

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

Dipartimento di Biomedicina Clinica e Molecolare

Dottorato di Ricerca in Malattie dell'Apparato Respiratorio

XXIV ciclo

Coordinatore: Prof. C. Vancheri

---

**Dott.ssa Stefania Sichili**

*ALLERGIA ALIMENTARE E ASMA BRONCHIALE*

---

**Tesi di Dottorato**

---

**Relatore:**

**Ch.mo Prof. Nunzio Crimi**

---

Anno Accademico 2011/2012



# INDICE

<b>Capitolo 1 - INTRODUZIONE</b>	<b>4</b>
1.1 Definizione	5
1.2 Epidemiologia	7
1.3 Patogenesi	13
1.4 Gli alimenti	18
1.5 I quadri clinici	19
- Anafilassi	20
- L' anafilassi associata a sforzo fisico	21
- La sindrome orale allergica	21
- I quadri clinici dell' allergia alimentare non IgE- mediata	23
1.6 La storia naturale	24
1.7 La diagnosi	27
-diagnostica molecolare	30
<b>Capitolo 2 - STUDIO CLINICO</b>	<b>37</b>
<b>Capitolo 3 - DISEGNO DELLO STUDIO</b>	<b>39</b>
3.1 Caratteristiche dei pazienti	40
3.2 Prick test	41
3.3 Dosaggio IgE specifiche RAST	43
3.4 Spirometria	47
<b>Capitolo 4 - RISULTATI</b>	<b>49</b>
<b>Capitolo 5 - CONCLUSIONI</b>	<b>53</b>
<b>Capitolo 6 - BIBLIOGRAFIA</b>	<b>56</b>

# **Capitolo 1**

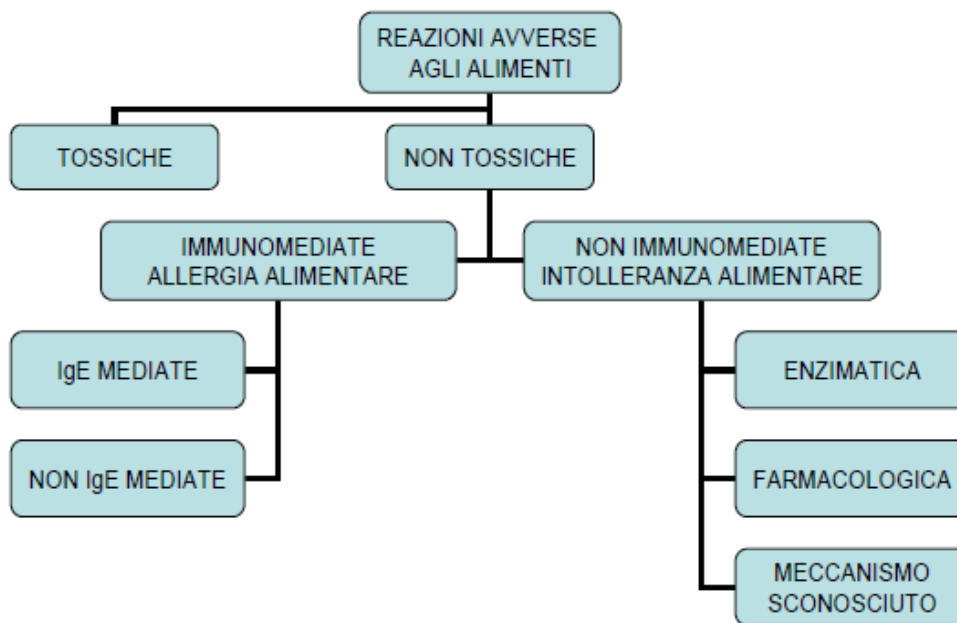
## ***INTRODUZIONE***

## 1.1 DEFINIZIONE

Il Sottocomitato Europeo per le Reazioni Avverse agli Alimenti dell'Accademia Europea di Allergologia e Immunologia Clinica ha proposto una classificazione delle reazioni avverse agli alimenti basata solo sui meccanismi patogenetici (Tabella 1.1). La prima distinzione fondamentale viene fatta tra le reazioni tossiche e non tossiche. Le reazioni tossiche sono dovute a ingestione di alimenti tossici o contaminati. Le reazioni non tossiche invece dipendono dalla suscettibilità individuale verso certi alimenti e vengono suddivise in reazioni immunomediate (allergia alimentare) e reazioni non immunomediate (intolleranza alimentare).

L'allergia alimentare è quindi caratterizzata da una risposta immunologica anomala ed esagerata verso specifiche proteine alimentari e può comprendere reazioni IgE mediate e non IgE mediate.

Le reazioni agli alimenti non indotte da meccanismi immunologici vengono classificate come intolleranza alimentare e i meccanismi in grado di provocarla possono essere di natura enzimatica, di tipo farmacologico o rimanere sconosciuti (idiosincrasici).<sup>1</sup>



**Tabella 1.1**

*Classificazione delle reazioni avverse agli alimenti.*

Oltre all'allergia e all'intolleranza alimentare bisogna ricordare che esiste un altro tipo di reazione agli alimenti che è la così detta pseudo allergia alimentare. Questa è caratterizzata da reazioni avverse agli alimenti che non avvengono su base immunologica ma riproducono la tipica sintomatologia dell'allergia alimentare. È tipicamente indotta da cibi ad alto contenuto o liberatori di istamina e sostanze simil-istaminiche come i formaggi. Queste reazioni "biologiche" sono molto frequenti e vengono spesso confuse con le allergie alimentari IgE mediate.

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA

La pubblica percezione dell'importanza delle reazioni allergiche agli alimenti, eccede la prevalenza di queste reazioni identificata con gli studi clinici. Gli studi eseguiti sia nei bambini che negli adulti indicano che mediamente il 25% della popolazione crede di soffrire di allergia alimentare, mentre la prevalenza reale è in realtà molto minore.<sup>2</sup>

Negli studi epidemiologici sotto citati viene testata la sensibilità dei soggetti verso i vari allergeni alimentari con varie metodiche. Infatti la sensibilizzazione di un soggetto nei confronti di un allergene alimentare si può studiare con parametri sia clinici (sintomi dopo l'assunzione dell'alimento, cioè durante l'esecuzione del test di scatenamento) sia laboratoristici (positività del prick test, misurazione delle IgE specifiche per l'alimento). È il fatto che vengono usati parametri diversi per misurare la sensibilità verso gli alimenti fa sì, che l'incidenza e la prevalenza dell'allergia varino in certi casi anche in maniera sostanziale da studio a studio.

Due studi europei hanno stimato la prevalenza dell'allergia alimentare nella popolazione generale adulta. Uno è stato svolto da Jansen e collaboratori e l'altro da Young e collaboratori. I due studi hanno evidenziato che la prevalenza si situa tra 1% e il 2% (Grafico 1.1).<sup>3,4</sup>

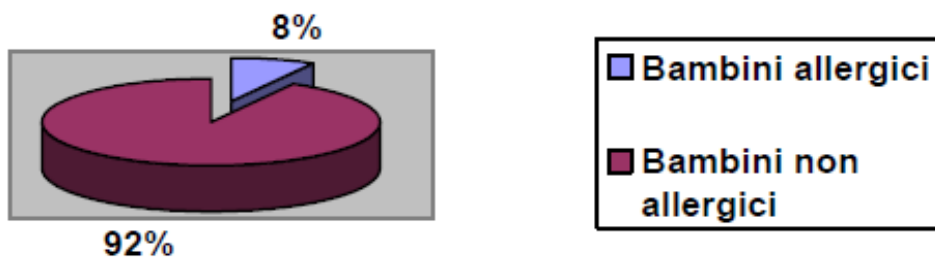
### Prevalenza dell'allergia alimentare nella popolazione adulta



*Grafico 1.1*

La prevalenza dell'allergia alimentare nel bambino è stata studiata da Bock, in 480 soggetti pediatrici seguiti dalla nascita fino al terzo anno di età. I risultati hanno mostrato, che secondo i genitori il 43% dei bambini avrebbe avuto reazioni allergiche agli alimenti, ma il test di scatenamento orale confermava un'allergia alimentare solo nell'8% dei casi (Grafico 1.2).<sup>5</sup>

### Incidenza dell'allergia alimentare nei bambini da 0 a 3 anni

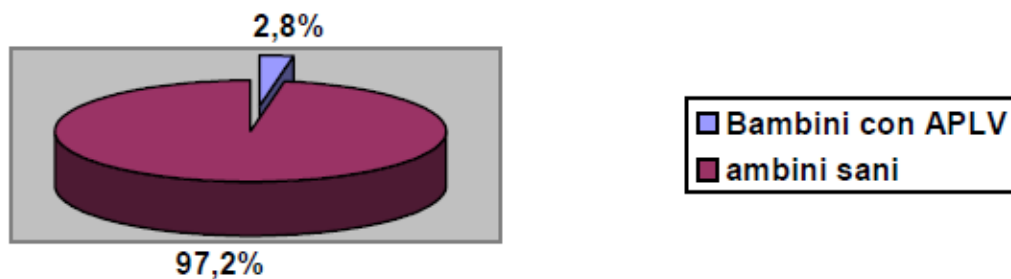


*Grafico 1.2*



Uno studio tedesco con coorti prospettiche dalla nascita ha invece individuato l'incidenza della sensibilizzazione agli allergeni alimentari dalla nascita fino al sesto anno di età, tramite il dosaggio delle IgE nel primo, secondo, terzo, quarto, quinto e sesto anno di vita. Nei risultati si è visto che il tasso annuo di sensibilizzazione agli allergeni alimentari decresce dal 10% nel primo anno di vita al 3% nel sesto anno di età.<sup>6</sup>

### Prevalenza dell'APLV nei bambini



*Grafico 1.3*

Soffermandosi in particolare sull'allergia alle proteine del latte vaccino, Schrender e collaboratori hanno studiato la prevalenza clinica dell'allergia al latte vaccino su 1368 bambini, che risultava del 2.8% (Grafico 1.3).<sup>7</sup>

Host e Halcken hanno eseguito invece uno studio prospettico per definire la storia naturale di allergia al latte vaccino, hanno quindi studiato 1759 bambini nel primo anno di vita. La prevalenza in questo studio è risultata pari a 2.2%.

Infatti il 56% dei bambini allergici guarisce entro l'anno di vita, il 67% entro l'anno e mezzo, il 77% a due anni e il 87% a tre anni.<sup>8</sup>

Allergia alimentare e l'asma bronchiale spesso coesistono nello stesso paziente, infatti circa un terzo dei bambini che ha allergia alimentare presenta anche asma e il 4-8 % di bambini con asma ha allergia alimentare. A partire dal 1960 nei Paesi occidentali è stato notato un aumento nella prevalenza sia dell'asma che delle allergie.

