

Italian Journal of  
**Allergy and Clinical  
Immunology**  
Giornale Italiano di  
**Allergologia e  
Immunologia Clinica**



Official Journal of  
the Italian Society  
of Allergy and  
Clinical Immunology

Volume **21**  
Issue **3**  
September **2011**

**Consiglio Direttivo**  
*Governing Board*

*Presidente/President*  
M. Triggiani

*Past President*  
L. Fontana

*Presidente Eletto/President Elect*  
G.W. Canonica

*Vice Presidente/Vice President*  
E.N. Nettis

*Segretario-Tesoriere/*  
*Secretary-Treasurer*  
D. Macchia

*Historian*  
A. Passaleva

*Consiglieri/Members*  
C. Bucca  
A. de Paulis  
M. Di Gioacchino  
S. Gangemi  
E. Heffler  
C. Incorvaia  
F. Marcucci  
M.L. Pacor  
E. Ridolo  
A. Romano  
O. Rossi  
M.G. Sabbadini

**Direttore Scientifico**  
*Editor-in-Chief*  
P.P. Dall'Aglio

**Co-direttore Scientifico**  
*Associate Editor*  
M. Triggiani

**Comitato Scientifico**  
*Editorial Board*  
C. Astarita  
B. Bochner  
S. Bonini  
N. Crimi  
R. D'Amelio  
G.F. Del Prete  
S. Gangemi  
C. Incorvaia  
G. Lucivero  
C. Masala  
M.L. Pacor  
G. Piu  
A. Romano  
B. Saia  
S. Sozzani  
M. Tagliatela  
P. Valent

**Direttore**  
*Editor*  
L. Fontana

**Direttore Responsabile**  
*Managing Editor*  
P.A. Pacini

**Segreteria di Redazione**  
*Editorial Office*  
L. Andreazzi  
Pacini Editore S.p.A.  
Via Gherardesca, 1  
56121 Pisa  
Tel. 050 3130285  
Fax 050 3130300  
landreazzi@pacineditore.it

© Copyright by Società Italiana di  
Allergologia e Immunologia Clinica

**Edizione**  
Pacini Editore S.p.A.  
Via Gherardesca, 1  
56121 Pisa  
Tel. 050 313011  
Fax 050 3130300  
info@pacineditore.it  
www.pacini medicina.it

PACINI  
EDITORE  
MEDICINA

# Informazioni per gli autori

## comprese le norme per la preparazione dei manoscritti

L'ITALIAN JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, rivista trimestrale, pubblica lavori originali, editoriali, note di attualità, di aggiornamento e di terapia, casi clinici e rassegne della letteratura riguardanti l'allergologia e l'immunologia clinica.

In una lettera di accompagnamento dell'articolo, firmata da tutti gli Autori, deve essere specificato che i contributi sono inediti, non sottoposti contemporaneamente ad altra rivista, ed il loro contenuto conforme alla legislazione vigente in materia di etica della ricerca.

In caso di sperimentazioni su umani, gli Autori devono attestare che tali sperimentazioni sono state svolte secondo i principi riportati nella Dichiarazione di Helsinki (1975, rev. 2000); gli Autori sono gli unici responsabili delle affermazioni contenute nell'articolo e sono tenuti a dichiarare di aver ottenuto il consenso informato per la sperimentazione e per l'eventuale riproduzione di immagini. Per studi su cavie animali, gli Autori sono invitati a dichiarare che sono state rispettate le relative leggi nazionali e le linee guida istituzionali.

La Redazione accoglie solo i testi conformi alle norme editoriali generali e specifiche per le singole rubriche. La loro accettazione è subordinata alla revisione critica di esperti, all'esecuzione di eventuali modifiche richieste ed al parere conclusivo del Direttore.

Conflitto di interessi. Gli Autori devono dichiarare se hanno ricevuto finanziamenti o se hanno in atto contratti o altre forme di finanziamento, personali o istituzionali, con Aziende i cui prodotti sono citati nel testo. Questa dichiarazione verrà trattata dal Direttore come una informazione riservata e non verrà inoltrata ai revisori. I lavori accettati verranno pubblicati con l'accompagnamento di una dichiarazione ad hoc, allo scopo di rendere nota la fonte e la natura del finanziamento.

### Norme generali per gli Autori

Testo: in lingua italiana o inglese, da inviare a mezzo E-mail, unitamente alla lettera di cessione del copyright, alla Redazione della Rivista:

Italian Journal of Allergy and Clinical Immunology  
Pacini Editore S.p.A. - Segreteria di Redazione: Lisa Andreazzi  
landreazzi@pacinieditore.it

Il dattiloscritto dovrà avere le seguenti caratteristiche:

- ampio margine
- massimo 25 righe per pagina, con interlinea doppia
- numerazione delle pagine a partire dalla prima e dovrà essere corredato di:
  - 1) titolo del lavoro (in italiano ed inglese);
  - 2) riassunto (in italiano ed inglese);
  - 3) parole chiave (in italiano ed inglese);
  - 4) titolo e didascalie delle tabelle e delle figure.

Agli Autori è riservata la correzione ed il rinvio (entro e non oltre 3 giorni dal ricevimento) delle sole prime bozze del lavoro.

Nella prima pagina devono comparire:

il titolo (conciso); le parole chiave; i nomi degli Autori e l'Istituto o Ente di appartenenza; la rubrica cui si intende destinare il lavoro (decisione che è comunque subordinata al giudizio del Direttore); il nome, l'indirizzo ed il recapito telefonico dell'Autore cui sono destinate la corrispondenza e le bozze.

Nella seconda pagina comparirà il riassunto e, nelle ultime, la bibliografia, le didascalie di tabelle e figure e l'eventuale menzione del Congresso al quale i dati dell'articolo siano stati comunicati (tutti o in parte).

Tabelle: devono essere contenute nel numero (evitando di presentare lo stesso dato in più forme), dattiloscritte una per pagina e numerate progressivamente con numerazione romana. Nel testo della tabella e nella legenda utilizzare, nell'ordine di seguito riportato, i seguenti simboli: \*, †, ‡, §, ¶, \*\*, ††, ‡‡, ...

Figure: Inviare le immagini in files separati dal testo e dalle tabelle.

Software e formato: inviare immagini preferibilmente in formato TIFF o EPS, con risoluzione minima di 300 dpi e formato di 100 x 150 mm. Altri formati possibili: JPEG, PDF. Evitare nei limiti del possibile .PPT (file di Powerpoint) e .DOC (immagini inseriti in file di .DOC).

Nome del/i file/s: inserire un'estensione che identifichi il formato del file (esempio: .tif; .eps).

Bibliografia: va limitata alle voci essenziali identificate nel testo con numeri arabi ed elencate al termine del manoscritto nell'ordine in cui sono state citate. Devono essere riportati i primi tre Autori, eventualmente seguiti da et al. Le riviste devono essere citate secondo le abbreviazioni riportate su Index Medicus.

Esempi di corretta citazione bibliografica per:

articoli e riviste:

Cazzola M, Mattina A, Matera MG. *Alterazioni immunologiche nella sindrome di Kawasaki*. Arch Dis Child 1989;64:360-2.

libri:

Smith DW. *Allergy and Inflammation*. Third Edition. Philadelphia: WB Saunders Co. 1982.

capitoli di libri o atti di Congressi:

Krmpotic-Nemanic J, Kostovis I, Rudan P. *Platelets as effectors of hypersensitivity reactions*. In: Smith DW, ed. *Allergy and Inflammation*. Third Edition. Philadelphia: WB Saunders Co. 1982, pp. 14-25.

Ringraziamenti, indicazioni di grants o borse di studio, vanno citati al termine della bibliografia.

Le note, contraddistinte da asterischi o simboli equivalenti, compariranno nel testo, a piè di pagina.

I farmaci vanno indicati col nome chimico. Solo se inevitabile potranno essere citati col nome commerciale (scrivendo in maiuscolo la lettera iniziale del prodotto).

### Norme specifiche per le singole rubriche

1. Editoriali: sono intesi come brevi considerazioni generali e pratiche su temi d'attualità, in lingua italiana, sollecitati dal Direttore o dai componenti il Comitato di redazione. È omissso il riassunto.

2. Articoli d'aggiornamento: possono anche essere commissionati dal Direttore. Di regola non devono superare le 20 pagine dattiloscritte, comprese tabelle, figure e voci bibliografiche. Legenda di tabelle e figure sono a parte.

3. Articoli originali: comprendono lavori che offrono un contributo nuovo o frutto di una consistente esperienza, anche se non del tutto originale, in un determinato settore.

Devono essere suddivisi nelle seguenti parti: introduzione, materiale e metodi, risultati e discussione.

Il testo non dovrebbe superare le 15 pagine dattiloscritte compresi iconografia, bibliografia e riassunto. Legenda di tabelle e figure a parte. Il riassunto ed il summary (in lingua inglese) non devono superare le 250 parole ciascuno, e vanno suddivisi di regola nelle seguenti sezioni: Introduzione/Introduction, Metodi/Methods, Risultati/Results, Discussione/Discussion. Nella sezione Introduzione/Introduction va sintetizzato con chiarezza l'obiettivo (o gli obiettivi) del lavoro, vale a dire l'ipotesi che si è inteso verificare; nei Metodi/Methods va riportato il contesto in cui si è svolto lo studio (Ospedale, Centro specialistico ...), il numero e il tipo di soggetti analizzati, il disegno dello studio (randomizzato, in doppio cieco ...), il tipo di trattamento e il tipo di analisi statistica impiegata. Nella sezione Risultati/Results vanno riportati i risultati dello studio e dell'analisi statistica. Nella sezione Discussione/Discussion va riportato il significato dei risultati soprattutto in funzione delle implicazioni cliniche.

4. Comunicazioni brevi: comprendono brevi lavori (non più di 3 pagine di testo) con contenuto analogo a quello degli Articoli originali e come questi suddivisi. Sono ammesse 2 tabelle o figure e una decina di voci bibliografiche. Non è prevista correzione di bozze da parte dell'Autore.

5. Casi clinici: vengono accettati dal Comitato di Redazione solo lavori di interesse didattico e segnalazioni rare. La presentazione comprende l'esposizione del caso ed una discussione diagnostico-differenziale. Il testo deve essere conciso e corredato, se necessario, di 1-2 figure o tabelle e di pochi riferimenti bibliografici essenziali. Il riassunto è di circa 50 parole.

6. Diagnostica e ricerca di Laboratorio: articoli originali o reviews che affrontino temi di diagnostica e ricerca delle malattie allergiche e immu-

niarie dal punto di vista del laboratorio. Gli articoli originali dovrebbero includere descrizioni di nuove metodiche o significative innovazioni di metodiche esistenti. Devono essere strutturati come descritto per Articoli di aggiornamento od Articoli originali.

7. Lettere alla direzione: possono far riferimento a problemi di interesse allergologico od immunologico d'attualità oppure ad articoli già pubblicati. Nel secondo caso la lettera verrà preventivamente inviata agli Autori dell'articolo e l'eventuale risposta degli stessi pubblicata in contemporanea. La loro estensione non dovrebbe superare le due pagine dattiloscritte, precedute dal titolo. È richiesta la sola lingua italiana.

8. Continuing Medical Education: comprende attività educazionali che hanno lo scopo di "mantenere, sviluppare e migliorare le nozioni scientifiche e l'abilità professionale del medico al fine di assicurare adeguate prestazioni e la più alta professionalità al paziente", di garantire continuità, sistematicità e ricorrenza degli interventi didattici teorico-pratici nel corso dell'esercizio della professione.

9. Bollettino: questa rubrica si articola in diverse sezioni: notizie sindacali, verbali del Consiglio Direttivo, notizie di segreteria e una sezione in cui vengono raccolte tutte le informazioni che possono essere di qualche interesse per i Soci della SIAIC. Il testo non dovrebbe superare le 10 pagine dattiloscritte.

10. Forum di Allergia e Immunologia Clinica: Questa sezione è dedicata alla discussione di un argomento specifico secondo le modalità di un dibattito processuale.

11. Sezioni regionali: questa rubrica ospiterà una rassegna sui Convegni, Corsi, Meeting, ecc. organizzati dalle Sezioni. Verranno inoltre pubblicati gli Abstracts di più alto contenuto scientifico dei lavori presentati ai Convegni delle Sezioni. Il testo non dovrebbe superare le 10 pagine dattiloscritte.

12. Notiziario: In libreria, Dalla letteratura medica; Corsi e Congressi; Notizie varie.

L'editore resta a disposizione degli aventi diritto con i quali non è stato possibile comunicare e per le eventuali omissioni.

Per le inserzioni pubblicitarie e le richieste di abbonamento rivolgersi a:  
Italian Journal of Allergy and Clinical Immunology  
Pacini Editore S.p.A. - via Gherardesca, 56121 Pisa  
Tel. 050 313011 - Fax 050 3130300

#### ABBONAMENTI

L'ITALIAN JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY è trimestrale (ogni anno vengono pubblicati 4 fascicoli); viene inviata gratuitamente a tutti i Soci in regola con la quota annuale. I prezzi degli abbonamenti annuali per i non Soci sono i seguenti: Italia € 75; estero € 90. Questo fascicolo € 25.

Numeri e annate arretrate: il doppio (se disponibili).

I dati relativi agli abbonati sono trattati nel rispetto delle disposizioni contenute nel D.Lgs. del 30 giugno 2003 n. 196 a mezzo di elaboratori elettronici ad opera di soggetti appositamente incaricati. I dati sono utilizzati dall'editore per la spedizione della presente pubblicazione. Ai sensi dell'articolo 7 del D.Lgs. 196/2003, in qualsiasi momento è possibile consultare, modificare o cancellare i dati o opporsi al loro utilizzo scrivendo al Titolare del Trattamento: Pacini Editore S.p.A. - Via A. Gherardesca 1 - 56121 Pisa.

Rivista stampata su carta TCF (Total Chlorine Free) e verniciata idro.

Le fotocopie per uso personale del lettore possono essere effettuate nei limiti del 15% di ciascun fascicolo di periodico dietro pagamento alla SIAE del compenso previsto dall'art. 68, commi 4 e 5, della legge 22 aprile 1941 n. 633.

Le riproduzioni effettuate per finalità di carattere professionale, economico o commerciale o comunque per uso diverso da quello personale possono essere effettuate a seguito di specifica autorizzazione rilasciata da AIDRO, Corso di Porta Romana n. 108, Milano 20122, e-mail: segreteria@aidro.org e sito web: www.aidro.org.

Aut. Trib. di Pisa n. 774 del 31/12/1996

Finito di stampare presso le Industrie Grafiche della Pacini Editore S.p.A., Pisa - novembre 2011

## Information for authors including editorial standards for the preparation of manuscripts

The ITALIAN JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY is a quarterly journal that publishes original papers, editorials, notes on subjects of topical interest, case reports, and reviews in the areas of allergology and clinical immunology.

A separate covering letter, signed by every Author, must state that the material submitted has not been previously published, and is not under consideration (in whole or in part) elsewhere, and that it is conform with the regulations currently in force regarding research ethics. If an experiment on humans is described, a statement must be included that the work was performed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki (1975, rev. 2000). The Authors are solely responsible for the statements made in their paper, and must state that they have obtained the informed consent of patients for their participation in the experiments and for the reproduction of photographs. For studies performed on laboratory animals, the authors must state that the relevant national laws or institutional guidelines have been adhered to.

Only papers that have been prepared in strict conformity with the editorial norms outlined herein will be considered for publication. Their eventual acceptance is conditional upon a critical assessment by experts in the field, the implementation of any changes requested, and the final decision of the Editor.

#### Conflict of Interests

In the letter accompanying the article, Authors must declare if they got funds, or other forms of personal or institutional financing – or even if they are under contract – from Companies whose products are mentioned in the article. This declaration will be treated by the Editor as confidential, and will not be sent to the referees. Accepted works will be published accompanied by a suitable declaration, stating the source and nature of the financing.

#### General instructions

The text must be written in either Italian or English and sent by E-mail (with copyright transfer statement) to Italian Journal of Allergy and Clinical Immunology - Pacini Editore S.p.A. - Editorial Department: Lisa Andreazzi - landreazzi@pacinieditore.it.

The text must be typewritten with ample margins, 25 lines per page. The pages should be numbered, beginning with the first page. The paper must include:

- (1) a title (in both Italian and English);
- (2) an abstract (in both Italian and English);
- (3) a set of key words (in both Italian and English);
- (4) titles and legends for all of the tables and figures.

The Authors are required to correct and return (within 3 days of their being sent) the first set of galley proofs of their paper.

On the first page of the manuscript should appear:

a concise title; a set of key words; the names of the authors and the institute or organisation to which each author is affiliated; the category under which the authors intend the work to be published (although the final decision here rests with the Editor); and the name, mailing address, and telephone and fax numbers of the author to whom correspondence and the galley proofs should be sent.

The second page should contain the abstract. At the end of the text should appear the bibliography, the legends to the tables and figures, and specification (where applicable) of the congress at which all or part of the data in the paper may have already been presented.

Tables must be limited in number (the same data should not be presented twice, in both the text and tables), typewritten one to a page, and numbered consecutively with Roman numbers. In the text and legend of the tables,

Authors must use, in the exact order, the following symbols: \*, †, ‡, §, ¶, \*\*, ††, ‡‡ ...

Figures: Send pictures in separate files from text and tables.

Software and format: send images in .TIFF or .EPS format, minimum resolution 300 dpi (100 x 150 mm). Other acceptable formats: .JPEG, .PDF. If possible, avoid the use of .PPT (Powerpoint files) and .DOC (images included in .DOC files).

Insert an extension identifying the file format (example: .Tif; .Eps).

The references must be limited to the most essential and relevant references, identified in the text by Arabic numbers and listed at the end of the manuscript in the order in which they are cited. The format of the references in the bibliography section should conform with the examples provided in N Engl J Med 1997;336:309-15. The first three Authors must be indicated, followed by "et al". Journals should be cited according to the abbreviations reported on Pub Med.

Examples of the correct format for bibliographic citations:

Journal articles

Cazzola M, Mattina A, Mattera MG. *Alterazioni immunologiche nella sindrome di Kawasaki*. Arch Dis Child 1989;64:360-2.

Books

Smith DW. *Allergy and Inflammation*. Third Edition. Philadelphia: WB Saunders Co. 1981.

Chapters from books or material from conference proceedings

Krmpotic-Nemanic J, Kostovis I, Rudan P. *Platelets as effectors of hypersensitivity reactions*. In: Smith DW, ed. *Allergy and Inflammation*. Third Edition. Philadelphia: WB Saunders Co. 1981, pp. 12-52.

Acknowledgements and the citation of any grants or other forms of financial support should be provided after the bibliography.

Notes to the text, indicated by asterisks or similar symbols, should appear at the bottom of the relevant page.

