

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

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

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

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

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

#### Parole chiave

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

#### Key words

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

#### Riassunto

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

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

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

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

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

#### Summary

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

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

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

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

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

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

## 1. Introduzione

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

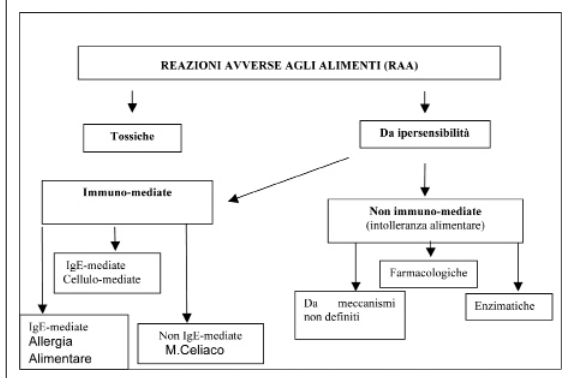
L'AA nell'adulto può persistere dall'età pediatrica oppure può insorgere "de novo": una volta insorta si mantiene per tutta la vita, diversamente da quanto può accadere in fasce di età giovanile. Da uno studio condotto in Italia è emerso che gli allergici ad alimenti rappresentano l'8% di tutti gli allergici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

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

### 1.1. CLASSIFICAZIONE DELLE REAZIONI AVVERSE AD ALIMENTI

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

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



### 1.2. QUADRI CLINICI DELL'ALLERGIA ALIMENTARE

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

Tab. I. Principali sintomi dell'allergia alimentare.

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

## 2. Metodiche diagnostiche per l'allergia alimentare

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

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

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

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

Le metodiche diagnostiche standardizzate sono le seguenti:

Metodiche diagnostiche di primo livello:

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

Metodiche diagnostiche di secondo livello:

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

Metodiche diagnostiche di terzo livello:

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

Metodiche diagnostiche di quarto livello:

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

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

### 2.1. METODICHE DI PRIMO LIVELLO

#### 2.1.1. Anamnesi allergologica

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

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

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

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

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

#### 2.1.2. Prove allergologiche cutanee

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

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

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

### Tecnica d'esecuzione

L'esecuzione dello SPT prevede di:

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

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

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

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

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

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

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

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

### Limiti della diagnostica mediante prick test

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

Le maggiori limitazioni degli estratti allergenici sono quindi dovute:

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

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

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

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

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

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

#### 2.1.2.2. Prick by prick

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

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

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

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

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

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

## 2.2. METODICHE DIAGNOSTICHE DI SECONDO LIVELLO

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

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

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

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

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

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

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

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

### 2.2.2. Diagnostica molecolare

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### *Profiline*

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

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

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

Tab. VIII. Profiline.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

maggiore stabilità che si traduce in una maggiore rilevanza clinica.

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

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

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

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

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

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

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

#### Taumatine

Le Thaumatin-like Proteins (TLP) sono molecole di 30 kda identificate come allergeni in molti tipi di frutta (pesca Pru p 2; mela Mal d 2; Kiwi Act d 2; ciliegia Pru av 2; uva Vit v TLP). Non è ancora ben conosciuto il reale ruolo clinico della sensibilizzazione a tali molecole poiché sono rare le monosensibilizzazioni. Nonostante si tratti di molecole resistenti alle proteasi ed al calore i pazienti con tali sensibilizzazioni sembrano presentare solo sindrome orale allergica.

#### Determinanti carboidratici cross reattivi (CCD)

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

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

##### Tropomiosine

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

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

Tab. IX. Tropomiosine.

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

### *Parvalbumine*

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

### *Caseine*

Il latte bovino contiene oltre 40 proteine, molte delle quali possono essere allergeniche. L'80% di esse è rappresentato dalla caseina (Bos d 8) mentre il restante 20% è rappresentato dalle siero-proteine, fra cui le principali sono la  $\beta$ -lattoglobulina (Bos d 5) (10%), la  $\alpha$ -lattalbumina (Bos d 4) (5%), l'albumina sierica bovina (BSA) (Bos d 6) (1%), la lattoferrina (presente in tracce). Le caseine sono gli allergeni maggiormente coinvolti nelle allergie da latte vaccino. Le caseine si trovano nel latte dei mammiferi a concentrazioni attorno ai 15 mg/ml e sono in grado di legare il calcio. Sono degradate dalla digestione proteolitica ma sono altamente resistenti al calore e quindi ai processi di pastorizzazione o di ebollizione e ciò è dovuto al fatto che i principali epitopi sono lineari e non conformazionali. Esistono considerevoli somiglianze tra caseine del latte di mammiferi differenti che spiegano le cross-reattività documentate.