Devenny e all. hanno mostrato un aumento della prevalenza dei bambini asmatici da meno del 5% nel 1964 al 25% circa nel 1999, grazie all'ausilio di questionari compilati dai genitori, nel Regno Unito.

L'incidenza dell'asma in USA è cresciuta da 2.5 casi su 1000 abitanti a 6 su 1000 tra il 1980 e il 1996. E' comunque importante notare, che recenti indagini hanno mostrato una stabilizzazione della prevalenza dell'asma in Paesi sviluppati come Belgio, Gran Bretagna, Singapore, Hong Kong e Svizzera.

Secondo una stima della National Health Interview Survey in USA tra il 2001 e il 2003 circa 20 milioni di persone hanno avuto una diagnosi di asma, di questi circa 6,2 milioni erano ragazzi con meno di 18 anni.

È anche evidente che la prevalenza dell'allergia alimentare è aumentata negli ultimi 10-15 anni. Studi effettuati in USA e UK hanno mostrato un raddoppiamento nel numero di bambini allergici agli arachidi, con più dell'1% di bambini affetti.

La prevalenza delle allergie alimentari IgE mediate in USA varia tra il 2-5%. È maggiore nella popolazione pediatrica che in quella adulta, con una stima del 6-8% nei bambini sotto i 5 anni e del 2-4% negli adulti; inoltre è stata osservata più spesso in individui con dermatite atopica.<sup>9</sup>

In USA è stata stimata una prevalenza di allergia alimentare del 2,5% così distribuita: arachidi 1,3 %, latte 0,4%, uova 0,2%, gamberi 1%.<sup>10</sup>

In Europa la prevalenza dell'allergia alimentare negli adulti sarebbe del 2-4%.<sup>11</sup>

Secondo uno studio condotto a Chicago l'allergia alimentare è associata ad asma sia nei bambini di età superiore a sei anni che in quelli di età inferiore.

I bambini con multiple o gravi allergie alimentari, presentano un'associazione più importante con l'asma bronchiale, sviluppandola più precocemente rispetto ai bambini senza allergia alimentare. Non è stata osservata associazione tra sensibilizzazione alimentare asintomatica ed asma.<sup>12</sup>

La prevalenza dell'allergia alimentare è stata stimata con difficoltà nel corso del tempo. Una recente meta-analisi di 51 studi ha mostrato che la prevalenza dell'allergia alimentare riferita a latte di mucca, uova, arachidi, pesce e molluschi varia tra il 3% e il 35%. Tuttavia se prendiamo in considerazione i dati di sei studi che valutano la sensibilizzazione allergica tramite l'uso del test di provocazione orale, la prevalenza dell'allergia alimentare era tra l'1% e il 10,8%. I più comuni allergeni alimentari nei bambini sono latte (2,5%), uova (1,3%), arachidi (0,8%), grano (0,4%), soia (0,4%), frutta a guscio (0,2%), pesce (0,1%) e molluschi (0,1%).<sup>13</sup>

Il primo studio italiano che ha cercato di valutare le frequenza e le caratteristiche delle allergie alimentari nella popolazione è quello condotto da Asero e coll.

Considerando che la prevalenza di malattie allergiche è di circa il 20% nella popolazione generale italiana (simile ad altri paesi sviluppati) solo il 2% degli adulti italiani (corrispondente a circa il 10% dei individui atopici) sono suscettibili di avere qualche allergia alimentare; tale dato è in linea con le stime attuali di allergia alimentare nel 2-4% degli adulti europei.

Asero, inoltre, osserva una prevalenza maggiore nelle donne rispetto agli uomini di allergia alimentare; dato che conferma analoghe osservazioni effettuate in altri studi.

La maggior parte dei pazienti con allergia alimentare presenta anche sensibilizzazione ai pollini, ciò suggerisce una possibile correlazione fra allergeni alimentari ed aereoallergeni, in particolare modo in quelle aree in cui i pollini giocano un ruolo importante tale da poter influenzare l'insorgenza di allergia alimentare. <sup>11</sup>

Lo stile di vita occidentale potrebbe essere legato all'aumento dello sviluppo di atopia, ma non vi sono studi a dimostrazione di ciò. Questi fattori includono:

-Maggiore esposizione agli acari della polvere, dovuta al fatto che le persone passano più tempo in casa e che le moderne abitazioni hanno condizioni più favorevoli alla crescita degli acari. <sup>14</sup>

-L' "ipotesi igienica" suggerisce che la riduzione della dimensione della famiglia, migliori i servizi della casa e i più alti standard di pulizia personale hanno ridotto le possibilità di infezioni crociate nelle giovani famiglie. D' altro canto, la riduzione dell' esposizione a microorganismi è ritenuta responsabile dell' aumento della suscettibilità alle malattie allergiche attraverso lo sviluppo di alterazioni del sistema immunitario. <sup>9</sup>

-Studi epidemiologici hanno mostrato un collegamento tra obesità e sviluppo e severità dell' asma. <sup>15</sup>

-È stato ipotizzato che anche la riduzione dell' assunzione di antiossidanti e l' aumento del consumo di grassi nella dieta occidentale possano svolgere un ruolo nello sviluppo delle malattie allergiche, ma i risultati degli studi non hanno dimostrato il legame fra allergia, asma e dieta. <sup>16</sup>

-È stato evidenziato che i bambini cresciuti in fattoria hanno una ridotta prevalenza di malattie allergiche. Uno studio suggerisce che il consumo di latte non pastorizzato da parte di questi bambini possa contribuire alla riduzione della sensibilizzazione allergica. <sup>17</sup>

### 1.3 PATOGENESI

L'intestino è l'organo immunologico maggiore del corpo umano. Considerando l'estensione della superficie della mucosa, la varietà e la quantità di alimenti, virus, batteri e altri materiali estranei a cui il tratto gastrointestinale e il tessuto linfoide associato (GALT) sono esposti, è sorprendente che solo una modesta, benché misurabile parte della popolazione, soffra di allergia alimentare.

La principale funzione del tratto gastroenterico è quella di ridurre i cibi ingeriti ad elementi semplici, che possano essere assorbiti ed utilizzati per la produzione di energia e crescita cellulare. Per impedire che antigeni estranei e non processati passino la barriera gastrointestinale e provochino un'immunizzazione indiscriminata si sono sviluppati nell'intestino particolari meccanismi di protezione di tipo immunologico e non immunologico.<sup>18</sup>

Questi meccanismi di protezione si identificano con la barriera mucosale intestinale, che è formata dal rivestimento mucoso dell'intestino, perciò da fattori aspecifici (non immunologici) dell'ospite come: la motilità intestinale, la secrezione del muco, la presenza di acidi gastrici, gli enzimi duodenopancreatici, e da fattori specifici (immunologici) dell'ospite rappresentati dalla produzione di IgA secretorie e dall'interazione dell'antigene con il GALT.<sup>19,20</sup>

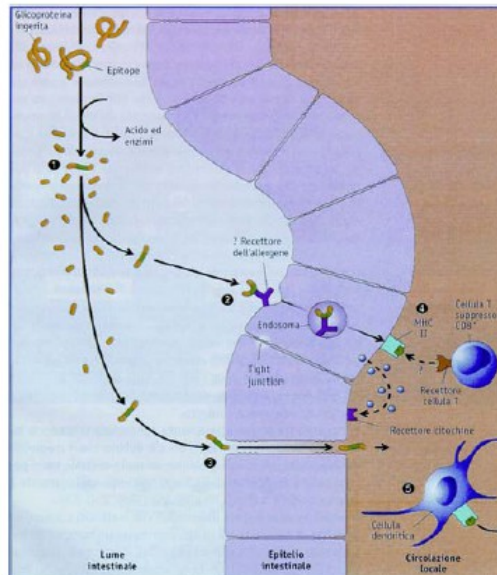
Dall'interazione dell'epitelio dell'intestino denominata tolleranza orale. La tolleranza orale è il processo fondamentale con il quale l'intestino mantiene un'omeostasi immunologica a livello locale e sistemico.

Viene definita come un'iporesponsività immunologica specifica, che fa seguito a un precedente esposizione mucosale dell'antigene.

La soppressione della risposta immunologica specifica include la soppressione dell'immunità IgE e cellulo-mediata, ma non previene la produzione di anticorpi IgG anti alimenti.<sup>21,22</sup>

Il meccanismo di come si verifica questa iporesponsività specifica non è ancora stato ben chiarito, ma studi recenti hanno ipotizzato che, siano gli enterociti ad avere un ruolo chiave, catturando gli antigeni solubili e attivando selettivamente le cellule sopressorie CD8+. Sembra invece che gli antigeni particolati e i microrganismi siano riconosciuti dalle cellule M che portano ad un'immunità attiva e produzione di IgA. Una rottura anche temporanea di

questi meccanismi protettivi può portare a perdita della tolleranza e alla sensibilizzazione ad alimenti.<sup>20</sup> È stato ipotizzato che gli enterociti regolano la rapidità e il tipo di assorbimento degli antigeni ingeriti (Figura 1.1).