Drugs should be referred to by their chemical name; the commercial name should be used only when absolutely unavoidable (capitalizing the first letter of the product name).

### Specific instructions for the various categories of papers

1. Editorials (written on the invitation of the Editor or a member of the Editorial Board) are brief discussions of the general and practical aspects of topics of current interest. They should be written in Italian; no abstract is necessary.

2. Reviews may be submitted for consideration by authors, or may be written on the invitation of the Editor. They should not exceed 20 typewritten pages, including the bibliography, tables, and figures (but not including the legends).

3. Original articles represent reports of new and original work, or descriptions of a consolidated body of experience (even if not entirely original) in a given field. The text must be sub-divided into the following sections: Introduction, Materials and methods, Results and Discussion. The text must not exceed 15 typewritten pages, pictures, bibliography and summary included (legend of figures and tables apart). The abstract, written in English, must be less than 250 words and must be subdivided into the following sections: Introduction, Method(s), Results, Discussion.

In the Introduction section, the aim (or the aims) of the work must be clearly summarised (i.e., the hypothesis the Authors want to verify); in the Method(s) section, the Authors must report the context of the study (Hospital, Specialist Centre...), the number and the kind of subjects under analysis, the kind of treatment and of statistical analysis used. In the Results section are reported the results of the study and of the statistical analysis. In the Discussion section is reported the significance of the results with regard to clinical implications.

4. Short communications comprise short works (the text should not exceed 3 pages) analogous in content to the original articles, and sub-divided in the same manner. A maximum of 2 tables or figures and 10 bibliographic references is allowed. Galley proofs of short communications will not be sent to authors for correction.

5. Case reports will be considered for publication only if they describe very rare cases or are of particular didactic interest. The presentation should include a clear exposition of the case and a discussion of the differential diagnosis. The text must be concise, and furnished with no more than 1 or 2 figures or tables, and with a few essential bibliographic references. The abstract should be approximately 50 words in length.

6. Diagnostic and Laboratory Research: original articles or reviews facing topics on research and diagnostic of allergic and immune diseases from the point of view of the laboratory. Original articles should include descriptions of methods or significant innovations in existing methods. They must be structured as described for Reviews or Original articles.

7. Letters to the Editor may refer to topics of current interest or to articles already published in the journal (in which case the authors of the original article will be invited to write a reply for simultaneous publication), or may be used to present original scientific data. The body of the letter, preceded by a suitable title, must not exceed two typewritten pages; it may be illustrated with one table or figure, and include 2 or 3 essential bibliographic references.

8. Continuing Medical Education are original articles or reviews (followed by a series of test questions) that provide CME credits in accordance with the Guidelines of the Unione Europea Medici Specialisti. The scope of the CME program is to maintain, up-date and constantly improve the professional preparation of the specialist, thereby guaranteeing the highest possible level of care to the patient, by making available regular and systematic didactic activities during the course of the specialist's career.

9. Bulletin provides information of interest under various headings to SIAIC members, such as official reports and statements by the Board of Directors of the SIAIC, administrative news, union news, etc. Any text published in this section should not exceed 10 typewritten pages.

10. Allergy and Immunology Forum: this part is dedicated to a specific topic, in the form of a processual discussion.

11. Regional section: provide reports of conferences, courses and meetings organised by the SIAIC various sections. In addition, the abstracts of works of particular interest presented at section conferences may be published. Reports should not exceed 10 typewritten pages.

12. Information on recently published books and articles, up-coming conferences, and other significant significant news in the fields of allergology and clinical immunology.

The editor remains at the complete disposal of those with rights whom it was impossible to contact, and for any omissions.

Applications for advertisement space and enquiries regarding rates should be directed to:

Italian Journal of Allergy and Clinical Immunology  
Pacini Editore S.p.A., via Gherardesca, 56121 Pisa, Italy  
Tel. 050 313011 - Fax 050 3130300

### Subscription information

The *Italian Journal of Allergy and Clinical Immunology* publishes four issues per year. The journal is sent free of charge to all members of the Italian Society of Allergy and Clinical Immunology upon payment of their membership dues. The annual subscription rates for non-members are as follows:  
Italy € 75; all other countries € 90.

This issue € 25. Back issues when available € 50.

Subscribers' data are treated in accordance with the provisions of the Legislative Decree, 30 June 2003, n. 196 – by means of computers operated by personnel, specifically responsible. These data are used by the Publisher to mail this publication. In accordance with Article 7 of the Legislative Decree no. 196/2003, subscribers can, at any time, view, change or delete their personal data or withdraw their use by writing to Pacini Editore SpA - Via A. Gherardesca 1, 56121 Pisa, Italy.

Subscription orders and enquiries should be sent to:

Italian Journal of Allergy and Clinical Immunology  
Pacini Editore S.p.A., via Gherardesca, 56121 Pisa, Italy

Journal printed with total chlorine free paper and water varnishing.

Photocopies, for personal use, are permitted within the limits of 15% of each publication by following payment to SIAE of the charge due, article 68, paragraphs 4 and 5 of the Law April 22, 1941, No 633.

Reproductions for professional or commercial use or for any other other purpose other than personal use can be made following A WRITTEN REQUEST AND specific authorization in writing from AIDRO, Corso di Porta Romana, 108, 20122 Milan, Italy (segreteria@aidro.org - www.aidro.org).

Printed by Pacini Editore S.p.A., Pisa - November 2011

**SIAIC-IFIACI: Gruppo di Studio Allergie/Intolleranze Alimentari**

Position statement: diagnostica *in vivo* ed *in vitro* nell'adulto delle allergie alimentari IgE mediate

*Position statement: in vivo and in vitro diagnosis of food allergy in adults*

D. Macchia, S. Capretti, L. Cecchi, G. Colombo, G. Di Lorenzo, F. Fassio, F. Latella, M. Manfredi,  
L. Marcomini, R. Manetti, G. Melioli, P. Minale, E. Nucera, S. Peveri, F. Lodi Rizzini,  
R.E. Rossi, E. Savi, D. Schiavino, G. Zuliani

57

**Articolo originale**

*Original article*

Sistema complementare e Artrite Reumatoide: correlazioni con autoanticorpi,  
caratteristiche cliniche e di laboratorio e farmaci anti-TNF $\alpha$

*Complement system and Rheumatoid Arthritis: relationships with autoantibodies,  
serological, clinical features and anti-TNF $\alpha$  treatment*

G. Di Muzio, E. Ballanti, M.S. Chimenti, P. Conigliaro, D. Graceffa, M.D. Guarino, E. Greco,  
B. Kroegler, L. Novelli, C. Perricone, R. Perricone

73

**Bollettino**

*Bulletin*

81

**Notiziario**

*Information*

Libreria / *Book review*

82

### SIAIC-IFIACI: GRUPPO DI STUDIO ALLERGIE/INTOLLERANZE ALIMENTARI

#### **Position statement: *in vivo* and *in vitro* diagnosis of food allergy in adults**

D. Macchia, S. Capretti, L. Cecchi, G. Colombo, G. Di Lorenzo, F. Fassio, F. Latella, M. Manfredi, L. Marcomini, R. Manetti, G. Melioli, P. Minale, E. Nucera, S. Peveri, F. Lodi Rizzini, R.E. Rossi, E. Savi, D. Schiavino, G. Zuliani

Food allergy (FA) is an important problem due to its increasing prevalence in general population and to its broad range of clinical manifestations (from mild symptoms to anaphylactic shock, sometimes fatal).

The identification of the food responsible for symptoms, using all the available standardized diagnostic methods, must be the main goal.

The diagnosis of food allergy should be based on a correct procedure, that starts from a thorough clinical history and proceeds through the performance of *in vivo* and *in vitro* diagnostic methods, with a progressive level of complexity.

The recent development of molecular biology techniques, that implies the use of molecular allergens, has improved the knowledge of food allergens and designs a component-resolved sensitization profile (CRD: Component Resolved Diagnosis) for each patient, with important clinical and therapeutic consequences.

However, the increasing use of *in vitro* routine tests based on molecular allergens runs the risk of possible, potentially serious mistakes. The Specialist in Allergology and Clinical Immunology should manage this complicated matter, after an adequate training.

Therefore, a shared and standardized diagnostic pathway is mandatory. The aim of this position statement is to suggest the basic points in the adult food allergy diagnosis.

### ORIGINAL ARTICLE

#### **Complement system and Rheumatoid Arthritis: relationships with autoantibodies, serological, clinical features and anti-TNF $\alpha$ treatment**

G. Di Muzio, E. Ballanti, M.S. Chimenti, P. Conigliaro, D. Graceffa, M.D. Guarino, E. Greco, B. Kroegler, L. Novelli, C. Perricone, R. Perricone

**Objectives.** Rheumatoid factor (RF), anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) and complement system are involved in rheumatoid arthritis (RA) pathogenesis. Aim of this study is to investigate whether ACPA can activate the Complement system *in vivo* in patients with Rheumatoid Arthritis who are treated by means of traditional and/or biologic DMARDs.

**Methods.** One-hundred fourteen RA patients (89 F/25 M) diagnosed according to 1987 ACR criteria and 30 healthy controls were enrolled. Serological analysis included ESR, CRP, complement C3, C4 and CH50, RF and ACPA. Seventy-six patients started anti-TNF $\alpha$  treatments and were studied also after 22 weeks. Disease activity was measured with DAS28 and response to therapy with EULAR criteria.

**Results.** At baseline, C3, C4 and CH50 levels in RA patients were significantly higher than in controls. No demographic or clinical differences were observed between ACPA+ (n = 76) and ACPA- (n = 38) patients, nor in C3, C4 and CH50 levels. In patients undergoing anti-TNF $\alpha$  therapy, C3, C4 and RF were significantly reduced after 22 weeks. RF changes showed positive correlation with CH50 after 22 weeks. DAS28 significantly ameliorated after 22 weeks.

**Conclusions.** C3, C4, CH50 levels that we studied in serum of RA patients seem to correlate with RF levels rather than ACPA, independently from the therapy administered.

SIAIC-IFIACI: GRUPPO DI STUDIO ALLERGIE/INTOLLERANZE ALIMENTARI  
 COORDINATORE: DONATELLA MACCHIA

## Position statement: diagnostica *in vivo* ed *in vitro* nell'adulto delle allergie alimentari IgE mediate

### Position statement: *in vivo* and *in vitro* diagnosis of food allergy in adults

D. MACCHIA<sup>1</sup>, S. CAPRETTI<sup>1</sup>, L. CECCHI<sup>2</sup>, G. COLOMBO<sup>3</sup>, G. DI LORENZO<sup>4</sup>, F. FASSIO<sup>5</sup>, F. LATELLA<sup>6</sup>, M. MANFREDI<sup>7</sup>, L. MARCOMINI<sup>8</sup>, R. MANETTI<sup>9</sup>, G. MELIOLI<sup>8</sup>, P. MINALE<sup>10</sup>, E. NUCERA<sup>11</sup>, S. PEVERI<sup>12</sup>, F. LODI RIZZINI<sup>13</sup>, R.E. ROSSI<sup>14</sup>, E. SAVI<sup>12</sup>, D. SCHIAVINO<sup>11</sup>, G. ZULIANI<sup>15</sup>

<sup>1</sup> UO Allergologia Immunologia Clinica, Ospedale "S. Giovanni di Dio", AS Firenze; <sup>2</sup> Allergologia, Prato; <sup>3</sup> Unità di Allergologia, Osp. "S. Raffaele", Milano; <sup>4</sup> Allergologia Immunologia Clinica, Università di Palermo; <sup>5</sup> SOD Immunoallergologia, AOU Careggi, Firenze; <sup>6</sup> Medico Medicina Generale, Firenze; <sup>7</sup> Laboratorio Immunoallergologia, AS Firenze; <sup>8</sup> Laboratorio Centrale di Analisi, Dipartimento Medicina Sperimentale e di Laboratorio, Ist. "G. Gaslini", Genova; <sup>9</sup> Università di Sassari; <sup>10</sup> UO Allergologia Immunologia Clinica, Osp. "S. Martino", Genova; <sup>11</sup> Allergologia Immunologia Clinica, Università Cattolica Sacro Cuore, Roma; <sup>12</sup> UO Semplice Allergologia, Osp. "G. da Saliceto", Ausl Piacenza; <sup>13</sup> SSVD Allergologia, Ospedali Civili, Brescia; <sup>14</sup> Rete di Allergologia Regione Piemonte, AS Cuneo 1; <sup>15</sup> Scienza della Nutrizione, Firenze

#### Parole chiave

Diagnosi Allergia Alimentare • Prick test • Allergeni molecolari • Diagnostica molecolare dell'Allergia Alimentare

#### Key words

Food allergy diagnosis • Skin prick test • Molecular allergens • Component Resolved Diagnosis in food allergy

#### Riassunto

L'Allergia Alimentare (AA) rappresenta un problema importante sia per la prevalenza in aumento nella popolazione generale, sia per l'ampio spettro delle possibili manifestazioni cliniche (da sintomi lievi fino allo shock anafilattico, talora l'exitus).

Il principale impegno deve essere rivolto all'individuazione degli alimenti in grado di scatenare e/o mantenere la sintomatologia, utilizzando tutte le metodiche diagnostiche standardizzate disponibili.

Una corretta diagnosi di allergia alimentare si deve fondare su un preciso iter, che parte da una accurata anamnesi e procede attraverso l'esecuzione di metodiche diagnostiche, *in vivo* ed *in vitro*, di differente e via via più complesso livello.

L'impiego negli ultimi anni di tecniche di biologia molecolare e, quindi, di allergeni molecolari, ha consentito di migliorare notevolmente la conoscenza degli allergeni alimentari e di individuare nel singolo paziente un profilo di sensibilizzazione componente-specifico, piuttosto che estratto-specifico (CRD: Component Resolved Diagnosis), con significative ricadute cliniche e terapeutiche. Tuttavia, il loro utilizzo in test *in vitro* routinari da parte di sempre più numerosi laboratori rischia di portare a possibili errori con conseguenze anche gravi. La figura professionale che, dopo adeguata formazione, possiede tutte le competenze per gestire tale complessità è lo specialista in Allergologia e Immunologia Clinica.

Ne consegue l'esigenza di un approccio diagnostico condiviso e standardizzato. Scopo di questo documento è indicare gli approcci fondamentali nella diagnostica allergologica delle AA dell'adulto.

#### Summary

Food allergy (FA) is an important problem due to its increasing prevalence in general population and to its broad range of clinical manifestations (from mild symptoms to anaphylactic shock, sometimes fatal).

The identification of the food responsible for symptoms, using all the available standardized diagnostic methods, must be the main goal.

The diagnosis of food allergy should be based on a correct procedure, that starts from a thorough clinical history and proceeds through the performance of *in vivo* and *in vitro* diagnostic methods, with a progressive level of complexity.

The recent development of molecular biology techniques, that implies the use of molecular allergens, has improved the knowledge of food allergens and designs a component-resolved sensitization profile (CRD: Component Resolved Diagnosis) for each patient, with important clinical and therapeutic consequences.

However, the increasing use of *in vitro* routine tests based on molecular allergens runs the risk of possible, potentially serious mistakes. The Specialist in Allergology and Clinical Immunology should manage this complicated matter, after an adequate training.

Therefore, a shared and standardized diagnostic pathway is mandatory. The aim of this position statement is to suggest the basic points in the adult food allergy diagnosis.

## 1. Introduzione

L'Allergia Alimentare (AA) rappresenta un problema emergente in relazione alla prevalenza nella popolazione generale ed all'ampio spettro di manifestazioni cliniche che spaziano da sintomi lievi fino allo shock anafilattico che in alcuni casi può essere fatale. Vi è accordo generale nel ritenere che lo specialista in Allergologia ed Immunologia Clinica rappresenti la figura con tutte le competenze utili alla gestione dei quadri clinici correlati all'AA. Il principale impegno deve essere rivolto all'individuazione dell'alimento / alimenti in grado di scatenare e mantenere la sintomatologia, utilizzando tutte le metodiche diagnostiche standardizzate disponibili. La mancanza di procedure diagnostiche condivise, la mancanza di studi epidemiologici nazionali e di registri nazionali di reazioni gravi agli alimenti, rende le stime epidemiologiche imprecise e manchevoli: tuttavia, il trend delle reazioni avverse agli alimenti (RAA) è sicuramente in aumento, come dimostrano i dati clinici riferentesi a "case reports" e ai dati internazionali <sup>1</sup>. Nell'ambito delle RAA, l'AA IgE -mediata rappresenta il problema clinico a maggior impatto sociale: la prevalenza negli USA è stimata nell'ordine del 3-4% degli adulti e del 6-8% dei bambini ed è incrementata negli ultimi anni <sup>2-4</sup>.

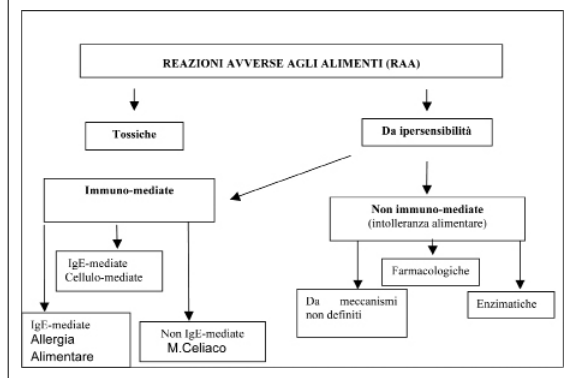
L'AA nell'adulto può persistere dall'età pediatrica oppure può insorgere "de novo": una volta insorta si mantiene per tutta la vita, diversamente da quanto può accadere in fasce di età giovanile. Da uno studio condotto in Italia è emerso che gli allergici ad alimenti rappresentano l'8% di tutti gli allergici <sup>5</sup>. Va rilevato inoltre che le AA condizionano in maniera rilevante la qualità della vita dei pazienti e dei loro familiari <sup>6,7</sup>.

Da qui l'esigenza di un approccio diagnostico condiviso e standardizzato: lo scopo di questo documento è quello di indicare gli approcci fondamentali nella diagnostica allergologica delle AA nell'adulto.

### 1.1. CLASSIFICAZIONE DELLE REAZIONI AVVERSE AD ALIMENTI

La classificazione delle RAA proposta di recente da un "board" di esperti del National Institute of Health <sup>4</sup> in linea con le precedenti <sup>8</sup> include fra le reazioni immunomediate le AA e la M Celiaca (condizione caratterizzata da meccanismi immunologici di base ben diversi dall'AA e con diverso approccio metodologico diagnostico), distinguendo queste realtà cliniche dalle RAA non-immunomediate o da intolleranza, spesso condizioni transitorie per le quali, fatto salvo per le forme da difetto enzimatico, non esistono al momento test diagnostici attendibili (Fig. 1).

