polpo. In caso di positività, oltre che a Pen a 1 / Der p 10, anche a Der p 1 e/o Der p 2, con alta probabilità la sensibilizzazione primaria è da acari, con sviluppo secondario di IgE anche verso la tropomiosina degli acari. Tali pazienti possono avere reazioni avverse in seguito ad assunzione di crostacei. In caso di positività di Der p 1 e/o Der p 2 e negatività di Pen a 1 / Der p 10, la positività IgE per f24 è dovuta ad altre molecole cross-reattive tra acari e gamberetto, ma in tal caso il significato clinico è incerto.

### **4) Positività all'estratto di arachide (f13)**

L'arachide possiede molte molecole allergeniche, alcune delle quali responsabili di gravi reazioni allergiche, mentre altre sono attribuibili a cross-reattività con pollini, quali Ara h 8 (PR-10) e Ara h 5 (profilina, omologo di Bet v 2). Le molecole legate a sensibilizzazione primaria all'arachide sono Ara h 1 (7S globulina, *vicilin-like*), Ara h 2 (2S albumina, classe a cui appartengono anche Ara h 6 e Ara h 7), Ara h 3 (11S globulina, *legumin-like*), Ara h 9 (LTP). Ara h 1, h 2, h 3, h 8 e h 9, sono ora a disposizione per la diagnostica. Tale molecole, con l'aggiunta di una profilina (Bet v 2 o Phl p 12) sono in grado di offrire un completo profilo allergologico in sensibilizzati all'arachide. Analogamente a quanto visto sopra per nocciola o pesca, sensibilizzazioni a profiline o PR-10 sono indice di cross-reattività con pollini, che al più si estrinsecano con una SOA, mentre sensibilizzazioni ad altri allergeni indicano sensibilizzazione primaria. Quasi tutti i soggetti sono sensibilizzati ad Ara h 2 (principale marcatore di tale allergia), ma i soggetti con sensibilizzazioni anche ad Ara h 1 e Ara h 3, sembrano essere quelli che presentano reazioni più gravi. Recentemente è stata riportata l'importanza di Ara h 9 (LTP), in pazienti dell'area mediterranea<sup>39</sup>.

## **b) Definizione del profilo allergologico partendo da una specifica condizione clinica**

### **1) SOA legata all'assunzione di frutta appartenente alla famiglia delle *Rosaceae***

In questo caso il quesito clinico è quello di sapere se il paziente, oltre alla SOA, potrà sviluppare in futuro anche

reazioni sistemiche dopo assunzione di frutta. La determinazione della reattività IgE verso Bet v 1, Bet v 2 e Pru p 3, è in grado di rispondere esaurientemente a tale quesito, come già descritto al punto 2 del paragrafo precedente.

### **2) Pazienti con reazioni avverse ai crostacei**

In base a quanto precedentemente riportato, la determinazione di Pen a 1 è in grado di confermare la sensibilizzazione ai crostacei e quindi la potenziale pericolosità della reazione. Non tutti i soggetti con reazioni allergiche ai crostacei, però, presentano positività per tale allergene, per cui, dal momento che ancora non abbiamo a disposizione a scopo diagnostico le altre molecole dimostrate responsabili di tale allergia (in particolare Lit v 3), è opportuno usare in associazione a Pen a 1, anche l'estratto (f 24).

### **3) Pazienti con reazioni avverse in seguito ad assunzione di pesce**

Poiché l'allergene responsabile delle reazioni avverse è la parvalbumina, la quale ha un alto grado di omologia fra i vari tipi di pesce, può essere sufficiente la determinazione delle IgE specifiche verso Cyp c 1 o verso Gad c 1 per la definizione diagnostica.

### **4) Pazienti con reazioni avverse al latte e all'uovo**

Le principali caratteristiche delle molecole allergeniche di tali alimenti e il loro significato clinico sono stati ampiamente descritti nel capitolo relativo alle molecole associate ai cibi di origine animale. Per la definizione del profilo allergico in pazienti sensibilizzati al latte con il sistema ImmunoCAP sono oggi a disposizione la  $\alpha$ -lattalbumina (Bos d 4), la  $\beta$ -lattoglobulina (Bos d 5), la caseina (Bos d 8), mentre con il sistema *microarray* (ISAC) è possibile determinare anche le IgE rivolte verso la lattoferrina (Bos lactoferrin) e l'albumina serica bovina (Bos d 6). Per la definizione del profilo allergico in sensibilizzati all'uovo è possibile valutare la presenza di IgE verso ovomucoide (Gal d 1), ovalbumina (Gal d 2) e ovotrasferrina (Gal d 3).