**Figura 1.1**

*Assorbimento e presentazione dell'antigene a livello intestinale.*

*1= Frammenti immunologici attivi.*

*2= Recettori specifici per l'antigene.*

*3= Allontanamento delle tight junctions da parte di mediatori.*

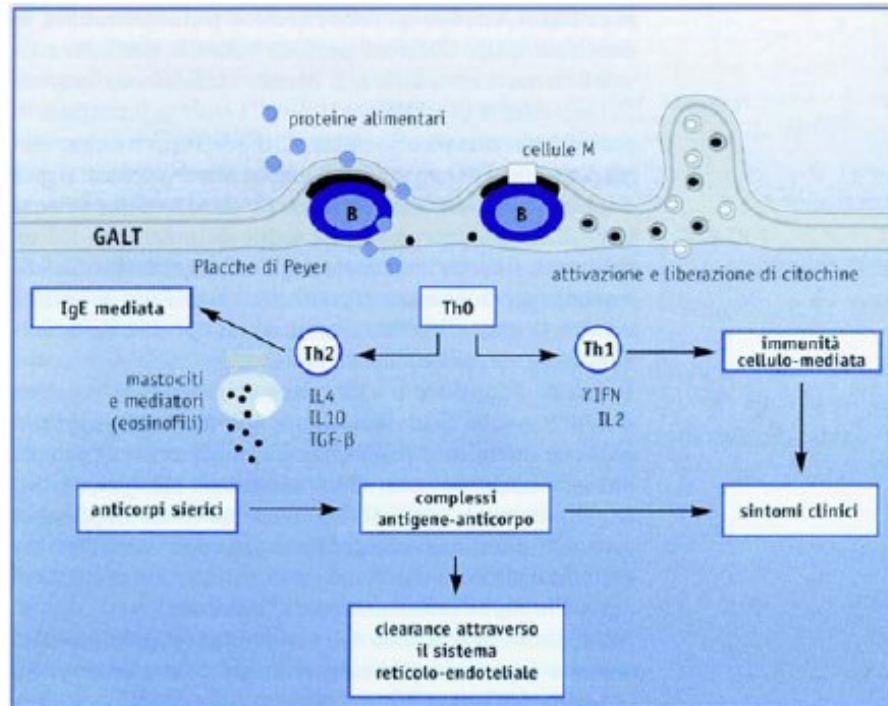
*4= Enterociti in grado di riconoscere e processare l'antigene.*

*5= Cellule dendritiche specializzate al trasporto dell'antigene al GALT.*

L'assorbimento dell'antigene sembra composto da due fasi, durante le quali negli esperimenti condotti in laboratorio l'animale sensibilizzato presenta un assorbimento maggiore. Nella prima fase il trasporto, che è antigene specifico, avviene tramite gli endosomi. L'assorbimento tramite gli enterociti sembra dipendere da un recettore specifico, simile ad un'immunoglobulina. Durante la prima fase vengono liberati dei mediatori che innescano la seconda fase caratterizzata dall'allargamento delle tight junction tra le cellule epiteliali, così si crea un flusso più generalizzato dell'allergene. In questa fase predomina il trasporto mastocita dipendente, che è paracellulare, e non antigene specifico.

Questi studi indicherebbero che nelle reazioni IgE mediate l'assorbimento intestinale sarebbe aumentato, e fanno pensare che ci sia una via specifica di trasporto che coinvolge gli anticorpi e una via aspecifica che coinvolge le citochine. Entrambe le vie a quanto sembra possono accelerare il trasporto dell'antigene attraverso l'epitelio.<sup>23,24</sup>

Per quanto sia ancora poco conosciuta la reazione allergica a livello intestinale è indubbio che sotto l'effetto delle condizioni patologiche la risposta immune cellulomediata gioca il ruolo maggiore nel provocare danno mucosale. Questa risposta cellulomediata può portare a modifiche locali per rilascio di citochine particolari e attivazione preferenziale dei linfociti Th2 (secercono: IL4, IL5, IL10 e IL13) che favoriscono la produzione di IgE e provocano un circuito di amplificazione infiammatoria (attrazione di eosinofili e altri tipi di cellule) che porta ad alterazione della morfologia e funzione della mucosa (Figura 1.2).



**Figura 1.2**

*Ipotesi patogenetica dell'allergia alimentare.*

Fenomeni secondari come l'aumento della permeabilità intestinale e l'aumento della formazione di complessi immuno-circolanti possono accompagnare sintomi clinici che possono manifestarsi in qualsiasi parte dell'organismo.<sup>19, 25, 26</sup>

In pazienti allergici alle arachidi è stato possibile dimostrare la presenza di linfociti Th2 alimento specifici.<sup>27</sup> Questo perciò conferma che a livello intestinale nei soggetti atopici con allergia alimentare si forma per la presenza di mastociti, eosinofili e linfociti il pattern citochinico di tipo Th2. Sembra così evidente che anche la patogenesi dell'allergia alimentare può essere spiegata tramite l'ipotesi Th2 dell'allergia.<sup>19, 25, 26</sup>



La maggiore frequenza dell'allergia alimentare nel bambino piccolo potrebbe essere giustificata dall'immaturità sia immunologica sia strutturale del tratto gastrointestinale che nei bambini geneticamente predisposti dopo l'ingestione dell'antigene può portare ad una risposta immunologica anomala. La maturazione del sistema immune e della barriera intestinale spiegherebbe pure la frequente acquisizione della tolleranza nei primi anni di vita.<sup>2</sup>

## 1.4 GLI ALIMENTI

Tutti i cibi contengono potenziali allergeni, che possono indurre una sensibilizzazione all'alimento e manifestazioni cliniche di ogni grado di severità. In realtà solo alcuni alimenti ricorrono frequentemente come causa di allergia alimentare. Gli alimenti implicati variano da luogo a luogo a seconda delle abitudini alimentari dei vari paesi. Gli alimenti che più frequentemente inducono l'allergia sono: il latte vaccino, le uova, il pesce, la verdura e la frutta fresca, soia, frumento e nei paesi Anglosassoni anche le arachidi e le noccioline.<sup>28</sup>

<b>ALIMENTO</b>	<b>CROSS-REATTIVITÀ</b>	<b>PERCENTUALE</b>
UOVA	POLLAME	< 5%
LATTE VACCINO	MANZO / VITELLO	10%
LATTE VACCINO	LATTE DI CAPRA	90%
MANZO / VITELLO	AGNELLO	50%
PESCE	ALTRI TIPI DI PESCE	50%
ARACHIDI	LEGUMI	10%
SOIA	LEGUMI	5%
FRUMMENTO	CEREALI	25%
ARACHIDI	NOCCIOLONE	35%
NOCCIOLINE	ALTRI TIPI DI NOCI	>50%

**Tabella 1.2**

*La cross-reattività tra alimenti*

Esiste pure una cross-reattività tra alimenti appartenenti alla stessa famiglia biologica o animale, che può mostrarsi con una reattività clinica a diversi alimenti della stessa famiglia (Tabella 1.2).<sup>29, 30</sup>

## 1.5 I QUADRI CLINICI

L'ipersensibilità agli alimenti IgE mediata è caratterizzata da un'enorme varietà di quadri clinici che si manifestano in un tempo variabile da alcuni minuti a poche ore dopo l'ingestione del cibo offendentente. I sintomi possono coinvolgere qualsiasi organo. Le reazioni possono manifestarsi a carico dell'orofaringe, del tratto gastrointestinale, dell'apparato respiratorio e della cute.

**Le manifestazioni a carico dell'orofaringe** sono: prurito e formicolio alle labbra, palato, lingua o gola; gonfiore delle labbra e della gola; sensazione di ristrettezza (spasmo) in gola, raucedine, disfonia e/o tosse secca.

**Le manifestazioni a carico del tratto gastrointestinale** sono: nausea, vomito, crampi addominali, coliche e diarrea.

**Le manifestazioni a carico del naso e degli occhi** possono provocare prurito, lacrimazione e congestione nasale associata alla rinocongiuntivite.

**Le manifestazioni a carico del polmone** è caratterizzato da broncospasmo, dispnea e respiro corto.

**Le manifestazioni a carico della cute** sono: l'orticaria, l'angioedema e la dermatite atopica (Tabella 1.3).<sup>31, 32, 33</sup>

<b>REAZIONI CUTANEE</b>	ORTICARIA/ANGIOEDEMA DERMATITE ATOPICA
<b>REAZIONI RESPIRATORIE</b>	RINOCONGUNTIVITE ASMA
<b>REAZIONI GASTROINTESTINALI</b>	SINDROME ORALE ALLERGICA ANAFILASSI INTESTINALE

*Tabella 1.3*

*Quadri clinici dell'allergia alimentare IgE mediata.*

## **L'anafilassi**

L'anafilassi è la più temibile conseguenza dell'allergia alimentare e può essere scatenata anche da quantità minime di alimento. L'anafilassi è definita come una reazione sistemica che produce difficoltà respiratorie (asma, edema laringeo) e ipotensione ed è dovuta ad un rapido rilascio in circolo di mediatori da parte di mastociti tissutali e basofili circolanti. Insorge a distanza di secondi o minuti dal contatto con l'allergene causale, le reazioni anafilattiche tardive (dopo un'ora) sono eccezionali e sono caratterizzate da un decorso più benigno, infatti la reazione è tanto meno grave quanto maggiore è l'intervallo di tempo che intercorre tra esposizione e reazione. I sintomi iniziali sono caratterizzati da eritema, prurito localizzato a mani, piedi inguine e cavo ascellare e il soggetto ha la sensazione di un evento grave e imminente. Le manifestazioni cutanee poi si trasformano in orticaria e angioedema e non spariscono prima di 24 ore. Le reazioni respiratorie tipiche sono caratterizzate da edema laringeo che si manifesta inizialmente con raucedine, dispnea, sensazione di nodo alla gola e quindi con stridore laringeo, tosse, gemiti espiratori, broncospasmo con conseguente dispnea e cianosi. Le alterazioni respiratorie possono aggravarsi fino all'asfissia. Le manifestazioni gastrointestinali sono caratterizzate da vomito crampi addominali e diarrea.

Nei casi più gravi si può avere una sintomatologia a carico dell'apparato cardiocircolatorio con dolore retrosternale che può essere seguito da sincope per ipotensione e collasso vascolare.

Altri sintomi, che si possono verificare nel corso di anafilassi, comprendono prurito al palato, agli occhi e al naso, starnuti, sudorazione, disorientamento, perdita del controllo dei sfinteri.

In alcuni soggetti la reazione può avere un andamento bifasico con comparsa dopo un intervallo libero di 4-8 ore di una seconda ondata di sintomi.

Nell'allergia alimentare l'anafilassi si manifesta caratteristicamente con edema delle labbra, del volto e del laringe e con sintomi gastrointestinali.<sup>34</sup>

La terapia dell'anafilassi deve essere eseguita il più rapidamente possibile dal momento che l'intervento precoce si associa ad una prognosi nettamente migliore, sebbene la morte del paziente sia ancora possibile anche in casi di intervento terapeutico tempestivo.