Fig. 1. Classificazione delle reazioni avverse ad alimenti (RAA).



### 1.2. QUADRI CLINICI DELL'ALLERGIA ALIMENTARE

L'AA può essere responsabile di segni e sintomi che si manifestano a breve distanza dall'assunzione dell'alimento (da pochi minuti a poche ore) e che sono tanto più gravi quanto più precocemente insorgono; possono interessare diversi organi ed apparati: l'AA può causare manifestazioni a carico della cute, dell'apparato respiratorio, dell'apparato gastrointestinale e manifestazioni sistemiche <sup>4</sup> (Tab. I).

Tab. I. Principali sintomi dell'allergia alimentare.

Organi ed apparati	Manifestazioni cliniche
Apparato respiratorio	Ocutorinite Asma bronchiale Edema della glottide
Cute e sottocute	Rash eritematoso Prurito senza eritema Orticaria-angioedema Dermatite atopica Eczema
Apparato gastro-enterico	Sindrome orale allergica Dolori addominali Vomito Diarrea
Apparato cardio-circolatorio	Ipotensione Sincope Arresto cardiaco Shock anafilattico

## 2. Metodiche diagnostiche per l'allergia alimentare

La diagnostica delle AA prevede vari livelli di competenze dove la figura dello specialista allergologo ha un ruolo di primaria importanza; occorre rilevare che in tale approccio è fondamentale il medico di medicina generale poiché, sulla base della sua prima valutazione clinica, nel sospetto di AA, può consigliare, insieme ad un primo intervento terapeutico e preventivo, di rivolgersi allo specialista allergologo per l'approccio diagnostico<sup>3</sup>.

Una corretta diagnosi di allergia alimentare presuppone l'esecuzione di un preciso iter diagnostico che prevede da principio un'accurata raccolta anamnestica seguita dall'esecuzione di test *in vivo* ed *in vitro* standardizzati e condivisi: la diagnosi è finalizzata all'individuazione dell'alimento/i responsabile che può o deve essere escluso dalla dieta al fine del ripristino e/o del mantenimento dello stato di salute. Solo dopo che è stata effettuata una diagnosi di certezza di allergia alimentare si può escludere dalla dieta uno o più alimenti.

È necessario specificare (anche se non oggetto di trattazione "in estenso" nel presente lavoro) che il paziente deve essere anche correttamente informato circa le ulteriori misure preventive e terapeutiche (anche nell'urgenza medica) da intraprendere: in particolare deve essere istruito circa la possibilità di incontrare involontariamente l'alimento verso il quale è allergico e sulla possibilità che certe condizioni concomitanti (esercizio fisico, assunzione di farmaci quali farmaci antinfiammatori non steroidei – FANS ed altre) possano favorire l'insorgenza di una AA.

Potrà essere anche necessario coinvolgere lo specialista in Scienza della Nutrizione al fine di instaurare una dieta personalizzata ed equilibrata per il paziente allergico. Si auspica inoltre che i pazienti allergici ad alimenti possano fruire anche nell'alimentazione "fuori casa" di pasti sicuri con indicazione corretta nei menù degli alimenti utilizzati.

Le metodiche diagnostiche standardizzate sono le seguenti:

Metodiche diagnostiche di primo livello:

- anamnesi allergologica;
- prove allergologiche cutanee (prick test e prick by prick con alimenti freschi).

Metodiche diagnostiche di secondo livello:

- ricerca IgE totali – Ricerca IgE specifiche verso estratti alimentari;
- diagnostica molecolare (Ricerca IgE specifiche verso singole molecole).

Metodiche diagnostiche di terzo livello:

- diagnostica molecolare mediante microarray (ISAC);
- test di scatenamento orale.

Metodiche diagnostiche di quarto livello:

- test di attivazione dei basofili (BAT);
- immunoblotting.

Tutte le metodiche proposte dalla Medicina Complementare Alternativa (CAM) per la diagnosi di AA (metodiche non convenzionali) non sono standardizzate e non sono rilevanti per la diagnosi di AA.

### 2.1. METODICHE DI PRIMO LIVELLO

#### 2.1.1. Anamnesi allergologica

La raccolta dell'anamnesi è fondamentale, soprattutto per identificare una correlazione fra l'ingestione dell'alimento e la comparsa dei sintomi. Un'anamnesi accurata è importante per identificare il o gli alimenti sospetti (facilmente individuabili in caso di ripetute manifestazioni cliniche correlate all'ingestione di pasti in cui sia presente lo stesso alimento).

L'anamnesi allergologica deve essere indirizzata a precisare quanto segue:

- presenza o meno di sintomi analoghi in altre persone;
- alimenti ingeriti nelle due ore precedenti l'inizio dei sintomi;
- allergeni contaminanti intervenuti durante la preparazione (ad esempio: caseina, lattice, ovomucoide);
- cottura e conservazione dell'alimento;
- esecuzione di sforzi dopo l'ingestione dell'alimento;
- concomitante assunzione di farmaci (FANS) o alcool;
- effettuazione o meno di terapie con antiacidi;
- esistenza o meno di altra patologia allergica (ad esempio respiratoria o cutanea);
- stato generale di salute (altre malattie concomitanti).

Un corretto approccio diagnostico presuppone, inoltre, di effettuare in maniera scrupolosa l'esame obiettivo al momento della visita.

Quando l'intervallo di tempo tra la raccolta dei dati anamnestici e la comparsa della sintomatologia è lungo, può essere difficile individuare l'alimento incriminato, ugualmente nel caso dell'allergene "nascosto". Talvolta l'anamnesi può essere rivalutata e approfondita a posteriori alla luce dei risultati dei test allergometrici che possono evidenziare sensibilizzazioni ad alimenti inizialmente ignorati dal paziente, presenti invece nel cibo e responsabili della reazione<sup>9</sup>.

#### 2.1.2. Prove allergologiche cutanee

##### 2.1.2.1. Skin prick test (SPT)

Il prick test è un test diagnostico semplice, poco costoso e con basso rischio di effetti collaterali. È il primo esame diagnostico che si effettua (sia per allergeni inalatori sia per alimenti) per un paziente con anamnesi positiva per reazione avversa ad alimenti.

Gli SPT costituiscono un rapido metodo di screening nella diagnosi di reazioni allergiche IgE-mediate; gli SPT per alimenti hanno un'eccellente sensibilità ed un elevato valore predittivo negativo (> 90%), ma una scarsa specificità ed un basso valore predittivo positivo. Quindi una loro negatività permette di escludere con buona sicurezza la possibilità di un'allergia IgE-mediata mentre una loro positività, se non confermata dalla clinica, dal dosaggio delle IgE-specifiche sieriche, dalla diagnostica molecolare e/o dal test di provocazione orale, non permette di fare diagnosi di certezza di allergia alimentare<sup>9-13</sup>. Le positività riscontrate devono essere messe in relazione all'anamnesi del paziente valutando la rilevanza clinica di ciascuna di esse e la relazione con eventuali allergie respiratorie: l'interpretazione, apparentemente empirica, dei risultati ottenuti è quindi fondamentale nell'ambito di questa semplice diagnostica ed è da affidare allo specialista allergo-immunologo clinico.

### Tecnica d'esecuzione

L'esecuzione dello SPT prevede di:

1. applicare sulla parte volare degli avambracci del paziente (5 cm dal polso e 3 cm dalla fossa antecubitale) una goccia per ogni estratto allergenico che si vuole testare, mantenendo una distanza minima tra di essi di circa 3 cm;
2. effettuare una pressione tramite una lancetta sterile monouso per singolo allergene con punta di 1 mm attraverso ogni goccia perpendicolarmente al piano cutaneo;
3. mantenere per circa 3 secondi la lancetta senza muoverla o ruotarla per evitare il sanguinamento con moderata pressione;
4. rimuovere accuratamente la soluzione allergenica con un mezzo assorbente singolo per singolo allergene testato.

Lo stesso procedimento verrà seguito per testare l'istamina (10 mg/ml) come controllo positivo, e la fisiologica glicerinata, come controllo negativo.

La lettura dei risultati è effettuata a distanza di 5 minuti dall'esecuzione del test per l'istamina e a distanza di 15 minuti dall'esecuzione del test per gli allergeni. L'esame è considerato positivo con la comparsa di un pomfo di almeno 3 mm di diametro medio in riferimento ad una risposta positiva all'istamina e ad una negativa alla fisiologica glicerinata<sup>9</sup>. Questi ultimi due test, infatti, permettono di verificare che il paziente non presenti dermografismo (positivizzazione di tutti i test, compreso il controllo negativo, con pomfi di stesso diametro medio) e che risponda normalmente all'istamina (ad indicare l'assenza di interferenza negativa da parte di farmaci o di altre condizioni di iporeattività cutanea).

Interpretazione dei risultati: i risultati sono espressi come diametro medio del pomfo (dove per diametro

medio si intende il diametro maggiore sommato a quello minore diviso due); possono essere:

1. *Negativo* con pomfo di diametro medio < 3 mm;
2. *Debolmente positivo* con pomfo di diametro medio > 3 mm;
3. *Fortemente positivo* con pomfo di diametro medio > 10 mm.

Al fine della riproducibilità inter-operatori è bene indicare per singolo allergene testato il diametro del pomfo e il diametro dell'eritema circostante ottenuto: il tutto rapportato al pomfo dell'istamina che viene indicato ugualmente e del relativo eritema. È fondamentale per un'attenta e precisa lettura dei risultati tenere in considerazione l'esistenza di alcuni fattori che possono causare:

- falsi positivi (distanza ravvicinata fra un test e l'altro, sanguinamento, pressione eccessiva, trasporto di un allergene da un altro prick, utilizzo di una stessa lancetta per più di un test, iper reattività cutanea o dermografismo);
- falsi negativi (pressione troppo leggera, cute poco irrorata, presenza di malattie cutanee, estratti diluiti o scarsamente attivi, utilizzo di farmaci in grado di interferire con la risposta cutanea come in particolare gli antistaminici<sup>10,11</sup>).

### Limiti della diagnostica mediante prick test

Gli SPT nella diagnosi di allergia alimentare hanno un ruolo importante ma non decisivo, a differenza dell'allergia respiratoria dove i test cutanei sono spesso diagnostici e raramente si deve ricorrere ad ulteriori accertamenti per confermare la diagnosi. Gli allergeni alimentari sono infatti costituiti da più molecole: alcune stabili al calore, alla conservazione e alla digestione (epitopi lineari) e altre meno stabili (epitopi conformazionali) che si degradano con la cottura e la conservazione perdendo l'allergenicità. I prick eseguiti con estratti allergenici del commercio contenenti proteine stabili come caseina del latte vaccino, ovomucoide dell'uovo, albumine e vicilline dell'arachide, poiché ben rappresentate nell'estratto, risultano avere un valore predittivo negativo elevato attorno al 100%. I prick con estratti allergenici di altri alimenti e di alimenti vegetali invece presentano un valore predittivo negativo basso contenendo molecole termolabili (come le profiline) facilmente denaturate durante i processi di allestimento industriale, e da una conservazione non corretta. Per questi allergeni può essere utile ricorrere al prick by prick con l'allergene fresco.

Le maggiori limitazioni degli estratti allergenici sono quindi dovute:

- al contenuto: ogni estratto infatti è una miscela eterogenea composta da un lato da proteine allergeniche maggiori e minori e, dall'altro, da componenti biologicamente inattivi come altre proteine non allergeniche, glicoproteine, carboidrati;

- al processo produttivo: alcuni allergeni infatti possono andare incontro a parziale degradazione durante il processo di estrazione e risultare così poco rappresentati nel prodotto finale;
- alla cross-reattività: le fonti biologiche infatti possono contenere allergeni con forte potenziale di cross reattività.

Si propone il seguente pannello di alimenti da testare con la metodica dello SPT (da Rete Allergologica Piemontese, rivisto):

Pannello alimenti per Prick Test	
Albume	Manzo
Arachide	Mela
Banana	Merluzzo
Carota	Nocciola
Caseina	Noce
Fagiolo	Pesca
Farina di frumento	Pisello
Gamberetto	Pollo
Lattoalbumina	Pomodoro
$\beta$ -lattoglobulina	Riso
Maiale	Sedano
Mais	Soia
Mandorla	Tuorlo

La recente possibilità di impiegare nella diagnostica le singole molecole allergeniche (diagnostica molecolare – Component Resolved Diagnosis – CRD) consente di inquadrare con maggior precisione il profilo allergenico del paziente aggiungendo informazioni prognostiche sulla pericolosità della reazione. Questo approccio diagnostico (disponibile *in vitro* per numerose molecole) è possibile *in vivo* con estratti per prick test contenenti la *Lipid Transfer Protein* (LTP), proteina gastro e termostabile delle Rosacee e la profilina di palma (Pho d 2), proteina ubiquitaria dei vegetali gastro e termolabile.

Il loro impiego, a completamento della diagnostica effettuata con gli estratti da fonte intera, permette una più precisa valutazione del rischio che corre il paziente in caso di ingestione dell'alimento sospetto (Tab. II).

#### 2.1.2.2. Prick by prick

È possibile ricorrere al prick test effettuato con alimenti freschi (prick by prick), in particolare del mondo vegetale, per una diagnosi accurata nell'ambito dell'allergia alimentare ed in particolare per ovviare al problema della falsa negatività del prick test dovuta

Tab. II. Estratti di singole molecole ricombianti o native disponibili per prick test.

Molecola	Fonte di origine
Lattoalbumina	Latte vaccino
$\beta$ -lattoglobulina	Latte vaccino
Caseina	Latte vaccino
Ovoalbumina	Albume d'uovo
Ovomucoide	Albume d'uovo
LTP (Pru p 3)	Pesca
Profilina (Pho d 2)	Palma
PR10 (Mal d 1)	Mela (non disponibile in Italia)

a perdita di frazioni antigeniche nel processo di allestimento degli estratti industriali.

Si propone di effettuare il test prima con gli estratti commerciali ed in caso di incongruenze con la storia clinica, successivamente ricorrere anche al test con l'alimento fresco<sup>12 13</sup>. In particolare tale metodica consente di testare gli alimenti prevalentemente del mondo vegetale che la storia clinica individua come alimenti causali, inoltre in casi in cui non sia reperibile l'estratto commerciale. Questa tecnica consiste nel pungere l'alimento fresco, se è solido, con una lancetta, con cui viene poi eseguito un regolare prick test; se invece l'alimento è liquido, vi si immerge direttamente la lancetta. La tecnica del prick by prick ha dimostrato una buona affidabilità diagnostica<sup>3 4</sup> con alto valore predittivo positivo e negativo. È necessario ricordare che alcuni alimenti ricchi di istamina e ad alto contenuto di lectine possono produrre falsi positivi.

L'utilizzazione del prick by prick con l'alimento fresco non è del tutto esente da rischi e nei soggetti altamente sensibili può dar luogo a reazioni avverse sistemiche.

## 2.2. METODICHE DIAGNOSTICHE DI SECONDO LIVELLO

### 2.2.1. Ricerca IgE totali e specifiche per alimenti

Si tratta di esami immunoenzimatici che non consentono di per sé di porre diagnosi di allergia alimentare e diagnosi causale: i risultati di tali esami necessitano dell'interpretazione da parte dello specialista allergologo.

Il dosaggio delle IgE totali sieriche può risultare utile nell'inquadramento della condizione allergologica del soggetto, ma solo quando utilizzato unitamente al dosaggio delle IgE specifiche. In altri termini, il solo dosaggio delle IgE totali sieriche non ha alcun valore predittivo nei confronti della diagnosi di un'allergia alimentare. Occorre considerare che un elevato livello

di IgE totali può condizionare l'emergenza di falsa positività per IgE specifiche.

La ricerca delle IgE specifiche per estratti alimentari, si effettua attualmente con la metodica in immunofluorescenza enzimatica (ad esempio: ImmunoCAP); il termine RAST (Radio Allergo Sorbent Test) è obsoleto. È un test di secondo livello anche in considerazione del notevole costo e quindi da eseguirsi come approfondimento diagnostico dopo il prick test: è da tener presente che il test cutaneo rileva le IgE specifiche legate ai mastociti cutanei mentre il test sierologico rileva appunto le IgE in circolo: per questo i risultati dei due test possono essere diversi<sup>4</sup>. La ricerca delle IgE sieriche specifiche è da effettuare in quelle condizioni in cui il prick test non può essere eseguito (ad esempio concomitante terapia antistaminica o patologie cutanee che possano interferire con la corretta interpretazione del test o rischio di reazioni sistemiche): è comunque un test utile nell'inquadramento delle AA da parte dello specialista. Infatti, le odierne metodiche quantitative con estratti alimentari hanno dimostrato livelli di sensibilità (e valore predittivo negativo) paragonabili al prick test, con ottimi livelli di specificità e valore predittivo positivo (Tab. III)<sup>14 15</sup>. Il test è in grado di dosare le IgE specifiche per un dato allergene, in maniera quantitativa, in un range tra 0 e 100 kUA/l (kilounità di IgE specifiche per allergene, per litro). Il cut-off per la positività del test, originariamente impostato a 0,35 kUA/l, è stato recentemente abbassato a 0,10 kUA/l dal produttore, con ulteriore aumento della sensibilità del test a scapito di una riduzione della specificità.

Secondo alcuni Autori<sup>14</sup>, livelli di IgE specifiche superiori ad un determinato valore ("cut-off diagnostico") avrebbero una predittività superiore al 95% per una forma sintomatica. Il superamento di tale livello in presenza di storia clinica compatibile, in altre parole, consentirebbe di confermare la diagnosi di AA senza ricorrere al test di challenge. Tali risultati sono però influenzati da molteplici variabili e sono stati validati su popolazioni non europee; pertanto, la loro riproducibilità nella popolazione italiana è quantomeno da confermare.

È inoltre importante sottolineare che valori di IgE specifiche < 0,10 kUA/l (cut-off di positività) non escludono la possibilità di una reazione allergica IgE mediata, e che la conferma di negatività, nel caso di forte sospetto clinico-anamnestico, può essere raggiunta solo con test cutanei negativi e test di provocazione negativo.

Per le ragioni sopra esposte, il dosaggio delle IgE specifiche per alimenti necessita dell'interpretazione da parte dello specialista allergologo e non consente di per sé di effettuare diagnosi causale di allergia alimentare; in caso contrario, infatti, potrebbero essere eliminati dalla dieta alimenti non realmente in grado di determinare la sintomatologia riferita o, al contrario, essere consentiti alimenti potenzialmente in grado di determinare reazioni allergiche.

### 2.2.2. Diagnostica molecolare

Negli ultimi anni l'impiego di tecniche di biologia molecolare ha consentito di migliorare notevolmente la conoscenza degli allergeni ed il loro ruolo nelle allergie alimentari.