Soggetti allergici al latte con sensibilizzazione alla caseina presentano reazioni anche con cibi cotti e i bambini con alti valori di IgE verso tale molecola hanno maggiori probabilità di persistenza di tale allergia. Pazienti con sensibilizzazione a Bos d 4 tollerano il latte se trattato al calore, come pure quelli sensibilizzati a Bos d 5; in quest'ultimo caso il latte deve essere bollito, in quanto la pastorizzazione non è sufficiente.

Soggetti allergici all'uovo con sensibilizzazione all'ovomucoide (Gal d 1) presentano reazioni anche con cibi cotti e i bambini con alti valori di IgE verso tale molecola hanno maggiore probabilità di persistenza di tale allergia.

### **5) Pazienti con anafilassi esercizio-indotta, cibo-dipendente**

Tale particolare condizione clinica, in cui l'anafilassi compare entro le 4 ore seguenti all'ingestione di un cibo allergizzante, seguito da esercizio fisico, spesso è associata all'assunzione di cereali. In questo caso l'allergene in causa è l' $\omega$ -5 gliadina (Tri a 19), la cui determinazione, quindi, risulta essere un test diagnostico altamente predittivo per forma di anafilassi. Non è ancora del tutto noto il meccanismo fisiopatologico di tale condizione clinica, ma sembra che l'esercizio fisico sia in grado di attivare la tran-

sglutaminasi della mucosa intestinale, facilitando la formazione di complessi gliadina-transglutaminasi, i quali favorirebbero il legame delle IgE rivolte verso l' $\omega$ -5 gliadina<sup>40</sup>.

In conclusione, quindi, nelle allergie alimentari la CRD, definendo il profilo allergologico di ciascun singolo paziente, rappresenta un importante strumento in grado di predire il rischio di reazioni sistemiche e, di conseguenza, risulta fondamentale per le indicazioni dietetiche e terapeutiche di ogni singolo caso. Come emerge dagli esempi di algoritmi diagnostici sopra riportati, importanti indicazioni possono essere ottenute utilizzando relativamente poche molecole, già disponibili con le metodologie convenzionali utilizzate nei laboratori clinici per la determinazione delle IgE specifiche. E' però probabile che la continua identificazione e caratterizzazione di nuove molecole associate ad allergie alimentari, e non solo, renda più completi, ma anche più complessi i singoli profili allergenici, con la necessità di dover dosare contemporaneamente parecchie molecole. E' pertanto ipotizzabile che le tecnologie *multiplexing*, quali il *microarray*, rappresenteranno in futuro le metodologie d'elezione per la diagnostica allergologica *in vitro*.