### **L'anafilassi associata a sforzo fisico**

Esiste inoltre un'anafilassi che deriva dall'associazione tra sforzo fisico e allergia alimentare. Per il verificarsi dell'anafilassi entrambi gli stimoli sono strettamente necessari, infatti insorge se successivamente all'assunzione dell'alimento viene praticato dello sforzo fisico.<sup>35, 36, 37</sup>

### **La sindrome orale allergica**

Vengono dette sindrome orale allergica le manifestazioni che interessano prevalentemente il cavo orale e insorgono dopo il contatto del cibo allergizzante con la cavità orale. Di solito i sintomi (prurito e pizzicore orofaringei, papule e vescicole della mucosa e edema labiale) si risolvono rapidamente, ma in certi casi la sindrome orale allergica evolve in sintomi sistemici. L'allergia a qualsiasi alimento può manifestarsi con la sindrome orale allergica, ma generalmente tale sindrome insorge in pazienti allergici alla frutta e alla verdura fresca, che tipicamente sono anche pazienti pollinosici.<sup>38, 39</sup>

Negli ultimi anni è stata segnalata una cross-reattività tra alimenti vegetali e pollini (Tabella 1.4). Sono stati eseguiti vari studi che hanno appurato la presenza di epitopi comuni nei pollini e negli alimenti vegetali. Due dei più importanti epitopi responsabili della cross-reattività inalanti-alimenti sono stati recentemente purificati e clonati, sono l'allergene maggiore della betulla (Bet v1) e la profilina (Bet v2). La profilina è presente in vari pollini e alimenti vegetali (come sedano, patata, pomodori, carote, pesche, pere, noci) e nel 50% dei pollinosici con accertata ipersensibilità ai vegetali sono state riscontrate IgE specifiche per la profilina.<sup>40, 41, 42</sup>

<b>GRAMINACEE</b>	FRUMENTO, MELONE, ANGURIA, POMODORO, ARANCIA, KIWI, PESCA, ALBICOCCA, CILIEGIA, PRUGNA
<b>URTICACEE</b>	GELSO, BASILICO, PISELLI
<b>COMPOSITE</b>	SEDANO, MELONE, ANGURIA, MELA, BANANA, ZUCCA, CAMOMILLA
<b>BETTULACEE</b>	MELA, PERA, ALBICOCCA, CILIEGIA, BANANA, NOCE, NOCCIOLA, CAROTA, FINOCCHIO, SEDANO, PATATA

**Tabella 1.4**

*Cross-reattività frequentemente riscontrata tra pollini ed alimenti vegetali.*

## **I quadri clinici dell'allergia alimentare non IgE mediata**

L'ipersensibilità ad alimenti non IgE mediata si manifesta tipicamente con sintomi a livello del tratto gastroenterico, i quadri clinici sono: l'enterocolite, la proctocolite, l'enteropatia allergica, la gastroenterite allergica eosinofila, il reflusso gastro-esofageo.<sup>43</sup>

## 1.6 LA STORIA NATURALE

La storia naturale dell'allergia alimentare è caratterizzata da una spiccata tendenza alla guarigione in tempi variabili qualunque sia il momento della sensibilizzazione. Si è visto che la prevalenza dell'ipersensibilità agli alimenti è maggiore nel primo anno di vita, uno studio prospettico ha infatti dimostrato che l'80% dei sintomi confermati si manifestano nel primo anno.<sup>5</sup> I bambini di solito acquisiscono la tolleranza entro pochi anni nella maggior parte dei casi tranne che per le arachidi, noccioline e pesce.<sup>44</sup>

In uno studio prospettico sull'allergia alle proteine del latte vaccino, condotto su bambini fino ai tre anni di età, si è visto che il 56% dei bambini guarisce entro l'anno, il 77% entro i due anni e il 87% entro i tre anni.

Questo studio ha anche rilevato che il 92% dei bambini, che soffre di allergia alle proteine del latte vaccino, presenta almeno due sintomi, mentre il 72% ha sintomi localizzati in due o più organi differenti contemporaneamente. Il 49% ha all'anamnesi una storia familiare di atopia e nel 23% dei casi la familiarità atopica riguarda entrambi i genitori.<sup>8</sup>

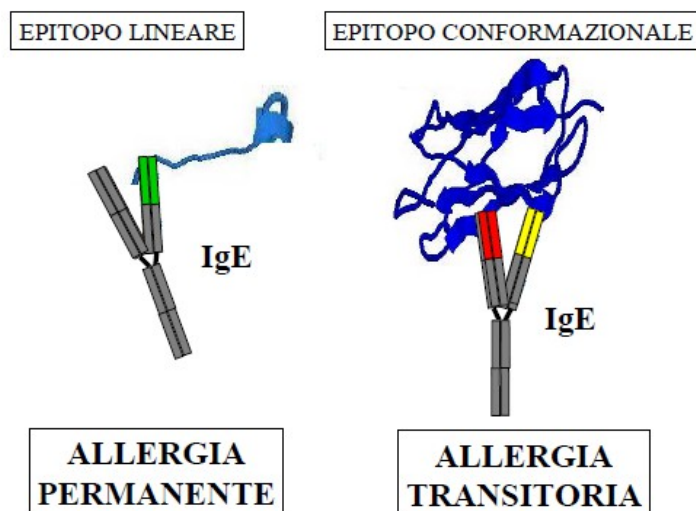
Tutti i bambini con prick test negativo a un anno di età sono diventati tolleranti al latte vaccino entro i tre anni, mentre il 25% dei soggetti con prick test positivo all'anno presentava ancora allergia al terzo anno. E il 35% dei bambini con IgE specifiche per le proteine del latte vaccino a un anno ha sviluppato altre allergie alimentari entro i dieci anni.<sup>45</sup>

Come si è visto dai dati esposti i bambini con allergia alle proteine del latte vaccino non IgE mediata hanno una buona prognosi infatti tutti guariscono entro i tre anni di vita, mentre quelli con allergia IgE mediata hanno un aumentato rischio, sia che l'ipersensibilità persista, sia che sviluppino un'altra allergia alimentare.



Studiando la persistenza della reattività clinica nell'allergia alle proteine del latte vaccino sembra che la caseina giochi un ruolo molto importante. Le IgE specifiche per la caseina sono prevalenti nei bambini più grandi e negli adulti.

È stato pure rilevato che i bambini, nei quali persiste l'allergia, presentano livelli più elevati di IgE specifiche per la caseina rispetto ai più piccoli.<sup>46</sup> È stato inoltre ipotizzato che la persistenza di allergia alle proteine del latte vaccino sia correlata, come per l'allergia all'uovo<sup>47</sup>, allo sviluppo di IgE verso epitopi lineari mentre epitopi conformazionali sarebbero in causa nella forma transitoria (Figura 1.3).



*Figura 1.3*

*Rappresentazione grafica dei epitopi delle IgE*

Uno studio recente ha in effetti determinato gli epitopi per le IgE sulla  $\alpha 1s$  caseina. Due epitopi lineari sono stati riconosciuti solo dai pazienti con allergia persistente.

Il riconoscimento di questi epitopi non era correlato all'età potendo essere dimostrata in tali pazienti sia all'esordio sia dopo anni di malattia. Lo screening per le IgE specifiche per tali epitopi potrebbe essere utile per identificare fin dall'esordio i pazienti che non supereranno la loro allergia.<sup>48</sup> Anche se i bambini più piccoli divengono più facilmente tolleranti verso l'alimento allergizzante,<sup>49, 50</sup> sembra evidente che anche bambini più grandi ed adulti possono superare l'allergia alimentare.<sup>51, 52, 53</sup>

## 1.7 LA DIAGNOSI

La diagnosi di allergia alimentare è a tutt'oggi essenzialmente clinica. È basata sugli elementi anamnestici, sull'età di insorgenza soprattutto per quel che riguarda l'allergia alle proteine del latte vaccino che tipicamente insorge nel lattante e nel bambino molto piccolo. Anche la clinica può orientare verso la diagnosi anche se le manifestazioni dell'allergia sono estremamente varie.

Comunque la diagnosi di allergia alimentare si deve basare soprattutto su di un'attenta analisi causa \ effetto tra l'assunzione dell'alimento sospetto e i sintomi del paziente. Tramite una accurata anamnesi si cerca di individuare l'alimento e questo è successivamente eliminato dalla dieta per un dato periodo durante il quale se il paziente è veramente affetto da allergia alimentare i sintomi scompaiono.<sup>54</sup> La conferma diagnostica può venire comunque solo dai successivi test di scatenamento, che possono essere eseguiti o in aperto, o in singolo cieco con cibo fresco, o in doppio cieco contro placebo con materiale liofilizzato. Il test di scatenamento consiste nella somministrazione per os a dosi crescenti dell'alimento sospetto fresco, oppure in capsule contenenti proteine alimentari industrialmente preparate ed è perciò in grado di definire il nesso casuale tra l'ingestione dell'alimento e la reazione clinica del paziente.<sup>55, 56</sup>

Infatti se il paziente è affetto da allergia alimentare l'assunzione dell'alimento gli provoca la comparsa dei sintomi per i quali è giunto all'osservazione del medico.

Il test di scatenamento va eseguito in ambiente protetto e deve essere interrotto immediatamente se compaiono reazioni gravi (anafilassi) e non deve mai essere eseguito come conferma diagnostica nei bambini con storia di reazioni anafilattiche.

In questi casi c'è l'indicazione di eseguire il test di scatenamento dopo un congruo periodo di dieta di eliminazione per verificare se c'è stata acquisizione della tolleranza (test di uscita).<sup>57</sup> Se l'eziologia alimentare dell'allergia è certa (l'alimento è stato identificato ed eliminato dalla dieta con la conseguente risoluzione dei sintomi) non sembra ragionevole, anche nei soggetti che non presentano reazioni gravi, eseguire in tempi ravvicinati il test di scatenamento per la conferma diagnostica, ma conviene posticiparlo ad un'età in cui vi è elevata probabilità che la tolleranza sia stata raggiunta.<sup>58</sup>

In questo contesto clinico svolgono un loro ruolo anche i test di provocazione cutanea e i vari test di laboratorio soprattutto nel fornire delle orientazioni indicative al clinico.<sup>54, 59</sup>

Per riconoscere le reazioni IgE mediate sono molto utili i test cutanei eseguiti con la metodica del prick usando estratti alimentari standardizzati. Gli estratti vegetali e la frutta vanno testati con la metodica del prick by prick (usando piccole quantità di alimento fresco). Un altro test utile per individuare le reazioni IgE mediate è la ricerca di anticorpi alimento specifici in vitro (RAST).<sup>57</sup>

Però sia il prick che il RAST hanno un difetto di specificità e di sensibilità. La sensibilità e l'accuratezza del valore predittivo negativo sono abbastanza buoni, mentre la specificità e il valore predittivo positivo sono molto più scarsi.

Negli ultimi anni sono stati eseguiti vari studi che hanno esaminato il valore dei prick test e dei RAST nel predire le reazioni avverse ai test di scatenamento.

