

La diagnostica molecolare in allergologia

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



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

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

I temi trattati comprenderanno:

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

Abstract

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

Introduzione all'allergologia molecolare

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

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

Centro di Allergologia Molecolare, IDHRCCS, Roma

c.alessandri@idi.it

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

Fonte allergenica

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

Allergeni

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

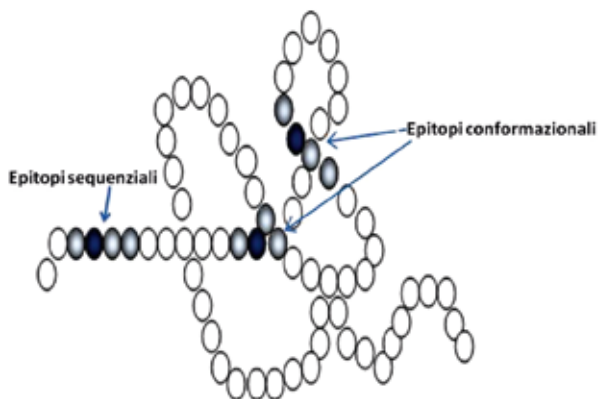


Fig. 1. Epitopi conformazionali e sequenziali.

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

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

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

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

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

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

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

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

Estratti allergenici

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

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

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

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

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

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

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

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

Allergeni molecolari

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

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

Nomenclatura e classificazione degli allergeni molecolari

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

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

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

Si usano i termini di:

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

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

Il microarray per la determinazione delle IgE

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

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

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

Per evidenziare il legame antigene-anticorpo tra le IgE

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

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

segue

continua Tab. I

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

segue

continua Tab. 1

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

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

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

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

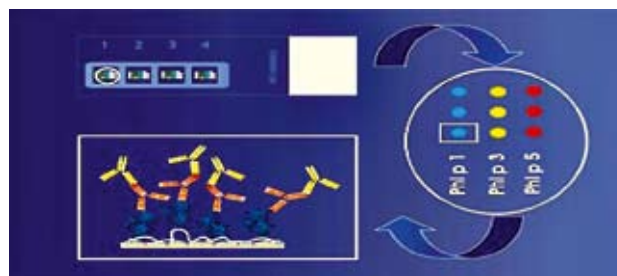


Fig 2b. Reazione antigene anticorpo.

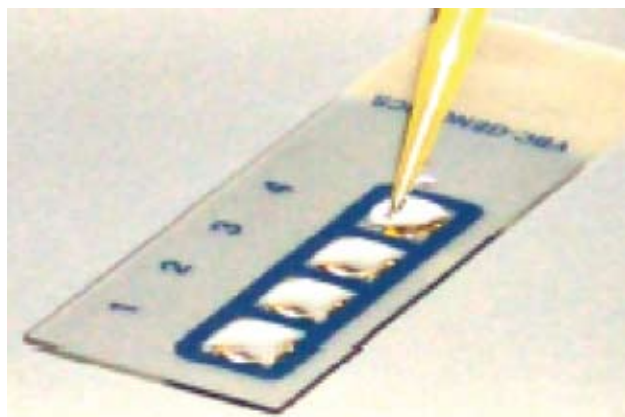


Fig. 2a. Distribuzione del siero sul vetrino.



Fig 2c. Misurazione della fluorescenza.

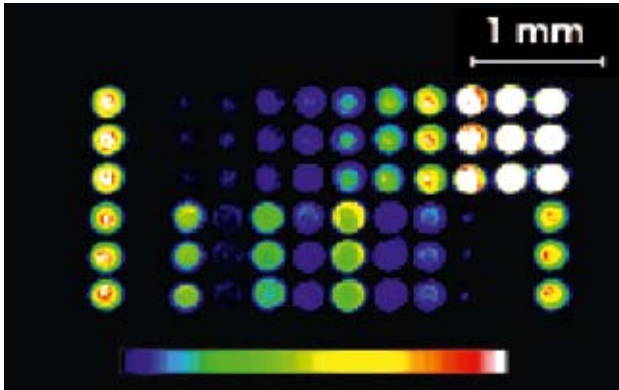


Figura 2d. Immagine test ISAC.

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

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

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

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

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

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

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

In conclusione di questa prima parte possiamo affermare che:

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

Bibliografia

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

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