Una diagnostica basata sugli estratti allergenici classici può arrivare solo alla identificazione della sorgente allergenica (es. allergia alla pesca, all'uovo, ecc.), ma non ad identificare l'entità molecolare verso cui un paziente si è sensibilizzato (es. LTP, profiline, PR10, ecc.). La caratterizzazione del profilo allergenico individuale di un paziente, grazie all'impiego delle singole molecole purificate o ricombinanti (Component Resolved Diagnosis, CRD), non rappresenta solo un affinamento diagnostico ma ha notevoli ripercussioni sia prognostiche che terapeutiche.

Nella pratica clinica quotidiana risulta essenziale l'utilizzo delle molecole per differenziare:

- 1) pazienti con sensibilizzazione genuina verso un alimento (con rischio elevato in caso di ingestione accidentale);
- 2) pazienti che presentano co-riconoscimenti, cioè sensibilizzazione verso proteine ubiquitarie presenti in pollini (che fungono da sensibilizzante primario) e comuni anche ad alimenti (con rischio molto minore di reazione avversa).

**Tab. III.** Valori di sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (VPP) e negativo (VPN) dei test per la ricerca di IgE specifiche *in vitro*, per i più comuni allergeni<sup>16</sup>.

Allergene	Sensibilità (%)	Specificità (%)	VPP (%)	VPN (%)	"cut-off diagnostico"
Uovo	61	95	98	38	6 kUA/l
Latte	57	94	95	53	15 kUA/l
Arachide	57	100	100	36	14 kUA/l
Merluzzo	63	91	56	93	3 kUA/l
Soia	44	94	73	82	30 kUA/l
Grano	61	92	74	87	26 kUA/l

Anche nelle indagini di routine, in diversi laboratori stanno progressivamente affermandosi test *in vitro* che utilizzano allergeni molecolari purificati o ricombinanti anche mediante ad esempio ImmunoCAP<sup>17</sup>. Il nuovo approccio molecolare alla diagnosi allergologica (CRD) permette di stabilire se il paziente affetto da allergie alimentari presenti una sensibilizzazione agli alimenti indipendente dalla sensibilizzazione ad aeroallergeni (sensibilizzazione primaria) o da essa dipendente (sensibilizzazione secondaria).

Generalmente, nelle forme primarie il processo di sensibilizzazione avviene per ingestione, mentre nelle forme secondarie l'allergene introdotto per inalazione è responsabile della sensibilizzazione e la sintomatologia alimentare è dovuta al co-riconoscimento di allergeni omologhi presenti negli alimenti.

Nell'ambito delle metodiche di laboratorio per il dosaggio delle IgE specifiche verso allergeni purificati o ricombinati singoli o anche con i più recenti test con "microarray", possono essere impiegate molecole allergeniche di provenienza alimentare che sono di grande utilità per l'inquadramento del paziente con AA (Tab. IV). Infatti, anche nell'ambito di uno stesso alimento, la sensibilizzazione ad una molecola piuttosto che ad un'altra comporta notevoli differenze sul piano clinico e terapeutico.

Nella diagnosi di laboratorio l'utilizzo di allergeni molecolari naturali o ricombinanti, rappresentativi di una certa famiglia, consente di delineare un profilo di sensibilizzazione del paziente. Analogamente a quanto avviene con gli allergeni inalanti, il paziente con allergie alimentari può essere co-sensibilizzato ad allergeni alimentari diversi sia labili che stabili. Non è infrequente che pazienti allergici a Bet v 1 della Betulla con sindrome orale allergica possano essere etichettati, in mancanza di una diagnostica molecolare, come sensibilizzati in modo esclusivo a Bet v 1 omologhi presenti nelle Rosacee, che raramente scatenano crisi sistemiche gravi. La co-sensibilizzazione eventuale e possibile a Lipid Transfer Proteins (LTPs), se non diagnosticata, pone questi pazienti a rischio di reazioni gravi dopo ingestione di frutta, frutta secca o succhi. Analoghe considerazioni possono essere fatte nei casi di sensibilizzazioni misconosciute, perché non hanno ancora scatenato sintomi rilevanti, verso allergeni stabili come le taumatine, le cupine o altre prolamine.

Pertanto l'utilizzo della CRD permette di individuare, nel singolo paziente, un profilo di sensibilizzazione componente-specifico, piuttosto che estratto-specifico. Questo, nel campo dell'allergia alimentare, è di fondamentale importanza per:

a. discriminare tra cross-reazioni e co-sensibiliz-

**Tab. IV.** Alcuni degli allergeni importanti dal punto di vista epidemiologico disponibili per la diagnostica molecolare mediante metodica ImmunoCAP (o ImmunoCap-ISAC).

Famiglia proteica (o sorgente allergenica)	Allergene
Superfamiglia delle cupine Vicilline Legumine	Ara h 1 (arachide) Ara h 3 (arachide), Cor a 9 (nocciola)
Superfamiglia delle prolamine Albumine 2S Proteine di Trasferimento Lipidico (LTP) Prolamine dei cereali	Ber e 1 (noce brasiliana), Ara h 2 (arachide), Gly m 6 Pru p 3 (pesca), Cor a 8 (nocciola), Art v 3 (Composite) Tri a 19 (grano)
Proteine di patogenesi -10 PR10: proteine intracellulari PR3: chitinasi di Classe 1	Pru p 1(pesca), Api g 1 (sedano), Gly m 4 (Soia) Hev b 11, Hev b 6.02 (latice, banana, avocado)
Profiline	Pru p 4 (pesca) (Bet v 2, Phl p 12, Hev b 8)
Determinanti carboidratici cross-reattivi	MUXF3 (sedano, pomodoro, zucchini)
Tropomiosine	Pen a 1 (gambero)
Calcium binding proteins	Gad c 1 (merluzzo)
Proteine del latte	Bos d 4 ( $\alpha$ -albumina) Bos d 5 ( $\beta$ -lattoglobulina) Bos d 8 (caseina) Bos d lactoferrin (lattoferrina)
Proteine dell'uovo	Gal d 1 (ovomucoide) 39 Gal d 2 (ovalbumina) Gal d 3 (conalbumina) Gal d 4 (lisozima)

zazioni, soprattutto per i componenti del regno vegetale (“plant food allergy”);

- b. stimare con maggiore precisione il rischio di reazioni gravi, in caso di contatto futuro con l’allergene (Tab. IV).

I test molecolari sono quindi da considerare, al momento, un approfondimento da affiancare alla diagnostica allergologica “classica” che utilizza, *in vivo* o *in vitro*, estratti allergenici: è importante sottolineare che i test molecolari e la CRD, data l’elevata complessità che li caratterizza e la delicatezza delle scelte terapeutiche che ne possono conseguire, dovrebbero essere considerati prerogativa esclusiva dello specialista in Allergologia ed Immunologia Clinica che abbia avuto un adeguato percorso formativo (Tab. V).

**Tab. V.** Famiglie di molecole proteiche e carboidratiche maggiormente implicate nell’allergia alimentare.

<b>Molecole associate ad allergie a cibi di origine vegetale</b>
Proteine PR-10 (omologhi di Bet v 1)
Proteine di trasferimento lipidico non specifiche (nsLTP)
Profiline
Proteine di deposito
Thaumatococcus-like-proteins (TLP)
Determinanti carboidratici cross-reattivi (CCD)
<b>Molecole associate ad allergie a cibi di origine animale</b>
Tropomiosine
Parvalbumine
Caseine
Lipocaline – Famiglia del lisozima – Famiglia delle Transferrine – Ovomucoide

### 2.2.2.1. Molecole associate ad allergie a cibi di origine vegetale

#### *Proteine di patogenesi-10 (PR-10) (omologhi di Bet v 1)*

L’allergene maggiore della Betulla, Bet v 1, appartiene al numeroso gruppo di proteine vegetali indicate come proteine di patogenesi-10 (proteine PR = pathogenesis related proteins). Gli omologhi di Bet v 1 sono localizzati principalmente nella polpa della frutta della famiglia delle Rosacee (mela, pesca, pera, ciliegia, albicocca, ecc.), delle Apiacee (sedano, finocchio, carota) e delle Fabacee (arachide, soia), kiwi e nocciola. Oltre la metà dei pazienti allergici alla Betulla (50-90%) riferisce manifestazioni cliniche in relazione all’assunzione o al contatto con taluni alimenti ve-

getali, ed il rischio di sviluppare sintomi varia in funzione della concentrazione di IgE specifiche per Bet v 1.

In particolare, la sensibilizzazione per Bet v 1 è strettamente correlata con l’insorgenza di sindrome orale allergica in seguito all’ingestione di nocciola o Rosacee (mela, pesca, ciliegia) (Tab. VI).

**Tab. VI.** Proteina PR-10/omologo Bet v 1.

<b>Fonte allergenica</b>	<b>Allergene</b>
Betulla	rBet v 1
Ontano	rAln g 1
Polline di nocciolo	rCor a 1.0101
Nocciola	rCor a 1.0401
Mela	r Mal d 1
Pesca	rPru p 1
Semi di soia	rGly m 4
Arachide	rAra h 8
Sedano	rApi g 1
Carota	rDau c 1
Kiwi	nAct d 8
Ciliegia	rPru av 1

Le proteine omologhe di Bet v 1 sono particolarmente sensibili al calore ed alla digestione da parte di proteasi; per tale motivo i sintomi di cui sopra si verificano principalmente con alimenti freschi e sono per lo più limitati al contatto con la mucosa orale. Per lo stesso motivo, i cibi cotti o processati industrialmente (come i succhi di frutta) sono generalmente tollerati dai soggetti con sensibilizzazione a Bet v 1.

Tuttavia, gli omologhi di Bet v 1 contenuti nelle nocciole, sedano, arachide e soia sono più stabili al calore ed alla digestione delle corrispondenti proteine presenti nelle Rosacee. Ciò spiegherebbe perché sono state documentate reazioni di tipo sistemico dopo ingestione di questi cibi e più in generale dopo ingestione di cibi appartenenti alla famiglia delle Apiacee e Fabacee in soggetti con sensibilizzazione a Bet v 1. Recentemente è stato documentato che allergeni Bet v 1 correlati possono peggiorare la dermatite atopica perché la proteina denaturata nello stomaco conserva la capacità di stimolare i linfociti attraverso i peptidi lineari residui.

È da sottolineare che la sensibilizzazione a Bet v 1, nei soggetti allergici alla betulla, mostra un gradiente discendente Nord-Sud: nelle regioni del Nord Europa ricche di betulle, i soggetti allergici alla betulla mostrano quasi invariabilmente sensibilizzazione a Bet v 1, in molti casi isolata. Nell’Europa del Sud, invece, la positività alla Betulla riflette più spesso una

sensibilizzazione a PR-10 di altre specie polliniche (ad esempio il nocciolo) o ad altri componenti non Bet v 1-omologhi. Questi soggetti del Sud Europa (compresi soggetti Italiani, soprattutto nelle regioni meridionali), in particolare se mostrano una bassa sensibilizzazione verso la famiglia PR-10 ed un'elevata sensibilizzazione verso le Rosacee, devono essere indagati attentamente perché a maggior rischio di reazioni sistemiche, dovute a sensibilizzazione nei confronti di altre componenti molecolari (come LTP e proteine di deposito) in esse contenute<sup>5 18 19</sup>.

#### *Proteine di trasferimento lipidico (LTPs)*

Le LTPs sono piccole molecole di 9-10 kda, termolabili, gastroresistenti, presenti nella buccia della frutta appartenente alla famiglia delle Rosacee (soprattutto pesca - Pru p 3), ma anche delle Betulacee (nocciola-Cor a 8) ed in altri alimenti vegetali (arachide, mais, orzo, uva, verza, ecc.): sono in grado di scatenare gravi reazioni (anafilassi, orticaria, asma) anche dopo assunzione di cibi o bevande sottoposti a cottura o processati industrialmente (Tab. VII).

La sensibilizzazione ad LTP è stata riscontrata prevalentemente nei soggetti delle regioni dell'Europa del Sud, in maniera indipendente dalla sensibilizzazione verso pollini<sup>20</sup>.

Si ricorda che l'allergene molecolare LTP è presente in una certa concentrazione nel reattivo per prick test della pesca (rPru p 3 della pesca).

#### *Profiline*

Le profiline perché presenti in molte specie vegetali anche non botanicamente correlate, mostrano ampia omologia e cross-reattività (sia tra i pollini, ma anche tra pollini e alimenti vegetali o lattice) (Tab. VIII).

In Italia la prevalenza di sensibilizzazione alle profiline nei soggetti con allergia ai pollini varia dal 30 al 55%, ed è maggiore nelle aree geografiche dove predominano le Graminacee.

La probabilità di sensibilizzazione nei confronti delle profiline può essere ipotizzata allorquando è

Tab. VII. Proteine di trasferimento lipidico (LTP).

Fonte allergenica	Allergene
Pesca	rPru p 3
Mela	rMal d 3
Ciliegia	rPru av 3
Arachide	rAra h 9
Nocciola	rCor a 8
Noce	Jug r 3
Assenzio selvatico	nArt v 3
Parietaria	r Par j 2
Grano	Tri a 14

Tab. VIII. Profiline.

Fonte allergenica	Allergene
Pesca	rPru p 4
Mela	rMal d 4
Arachide	rAra h 5
Betulla	rBet v 2
Olivo	n Ole e 2
Coda di topo	rPhl p 12
Lattice	rHev b 8

ampio il numero di sensibilizzazioni per allergeni alimentari, sia quando è presente sintomatologia per alcuni alimenti soprattutto banana, patata, carota, sedano, grano saraceno, melone, paprika, arancia e pomodoro.

Le profiline sono allergeni ad impatto clinico modesto, sono termolabili, sensibili alle proteasi e danno luogo prevalentemente a sindrome orale allergica, mentre rarissime sono le reazioni gravi<sup>21 22</sup>.

Poiché questa famiglia di proteine mostra una così elevata omologia, è stato proposto che un singolo componente possa essere utilizzato per effettuare uno screening di sensibilizzazione nei confronti delle profiline; a tale proposito vengono più spesso utilizzate Bet v 2 o Phl p 12<sup>22</sup>.

Si rammenta a tale proposito che l'allergene molecolare della profilina è disponibile anche per prick test (rPho d 2 della Palma), anche se non sembra molto rilevante dal punto di vista clinico e usato da solo non esclude sensibilizzazioni ad altri allergeni cross-reattivi, come calcium binding proteins, Bet v 1 omologhi (ad esempio: un paziente polisensibile positivo a un estratto di Betulla, positivo alla profilina, Bet v 2 omologo di Pho d 2, può essere cosensibilizzato a Bet v 1 o a Bet v 4.).

#### *Proteine di deposito (prolamine e cupine)*

La famiglia delle proteine di deposito è costituita da un gruppo eterogeneo di proteine appartenenti a due superfamiglie differenti: le prolamine e le cupine.

Esse sono spesso designate in base al coefficiente di sedimentazione: le globuline 7S e 11S appartengono alle cupine; le albumine 2S e le proteine di trasferimento lipidico appartengono alle prolamine.

Le proteine di deposito sono gli allergeni predominanti dei semi e del guscio (è da ricordare che nella frutta con guscio sono presenti anche proteine Bet v 1-omologhe, profiline e LTP, ma in concentrazioni nettamente minori) e la loro struttura chimica è notevolmente stabile al calore e alle proteasi. Tra le proteine di deposito le albumine 2S (a cui appartengono ad es. Ber e 1 della noce brasiliana ed Ara h 2 dell'arachide), sono dotate di una

maggiore stabilità che si traduce in una maggiore rilevanza clinica.

Le cupine sono contenute nei semi di molte piante monocotiledoni e dicotiledoni con omologhi nelle gimnosperme, conifere.

Fanno parte di questa famiglia le globuline 7S e le globuline 11S della soia (Gly m Bd28K, Gly m Bd60K, Gly m Glicinina G1, G2, G4), Ara h 1 e Ara h 3 dell'arachide, Ana c 1 e Ana c 2 dell'anacardo, Jug r 2 della noce, e Len c 1 della lenticchia; la legumina della nocciola (Cor a 9) e della mandorla: la tostatura di queste proteine non altera la loro capacità allergenica e la loro potenzialità ad indurre reazioni gravi. La polisensibilizzazione ai semi oleosi dovuta a cross-reattività è un fenomeno comune e sembra crescere con l'età. Il rischio di sviluppare sintomi è correlato con i livelli di IgE specifiche e la severità sembra essere correlata con la co-sensibilizzazione a proteine di deposito diverse.

Pertanto, i pazienti con alti livelli di IgE specifiche per le proteine di deposito dovrebbero essere esclusi dai test di provocazione. La sensibilizzazione verso le proteine di deposito dovrebbe essere considerata un'importante marker di possibile reazione sistemica grave.

Fanno parte del gruppo delle proteine di deposito anche le prolamine del grano: in questo cereale sono stati identificati numerosi allergeni: Tri a 18; Tri a 19, una gliadina, conosciuta come  $\omega$ -gliadina "veloce", responsabile dei quadri di anafilassi correlata all'esercizio fisico (FDEIA, food-dependent exercise-induced anaphylaxis)<sup>23</sup>; Tri a chitinasi, coinvolta nella sindrome lattice-frutta; Tri a LTP (Tri a 14), legata a reazioni sistemiche caratteristiche di questo gruppo di allergeni. È stato documentato che la cottura può incidere in modo significativo sull'allergenicità delle prolamine dei cereali<sup>24 25</sup>.

Le 2S albumine sono un'importante famiglia di proteine di deposito presenti, insieme alle cupine, esclusivamente nei semi dei dicotiledoni. Le 2S albumine possono sensibilizzare un individuo per inalazione o per ingestione. Gli allergeni più rappresentativi di questa famiglia sono Ara h 2, Ara h 6, Ara h 7 dell'arachide<sup>26</sup>; Bra j 1 e Sin a 1, rispettivamente della senape orientale e della senape gialla; Jun r 1 della noce; Ses i 1 e Ses i 2 del sesamo; Ber e 1 della noce brasiliana e le 2S albumine della mandorla, dei semi di girasole, della soia e del cece. Ara h 2, Ara h 6 e Ber e 1, gli allergeni più rappresentativi di questa famiglia, sono estremamente resistenti alla digestione proteolitica, alla denaturazione termica e proteolitica<sup>26</sup>.

Un altro gruppo di allergeni della superfamiglia delle prolamine esclusivi dei cereali, è costituito dagli inibitori dell' $\alpha$ -amilasi/tripsina (inibitori bifunzionali). Essi possono sensibilizzare i soggetti attraverso i polmoni, come nel caso dell'asma occupazionale

dovuto alla farina degli addetti alla panificazione. Alternativamente il processo di sensibilizzazione può avvenire anche per ingestione di cereali come il grano, l'orzo e il riso. Gli allergeni meglio caratterizzati sono gli inibitori dell' $\alpha$ -amilasi del riso e del frumento<sup>27</sup>. Altri inibitori dell' $\alpha$ -amilasi sono stati identificati nel granturco, nell'orzo e nella birra<sup>28</sup>.