Questi studi sono stati condotti nei soggetti che avevano già ricevuto diagnosi di allergia alimentare.<sup>60, 61, 62, 63</sup> Sampson in uno studio del 1997 ha accertato che in soggetti con l'allergia da uovo, latte vaccino, arachidi e

pesce i livelli diagnostici di IgE possono predire la reattività clinica al test di scatenamento con accuratezza maggiore del 95%.<sup>60</sup> Lo stesso è stato visto per i test cutanei da Sporik, il quale ha collegato il diametro della reazione cutanea dopo l'esecuzione del prick test con la positività al test di scatenamento. È risultato che la specificità aumentava con l'aumentare del diametro della reazione e raggiunge il 100% per diametri di 8mm per il latte vaccino e le arachidi e 7mm per l'uovo.<sup>61</sup>

Per quello che concerne anticorpi anti-alimenti non IgE, ovvero anticorpi di classe IgG e IgA, va ricordato che la presenza nel siero di IgG contro alimenti è un fenomeno fisiologico, anche se un certo gruppo di individui allergici alle proteine del latte vaccino presenta titoli anticorpali più alti. Nel complesso comunque questi test hanno un limitato valore diagnostico.<sup>54</sup> Un altro esame orientativo nella diagnosi è la conta degli eosinofili, infatti un valore di eosinofili superiore a 800-1000/mm<sup>3</sup> in assenza di parassitosi è orientativo per una condizione di allergia alimentare. La conta degli eosinofili è un esame anche molto utile e molto pratico per valutare (in tempi più brevi che con la risposta clinica) l'effetto della dieta di eliminazione e l'andamento di un test di scatenamento.<sup>64</sup>

I test che esplorano le alterazioni mucosali e in particolare i test di permeabilità intestinale agli zuccheri sono utili soprattutto nei bambini con enteropatia allergica alle proteine del latte vaccino in fase attiva. Infatti la permeabilità intestinale risulta alterata con diminuito assorbimento di piccole molecole come lo xilosio.

Il test allo xilosio è utilizzato anche per rendere più sensibile il test di scatenamento, se infatti il test si positivizza durante il test di scatenamento abbiamo un'evidenza significativa dell'effetto lesivo dell'alimento.<sup>55</sup>

## **Diagnostica molecolare**

L'attuale metodica di dosaggio delle IgE specifiche si basa sulla utilizzazione di estratti naturali allergenici o dell'alimento intero che ovviamente variano notevolmente in composizione e allergenicità. Questo potrebbe essere uno dei motivi della non adeguata affidabilità diagnostica dei test finora applicati.

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<sup>65,66</sup>.

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"<sup>67</sup>.

### *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 ( $\mu\text{g/ml}$ ) le concentrazioni delle proteine allergeniche maggiori, ma non le minori che potrebbero essere addirittura assenti<sup>68</sup>. 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)<sup>69</sup>, Pru p 3<sup>70</sup>. 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 proteine<sup>71</sup>.

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 IgE<sup>72</sup>, non sono esenti da rischi di anafilassi<sup>73,74</sup>, 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 loro.<sup>75</sup> 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<sup>76,77</sup>. 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)<sup>78</sup>.

Si possono ottenere risultati falsamente positivi o negativi in presenza di <sup>67,77</sup>: alti livelli di IgE totali (> 2000 UI/l), legami monovalenti delle IgE [es. per presenza di determinanti cross reattivi dei carboidrati (CCD)] <sup>79</sup>, supplementazione di allergeni ricombinanti all'estratto <sup>80</sup>, basso livello di IgE specifiche in rapporto alle IgE totali <sup>77</sup>, produzione locale di IgE specifiche e loro assenza in circolo <sup>77</sup>, scarsa presenza dell'allergene nell'estratto <sup>77</sup>.

### *Allergeni molecolari*

Negli ultimi anni sono stati caratterizzati a livello molecolare 1785 allergeni (<http://www.allergome.org>). 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 allergenica <sup>81,82</sup>. 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 e 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 e 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 genere, 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)<sup>83</sup>.

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).

### *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 genomica <sup>84</sup>. 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 migliaia <sup>85</sup>.

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 molecole 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. 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 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. La fluorescenza è successivamente misurata da uno scanner dotato di sorgente d'eccitazione laser. 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.

Per eseguire il test sono necessarie circa cinque ore. I risultati sono elaborati sotto forma di classi ISAC (assente-basso-medio-alto) e unita 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 ( $r = 0,72-0,99$ )<sup>86-88</sup> o come in alcuni casi ISAC possa vantare maggiore sensibilità e specificità<sup>89-91</sup>, possedendo il più alto valore predittivo negativo rispetto a qualsiasi altro test impiegato nella diagnostica allergologica<sup>67</sup>.

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 specifico<sup>92</sup>. 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 rilevanti.<sup>93</sup> 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”<sup>94,95</sup> consentono invece di allestire array di proteine sempre più completi, atti a mimare tutte le fonti allergeniche a cui

l'organismo umano e 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 recentemente.<sup>96</sup> 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:

- a) le molecole rappresentano l'evoluzione della diagnostica allergologica;
- b) il microarray è un comodo, veloce ed economico strumento diagnostico;
- c) 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;

d) la diagnostica allergologica molecolare richiede idonee conoscenze da parte dell'allergologo pediatra, per essere applicata alla clinica.

## **Capitolo 2**

# ***STUDIO CLINICO***

L'allergia Alimentare rappresenta una delle cause di Asma bronchiale spesso sottovalutata e poco considerata al momento della diagnosi in quanto rappresenta una piccola percentuale dei fenotipi dell'asma allergico.<sup>11</sup>

Lo scopo dello mio studio è di valutare la prevalenza di asma bronchiale secondaria ad allergia alimentare e le loro caratteristiche, nei pazienti afferenti al ambulatorio di Allergologia dell'Ospedale Policlinico di Catania dal mese di gennaio a dicembre 2011.

## **Capitolo 3**

# ***DISEGNO DELLO STUDIO***



### 3.1 CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI

Per questo studio sono stati considerati i pazienti afferenti al nostro ambulatorio di Allergologia dell'Ospedale Policlinico di Catania con diagnosi di asma bronchiale da allergia alimentare nell'anno 2011.

Dal mese di Gennaio al mese di Dicembre 2011 sono giunti presso il nostro ambulatorio 4544 pazienti per sospetta patologia di natura allergica.

I pazienti affetti da asma bronchiale erano 1233 rappresentando quindi solo il 27 % delle utenze. Il restante 73% dei pazienti avevano effettuato una visita allergologica perché lamentavano orticaria acuta o cronica, dermatite allergica o irritativa da contatto, intolleranza al lattosio, rinite allergica ecc. Considerando il gruppo di pazienti affetti da asma bronchiale solo il 6% (75 pazienti su 1233) presentava asma da allergia alimentare all'anamnesi.

La situazione clinica è stata confermata dal *prick test*, esame che consiste nell'applicare una goccia di estratto allergenico sulla cute dell'avambraccio facendola penetrare negli strati superficiali della pelle tramite la punta di una minuscola lancetta sterile, e dalla misura delle IgE sieriche specifiche (RAST, Radio-Allergo-Sorbent Test) e dallo studio spirometrico per stabilire il grado dell'asma.

## 3.2 PRICK TEST

È un test in vivo che valuta la presenza di anticorpi IgE-specifici fissati su cellule basofile e mastociti e consiste nell'introduzione di un allergene opportunamente diluito per via percutanea. Viene quindi utilizzato per la diagnosi eziologica delle reazioni immunologiche di tipo immediato e per l'inquadramento di soggetti atopici.

Gli allergeni si applicano sulla superficie volare degli avambracci (8-9 allergeni per braccio). Tale sede viene sgrassata con una garza imbevuta di disinfettante. Si marcano con un pennarello dermatografico i punti accanto ai quali verranno poste le gocce di allergene. Si applica una goccia di allergene, si esercita una pressione moderata (non deve esserci sanguinamento) per almeno un secondo con la lancetta in posizione verticale. Oltre gli allergeni si testano il controllo negativo (soluzione fisiologica) e positivo (istamina) per dare validità al test.

Si effettua la lettura a 15-20 minuti dall'applicazione ma prima le gocce vanno asciugate avendo l'accortezza di non utilizzare la stessa garza per più allergeni.

Una reazione positiva è caratterizzata dalla comparsa dopo pochi minuti (5-20) di un pomfo pruriginoso nella sede di introduzione dell'allergene. Per valutare l'intensità della risposta si fa un confronto tra il diametro medio del pomfo istaminico (significativo se il diametro è di almeno 3 mm). Anche nel caso dei prick test esistono una serie di condizioni, elencate in tabella 2, che possono indurre risposte falsamente negative o positive.

FALSE POSITIVITA'	FALSE NEGATIVITA'
Iperreattività dermografica	Iporeattività cutanea
Orticaria dermografica	Età pediatrica
Estratto molto concentrato	Antistaminici
Inquinanti e irritanti nell'estratto	Precedenti reazioni fortemente positive (refrattarietà cutanea per 24-48h)
Sostanze istamino-liberatrici nell'estratto	Concentrazione dell'allergene
Vicinanza a test fortemente positivi	Ittiosi, eczema atopico

Tabella 1. Condizioni che possono indurre false negatività e false positività durante l'esecuzione dei prick test.

Gli allergeni che sono stati testati erano pollini stagionali (graminacee, parietaria, olivo, betulla, cipresso) e perenni (acari della polvere, miceti, derivati epidermici di cane, gatto, coniglio) e allergeni alimentari (frutta, verdura, cereali e derivati, proteine di origine animale, carne e latte).

### **3.3 DOSAGGIO DELLE IgE SPECIFICHE PER ALLERGENI ( RAST)**

Il primo test realizzato per il dosaggio delle IgE allergene-specifiche fu il Radio-Allergo-Sorbent Test o RAST che prevede che l'allergene sia legato ad una fase solida che viene incubata con il siero/plasma in esame. Gli anticorpi IgE presenti nel campione e specifici per quell'allergene si legano all'allergene insolubilizzato ed il grado di reazione viene quindi misurato mediante l'aggiunta di un anticorpo anti-IgE umane radiomarcato. Sono stati in seguito evoluti test simili che evitano l'uso di reagenti radioattivi; fra questi uno dei più utilizzati è l'UniCap Specific IgE che prevede l'uso di una strumentazione dedicata.

Possono essere usati campioni di plasma e di siero (EDTA o eparina) venoso o capillare. I campioni possono essere tenuti a 2-8°C se la determinazione viene eseguita entro una settimana dal prelievo, oppure a -20 °C se usati più tardi.

Come già detto, l'allergene verso cui si vogliono misurare le IgE specifiche è legato covalentemente all'ImmunoCAP, una fase solida porosa di piccole dimensione ma di grande superficie. Questo viene fatto reagire con le IgE specifiche presenti nel campione in esame (40 µl) e per confronto con dei campioni standard (0,35 – 0,70 – 3,50 – 17,50 – 50,0 e 100 kUA/l). Dopo 30' di incubazione, si procede a lavaggi che rimuovono le proteine non legate dalla fase solida. Vengono quindi aggiunti anticorpi monoclonali anti-IgE coniugati con l'enzima per formare un complesso. Dopo una seconda incubazione (1 ora), gli anticorpi marcati non legati sono eliminati mediante lavaggio e il complesso legato viene incubato con un substrato di sviluppo. Dopo l'arresto della reazione, viene misurata la fluorescenza del

campione. Più alta è la risposta, più IgE specifiche saranno presenti nel campione in esame. Per la valutazione dei risultati, le risposte dei campioni sono trasformate in concentrazioni con l'uso della curva di calibrazione (Fig. 1). I valori sono espressi in kUA/l, in cui la lettera A indica “anticorpi specifici per allergene”. Valori inferiori a 0,35 kUA/l indicano assenza di anticorpi specifici per gli allergeni oppure livelli non rilevabili. Valori maggiori di 0,35 kUA/l rappresentano un progressivo aumento della concentrazione relativa di anticorpi specifici per gli allergeni testati.