### *Lipocaline*

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

### *Famiglia del lisozima*

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

### *Famiglia delle transferrine*

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

### *Ovomucoidi*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Problemi aperti riguardo alle procedure dei TPO sono rappresentati da:

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

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

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

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

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

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

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

#### *Indicazioni*

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

#### *Controindicazioni*

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

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

#### *In aperto*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

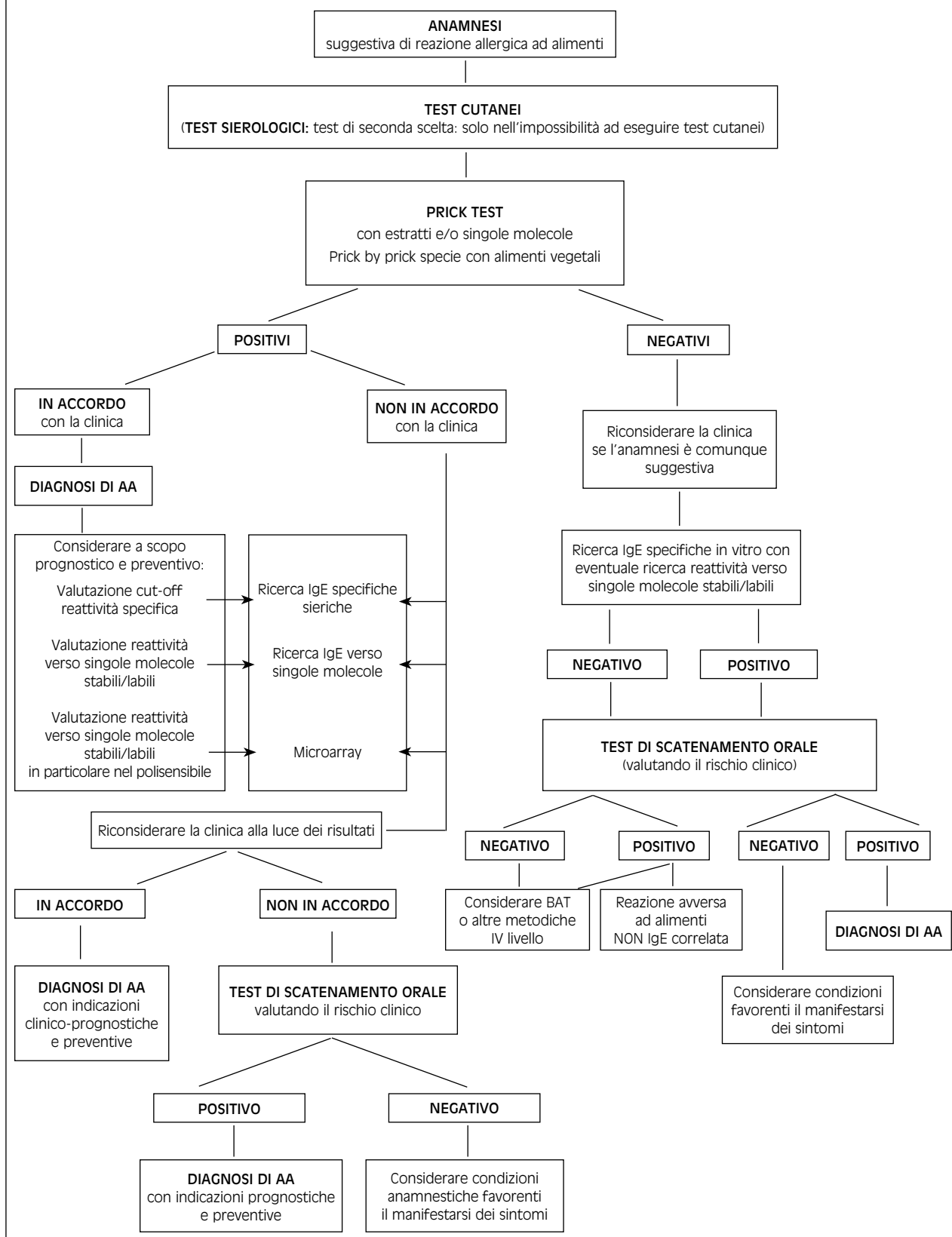
Per identificare invece il solo sottogruppo dei basofili attivati sono stati studiati diversi marcatori di membrana che vanno incontro ad "up-" o a "down-regulation" durante la degranulazione. Il marcatore maggiormente utilizzato è l'anticorpo monoclonale anti CD63 (gp53) che lega una glicoproteina di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

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

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

Le criticità maggiori sono da ricercarsi:

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

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

## 2.5. METODICHE NON CONVENZIONALI

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

## Bibliografia

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

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

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

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

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