#### Taumatine

Le Thaumatin-like Proteins (TLP) sono molecole di 30 kda identificate come allergeni 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 poiché sono rare le monosensibilizzazioni. Nonostante si tratti di molecole resistenti alle proteasi ed al calore i pazienti con tali sensibilizzazioni sembrano presentare solo sindrome orale allergica.

#### Determinanti carboidratici cross reattivi (CCD)

Approssimativamente il 20% dei pazienti allergici ai pollini presentano IgE specifiche per allergeni con peso molecolare superiore a 30 kda, la maggior parte dei quali è ascrivibile ai determinanti carboidratici (in particolari glicani contenenti fucosio o xilosio). La sensibilizzazione si associa raramente a sintomatologia clinica, ma può essere rilevante in una minoranza di pazienti ed è stata messa in relazione con il consumo di alcune verdure (sedano, pomodoro e zucchini). Poiché questi epitopi sono abbondantemente distribuiti nelle varie specie di vegetali e di animali invertebrati, nei soggetti CCD-positivi il dosaggio delle IgE specifiche per estratti allergenici può dare luogo a positività multiple (cross-reazioni).

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

##### Tropomiosine

Le tropomiosine sono una famiglia comprendente, fino ad oggi, 46 proteine strettamente correlate presenti in cellule muscolari e non muscolari (Tab. IX).

Le tropomiosine sono gli allergeni maggiori dei crostacei e dei molluschi e vengono oggi considerate pan-allergeni degli animali invertebrati. Le tropomiosine allergeniche sono termostabili e la cross-reattività è confinata alle diverse specie di crostacei e molluschi.

Tab. IX. Tropomiosine.

Fonte allergenica	Allergene
Gamberetto	rPen a 1, n Pen i 1, nPen m 1
Acaro della polvere	rDer p 10
Scarafaggio	nBla g 7
Anisakis	rAni s 3

### *Parvalbumine*

Le parvalbumine sono presenti in grande quantità nei muscoli bianchi di molte specie di pesci. La loro caratteristica fondamentale è dovuta alla presenza nella molecola di un domain capace di legare il calcio. Fenomeni di cross-reattività verso componenti muscolari dei pesci e delle rane sono stati documentati in alcuni soggetti allergici ai pesci, e sono attribuibili a somiglianze strutturali tra le due parvalbumine.

### *Caseine*

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%), l'albumina sierica bovina (BSA) (Bos d 6) (1%), la lattoferrina (presente in tracce). Le caseine sono gli allergeni maggiormente coinvolti nelle allergie da latte vaccino. Le caseine si trovano nel latte dei mammiferi a concentrazioni attorno ai 15 mg/ml e sono in grado di legare il calcio. 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. Esistono considerevoli somiglianze tra caseine del latte di mammiferi differenti che spiegano le cross-reattività documentate.

### *Lipocaline*

Le lipocaline sono un gruppo di proteine diverse che hanno in comune un'identità di sequenza di circa il 20%. Lipocaline che agiscono come allergeni alimentari sono la  $\beta$ -lattoglobulina (Bos d 5), presente nel latte vaccino, non resistente alle alte temperature ma resistente alla pastorizzazione, Bub b BLG (latte di bufala), Cap h BLG (latte di capra), Equ c BLG (latte di cavalla), Ovi a BLG (latte di pecora).

### *Famiglia del lisozima*

Il lisozima di tipo C e l' $\alpha$ -lattalbumina (non resistente al calore) appartengono alla famiglia delle glicosidasi idrolasi; l' $\alpha$ -lattalbumina, diversamente dal lisozima dell'uovo di pollo (Gal d 4), si lega al calcio. I due allergeni, pur esibendo una scarsa omologia di sequenza, hanno una struttura tridimensionale sovrapponibile.

### *Famiglia delle transferrine*

Le transferrine sono glicoproteine ricche in gruppi solforici, capaci di legare e controllare, *in vivo*, i livelli di ferro libero. I membri di questa famiglia identificati come allergeni alimentari minori includono la lattotransferrina (Bos d lattotransferrina) (parzialmente resistente al calore) e l'ovotransferrina dell'albumine dell'uovo di pollo (Gal d 3) (non resistente al calore).

### *Ovomucoidi*

Le molecole responsabili dell'allergia all'uovo si trovano localizzate nell'albumine, anche se sono stati descritti alcuni casi di reazione a molecole presenti nel tuorlo. Il 55% dell'albumine è composto da ovalbumina, altre molecole sono la conalbumina, l'ovomucoide, l'ovomucina ed il lisozima. L'ovomucoide del pollo (Gal d 1) è l'allergene dominante dell'albumine d'uovo: è resistente al calore, all'urea ed alle proteasi digestive. Nei 2/3 dei casi l'allergia si presenta nell'infanzia e scompare con la crescita.

## **2.3. METODICHE DIAGNOSTICHE DI TERZO LIVELLO**

### **2.3.1. Diagnostica molecolare mediante microarray**

Il più recente test in diagnostica molecolare utilizzabile anche in allergologia è il "microarray": si tratta di un test "miniaturizzato" che consente il rilievo di reattività specifica verso oltre 100 singole molecole; può essere studiata la reattività contemporaneamente sia verso allergeni da inalazione sia alimentari (ed altri) con minima quantità di materiale biologico (dosaggio di IgE specifiche con microarray di allergeni molecolari).

In casi particolari, come ad esempio nel paziente con numerose positività cutanee e/o sierologiche, laddove non sia possibile riconoscere l'alimento causale e volendo distinguere fra alimenti e/o singole molecole potenzialmente in grado di dare reazioni gravi, può essere utile affidarsi a questo test per una valutazione allergica allargata simultaneamente a oltre 40 importanti allergeni alimentari di tipo molecolare: l'interpretazione è da affidare a specialista allergologo formato in diagnostica molecolare ed è sempre da riferire ai rilievi clinico-anamnestici oltre che ai test precedentemente eseguiti<sup>29</sup>.

Questo test può rendersi indispensabile nell'ambito di poli-sensibilizzazioni dove non sia possibile individuare l'alimento/i causale, consentendo una certa previsione del rischio clinico; può indirizzare quindi e "guidare" l'eventuale esecuzione dei test di scatenamento orale. Inoltre, nel polisensibilizzato consente una limitazione alle richieste del dosaggio di IgE verso allergeni purificati e ricombinanti per ogni alimento.

### **2.3.2. Test di provocazione orale (TPO)**

Il test di provocazione orale (TPO) rimane l'esame "gold standard" per stabilire o escludere la responsabilità di un dato alimento nel provocare una reazione avversa, ma è in grado di porre una diagnosi esclusivamente di tipo eziologico, non dando alcuna indicazione sul meccanismo patogenetico della reazione<sup>4</sup>. Tale test consiste nella somministrazione di dosi progressivamente crescenti dell'alimento opportu-

namente diluito fino alla dose minima scatenante i sintomi<sup>30</sup>.

I TPO sono eseguiti al fine di identificare l'alimento responsabile delle manifestazioni allergiche nel caso in cui l'esame allergologico non fosse dirimente o con la finalità di verificare l'eventuale acquisizione o meno di una tolleranza spontanea nei confronti dell'alimento in questione<sup>31 32</sup>. L'identificazione dell'alimento responsabile permette di evitare regimi alimentari rigidi non necessari, che comportano importanti conseguenze sia da un punto di vista nutrizionale che psico-sociale.

Il test va eseguito in ambiente ospedaliero, da personale in grado di eseguire le manovre rianimatorie di base e con la disponibilità dei farmaci d'emergenza. È inoltre opportuno che all'interno della struttura vi sia un'unità di terapia intensiva con personale in grado di mettere in atto manovre rianimatorie avanzate. Il challenge orale necessita la preparazione del paziente per la procedura, la disponibilità di un adeguato setting sanitario per una conduzione organizzata, un attento inquadramento dei sintomi e segni, ed il trattamento di eventuali reazioni. Il paziente prima del test deve aver eliminato dalla dieta da 2-8 settimane l'alimento/i sospetto/i.

Problemi aperti riguardo alle procedure dei TPO sono rappresentati da:

- dose minima (dose minima tollerata) con la quale iniziare il test;
- come procedere nella somministrazione delle dosi successive;
- come mascherare il cibo sospetto;
- alterazioni legate alla cottura e processazione dei cibi;
- la maturazione, conservazione, varietà dei vegetali stessi che ne condiziona il contenuto allergenico.

La dose iniziale, l'incremento delle dosi, e gli intervalli fra le dosi sono basate sulla storia del paziente e scelte da un operatore esperto, e possono variare in soggetti diversi e per alimenti diversi.

In relazione alla possibilità di reazioni avverse, nell'ottica di una riduzione delle medesime, è possibile ricorrere alla metodica dell'"end point" per la scelta della dose di partenza anche per il test di scatenamento, dalla quale poi iniziare anche eventuale desensibilizzazione orale<sup>30</sup>.

L'interpretazione dei risultati e la programmazione del "follow-up" sono molto importanti. Un challenge negativo può permettere la reintroduzione di un alimento nella dieta, mentre un test positivo conferma in maniera scientifica la necessità di evitare un alimento.

#### *Preparazione del cibo per challenge orali*

Nel test in aperto l'alimento può essere fornito dallo stesso paziente. Nei test in singolo o doppio cieco, il materiale deve essere preparato in ambito sanitario,

per provvedere ad una adeguata mascheratura. È da evitare la contaminazione del cibo. È da notare che la cottura, e anche la manipolazione del cibo possono determinarne alterazioni dell'allergenicità. In caso di negatività del challenge, il paziente assumerà una porzione regolare dell'alimento testato: va posta particolare attenzione al fatto che ciò riguarda strettamente la forma in cui il cibo è stato somministrato durante il challenge stesso. Il cibo (ed anche il placebo) può essere veicolato o mascherato in apposite matrici.

#### *Indicazioni*

- Identificare l'alimento responsabile di reazioni acute per una prima diagnosi, o per monitorare la sopravvenuta tolleranza in caso di pregressa allergia.
- Determinare se un alimento associato con condizioni croniche come la dermatite atopica o la esofagite eosinofila può causare reazioni immediate.
- Espandere la dieta in soggetti con molteplici restrizioni dietetiche, spesso legato a fattori soggettivi.
- Stabilire il grado di tolleranza agli alimenti cross reattivi.
- Stabilire possibile acquisizione di una tolleranza spontanea all'alimento in questione nel caso in cui l'ultimo episodio avverso non sia avvenuto di recente ed i test eseguiti di nuovo diano indicazioni in tal senso.

#### *Controindicazioni*

- 1) In caso di severe reazioni anafilattiche (specie se recenti) conseguenti ad ingestioni isolate con esame allergologico positivo.
- 2) Quando il livello di IgE specifiche supera il cut-off, per cui si ha un'elevata probabilità che il test orale risulti positivo.
- 3) In caso di reattività a singole molecole individuate con la CRD che indicano possibile reazione grave e sconsigliano il "challenge".
- 4) Nel caso in cui si abbiano reazioni già durante l'esecuzione degli SPT.
- 5) Quando il paziente presenta una patologia sistemica acuta in atto o quando è in terapia con farmaci che possono attenuare (antistaminici, corticosteroidi) o amplificare la reazione ( $\beta$ -bloccanti, ACE-inibitori, FANS, ecc.).

## **Tipi di test di provocazione orale**

#### *In aperto*

Si utilizza per reazioni immediate quando non si teme una reazione grave. Può essere effettuato a livello ambulatoriale, con un protocollo semplificato di somministrazione ed una osservazione di circa due ore. Può essere influenzato fortemente dalla età e dall'atteggia-

mento psicologico del soggetto; in caso di negatività, l'alimento può essere reintrodotta nella dieta; in caso di positività non oggettivabile, va controllato con un test in doppio cieco. In caso di possibili reazioni gravi si può utilizzare uno schema di somministrazione mirato.

#### ***In singolo cieco***

Il paziente viene informato che l'alimento può essere o no presente nella dose somministrata. In caso di risposta del tutto negativa, o positiva con sintomi oggettivabili, non è necessario proseguire gli accertamenti.

#### ***In singolo cieco con placebo***

Consiste in due sessioni, una con il placebo ed una con l'alimento sospetto, che possono essere effettuate nello stesso giorno con due ore di intervallo; se non è possibile per questioni di tempo, si possono alternare dosi di placebo con alimento sospetto. In caso di sintomi ritardati si possono effettuare test distanziati di una settimana. Nei casi in cui si sospetti una forte componente psicologica, è opportuno testare il placebo prima dell'alimento sospetto. Possono essere ripetute sessioni con solo placebo o alimento sospetto per conferma di sintomi vaghi e non obiettivabili. In caso di positività con il placebo, sarà necessario ricorrere al doppio cieco. In caso di negatività, l'alimento tollerato deve essere ingerito nella sua forma naturale due ore dopo, o il giorno dopo il test. La tolleranza deve essere verificata con follow-up<sup>32</sup>.

#### ***In doppio cieco con placebo***

Gli alimenti da testare sono preparati, in maniera da non essere riconosciuti, da una terza persona (dietista) non coinvolta nell'esame clinico; la somministrazione di alimento sospetto e placebo è randomizzata. Solo quando il test è completato medico e paziente possono conoscere lo schema di somministrazione e discutere il risultato. Anche in questo caso solo l'ingestione dell'alimento in dosi normali, nella sua forma naturale, può essere definito tolleranza. Il challenge in doppio cieco ha rilevanza in particolare per la ricerca, ed è necessario in casi selezionati<sup>31 32</sup>.

## **2.4. METODICHE DIAGNOSTICHE DI QUARTO LIVELLO**

Si tratta di metodiche non ancora in uso nella diagnostica di routine, fra queste anche la metodica di ricerca di IgE specifiche nei confronti degli alimenti mediante immunoblotting, in uso nei laboratori di ricerca ed il test di attivazione dei basofili, effettuabile laddove presente citometria a flusso.

### ***2.4.1. Test di attivazione dei basofili (BAT)***

Il test di attivazione dei basofili (BAT) può essere utilizzato come indagine *in vitro* di quarto livello per

lo studio delle reazioni allergiche IgE (e non IgE) mediate.

Il rationale su cui si fonda questo test è la dimostrazione di un cambiamento nel fenotipo di membrana dei basofili attivati, evidenziato in citofluorimetria, dopo incubazione *in vitro* del sangue del paziente con l'allergene. È possibile impiegare leucociti isolati o, più semplicemente, sangue intero periferico che viene incubato per circa 15 minuti a 37°C con l'allergene e poi testato allo scopo di identificare le cellule in fase di degranulazione.

Solitamente per evidenziare i basofili vengono impiegati anticorpi marcati con ficoeritrina (PE) rivolti verso il CCR3, recettore per l'eotaxina, ben rappresentato su queste cellule<sup>33</sup>.

Per identificare invece il solo sottogruppo dei basofili attivati sono stati studiati diversi marcatori di membrana che vanno incontro ad "up-" o a "down-regulation" durante la degranulazione. Il marcatore maggiormente utilizzato è l'anticorpo monoclonale anti CD63 (gp53) che lega una glicoproteina di tipo lisosomiale contenuta in granuli intracitoplasmatici, presente sulla superficie dei basofili solo in fase di degranulazione; recentemente è stato impiegato anche il CD203c espresso esclusivamente sui basofili, sui mastociti e sulle cellule loro progenitriche che è sovraespresso in corso di attivazione di questi tipi cellulari. L'utilizzo del BAT è vantaggioso dal punto di vista clinico e rappresenta un utile strumento complementare nella diagnostica *in vitro* delle reazioni allergiche IgE mediate da alimenti come dimostrato per latte, uovo, arachide, grano<sup>34 35</sup> e anche nelle reazioni in cui vi è attivazione basofila senza presenza di anticorpi IgE, come evidenziato per i solfiti e per la carne di manzo<sup>36 37</sup>.

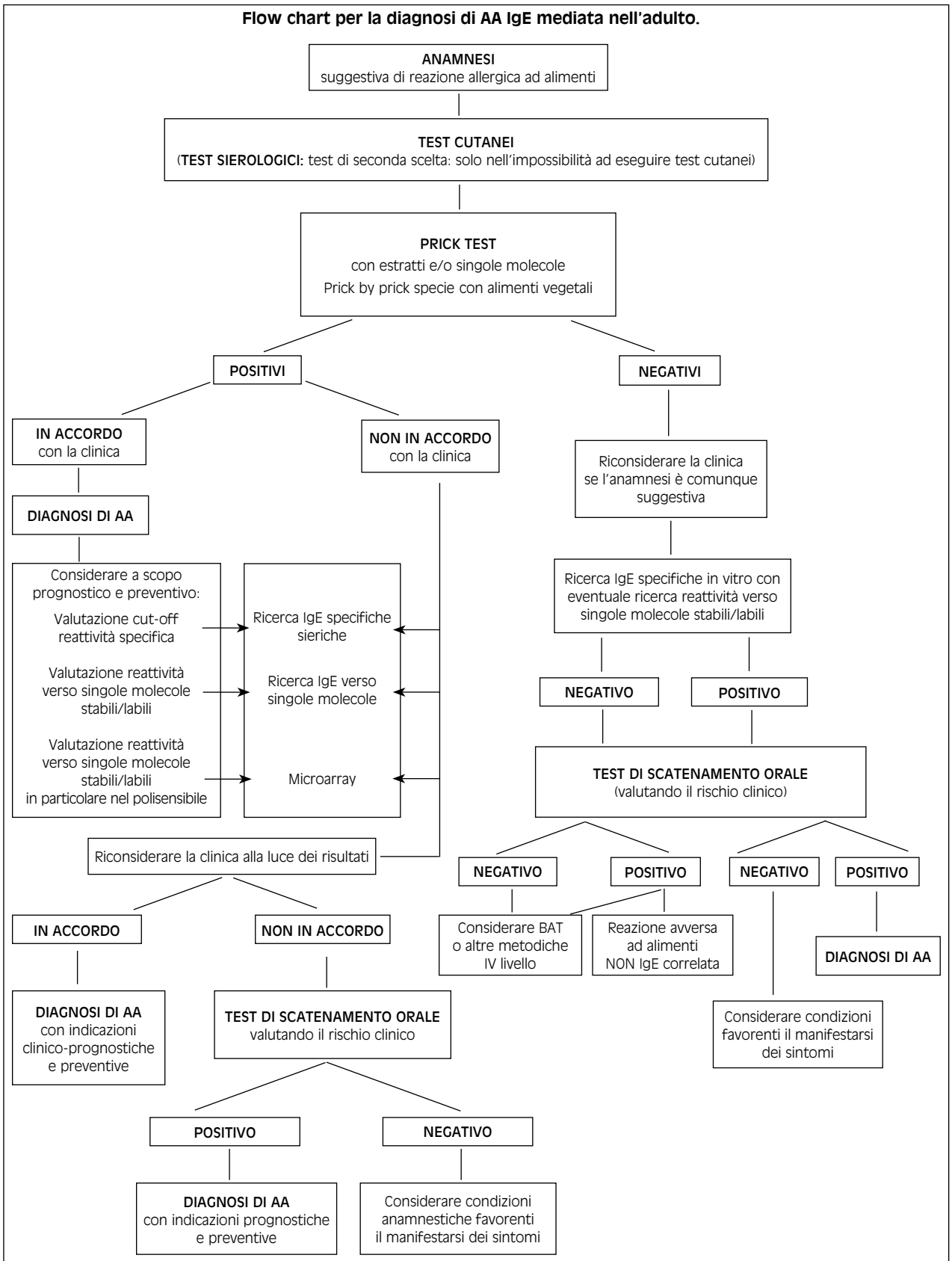
Questa indagine di quarto livello si è rivelata inoltre un utile complemento ai prick test e al dosaggio delle IgE specifiche soprattutto al fine di differenziare le semplici sensibilizzazioni, che spesso si riscontrano ma che non implicano necessariamente un sintomo clinico, dalle vere e proprie allergie che possono causare gravi reazioni. Recentemente è stato inoltre impiegato nel processo decisionale per la reintroduzione del latte nei bambini allergici alla caseina<sup>38</sup>.