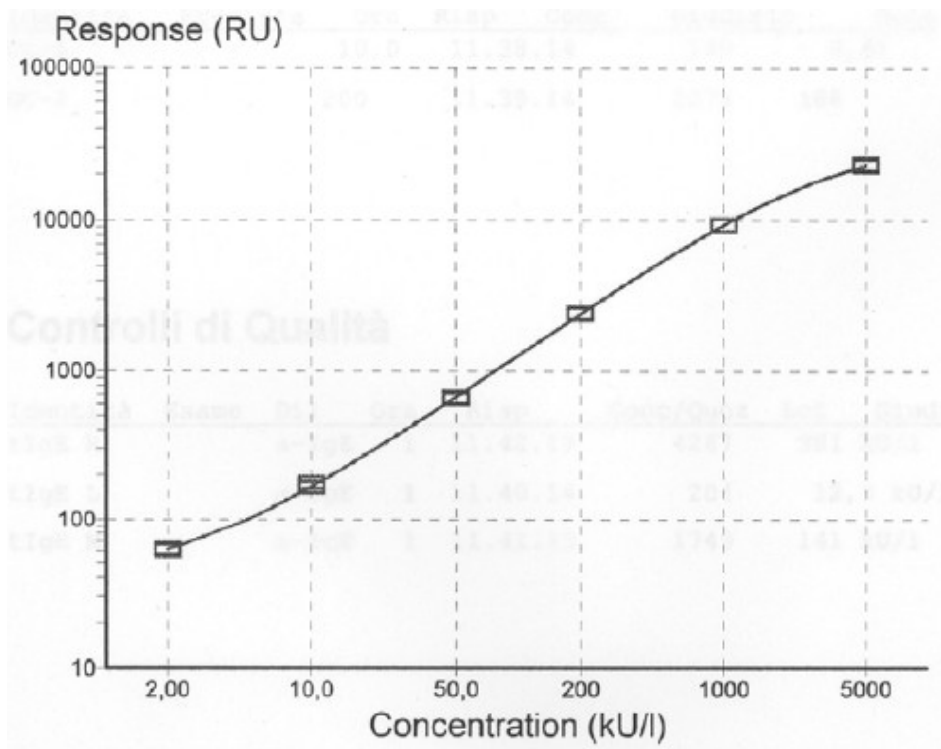


FIG.1

Gli allergeni verso cui si possono misurare le IgE specifiche sono molti ed appartengono a diverse categorie: pollini stagionali e perenni, alimenti, veleno di imenotteri e farmaci.

Nelle allergie alimentari, è possibile che gli anticorpi IgE specifici circolanti non siano rilevabili nonostante un'anamnesi chiara. Questi anticorpi possono essere diretti contro allergeni che vengono evidenziati od alterati durante i processi di preparazione industriale, di cottura o di digestione, e che pertanto non sono presenti nell'alimento allo stato naturale per il quale viene eseguito il test. Un risultato positivo ( $>0,35$  kU/l) per IgE specifiche per la penicillina indica la presenza di anticorpi IgE specifici contro il Penicilloyl, il maggiore determinante antigenico presente nel farmaco. Un risultato negativo ( $< 0,35$  kU/l) indica assenza di anticorpi IgE specifici contro il farmaco. Tali risultati si riscontrano nei soggetti non sensibilizzati. Tuttavia una risposta negativa può risultare anche in pazienti ipersensibili al farmaco, ad es. quando: a) i sintomi non sono mediati dalle IgE, b) il campione di sangue è stato prelevato dopo un periodo di tempo troppo lungo dall'ultima reazione allergica causata dalla somministrazione del farmaco (calo progressivo delle IgE), c) Il campione di sangue è stato prelevato molto presto dopo la reazione allergica. In alcuni casi è stato osservato un periodo di latenza tra la reazione allergica e la comparsa nel siero di anticorpi IgE specifici a livelli misurabili. Il test di rilevazione delle IgE specifiche, specie per allergeni alimentari, può essere disturbato dalla presenza nel campione di anticorpi di classe IgG (che competono per l'allergene, ma non vengono rilevati) o da autoanticorpi IgG che legano il complesso IgE-allergene. In tabella 1 sono riportati i valori di riferimento che ci permettono di stabilire la positività o negatività del test.

Valori di riferimento per le IgE specifiche (KU/L)

CLASSE 0	< 0.34	non rilevabili
CLASSE I	0.35 - 0.69	molto basse
CLASSE II	0.70 - 3.49	basse
CLASSE III	3.50 - 17.4	moderate
CLASSE IV	17.5 - 52.4	alte
CLASSE V	52.5 - 99.9	altissime
CLASSE VI	> 100	abnormi

Tabella 2. Valori di riferimento per le IgE sieriche specifiche (KU/L) e relative classi.

### 3.4 SPIROMETRIA

La spirometria rappresenta il test strumentale meglio standardizzato, esso rappresenta il gold standard per la diagnosi e l'inquadramento della Asma bronchiale. In presenza di un'anamnesi compatibile, la conferma diagnostica di asma è essenzialmente funzionale e si basa sull'obiettivazione dell'ostruzione bronchiale reversibile. La spirometria consente la valutazione quantitativa dei volumi polmonari e quindi permette di determinare il livello di gravità dell'ostruzione bronchiale e il grado di reversibilità della stessa, attraverso la misura della risposta all'uso di farmaci broncodilatatori. I parametri da valutare nella prova spirometria sono: il volume espiratorio massimo al primo secondo (FEV1), la capacità vitale forzata (FVC) o massima quantità d'aria che può essere inspirata a partire dalla condizione di massimo svuotamento e il rapporto FEV1/FVC (indice di Tiffenau). Le misure vanno eseguite prima e dopo l'inalazione di broncodilatatore a breve durata d'azione. L'ostruzione bronchiale sarà indicata da:  $FEV1 < 80\%$  del teorico e  $FEV1/FVC < 70\%$ . L'ostruzione sarà considerata reversibile se il FEV1 aumenta di almeno il 12% dopo inalazione di un  $\beta_2$  agonista a breve durata d'azione. L'episodicità e quindi la variabilità della patologia asmatica impone però che l'inquadramento funzionale comprenda anche il monitoraggio delle variazioni del grado di ostruzione bronchiale: per questo si procede alla misura periodica del picco di flusso espiratorio, PEF. Tale misura è piuttosto semplice e va ripetuta in diversi momenti della giornata. Come ulteriore procedura diagnostica, viene eseguito il test di provocazione bronchiale; esso ha il compito di valutare l'iperreattività bronchiale ovvero la capacità delle vie aeree di reagire con una riduzione di calibro se vengono esposte a stimoli fisici oppure chimici.



Il test consiste nella misura del FEV1 prima e dopo somministrazione di dosi crescenti di stimoli broncocostrittori (generalmente metacolina). Tanto minore è la dose dello stimolo broncocostrittore in grado di causare la riduzione del FEV1 del 20%, tanto maggiore sarà il grado di iperreattività bronchiale.

## **Capitolo 4**

### ***RISULTATI***

Sono stati arruolati nello studio i 75 pazienti affetti da asma bronchiale secondaria ad allergia alimentare i quali rappresentano il 6% dei pazienti del nostro ambulatorio osservate tra gennaio e dicembre 2011 (tabella 3).

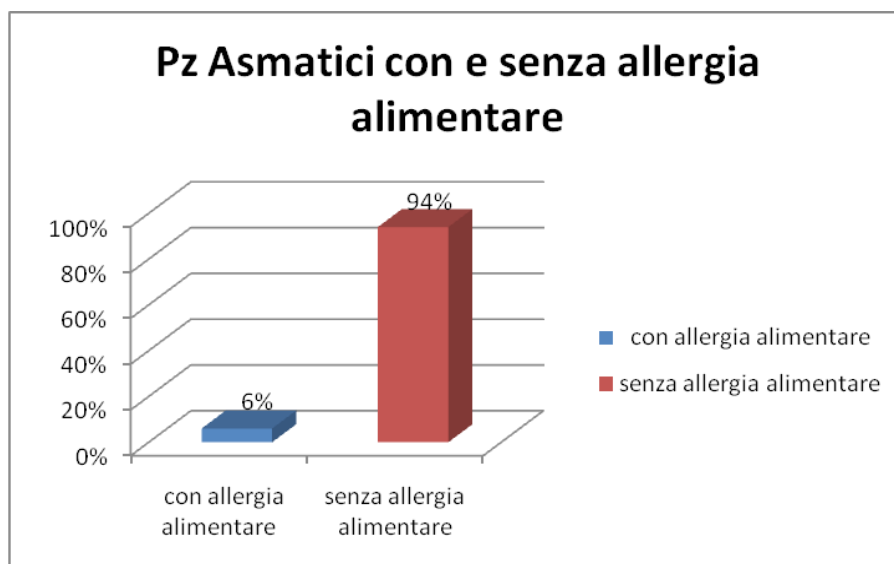


Tabella 3. Distribuzione dei pazienti affetti per asma bronchiale da allergia alimentare o da altre cause.

Avevano un'età compresa tra i 5 ed i 65 anni, con una prevalenza per il sesso femminile (50 contro 25 maschi). Sono state prese in considerazione 5 fasce d'età: da 0-6 anni; 7-18 anni; 19-35 anni; 36-50 anni e > 50 anni. Dalla tabella 4 si evince che l'età compresa fra i 36-50 anni è la più rappresentativa in conformità alle utenze del nostro ambulatorio che si occupa prevalentemente di adulti.