## BIBLIOGRAFIA

1. **Johansson SG, Bieber T, Dahl R, et al.** Revised nomenclature for allergy for global use: report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:832-6.
2. **Zuidmeer L, Goldhahn K, Rona RJ, et al.** The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1210-8.
3. **Branum AM, Lukas SL.** Food allergy among U.S. children: trends in prevalence and hospitalization. *NCHS Data Brief* 2008; 10:1-8.
4. **Bannon GA, Ogawa T.** Evaluation of available IgE-binding epitope data and its utility in bioinformatics. *Mol Nutr Food Res* 2006; 50:638-44.
5. **Sampson HA.** Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 201; 107:891-6.
6. **Bjorksten F, Halmepuro L, Hannuksela M.** Extraction and properties of apple allergens. *Allergy* 1980; 35:671-7.
7. **Asero R.** Plant-derived food allergens: an overview. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2006; 38:220-3.
8. **Breitender H, Ebner C.** Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:27-36.
9. **Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, et al.** Relationship between peach lipid transfer protein IgE levels hypersensitivity to non-Rosaceae vegetable food in patients allergic to lipid transfer protein. *Ann Allergy Asthma Immunol* 204; 92:268-72.
10. **Mendez-Arias L, Moneo I, Dominguez J, et al.** Primary structure of the major allergen of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) seed, Sin a 1. *Eur J Biochem* 1988;177:159-65.
11. **Kortt AA, Caldwell JB, Lilley GG, et al.** Amino acid and cDNA sequences of a methionine-rich 2S protein from sunflower seed (*Helianthus annuus* L.) *Eur J Biochem* 1991; 195:329-34.
12. **Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, et al.** A case of sesame seed-induced anaphylaxis. *Allergy* 1999; 54:526-33.
13. **Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, et al.** Allergenic similarities of 2S albumins. *Allergy* 2002; 57:62-3.
14. **Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, et al.** Walnut-induced anaphylaxis with cross-reactivity to hazelnut and Brazil nut. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:358-60.
15. **Peeters KA, Koppelman SJ, van Hoffen E, et al.** Does skin prick test reactivity to purified allergens correlate with clinical severity of peanut allergy? *Clin Exp Allergy* 2007; 37:108-15.
16. **Wensing M, Knulst AC, Piersma S, et al.** Patients with anaphylaxis to pea can have peanut allergy caused by cross-reactive IgE to vicilin (Ara h 1). *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:420-4.
17. **Teuber SS, Comstook SS, Sathe SK, et al.** Tree nut allergy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2003; 3:54-61.
18. **Wal JM.** Bovine milk allergenicity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; 93(5 Suppl 3):S2-11.
19. **Spuergin P, Walter M, Schiltz E, et al.** Allergenicity of alpha-caseins from cow, sheep, and goat. *Allergy* 1997; 52:293-8.
20. **Maynard F, Jost R, Wal JM.** Human IgE binding capacity of tryptic peptides from bovine alpha-lactalbumin. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113:478-88.
21. **Flower DR.** The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 1996; 318:1-14.
22. **Selo I, Clement G, Bernard H, et al.** Allergy to bovine beta-lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:1055-63.
23. **Davis PJ, Williams SC.** Protein modification by thermal processing. *Allergy* 1998; 53(46 Suppl):102-5.
24. **Ehn BM, Ekstrand B, Bengtsson U, et al.** Modification of IgE binding during heat processing of the cow's milk allergen beta-lactoglobulin. *J Agric Food Chem* 2004; 52:1398-403.
25. **Suutari TJ, Valkonen KH, Karttunen TJ, et al.** IgE cross-reactivity between reindeer and bovine milk beta-lactoglobulins in cow's milk allergic patients. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2006;16:296-302.
26. **Vincente-Serrano J, Caballero ML, Rodriguez-Perez R, et al.** Sensitization to serum albumins in children allergic to cow's milk and epithelia. *Pediatr Allergy Immunol* 2007; 18:53-7.
27. **Aabin B, Poulsen LK, Ebbehøj K, et al.** Identification of IgE-binding egg white proteins: comparison of results obtained by different methods. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 109:50-7.
28. **Yoshino R, Sakai K, Mizuka Y, et al.** Peptic digestibility of raw and heat-coagulated hen's egg white proteins at acid pH range. *Int J Food Sci Nutr* 2004; 55:635-40.



29. **Järvinen KM, Beyer K, Vila L, et al.** Specificity of IgE antibodies to sequential epitopes of hen's egg ovomucoid as a marker for persistence of egg allergy. *Allergy* 2007; 62:758-65.
30. **Peng HJ, Chang ZN, Tsai LC, et al.** Heat denaturation of egg-white proteins abrogates the inductions of oral tolerance of specific Th2 immune response in mice. *Scand J Immunol* 1998; 48:491-6.
31. **Proctor VA, Cunningham FE.** The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1988; 26:359-95.
32. **Park HS, Nahl DH.** New occupational allergen in a pharmaceutical industry: serratial peptidase and lysozyme chloride. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997; 78:225-9.
33. **Bugajska-Schreter A, Grote M, Vangelista L, et al.** purification, biochemical, and immunological characterization of a major food allergen: different immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound forms of carp parvalbumin. *Gut* 2000; 46:661-9.
34. **Hilger C, Thill L, Grigioni F, et al.** IgE antibodies of fish allergic patients cross-react with frog parvalbumin. *Acta allergologica* 2004; 59:653-60.
35. **Reese G, Ayuso R, Lehrer SB.** Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen. *Int arch allergy Immunol* 1999; 119:247-58.
36. **Garcia-Oozco KD, Aispuro-Hernandez E, Yepiz-Plascencia G, et al.** Molecular characterization of arginine kinase, an allergen from the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Int Arch allergy Immunol* 2007; 144:23-8.
37. **Ayuso R, Grishina G, Bardina L, et al.** Myosin light chain is a novel shrimp allergen, Lt v 3. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:795-802.
38. **Villalta D, Tonutti E, Visentini D, et al.** Detection of a novel 20 kDa shrimp allergen showing cross-reactivity to house dust mite. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*, 2010, in press.
39. **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.
40. **Palosuo K, Varjonen E, Nurkkala J, et al.** Transglutaminase-mediated cross-linking of a peptic fraction of  $\omega$ -5 gliadin enhances IgE reactivity in wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:1386-92.

*Per corrispondenza:*

Dott. Danilo Villalta  
Allergologia e Immunologia clinica  
Dipartimento di medicina di laboratorio  
A.O. "S. Maria degli Angeli"  
Via Montereale 24 - 33170 Pordenone  
Tel.: 0434399281 - Fax: 0434399344  
e-mail: danilo.villalta@aopn.fvg.it