La metodica però presenta ancora alcune criticità che non la rendono tuttora un test di routine.

Le criticità maggiori sono da ricercarsi:

- *nelle metodiche di conservazione del campione biologico*: per ottenere una buona vitalità delle cellule infatti il campione di sangue in EDTA andrebbe conservato a 4°C e analizzato entro 24h dal prelievo;
- *nella concentrazione utilizzata di allergene*, non sono ancora disponibili infatti curve dose-risposta standardizzate per ogni allergene.

**Flow chart per la diagnosi di AA IgE mediata nell'adulto.**



## 2.5. METODICHE NON CONVENZIONALI

Negli ultimi anni, si ricorre sempre con maggiore frequenza a vari test diagnostici proposti dalla Medicina Complementare ed Alternativa (CAM) tra i quali i più utilizzati sono il test citotossico, il DRIA-test, il test di provocazione/neutralizzazione sia sublinguale che sottocutaneo, il test del riflesso cardiaco auricolare, l'elettroagopuntura secondo Voll, la biorisonanza, la kinesiologia applicata e l'analisi del capello. Alla luce dei dati scientifici attuali nessuno di questi test si è dimostrato utile per la diagnosi di allergia o intolleranza alimentare. Infatti l'uso indiscriminato di questi metodi non è scevro da rischi, per i ritardi diagnostici che può comportare o per conseguenti squilibri dietetici, dannosi soprattutto nei bambini. Le pratiche e procedure diagnostiche proposte dalla CAM non sono quindi da ritenersi valide<sup>39-40</sup>. Occorre quindi scoraggiare in modo definitivo e capillare l'utilizzo di tali pratiche ed evitare che la diagnosi di RAA e quindi di allergia alimentare sia possibile nell'ambito di strutture laddove non sia presente lo specialista di riferimento allergo-immunologo.

### Bibliografia

- 1 Branum AM, Lukacs SL. *Food allergy among children in the USA*. Pediatrics 2009;124:1549-55.
- 2 Sicherer SH. *Epidemiology of food allergy*. J Allergy Clin Immunol 2011;127:594-62.
- 3 Sicherer SH. *Food Allergy*. J Allergy Clin Immunol 2010;125(Suppl 2):S116-25.
- 4 NIAID-Sponsored Expert Panel, Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, et al. *Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel*. J Allergy Clin Immunol 2010;126(Suppl):S1-58.
- 5 Asero R, Antonicelli L, Arena A, et al. *Epidem AAITO: features of food allergy in Italian adults attending allergy clinics: a multi-centre study*. Clin Exp Allergy 2009;39:547-55.
- 6 Flokstra-de Blok BM, Dubois AE. *Quality of life in food allergy: valid scales for children and adults*. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2009;9:214-21.
- 7 Lieberman JA, Sicherer SH. *Quality of life in food allergy*. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2011;11:236-42.
- 8 Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, et al.; EAACI nomenclature task force. *A revised nomenclature for allergy An EAACI position statement from EAACI nomenclature task force*. Allergy 2001;56:813-24.
- 9 La Shell M, Calabria C. *History-taking requires interaction, and skin testing requires appropriate screening*. J Allergy Clin Immunol 2009;124:388.
- 10 Pastorello E, Stocchi L, Bigi A, et al. *Value and limits of diagnostic tests in food hypersensitivity*. Allergy 1989;44(Suppl 9):151-8.
- 11 Bernstein IL, Li JT, Bernstein DI, et al.; American Academy of Allergy, Asthma and Immunology; American College of Allergy, Asthma and Immunology. *Allergy diagnostic testing: an update practice parameter*. Ann Allergy Asthma Immunol 2008;100(Suppl 3):S1-148.
- 12 Rusznak C, Davies RJ. *ABC of allergies. Diagnosing allergy*. BMJ 1998;316:686-9.
- 13 Lieberman JA, Sicherer SH. *The diagnosis of food allergy*. Am J Rhinol Allergy 2010;24:439-43.
- 14 Rancé F, Juchet A, Brémont F, et al. *Correlations between skin prick test using commercial extracts, fresh foods, specific IgE and food challenge*. Allergy 1997;52:1031-5.
- 15 Hamilton RG. *Clinical laboratory assessment of immediate-type hypersensitivity*. J Allergy Clin Immunol 2010;125(Suppl 2):S284-96.
- 16 Rancé F, Brondeau V, Abbal M. *Use of prick-tests in the screening of immediate allergy to protein: 16 cases*. Allerg Immunol (Paris) 2002;34:71-6.
- 17 Breiteneder H, Mills C. *Food allergens: molecular and immunological characteristics*. In: Metcalfe DD, Sampson HA, Simon RA, eds. *Food Allergy: Adverse Reactions to Foods and Food Additives*. Boston, MA: Blackwell Scientific Publications 2008.
- 18 Breiteneder H, Pettenburger K, Bito A, et al. *The gene coding for the major birch pollen allergen Bet v 1. is highly homologous to a pea disease resistance response gene*. EMBO J 1989;8:1935-8.
- 19 Hoffmann-Sommergruber K. *Plant allergens and pathogenesis related proteins. What do they have in common?* Int Arch Allergy Immunol 2000;122:155-66.
- 20 Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, et al. *Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion*. Int Arch Allergy Immunol 2000;122:20-32.
- 21 Mari A. *Multiple pollen sensitization: a molecular approach to the diagnosis*. Int Arch Allergy Immunol 2001;125:57-65.
- 22 Sankian M, Varasteh A, Pazouki N, et al. *Sequence homology: a poor predictive value for profilins cross-reactivity*. Clin Mol Allergy 2005;3:13.
- 23 Palosuo K, Alenius H, Varjonen E, et al. *A novel wheat gliadin as a cause of exercise-induced anaphylaxis*. J Allergy Clin Immunol 1999;103:912-17.
- 24 Matsuo H, Morita E, Tatharn AS, et al. *Identification of the IgE-binding epitope in omega-5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis*. J Biol Chem 2004;279:12135-40.
- 25 Simonato B, De Lazzari F, Pasini G, et al. *IgE binding to soluble and insoluble wheat flour proteins in atopic and non-atopic patients suffering from gastrointestinal symptoms after wheat ingestion*. Clin Exp Allergy 2001;31:1771-8.
- 26 Lehmann K, Schweimer K, Reese G, et al. *Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions*. Biochem J 2006;395:463-72.
- 27 Pastorello EA, Farioli L, Conti A, et al. *Wheat IgE-mediated food allergy in European patients: alpha-amylase inhibitors, lipid transfer proteins and low-molecular-weight glutenins. Allergenic molecules recognized by double-blind, placebo-controlled food challenge*. Int Arch Allergy Immunol 2007;144:10-22.
- 28 Curioni A, Santucci B, Cristaudo A, et al. *Urticaria from beer: an immediate hypersensitivity reaction due to a 10-kDa protein derived from barley*. Clin Exp Allergy 1999;29:407-13.

- <sup>29</sup> Rossi RE, Monasterolo G, Harwenegg C, et al. *Evaluation of 70 polysensitized allergic patients with skin prick test and an allergen microarray*. *Int J Allergy Clin Immunol* 2007;17:158-64.
- <sup>30</sup> Mori F, Pucci N, Rossi ME, et al. *Oral desensitization to milk: how to choose the starting dose!* *Pediatr Allergy Immunol* 2010;21(Pt 2):e450-3.
- <sup>31</sup> Sicherer SH. *Food allergy: when and how to perform oral food challenges*. *Pediatr Allergy Immunol* 1999;10:226-34.
- <sup>32</sup> Bindslev-Jensen C. *Standardization of double-blind, placebo-controlled food challenges*. *Allergy* 2001;56:75-7.
- <sup>33</sup> Sanz ML, Gamboa PM, De Weck AL. *In vitro tests: basophil activation tests drug hypersensitivity*. In: Pichler WJ, ed. *Drug Hypersensitivity*. Basel: Karger 2007, pp. 391-402.
- <sup>34</sup> Ocmant A, Mulier S, Hanssens L, et al. *Basophil activation tests for the diagnosis of food allergy in children*. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1234-45.
- <sup>35</sup> Tokuda R, Nagao M, Hiraguchi Y, et al. *Antigen-induced expression of CD203c on basophils predicts IgE-mediated wheat allergy*. *Allergol Int* 2009;58:193-9.
- <sup>36</sup> García-Ortega P, Scorza E, Teniente A. *Basophil activation test in the diagnosis of sulphite-induced immediate urticaria*. *Clin Exp Allergy* 2010;40:688, author reply 689-90.
- <sup>37</sup> Kim JH, An S, Kim JE, et al. *Beef-induced anaphylaxis confirmed by the basophil activation test*. *Allergy Asthma Immunol Res* 2010;2:206-8.
- <sup>38</sup> Rubio A, Vivinus-Nébot M, Bourrier T, et al. *Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children*. *Allergy* 2011;66:92-100.
- <sup>39</sup> Senna G, Bonadonna P, Schiappoli M, et al. *Pattern of use and diagnostic value of complementary/alternative tests for adverse reactions to food*. *Allergy* 2005;60:1216-7.
- <sup>40</sup> Niggeman B. *Unproven diagnostic procedures in IgE mediated allergic disease*. *Allergy* 2004;59:86-8.

■ Con la collaborazione di: L. Amati, Bari; A. Arsieni, Bari; A. Aruanno, Roma; P. Bernardis, Padova; P. Botta, Garbagnate; M. Caminati, Pavia; A. Ciccarelli, Napoli; G. Colombo, Milano; S. Contestabile, Firenze; E. Damiani, Bari; A. Detoraki, Napoli; E. Di Leo, Bari; M.P. Dolcher, Pisa; P. Fantini, Bari; E.M. Heffler, Torino; M. Landi, Torino; A. Melchiorre, Desenzano sul Garda; L. Nociti, Cosenza; C. Quercia, Brescia; V. Ricca, Torino; M. Schiappoli, Verona; L.G. Seccia, Barletta; S. Stranges, Caserta; M. Sugamiele, Erice; C.G. Uasuf, Palermo; M.T. Ventura, Bari.

■ Si ringraziano i Proff.ri Cristoforo Incorvaia ed Oliviero Rossi per il contributo dato alla revisione del documento.

■ Corrispondenza: Donatella Macchia, S.S. Allergologia Immunologia Clinica, Ospedale S. Giovanni di Dio, via di Torregalli 3, 50143 Firenze - E-mail: donatella.macchia@asf.toscana.it

# Sistema complementare e Artrite Reumatoide: correlazioni con autoanticorpi, caratteristiche cliniche e di laboratorio e farmaci anti-TNF $\alpha$

## *Complement system and Rheumatoid Arthritis: relationships with autoantibodies, serological, clinical features and anti-TNF $\alpha$ treatment*

G. DI MUZIO, E. BALLANTI, M.S. CHIMENTI, P. CONIGLIARO, D. GRACEFFA, M.D. GUARINO, E. GRECO, B. KROEGLER, L. NOVELLI, C. PERRICONE\*, R. PERRICONE  
Scuola di Specializzazione in Allergologia ed Immunologia Clinica, Università degli Studi di Roma Tor Vergata, UOC Reumatologia Policlinico Tor Vergata; \*Dipartimento di Clinica e Terapia Medica, Sezione di Reumatologia, Sapienza Università di Roma, Policlinico "Umberto I"

### Parole chiave

Sistema complementare • Anticorpi anti-peptide ciclico citrullinato • Artrite Reumatoide • Farmaci anti-TNF $\alpha$  • Fattore Reumatoide

### Key words

Complement System • Anti cyclic citrullinated peptide Abs • Rheumatoid Arthritis • Anti-TNF $\alpha$  Drugs • Rheumatoid Factor

### Riassunto

**Obiettivi.** Il Fattore reumatoide (FR), gli Anticorpi anti-proteine cicliche citrullinate, (Anti-CCP) ed il complemento sono coinvolti nella patogenesi dell'Artrite Reumatoide (AR). Il nostro studio ha lo scopo di verificare la capacità degli anticorpi anti-peptide ciclico citrullinato di attivare il sistema complementare in vivo, in pazienti con AR che effettuano terapie tradizionali (DMARDs) o inibitori del TNF $\alpha$ .

**Materiali e metodi.** Abbiamo considerato 114 pazienti (89 donne, 25 uomini) con diagnosi di AR formulata secondo i criteri ACR (1987) e 30 controlli sani. Le indagini sierologiche hanno compreso: VES, PCR, C3, C4 e CH50, FR e Anti-CCP. 76 pazienti sono stati sottoposti a terapia con Anti-TNF $\alpha$  e sono stati nuovamente esaminati dopo 22 settimane. L'attività di malattia è stata misurata con DAS 28 e la risposta alla terapia valutata secondo i criteri EULAR.

**Risultati.** Allo screening, i valori di C3, C4, CH50 erano significativamente maggiori nei pazienti con AR che nei controlli. Tra i pazienti con positività degli Anti-CCP (n = 76) e quelli con negatività (n = 38) non ci sono differenze cliniche o demografiche, e neanche differenze nei livelli di C3, C4, CH50. Nei pazienti sottoposti a terapia con farmaci biologici, C3, C4 e FR si sono ridotti significativamente dopo 22 settimane. I cambiamenti del FR hanno mostrato correlazione positiva con il CH50 nello stesso momento. Il DAS 28 è significativamente migliorato dopo 22 settimane.

**Conclusioni.** I livelli di C3, C4 e CH50, misurati in vivo nei sieri di pazienti con AR risultano indipendenti dai valori degli anticorpi Anti-CCP mentre sembrano correlati al FR, qualsiasi sia la terapia effettuata.

### Summary

**Objectives.** Rheumatoid factor (RF), anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) and complement system are involved in rheumatoid arthritis (RA) pathogenesis. Aim of this study is to investigate whether ACPA can activate the Complement system in vivo in patients with Rheumatoid Arthritis who are treated by means of traditional and/or biologic DMARDs.

**Methods.** One-hundred fourteen RA patients (89 F/25 M) diagnosed according to 1987 ACR criteria and 30 healthy controls were enrolled. Serological analysis included ESR, CRP, complement C3, C4 and CH50, RF and ACPA. Seventy-six patients started anti-TNF $\alpha$  treatments and were studied also after 22 weeks. Disease activity was measured with DAS28 and response to therapy with EULAR criteria.

**Results.** At baseline, C3, C4 and CH50 levels in RA patients were significantly higher than in controls. No demographic or clinical differences were observed between ACPA+ (n = 76) and ACPA- (n = 38) patients, nor in C3, C4 and CH50 levels. In patients undergoing anti-TNF $\alpha$  therapy, C3, C4 and RF were significantly reduced after 22 weeks. RF changes showed positive correlation with CH50 after 22 weeks. DAS28 significantly ameliorated after 22 weeks.

**Conclusions.** C3, C4, CH50 levels that we studied in serum of RA patients seem to correlate with RF levels rather than ACPA, independently from the therapy administered.

## Introduzione

L'Artrite Reumatoide (AR) è una malattia infiammatoria cronica sistemica che colpisce in prima istanza le articolazioni e che riproduce alcune caratteristiche dell'autoimmunità. Questa complessa malattia multifattoriale colpisce approssimativamente lo 0,5-1% della popolazione e conduce alla progressiva distruzione articolare. Fattori genetici ed ambientali contribuiscono alla suscettibilità e al fenotipo<sup>1</sup>. Anticorpi circolanti, specificamente il Fattore Reumatoide (FR) e gli Anticorpi anti-peptide ciclico citrullinato (Anti-CCP) sono caratteristici della malattia e possono essere utili strumenti diagnostici e prognostici<sup>2-4</sup> benché il loro ruolo patogenetico resti ancora parzialmente sconosciuto.

Recentemente due studi condotti su sieroteche di donatori di sangue (che successivamente hanno sviluppato l'Artrite Reumatoide), hanno dimostrato che gli anticorpi Anti-CCP erano presenti anni prima dei primi sintomi clinici<sup>5</sup>. Entrambi gli studi hanno evidenziato che la produzione di autoanticorpi Anti-CCP e del FR è un processo precoce nell'evoluzione della malattia e che la loro presenza è predittiva del suo sviluppo. In particolare, la positività degli Anti-CCP sembrerebbe essere correlata con lo sviluppo di un'AR erosiva e con prognosi peggiore, e questo effetto sembra sinergico al FR<sup>6</sup>.

Il sistema complementare è parte integrante del sistema di difesa immunitario, attivo verso i patogeni e nella clearance degli immunocomplessi. Il sistema complementare può essere innescato attraverso tre vie, ciascuna con una specifica molecola di riconoscimento: la via classica, la via alternativa e la via delle lectine. Qualunque sia la via coinvolta, il momento fondamentale dell'attivazione del sistema complementare è la formazione dell'enzima C3-convertasi e il conseguente clivaggio del C3, da cui derivano frazioni complementari attive, deputate all'opsonizzazione, alla chemiotassi e alla citolisi<sup>7</sup>. Benché il complemento sia sostanzialmente un sistema sierico, sue componenti possono essere rinvenute ad alte concentrazioni nel liquido sinoviale. In particolare, i suoi livelli nel liquido sinoviale di pazienti con AR si sono dimostrati inferiori rispetto ai controlli e questo fenomeno può essere spiegato ipotizzando un eventuale consumo locale<sup>8</sup>.