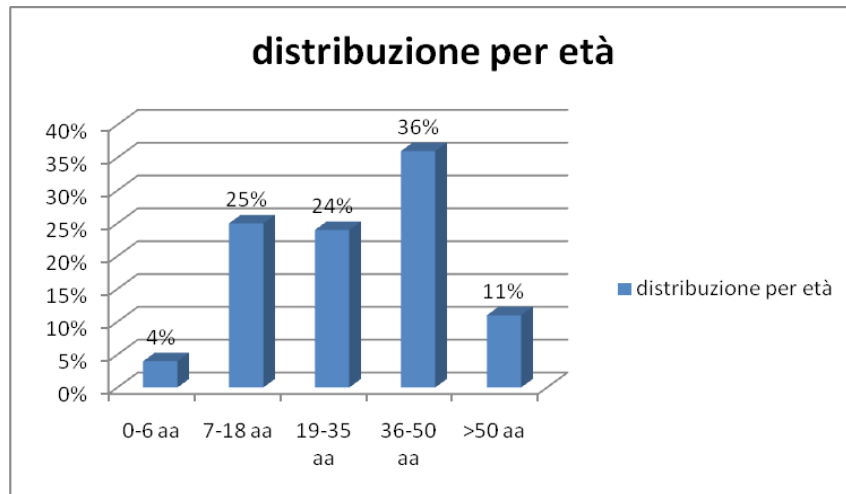


Tabella 4. Distribuzione dei pazienti in studio per fasce d'età

Il gruppo arruolato presentava all'anamnesi oltre l'asma conseguente all'ingestione di alimenti rinite o orticaria allergica. Nel 43% dei casi vi era associata una rinite allergica nel 8% dei casi orticaria allergica mentre nel 15% dei casi le due comorbilità coesistevano. (Vedi tabella 5)

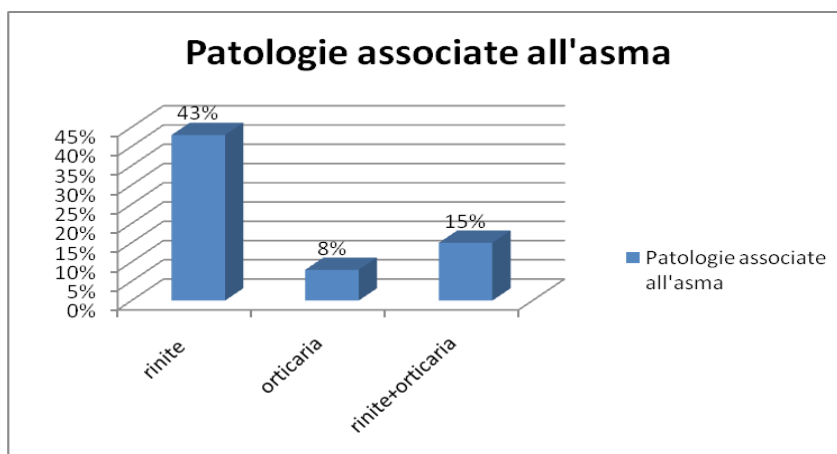


Tabella 5. Patologie riscontrate in anamnesi associate all'asma bronchiale.

Nel gruppo arruolato l'anamnesi di asma da alimenti è stata confermata con i test diagnostici allergologici a nostra disposizione: il prick test ed il dosaggio delle IgE specifiche sieriche.

In particolar modo in tabella 6 è stata riportata la distribuzione degli allergeni alimentari causa di asma nei pazienti arruolati nel nostro istituto. Ed è possibile notare che il grano è l'allergene più rappresentativo proprio perché il target d'età dei nostri pazienti appartiene ad una fascia adulta in accordo con ciò che è evidente in letteratura.<sup>11</sup>

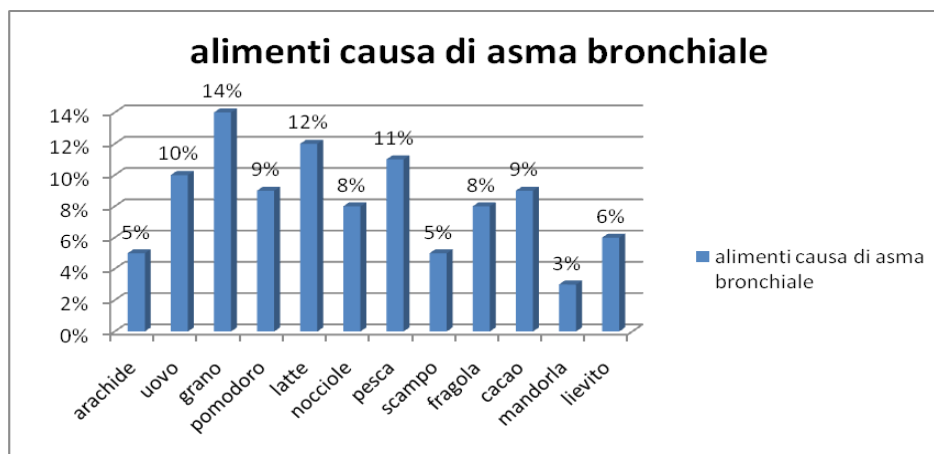


Tabella 6. Distribuzione degli alimenti causa di asma bronchiale.

## **Capitolo 5**

# ***CONCLUSIONI***

La pubblica percezione dell'importanza delle reazioni allergiche agli alimenti, eccede la prevalenza di queste reazioni identificata con gli studi clinici. Gli studi eseguiti sia nei bambini che negli adulti indicano che mediamente il 25% della popolazione crede di soffrire di allergia alimentare, mentre la prevalenza reale è in realtà molto minore.<sup>97</sup>

Due studi europei hanno stimato la prevalenza dell'allergia alimentare nella popolazione generale adulta. Uno è stato svolto da Jansen e collaboratori e l'altro da Young e collaboratori. I due studi hanno evidenziato che la prevalenza si situa tra 1% e il 2%.<sup>98,99</sup>

La prevalenza dell'allergia alimentare nel bambino è stata studiata da Bock, in 480 soggetti pediatrici seguiti dalla nascita fino al terzo anno di età. I risultati hanno mostrato, che secondo i genitori il 43% dei bambini avrebbe avuto reazioni allergiche agli alimenti, ma il test di scatenamento orale confermava un'allergia alimentare solo nell'8% dei casi.<sup>100</sup>

La prevalenza dell'allergia alimentare nell'asma bronchiale dimostrata nel nostro studio rispecchia i dati presenti in letteratura.

In questo studio i pazienti affetti da asma bronchiale da allergia alimentare sono prevalentemente di sesso femminile come lo confermano altri studi.<sup>101</sup>

Il nostro gruppo presentava all'anamnesi oltre l'asma conseguente all'ingestione di alimenti rinite o orticaria allergica. Nel 43% dei casi vi era associata una rinite allergica nel 8% dei casi orticaria allergica mentre nel 15 % dei casi le due comorbilità coesistevano.

Nel gruppo arruolato l'anamnesi di asma da alimenti è stata confermata con i test diagnostici allergologici a nostra disposizione: il prick test ed il dosaggio delle IgE specifiche sieriche.

Nei nostri pazienti il grano è l'allergene più rappresentativo proprio perché il target d'età dei nostri pazienti appartiene ad una fascia adulta in accordo con ciò che è evidente in letteratura.<sup>11</sup>



## **Capitolo 6**

# ***BIBLIOGRAFIA***

- 1 Bruijnzal-Koomen C., Ortolani C., Aas K., Bindsle-Jensen C., Björstén B., Momeret Vautrin D., Wutrich B.: Adverse reaction to food. Position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* 1995;50:623-35.
- 2 Sampson H.A.: Food Allergy. *JAMA* 1997; 278: 1888-94.
- 3 Jansen N., Kardinaal A.F.M., Huijbers G., Vlieg-Boerstra B.J., Martens B.P.M., Ockhuizen T.: Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 446-56.
- 4 Yung E., Stoneham M.D., Petrukevitch A., Barton J., Rona R.: A population study of food intolerance. *Lancet* 1994;343:1127-30.
- 5 Bock S.A.: Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics* 1987; 79: 683-8.
- 6 Kulig M., Bergmann R., Klettke U., Wahn V., Tacke U., Wahn U. and the Multicenter Allergy Study Group: Natural course of sensitization to food and inhalant allergens during the first 6 years of life. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:1173-9.
- 7 Schrandt JJP, Van den Bogart JPH, Forget PP, Schrandt-Stumpel CTRM, Kuijten RH, Kester ADM: Cow's milk protein intolerance in infants under 1 year of age: a prospective epidemiological study. *Eur J Pediatr* 1993; 152: 640-4.
- 8 Hoast A., Halcken S.: A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. *Allergy* 1990; 45:587-96.
- 9 J Andrew Bird, A Wesley Burks. Food allergy and asthma. *Primary Care Respiratory Journal* (2009); 18(4): 258-265.

- 10 Andrew H. Liu e coll. National prevalence and risk factors for food allergy and relationship to asthma: results from the national health and nutrition examination survey 2005-2006. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 October ; 126(4): 798–806.
- 11 R. Asero, L. Antonicelli, A. Arena, L. Bommarito, B. Caruso, M. Crivellaro, M. De Carli\_, E. Della Torre, F. Della Torre, E. Heffler, F. Lodi Rizzini, R. Longo, G. Manzotti, M. Marcotulli, A. Melchiorre, P. Minale, P. Morandi, B. Moreni, A. Moschella, F. Murzilli, F. Nebiolo, M. Poppa, S. Randazzo, G. Rossi and G. E. Senna “*Epidem AAITO: Features of food allergy in Italian adults attending allergy clinics: a multi-centre study* “ *Clinical & Experimental Allergy*, 2009, 39, 547–555
- 12 A Schroeder e coll. Food allergy is associated with an increased risk of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2009 February ; 39(2): 261–270.
- 13 Kewalramani, M E Bollinger. The impact of food allergy on asthma. *Journal of Asthma and Allergy* 2010:3 65–74.
- 14 Custovic A, Simpson A, Woodcock A. Importance of indoor allergens in the induction of allergy and elicitation of allergic disease. *Allergy* 1998;53(48 Suppl):115-20.
- 15 Sin DD, Sutherland ER. Obesity and the lung: 4. Obesity and asthma. *Thorax* 2008;63(11):1018-23.
- 16 Wood LG, Gibson PG. Dietary factors lead to innate immune Activation in asthma. *Pharmacol Ther* 2009 Jul;123(1):37-53.
- 17 Perkin MR, Strachan DP. Which aspects of the farming lifestyle explain the inverse association with childhood allergy? *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(6):1374-81.

- 18 Ferguson A.: The intestine as the battlefield. In: Atlas on mechanisms in adverse reactions to food. *Allergy* 1995; 50 (Suppl.20):15-7.
- 19 Strobel S.:Mechanisms of tolerance and sensitization in the intestine and other organs of the body. In: Atlas on mechanisms in adverse reactions to food. *Allergy* 1995; 50 (Suppl.20): 18-24.
- 20 Perini A.: *Allergia e intolleranza alimentare*. Pacini editore, Pisa, 2001.
- 21 Brandtzaeg P.:Nature and function of gastrointestinal antigen-presenting cells. *Allergy* 2001; 56 (Suppl.67): 16-20.
- 22 Holt P.G.: Mucosal immunity in relation to the development of oral tolerance/sensitization. *Allergy* 1998; 53 (Suppl.46): 16-9.
- 23 Sanderson I.R., Walker W.A.: Uptake and transport of macromolecules by the intestine: possible role in clinical disorders (an update). *Gastroenterology* 1993; 104:622-39.
- 24 Majamaa H., Isolauri E.: Evaluation of the gut mucosal barrier: evidence for increased antigen transfer in children with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 985-90.
- 25 Romagnani S.: The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 399-405.
- 26 Romagnani S.:The Th1/Th2 paradigm and allergic disorders. *Allergy* 1998; 53 (Suppl.46): 12-15.
- 27 De Jong E.C., Spanhaak S.: Food allergen (peanut)-specific Th2 clones generated from the peripheral blood of a patient with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 73.
- 28 Hourihane J. O'B.: Prevalence and severity of food allergy- need for control. *Allergy* 1998; 53 (Suppl.46): 84-8.

- 29 Bock S.A., Atkins F.M.: The natural history of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83: 900-4.
- 30 Werfel S., Cooke S., Sampson H.A.: Clinical reactivity to beef in cow milk allergic children. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 293-300.
- 31 Burks A.W., Stanley J.S.: Food Allergy. *Current Opinion in Pediatrics* 1998; 10: 588-93.
- 32 Mackay I.R., Rosen F.S.: Allergy and allergic diseases. *N Engl J Med* 2001; 344:109-12.
- 33 Novembre E., Lombardi E., Bernardini R., Mugnaini L., Vierucci A.: Asma bronchiale e allergia alimentare. *Medico e Bambino* 1994; 2: 86-91.
- 34 Ewan P.W.: Anaphylaxis. *BMJ* 1998; 316: 1442-5.
- 35 Romano A., Fonso M., Giuffreda F., Quarantino D., Papa G., Palmieri V., Zeppelini P., Venuti A.: Diagnostic work-up for food-dependent, exercise-induced anaphylaxis. *Allergy* 1995; 50: 817-24.
- 36 Dohi M., Suko M., Sugiyama H., Yamashita N., Tadokoro K., Juji F., Okudaira H., Sano Y., Ito K., Miyamoto T.: Food-dependent, exercise-induced anaphylaxis: a study on 11 Japanese cases. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 34-40.
- 37 Tilles S., Schocket A.L., Milgrom H.: Exercise induced anaphylaxis related to specific foods. *J Pediatr* 1995; 127: 587-9.
- 38 Ortolani C., Ispano M., Pastorello E.A., Ansaloni R., Magri G.C.: Comparison of results of skin prick tests (with fresh foods and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 683-690.

- 39 Pastorello E.A., Ortolani C., Ferioli L., Pravettoni V., Ispano M., Borga A., Bengtsson A., Incorvaia C., Berti C., Zanussi C.: Allergenic cross-reactivity among peach, apricot, plum, and cherry in patients with oral allergy syndrome: an in vivo and in vitro study. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 699-707.
- 40 Pauli G., Oster J.P., Deville P., Heiss S., Bessot J.C., Susani M., Ferreira F., Kraft D., Valenta R.: Skin testing with recombinant allergens rBet v 1 and birch profilin, rBet v 2: Diagnostic value for birch pollen and associated allergies. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 1100-9.
- 41 Ebner C., Hirschwehr R., Bauer L., Breiteneder H., Valenta R., Ebner H., Kraft D., Scheiner O.: Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 962-9.
- 42 Breiteneder H.: Plant-food and seafood allergens- an overview. *Allergy* 1998; 53 (Suppl 46): 31-4.
- 43 Ferguson A.: The gastrointestinal tract. In: Atlas on mechanisms in adverse reaction to food. *Allergy* 1995; 50 (Suppl 20): 33.
- 44 Hourihane J. O'B, Roberts S.A., Warner J.O.: Resolution of peanut allergy: casecontrol study. *BMJ* 1998; 316: 1271-5.
- 45 Host A., Halken S., Jacobsen H.P., Eastmann A., Mortensen S., Mygil S.: The natural course of cow's milk protein allergy/intolerance [abstract]. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: S490.
- 46 Sicherer S.H., Sampson H.A.: Cow's milk proteine-specific IgE concentrations in two age groups of milk allergic children and in children achieving clinical tolerance. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 507-12.

- 47 Cooke S.K., Sampson H.A.: Allergenic properties of Ovomuroid in man. *J Immunol* 1997; 159:2026-32.
- 48 Chatchatee P., Jarvinen K.M., Bardina L., Beyer K., Sampson H.A.: Identification of IgE- and IgG- binding epitopes on  $\alpha$  s1- casein: Differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:379-83.
- 49 Bock S.A.: The natural history of food sensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 69: 173-7.
- 50 Hill D.J., Firer M.A., Ball G., Hosking C.S.: Recovery from milk allergy in early childhood: antibody study. *J Pediatr* 1989; 114: 761-6.
- 51 Pastorello E., Stocchi L., Pravettoni V.: Role of the food elimination diet in adults with food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84:475-83.
- 52 Sampson H.A., Scaloni S.M.: Natural history of food hypersensitivity in children with atopic dermatitis. *J Pediatr* 1989; 115:23-7.
- 53 Hill D.J., Firer M.A., Shelton M.J., Hosking C.S.: Manifestations of milk allergy in infancy: clinical and immunological findings. *J Pediatr* 1986; 109: 270-6.
- 54 Troncone R., Caputo N.: La diagnosi di laboratorio dell'allergia alimentare: *Medico e Bambino* 1998; 2: 90-2.
- 55 Kaila M., Isolauri E.: Diagnosis of cow's milk allergy: Open or Blinded? *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:714-5
- 56 Jensen C.B.: Standardization of double- blind, placebo-controlled food challenges. *Allergy* 2001;56:Suppl. 67:75-7
- 57 Sampson H.A.: Food Allergy Part 2: diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 981-9.

- 58 Maggiore G., Ventura A.:Aspetti immunologici di alcune malattie dell'apparato gastro-intestinale e del fegato. In: Plebani A. (eds.): *Immunologia pediatrica*. McGraw- Hill, Milano, 1998
- 59 Lucarelli S., Frediani T., Quintieri F., De Gregorio P., Zingoni A.M., Stranges A., Del Guercio I., Barbato M., Pugliese A., Cardi E.: Valore dei test di laboratorio nella diagnosi di allergia alle proteine del latte vaccino. *Acta Pediatrica Med* 1993; S: 91-3
- 60 Sampson H.A., Ho D.G.: Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 444-51.
- 61 Sporik R., Hill D.J., Hosking C.S.: Specificity of allergen skin testing in predicting positive open food challenges to milk, egg and peanut in children. *Clin Exp Allergy* 1999; 30: 1540-6.
- 62 Hill D.J., Hosking C.S., Reyes-Benito L.V.: Reducing the need for food allergen challenges in young children: a comparison of in vitro with in vivo tests. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 1031-5
- 63 Sicherer S.H., Sampson H.A.: Cow' s milk protein-specific IgE concentrations in two age groups of milk-allergic children and in children achieving clinical tolerance. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 507-12
- 64 Novembre E., Ventura A.: Diagnosi di allergia alimentare. Da lavori del congresso Confronti in Pediatria. *Medico e Bambino* 1992; 2: 122-7.
- 65 Stewart GA, Simpson RJ, Thomas WR, et al. *Physicochemical characterization of a major protein allergen, Der p I, from the house dust mite, Dermatophagoides pteronyssinus. Amino acid analysis and circular dichroism studies.* *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987;82:444-6.



- 66 Harwanegg C, Laffer S, Hiller R, et al. *Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy*. Clin Exp Allergy 2003;33:7-13.
- 67 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.
- 68 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.
- 69 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.
- 70 Gamboa PM, Caceres O, Antepara I, et al. *Two different profiles of peach allergy in the north of Spain*. Allergy 2007;62:408-14.
- 71 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.
- 72 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.
- 73 Pitsios C, Dimitriou A, Stefanaki EC, et al. *Anaphylaxis during skin testing with food allergens in children*. Eur J Pediatr 2010;169:613-5.
- 74 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.

- 75 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.
- 76 McCann WA, Ownby DR. *The reproducibility of the allergy skin test scoring and interpretation by boardcertified/ board-eligible allergists*. Ann Allergy Asthma Immunol 2002;89:368-71.
- 77 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.
- 78 Ferreira F, Hawranek T, Gruber P, et al. *Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic*. Allergy 2004;59:243-67.
- 79 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.
- 80 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.
- 81 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.
- 82 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.

- 83 Chapman MD. *Allergen nomenclature*. Clin Allergy Immunol 2008;21:47-58.
- 84 Schena M, Shalon D, Davis RW, et al. *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray*. Science 1995;270:467-70.
- 85 Seliger H. *Introduction: array technology - an overview*. Methods Mol Biol 2007;381:1-36.
- 86 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.
- 87 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.
- 88 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.
- 89 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.
- 90 Ebo DG, Hagendorens MM, Knop KJ, et al. *Component- resolved diagnosis from latex allergy by microarray*. Clin Exp Allergy 2010;40:348-58.
- 91 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.

- 92 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.
- 93 Bousquet PJ, Burbach G, Heinzerling LM, et al. *GALEN skin test study III: Minimum battery of test inhalant allergens needed in epidemiological studies in patients*. *Allergy* 2009;64:1656-62.
- 94 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.
- 95 Valenta R, Twaroch T, Swoboda I. *Componentresolved diagnosis to optimize allergen-specific immunotherapy in the Mediterranean area*. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007;17(Suppl 1):36 40.
- 96 Scala E, Alessandri C, Bernardi ML, et al. *Crosssectional survey on immunoglobulin E reactivity in 23 077 subjects using an allergenic moleculebased microarray detection system*. *Clin Exp Allergy* 2010;40:911-21.
- 97 Sampson H.A.: Food Allergy. *JAMA* 1997; 278: 1888-94.
- 98 Jansen N., Kardinaal A.F.M., Huijbers G., Vlieg-Boerstra B.J., Martens B.P.M., Ockhuizen T.: Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 446-56.
- 99 Yung E., Stoneham M.D., Petruckevitch A., Barton J., Rona R.: A population study of food intolerance. *Lancet* 1994;343:1127-30.
- 100 Bock S.A.: Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics* 1987; 79: 683-8.  
01 Kanny G, Moneret-Vautrin DA, Flabbee J, Beaudouin E, Morisset M, Thevenin F. Population study of food allergy in France. *J Allergy Clin immunol* 2001; 108:133–40.