Molenaar et al. hanno dimostrato che i livelli plasmatici di fattori attivi del complemento e complessi Proteina C Reattiva-Complemento sono aumentati nella maggior parte dei pazienti con AR e che tali livelli correlano con i parametri di attività di malattia<sup>9</sup>. Il sistema complementare gioca un ruolo patogenetico nell'AR. Nei pazienti affetti, depositi di frazioni complementari sono stati rinvenuti nella sinovia con metodica immunochimica. A partire dalle due prime segnalazioni nel 2007 (NEJM e PloS), il locus

TRAF1-C5, dove è localizzato il gene codificante per la componente complementare C5, si è dimostrato strettamente associato ad un aumentato rischio di AR, in particolare in presenza di AC, e ad una progressione radiografica della malattia<sup>10,11</sup>.

Un recente lavoro di Trouw et al.<sup>12</sup> indica che gli anticorpi Anti-CCP sono in grado di attivare il sistema complementare in vitro attraverso la via classica e la via alternativa, ma non attraverso la via delle lectine. Gli autori hanno impiegato sieri di pazienti affetti da AR con alti livelli di anticorpi Anti-CCP e sieri di individui sani come fonte di fattori complementari. L'attività funzionale delle tre vie di innesco complementare è stata analizzata con metodica ELISA.

Scopo del nostro studio è stato quello di verificare se gli anticorpi Anti-CCP siano in grado di attivare il sistema complementare in vivo, in pazienti con AR che effettuano terapie con farmaci di fondo tradizionali (DMARDs) o farmaci biologici anti-TNF $\alpha$ .

Un risultato in questa direzione potrebbe essere rilevante per mettere a punto interventi terapeutici finalizzati alla modulazione del danno complementomediato in pazienti con AR.

## Materiali e metodi

### PAZIENTI

Abbiamo arruolato 114 pazienti (78,1% donne, n = 89, 21,9% uomini, n = 25, età media  $55,9 \pm 13,2$  anni) affetti da AR, diagnosticata secondo i criteri ACR del 1987<sup>13</sup>, afferenti all'Unità Operativa Complessa di Reumatologia, Policlinico Tor Vergata, Università Tor Vergata, Roma. Come popolazione di controllo, abbiamo reclutato 30 individui sani.

### VALUTAZIONE CLINICA

La raccolta dei dati si è avvalsa di un foglio elettronico che comprendeva caratteristiche demografiche, epoca della diagnosi, co-morbidità, terapie attuali e precedenti.

La valutazione clinica ha preso in considerazione la conta delle articolazioni dolenti e tumefatte su 28 articolazioni, ed il giudizio del medico e del paziente sullo stato di salute globale, riportato su una scala visuo-analogica (VAS, 0-100 mm). L'attività di malattia è stata misurata tramite il Disease Activity Score in 28 articolazioni (DAS 28)<sup>14</sup>, e la risposta clinica è stata valutata secondo i criteri di risposta dell'European League Against Rheumatism (EULAR)<sup>15</sup>.

Prima dell'arruolamento, tutti i pazienti erano naïve per terapie biologiche ed erano trattati solo con DMARDs e steroidi (96%) o soltanto prednisone (4%). In particolare il 19% era in trattamento con Methotrexate (MTX), l'11% con MTX e Idrossiclorochina (HCQ), il 23% con MTX e prednisone, il 13%

con Sulfasalazina (SSZ), il 6% con SSZ e prednisone, l'11% con HCQ, il 7% con HCQ e prednisone, il 4% con Leflunomide (LEF), il 2% con Ciclosporina (CyA) e il 4% solo con prednisone.

La maggior parte dei pazienti erano affetti da una malattia moderata-severa, secondo il DAS28-ESR (media all'arruolamento  $4,8 \pm 1,2$ , range 1,82-7,72). Successivamente, i pazienti sono stati suddivisi in 4 gruppi sulla base della presenza o assenza di Anti-CCP e/o FR. I vari gruppi erano omogenei per età, sesso, durata di malattia e attività di malattia. Il gruppo con la positività per Anti-CCP e FR è risultato il più numeroso contando 63 (55,2%) pazienti. Cumulativamente, i pazienti con positività degli Anti-CCP erano 78 (68,4%) mentre i pazienti completamente sieronegativi erano 21 (18,4%) (Tab. I).

76 pazienti hanno iniziato la terapia con farmaci biologici a causa dell'inadeguata risposta alla terapia con DMARDs convenzionali: 27 pazienti sono stati trattati con Adalimumab (40 mg ogni 14 giorni, sottocute, Humira, Abbott Immunology, USA), 49 con Etanercept (50 mg una volta la settimana, sottocute, Enbrel, Pfizer, USA).

I pazienti in trattamento con agenti anti-TNF $\alpha$  sono stati nuovamente valutati dopo 14 e 22 settimane di terapia. In tutti i pazienti, gli altri farmaci di fondo e lo steroide sono stati mantenuti stabili durante il follow-up.

#### ANALISI DI LABORATORIO

Lo studio è stato condotto dopo approvazione del comitato etico locale, in conformità con la dichiarazione di Helsinki e tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato. Abbiamo prelevato un campione di sangue al momento dello screening e, nei pazienti in terapia con farmaci biologici, il prelievo è stato ripetuto alla 14<sup>a</sup> e 22<sup>a</sup> settimana di terapia. I sieri sono stati conservati secondo protocolli standard a -70° fino al momento dell'utilizzo.

Il Fattore Reumatoide sierico IgM è stato rilevato con nefelometria (Behring Nephelometer Analyzer II; Dade Behring, Inc., Deerfield, IL, USA, valori normali 0-40 IU/ml).

I livelli sierici di anticorpi Anti-CCP sono stati determinati con metodica anti-CCP QUANTA Lite CCP IgG ELISA (Medical Technology Promedt Consulting GmbH, Germany, variabilità intra- ed inter-analisi del 6% e del 9% rispettivamente) e considerati positivi al di sopra del valore di cut-off di 20 U/ml. Il range di misurazione era 0-300 U/ml, e tutti i valori superiori a questo limite sono stati inclusi nella nostra analisi e considerati pari a 300 U/ml.

Per ciascun paziente sono state valutate anche la VES e la PCR. In tutti i pazienti le concentrazioni di C4 sono state studiate con l'immunodiffusione radiale (mg/dl)<sup>16</sup>, il C3 tramite nefelometria, secondo le metodiche standard (mg/dl). L'attività emolitica totale del complemento (THC) è stata valutata con metodica Mayer's 50% di emolisi (espressa come CH50), come precedentemente riportato<sup>17</sup>.

#### ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata condotta con l'ausilio del software statistico Graph Pad 5 (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA). Le variabili distribuite secondo una curva di normalità sono state sintetizzate utilizzando la media  $\pm$  deviazione standard (SD), e le variabili non distribuite secondo una normalità attraverso mediana e range.

Analógamente, sono stati applicati il test di Mann e Whitney, il test di Wilcoxon per dati appaiati, il t-test per dati appaiati.

I confronti tra variabili nominali sono stati effettuati con il test Chi quadro ( $\chi^2$ ) o il test Fisher quando i campioni erano inferiori a 100. Per confrontare i parametri di laboratorio nelle varie tempistiche (arruolamento, 14<sup>a</sup> e 22<sup>a</sup> settimana di follow-up) sono stati usati l'analisi di variabilità one-way ANOVA ed il post-test di Bonferroni (P).

Per stabilire la correlazione tra 2 variabili continue, ci siamo serviti di coefficienti di correlazione per le variabili normali e non normali, rispettivamente di Pearson e di Spearman.

Per indagare l'esistenza di un'associazione tra la risposta EULAR e il FR, gli Anti-CCP, il C3, il C4 ed il CH50 è stata condotta un'analisi di regressione multi-

Tab. I. Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti.

	Pz. No. (%)	Etanercept/ Adalimumab	Età media (range)anni	Sesso (m/f)	Durata di malattia media (range) anni	PCR media (range) mg/l	DAS28- VES media (range)
Anti-CCP- FR-	21 (18,4)	9/5	51,3 (15,0-76,0)	2/19	8,3 (0-49)	10,9 (0,4-67)	4,5 (1,91-6,38)
Anti-CCP- FR+	15 (13,2)	3/3	58,9 (44,0-78,0)	3/12	6,7 (0-21)	10,1 (0,7-48,6)	4,8 (3,63-6,19)
Anti-CCP+ FR-	15 (13,2)	7/5	52,5 (28,0-76,0)	2/13	4,4 (0-14)	9,3 (0,2-44,7)	4,5 (2,36-5,54)
Anti-CCP+FR+	63 (55,2)	30/14	57,5 (32,0-74,0)	18/45	9,3 (0-40)	16,4 (0,1-73,2)	5,1 (1,82-7,72)
<b>Total</b>	114	49/27	55,9 (15,0-78,0)	25/89	8,2 (0-49)	13,7 (0,1-73,2)	4,8 (1,82-7,72)

**Tab. II.** Caratteristiche di laboratorio dei controlli vs pazienti con AR al baseline.

Caratteristiche di laboratorio (media $\pm$ DS)	Controlli (n = 30)	Baseline della coorte con AR (n = 114)	Valore p*
VES (0-20 mm/h)	/	30,6 $\pm$ 22,2	/
PCR (0-5 mg/l)	/	13,7 $\pm$ 17,3	/
FR (0-40 U/l)	/	235,9 $\pm$ 553,5	/
Anti-CCP (0-20 U/l)	/	132,2 $\pm$ 251,1	/
C3	110 $\pm$ 25	127,9 $\pm$ 26,5	0,0012
C4	22,7 $\pm$ 8,3	29,7 $\pm$ 10,2	0,0003
CH50	130,0 $\pm$ 31,2	138,0 $\pm$ 44,4	NS

\* t-test per dati appaiati (controlli vs. 11 pazienti con AR al baseline).

variabile. Sono stati riportati valori di p a due code e considerati significativi valori di  $p \leq 0,05$ .

## Risultati

### COMPLEMENTO

Le caratteristiche di laboratorio al basale di tutta la coorte di pazienti con AR, confrontata con i controlli, sono schematizzate nella Tabella II.

La coorte di pazienti con AR ha mostrato, al basale, livelli medi di C3 e C4 significativamente maggiori dei controlli (t-test per dati appaiati, rispettivamente  $p = 0,0012$  e  $p = 0,0003$ ) e valori simili di CH50. Nel gruppo di pazienti affetti da AR non sono emerse differenze significative nei livelli di C3, C4, CH50 nel confronto tra pazienti con positività o assenza di Anti-CCP al basale, indipendentemente dal DMARD assunto (Fig. 1).

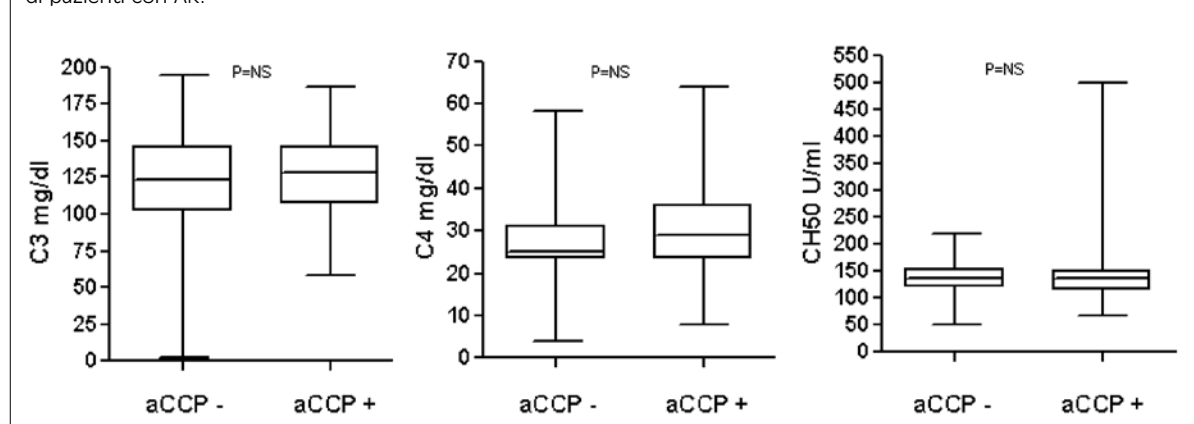
Anche quando ulteriormente suddivisi per la presenza o meno di FR, non è stata osservata nessuna differenza significativa (dati non riportati).

La Tabella III mostra le caratteristiche di laboratorio dei 76 pazienti trattati con anti-TNF $\alpha$  al baseline, dopo 14 e 22 settimane.

Al basale, non abbiamo osservato alcuna differenza tra i pazienti trattati con Anti-TNF $\alpha$  e quelli non trattati (dati non riportati), e anche in questo gruppo i valori medi al basale di C3 e C4 erano significativamente maggiori che nei controlli ( $p < 0,001$ ).

Confrontando le variazioni dei livelli del complemento nel gruppo di pazienti che ricevevano terapia con Anti-TNF $\alpha$ , abbiamo osservato una riduzione statisticamente significativa dei livelli di C3 ( $P_c \leq 0,003$ ) e C4 ( $P_c \leq 0,005$ ) sia alla 14<sup>a</sup> che alla 22<sup>a</sup> settimana, mentre i livelli di CH50 sono rimasti invariati ( $P_c = 0,78$ ). È interessante notare che, confrontando i livelli di C3, C4, CH50 alla 14<sup>a</sup> e 22<sup>a</sup> settimana nel

**Fig. 1.** Confronto dei livelli sierici del complemento tra pazienti positivi e negativi per Anti-CCP al basale nell'intero gruppo di pazienti con AR.



Parte dei dati sono stati comunicati al 7<sup>th</sup> International Autoimmunity Congress, Ljubljana, Slovenia, 5-9 Maggio 2010.

**Tab. III.** Caratteristiche di laboratorio del gruppo di pazienti trattati con anti-TNF $\alpha$  al basale, dopo 14 e 22 settimane.

Caratteristiche di laboratorio (media $\pm$ DS)	Baseline di pz con AR trattati con anti-TNF (n = 76)	Follow-up 14 settimane di pz trattati con anti-TNF (n = 76)	Valore di P <sub>c</sub> *	Follow-up 22 settimane di pz trattati con anti-TNF treated (n = 76)	Valore di P <sub>c</sub> **
VES (0-20 mm/h)	30,3 $\pm$ 22,5	20,7 $\pm$ 16,4	0,001	19,5 $\pm$ 17,1	< 0,0001
PCR (0-5 mg/l)	12,7 $\pm$ 16,7	5,3 $\pm$ 8,1	< 0,0001	5,3 $\pm$ 7,5	< 0,0001
FR (0-40 U/l)	290,6 $\pm$ 663,9	212,2 $\pm$ 457,2	NS	135,7 $\pm$ 256,1	0,04
Anti-CCP (0-20 U/l)	129,5 $\pm$ 208,1	151,0 $\pm$ 214,5	NS	147,9 $\pm$ 217,0	NS
C3	127,6 $\pm$ 27,3	115,7 $\pm$ 22,4	0,003	114,6 $\pm$ 25,2	0,001
C4	29,2 $\pm$ 9,9	25,8 $\pm$ 8,3	0,001	24,8 $\pm$ 8,3	0,005
CH50	134,3 $\pm$ 27,0	134,7 $\pm$ 32,7	NS	138,6 $\pm$ 32,0	NS
DAS28 <sub>VES</sub>	4,8 $\pm$ 1,3	4,0 $\pm$ 1,2	< 0,0001	4,1 $\pm$ 1,4	< 0,0001

\* One-way ANOVA corretto con Bonferroni (pazienti trattati con anti-TNF al baseline vs follow-up a 14 settimane); \*\* One-way ANOVA corretto con Bonferroni (pazienti trattati con anti-TNF al baseline vs follow-up a 22 settimane).

gruppo trattato con Anti-TNF $\alpha$  non ci sono differenze rispetto ai controlli.

I livelli di Anti-CCP non sono cambiati in maniera significativa durante le 22 settimane di terapia. A 22 settimane una riduzione leggermente maggiore dei livelli di Anti-CCP, benché non statisticamente significativa, veniva osservata nei 27 pazienti che avevano iniziato Adalimumab ( $p = 0,07$ ) rispetto a coloro che avevano iniziato Etanercept ( $p = 0,32$ ). Di converso, i livelli di FR hanno mostrato una riduzione statisticamente significativa alla 22<sup>a</sup> settimana di follow-up ( $P_c = 0,04$ , Tab. II), indipendentemente dal tipo di farmaco anti-TNF $\alpha$  assunto.

Suddividendo per Anti-CCP o FR, non è stata osservata alcuna differenza nei livelli medi di C3, C4, CH50 al baseline e la riduzione di C3 e C4 era simile nei vari gruppi (dati non mostrati).

#### COMPLEMENTO, AUTOANTICORPI E ATTIVITÀ DI MALATTIA

L'attività di malattia è significativamente migliorata sia alla 14<sup>a</sup> che alla 22<sup>a</sup> settimana di trattamento con Anti-TNF $\alpha$ , mostrando una media di moderata rispo-

sta EULAR ( $p < 0,0001$ , Tab. II). In particolare, alla 22<sup>a</sup> settimana, il 17,9% dei pazienti ha mostrato una buona risposta, il 35,7% una risposta moderata ed il 46,9% una risposta scarsa o assente. Non abbiamo osservato alcuna differenza statisticamente significativa del FR, degli Anti-CCP, dei valori di C3, C4, CH50, esaminati con il test one-way ANOVA, tra i pazienti che hanno mostrato una migliore risposta (definita come una buona risposta EULAR) e quelli con risposta moderata o assente, sia alla 14<sup>a</sup> sia alla 22<sup>a</sup> settimana (dati non mostrati).

#### ANALISI SEMI-QUANTITATIVA

Abbiamo poi eseguito un'analisi semi-quantitativa trasformando le variabili, come riassunto nella Tabella IV, utilizzando lo Z score di ogni variabile.

Il CH50 al baseline era associato ai livelli di FR ( $\chi^2 = 9,464$ ,  $p = 0,05$ ), con maggior numero di pazienti che mostravano un CH50 al di sotto dei valori normali avendo anche livelli elevati o molto elevati di FR. Non abbiamo riscontrato alcuna associazione tra livelli elevati/normali/ridotti di C3, C4, CH50 e livelli molto elevati/elevati/bassi o assenti di Anti-CCP.

**Tab. IV.** Z scores di ogni variabile.

Variabile	Z score		
FR (0-40 U/l)	< 40 = 0	40-300 = 1	> 300 = 2
Anti-CCP (0-20 U/l)	< 20 = 0	20-300 = 1	> 300 = 2
C3 (referenza = media del gruppo di controllo $\pm$ 2 DS)	< 60 = 0	60-135 = 1	> 135 = 2
C4 (referenza = media del gruppo di controllo $\pm$ 2 DS)	< 6,1 = 0	6,1-39,3 = 1	> 39,3 = 2
CH50 (referenza = media del gruppo di controllo $\pm$ 2 DS)	< 80,3 = 0	80,3-192,4 = 1	> 192,4 = 2
Risposta EULAR	No/Scarsa = 0	Moderata = 1	Buona = 2

## ANALISI DI CORRELAZIONE

Il nostro scopo era di verificare se i cambiamenti nei livelli del complemento avessero una correlazione con i cambiamenti dei livelli di FR o Anti-CCP. Quando abbiamo effettuato il test di Pearson, il CH50 correleva negativamente con il FR sia alla 14<sup>a</sup> che alla 22<sup>a</sup> settimana (coefficiente di Pearson = -0,358,  $p = 0,007$  e coefficiente di Pearson = -0,377,  $p = 0,006$ , rispettivamente). Al contrario, non abbiamo notato alcuna correlazione tra le modificazioni dei livelli di Anti-CCP e le modificazioni dei livelli di C3, C4, CH50. Alla 22<sup>a</sup> settimana di follow-up, la riduzione del C3 e del C4 mostrava una significativa correlazione con la diminuzione della VES ( $p = 0,012$  e  $p = 0,001$ , rispettivamente), ed il C4 anche con la PCR ( $p = 0,023$ ). Nessuna variazione dei livelli del complemento correleva significativamente con i cambiamenti dell'attività di malattia misurati col DAS 28.

## Discussione

Negli ultimi anni un crescente numero di pubblicazioni ha riportato che la ricerca degli anticorpi Anti-CCP mediante test di seconda generazione potrebbe diventare il marcatore di scelta per la diagnosi precoce di AR, vista la sua elevata specificità per la malattia ed una sensibilità paragonabile a quella del più diffuso, ma meno specifico FR. Inoltre, il riscontro di positività per gli anticorpi Anti-CCP si è mostrato in grado di preannunciare il futuro sviluppo di AR, sia in individui asintomatici, sia in pazienti con artrite indifferenziata ed, infine, i livelli anticorpali correlano con la progressione della malattia verso una forma erosiva<sup>2-5</sup>.

Come tutti gli anticorpi, anche gli Anti-CCP possono attivare i meccanismi effettori del sistema immune principalmente attraverso due vie, il legame a recettori cellulari Fc e l'attivazione del sistema complementare. Uno studio recente ha mostrato la capacità degli anticorpi Anti-CCP di attivare i recettori Fc<sup>20</sup>, mentre un lavoro di Trouw et al. ha recentemente dimostrato che gli anticorpi Anti-CCP sono in grado di attivare in vitro il sistema complementare, attraverso la via classica e la via alternativa<sup>12</sup>. Il sistema complementare svolge un ruolo fisiologico complesso (prevenzione della precipitazione degli immunocomplessi o solubilizzazione degli stessi) ma può anche determinare effetti patologici, come avviene nelle patologie da immunocomplessi<sup>21-22</sup>.

È stata riportata la presenza di aumentati livelli di componenti complementari attivate in pazienti con AR<sup>23</sup>. In generale, tali livelli sono molto più elevati nel liquido sinoviale che nel plasma<sup>23</sup>, suggerendo che il passaggio dal cavo articolare alla circolazione generale possa contribuire agli aumentati livelli plasmatici. Tale passaggio spiegherebbe gli alti livelli di

C3b/c e C4b/c nei pazienti con malattia attiva. Il complemento è un potente sistema infiammatorio, perciò la sua attivazione contribuisce alla flogosi locale di articolazioni infiammate. Inoltre, è stato dimostrato che il complemento contribuisce al danno tissutale in modelli animali di artrite<sup>24-25</sup>.

Come è caratteristico di molte malattie, nonostante l'evidenza di un locale consumo del complemento, i suoi livelli sistemici sono normali o elevati come in una qualunque risposta di fase acuta<sup>26</sup>.

Le osservazioni di Trouw et al. suggeriscono che il sistema complementare può essere coinvolto nella patogenesi dell'AR, in tutti i pazienti Anti-CCP positivi. A causa delle numerose variabili presenti, attualmente non è possibile concludere se l'attivazione complementare mediata dagli anticorpi Anti-CCP contribuisca maggiormente al danno tissutale o risulti benefica data la sua capacità di clearance degli immunocomplessi. Nel nostro studio abbiamo esaminato, in vivo, i livelli delle molecole complementari C3 e C4 ed il potenziale attivante il complemento degli anticorpi Anti-CCP, riscontrato nel siero di pazienti affetti da AR, che non avevano risposto a precedenti terapie convenzionali con DMARDs e venivano perciò trattati con altri DMARDs in monoterapia o in combinazione o erano candidati ad una terapia biologica anti-TNF $\alpha$ , al momento dell'arruolamento.

Ne risulta che l'attività complementare è correlata al FR, infatti, al baseline, ridotti livelli di CH50 sono associati con maggiori livelli di FR. Dopo 22 settimane di trattamento con Anti-TNF $\alpha$ , i livelli di CH50 sono incrementati e negativamente correlati con quelli del FR. Inoltre, il numero di pazienti con positività del FR appare significativamente ridotto alla 22<sup>a</sup> settimana di trattamento con Anti-TNF $\alpha$ .

Al contrario, l'attività complementare non appare correlata con gli Anti-CCP, né i livelli di C3, C4 e CH50 associati con la loro presenza (o assenza). Inoltre, dopo la terapia con antagonisti del TNF $\alpha$ , i cambiamenti nei livelli di C3, C4, CH50 non correlano con le variazioni dei livelli di Anti-CCP che sono rimasti stabili durante le 22 settimane di follow-up.

Ai fattori del complemento ed ai recettori viene attribuito un importante ruolo nell'AR sin dal primo lavoro di Brodeur nel 1991<sup>27</sup>, ed è evidente che la sintesi e l'attivazione del complemento avviene in siti diversi della sinovia reumatoide<sup>28-29</sup>. Aggarwal et al. hanno recentemente dimostrato una via alternativa di attivazione con la formazione del complesso di attacco terminale nei pazienti con AR giovanile<sup>30</sup>. Questo ha sottolineato l'evidenza del significato patogenetico della via di attivazione del complemento in AR. Questo dato non è stato confermato dai nostri risultati *in vivo*, che evidenziano che il FR più che gli Anti-CCP possono avere un ruolo nella modulazione complementare.

Tuttavia, non possiamo escludere una simile relazione a livello articolare, relazione che sarebbe peraltro dotata di notevole interesse patogenetico. Infatti, come precedentemente riportato, potrebbe essere utile studiare la capacità degli anticorpi Anti-CCP di attivare la cascata complementare in un sistema specifico, come lo spazio articolare, in cui questa attivazione è mediata principalmente da immunocomplessi presenti in situ. Tuttavia è nota la presenza a livello sinoviale di immunocomplessi FR-IgG, mentre non ci sono dati in letteratura che considerino gli anticorpi Anti-CCP ed il loro legame con peptidi citrullinati (numerosi nello spazio sinoviale), come attivatori locali del complemento. In particolare, per confermare il ruolo patogenetico degli anticorpi Anti-CCP nell'AR, risultano indispensabili ulteriori conoscenze circa la loro presenza nel liquido sinoviale, la loro capacità di produrre danno tissutale ed i loro diversi livelli durante la storia naturale della malattia.

Resta inoltre da chiarire se gli agenti anti-TNF $\alpha$  possano essere o meno responsabili dell'attivazione del complemento *in vivo*. Nella nostra coorte, abbiamo notato livelli relativamente elevati di C3 e C4 al basale,

evidenza di frequente riscontro nel plasma di pazienti con AR. Questo potrebbe spiegare la riduzione dei livelli di C3 e C4 in assenza di frammenti di clivaggio attivanti il complemento da noi osservati dopo il trattamento con antagonisti del TNF $\alpha$ . Per tale ragione dovremmo considerare la riduzione di componenti nativi del complemento come un miglioramento di uno stato infiammatorio preesistente. I farmaci anti-TNF $\alpha$  hanno un potenziale antinfiammatorio che può essere responsabile di parte del loro meccanismo nel controllo della malattia. Sono infatti capaci di ridurre le proteine di fase acuta, così come le componenti complementari, tutti fattori che possiamo considerare mediatori dell'infiammazione coinvolti nella patogenesi dell'AR.

Per concludere, la specifica modulazione e l'inibizione della produzione locale di complemento potrebbe essere un interessante target per la terapia dell'AR ed aggiungere un'ulteriore informazione circa il meccanismo di danno mediato dagli autoanticorpi patogenetici. Riteniamo che questi dati, derivanti da osservazioni *in vivo*, possano contribuire a chiarire ulteriormente il possibile ruolo svolto dal complemento nella patogenesi dell'AR.

## Bibliografia

- 1 Kochi Y, Suzuki A, Yamada R, et al. *Genetics of rheumatoid arthritis: underlying evidence of ethnic differences*. J Autoimmun. 2009 ;32:158-62.
- 2 Smolen JS. *Autoantibodies in rheumatoid arthritis*. In: van Venrooij WJ, Maini RN, ed. *Manual of biological markers of disease*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers 1996.
- 3 Zendman AJW, van Venrooij WJ, Pruijn GJM. *Use and significance of anti-CCP autoantibodies in rheumatoid arthritis*. Rheumatology 2006;45:20-5.
- 4 Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, et al. *Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies*. J Clin Invest 1998;101:273-81.
- 5 Zendman AJW, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. *Use and significance of anti-CCP autoantibodies in rheumatoid arthritis*. Rheumatology 2006;45:20-5.
- 6 van Venrooij WJ, Zendman AJW, Pruijn GJM. *Autoantibodies to citrullinated antigens in (early) rheumatoid arthritis*. Autoimmun Rev 2006;6:37-41.
- 7 Sjoberg AP, Trouw LA, Blom AM. *Complement activation and inhibition: a delicate balance*. Trends Immunol 2009;30:83-90.
- 8 Swaak AJ, van Rooyen A, Planten O, et al. *An analysis of the levels of complement components in the synovial fluid in rheumatic diseases*. Clin Rheumatol 1987;6:350-7.
- 9 Molenaar ET, Voskuyl AE, Familian A, et al. *Complement activation in patients with rheumatoid arthritis mediated in part by C-reactive protein*. Arthritis Rheum 2001;44:997-1002.
- 10 Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, et al. *TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genomewide study*. N Engl J Med 2007;357:1199-209.
- 11 Kurreeman FA, Padyukov L, Marques RB, et al. *A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis*. PLoS Med 2007;4:e278.
- 12 Trouw LA, Haisma EM, Levarht EW, et al. *Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways*. Arthritis Rheum 2009;60:1923-31.
- 13 Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum 1988;31:315-24.
- 14 Franssen J, Creemers MC, van Riel PL. *Remission in rheumatoid arthritis: agreement of the disease activity score (DAS28) with the ARA preliminary remission criteria*. Rheumatology (Oxford) 2004;43:1252-5.
- 15 van Gestel AM, Prevoo ML, van 't Hof MA, et al. *Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism Criteria*. Arthritis Rheum 1996;39:34-40.
- 16 Agostoni A, Aygören-Pürsün E, Binkley KE, et al. *Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond*. J Allergy Clin Immunol 2004;114:S51-131.
- 17 Perricone R, De Carolis C, Giacomello F, et al. *Impaired human ovarian follicular complement function in hereditary angioedema*. Scand J Immunol 2000;51:104-8.
- 18 Watson WC, Cremer MA, Wooley PH, et al. *Assessment of the potential pathogenicity of type II collagen autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis: evidence of restricted IgG3 subclass expression and activation of complement C5 to C5a*. Arthritis Rheum 1986;29:1316-21.

- <sup>19</sup> Steiner G, Smolen J. *Autoantibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance*. *Arthritis Res* 2002;4:S1-5.
- <sup>20</sup> Clavel C, Nogueira L, Laurent L, et al. *Induction of macrophage secretion of tumor necrosis Factor  $\alpha$  through Fc  $\gamma$  receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen*. *Arthritis Rheum* 2008;58:678-88.
- <sup>21</sup> Walport MJ. *Complement. First of two parts*. *N Engl J Med* 2001;344:1058-66.
- <sup>22</sup> Xu W, Berger SP, Trouw LA, et al. *Control of immune complexes by the classical pathway*. *Behring Inst Mitt* 1989;(84):111-20.
- <sup>23</sup> Makinde VA, Senaldi G, Jaward AS, et al. *Reflection of disease activity in rheumatoid arthritis by indices of activation of the classical complement pathway*. *Ann Rheum Dis* 1989;48:302-6.
- <sup>24</sup> Goodfellow RM, Williams AS, Levin JL, et al. *Local therapy with soluble complement receptor 1 (sCR1) suppresses inflammation in mono-articular arthritis*. *Clin Exp Immunol* 1997;110:45-52.
- <sup>25</sup> Wang Y, Rollins SA, Madri JA, et al. *Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:8955-9.
- <sup>26</sup> Holers VM, Thurman JM. *The alternative pathway of complement in disease: opportunities for therapeutic targeting*. *Mol. Immunol* 2004;41:147-52.
- <sup>27</sup> Brodeur JP, Ruddy S, Schwartz LB, et al. *Synovial fluid levels of complement SC5b-9 and fragment Bb are elevated in patients with rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum* 1991;34:1531-7.
- <sup>28</sup> Linton SM, Morgan BP. *Complement activation and inhibition in experimental models of arthritis*. *Mol Immunol* 1999;36:905-14.
- <sup>29</sup> Mollnes TE, Paus A. *Complement activation in synovial fluid and tissue from patients with juvenile rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum* 1986;29:1359-64.
- <sup>30</sup> Aggarwal A, Bhardwaj A, Alam S, et al. *Evidence for activation of the alternate complement pathway in patients with juvenile rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)* 2000;39:189-92.

## **Prestigioso Riconoscimento dell'European Academy of Allergy and Clinical Immunology al Prof. Gianni Marone**

In occasione del Congresso EAACI di Istanbul (11-15 Giugno) il Prof. Gianni Marone, già Presidente della SIAIC, ha ricevuto il prestigioso *Paul Ehrlich Award for Experimental Research*. Questo premio viene attribuito dall'EAACI a ricercatori di fama internazionale che abbiano raggiunto livelli di eccellenza nello studio dei meccanismi fisiopatologici alla base delle patologie allergiche ed immunologiche. Le ricerche condotte dal gruppo diretto dal Prof. Marone all'Università di Napoli Federico II hanno contribuito in maniera determinante ad identificare il ruolo dei mastociti e dei basofili nello sviluppo e nella progressione delle malattie allergiche ed autoimmuni e nel controllo della crescita neoplastica. Il Prof. Marone è il primo ricercatore italiano a ricevere questo importante riconoscimento internazionale che premia la carriera scientifica ed i traguardi raggiunti da uno dei più brillanti studiosi della nostra disciplina.

## **Due Membri del Consiglio Direttivo della SIAIC eletti nell'Executive Committee dell'EAACI**

Il Presidente della SIAIC, Prof. Massimo Triggiani, ed il Rappresentante dei Junior Members, Dr. Enrico Heffler, sono stati eletti nell'Executive Committee dell'EAACI durante il Congresso di Istanbul. Questa elezione rappresenta un significativo riconoscimento delle attività svolte dalla SIAIC nell'ambito dell'Accademia Europea ed offre una importante opportunità per rafforzare il ruolo dell'Allergologia e Immunologia Clinica italiana in ambito internazionale.

## Libreria

### Book Review

S.J. Bourke, G.P. Burns *Lecture Notes: Respiratory Medicine, 8<sup>th</sup> Edition*. Wiley-Blackwell, 2011. ISBN: 978-0-470-65442-2

Providing a detailed overview of respiratory medicine in one short volume, *Respiratory Medicine Lecture Notes* covers everything from the basics of anatomy and physiology through to information on a full range of respiratory diseases.

Whether approaching the topic for the first time, starting a rotation, or looking for a quick-reference summary, medical students, specialist nurses, technicians and doctors in training will find this book an invaluable source of theoretical and clinical information.

K. Izuhara, S.T. Holgate, M. Wills-Karp, eds. *Inflammation and Allergy Drug Design*. Wiley-Blackwell, 2011. ISBN: 978-1-4443-3014-4

Our knowledge and understanding of allergic diseases of the respiratory tract has improved to a point where new therapies are being developed for patient benefit.

*Inflammation and Allergy Drug Design* explains the biologic science that underpins the pathophysiology of asthma and related disorders, as well as their mechanisms. This authoritative guide consists of 25 chapters, each detailing the cutting-edge developments in a particular field. It is divided into three parts, covering cytokines, chemokines, growth factors and mediators.

This book allows immunologists, allergologists and researchers in the pharmaceutical industry to learn and appreciate the target biology in drug development. It also provides medical and pharmaceutical postgraduate students and clinicians with a basic understanding of allergic diseases in the respiratory tract.

R. Khanna. *Immunology (Oxford Higher Education)*. Oxford University Press 2011. ISBN: 978-0-1980-6826-6

The early chapters of the book provide a broad overview of the immune system and its functioning. The subse-

quent chapters present the importance of discriminating self from non-self through pattern recognition receptors (PRRs), structure and function of antibodies, major histocompatibility complex, antigen receptors of the adaptive immune system, cellular interactions that lead to activation of T and B lymphocytes, immune responses against various categories of pathogens, and manipulation of the immune system by vaccination and various vaccine strategies. The book also includes clinically significant areas and hypersensitivity states including allergy, immunodeficiency disorders, transplantation and tumor immunology. There is also a special emphasis on the HIV/AIDS pandemic against which efforts are on at a massive scale. Tolerance and autoimmunity have also been linked for a better understanding of the mechanisms that could lead to autoimmune diseases.

An additional feature of the book is the inclusion of various techniques, immunoassays, and experimental systems provided in the appendix. ELISA and other immunological techniques like agglutination and precipitation having wide ranging applications have also been included in the book.

M.A. Williams. *Allergens and Respiratory Pollutants: The Role of Innate Immunity*. Biohealthcare Publishing (Oxford) Limited, 2011. ISBN: 978-1-9075-6854-1

This book is a collection of 12 authoritative papers that draws upon the collective expertise of world leaders in the fields of innate immunity, immunotoxicology and pulmonary biology. The book critically explores the biological and immunological mechanisms that contribute to immune dysfunction on exposure to allergens and the susceptibility to infectious disease on exposure to ambient pollutants. The clinical relevance of exposure to ambient airborne xenobiotics is critically discussed and collectively, this book provides an educational forum that links the health effects of environmental exposures, immune dysfunction and inflammatory airways disease.