

Nuove proteine allergeniche vegetali. Rassegna della letteratura ed esperienze personali

New vegetable allergenic proteins. Review of the literature and personal experiences

E. DAMIANI, A.M. ALOIA, M.G. PRIORE, P. FANTINI, P. DELLE DONNE, E. NETTIS, A. FERRANNINI
Dipartimento MIDIM, Cattedra di Allergologia e Immunologia Clinica, Università di Bari

Parole chiave

Allergia alimentare • Proteine allergeniche • Immunoblotting

Key words

Food allergy • Allergenic proteins • Immunoblotting

Riassunto

Gli alimenti vegetali sono causa frequente di reazioni allergiche. I loro allergeni mostrano grande variabilità, anche all'interno di una stessa specie, e questo spiega le differenze di immunoreattività tra varietà. A complicare il quadro patogenetico e le possibilità diagnostiche interviene il gioco delle cross-reattività, sia tra alimenti appartenenti alla stessa famiglia o a famiglie affini, che anche con allergeni pollinici. La caratterizzazione, l'identificazione, la purificazione ed il *sequencing* degli allergeni alimentari è di grande importanza nel migliorare la comprensione dei meccanismi patogenetici e la qualità della diagnostica, consentendo l'allestimento di estratti più affidabili. In questa rassegna vengono riportati i dati più recenti della letteratura riguardanti i nuovi allergeni vegetali, le metodiche per studiarli e vengono discusse alcune nostre esperienze al riguardo.

Summary

Vegetable foods are a common cause of allergic reactions. Furthermore, their allergens show great variability, also within the same kind of food. This may explain the immunological differences between different vegetables. Patients with allergy to a vegetable food may show hypersensitivity to other foods belonging to the same family and beyond. There are also cross-reactivities between food and inhalant allergens. The characterization, identification, purification and sequencing of food allergens is of great importance in improving understanding of the pathogenetic mechanisms and for diagnosis of food allergy, with the development of more reliable diagnostic extracts. In this review the recent data of literature on new vegetable allergens, on the techniques to investigate vegetable allergens and our experiences are reported.

Introduzione

Gli alimenti vegetali, causa frequente di reazione allergica alimentare, sono stati particolarmente studiati dal punto di vista immunologico. Un primo dato interessante che emerge è che le diverse specie di alimenti possono contenere una grande varietà di isoallergeni, a loro volta responsabili di differenze di immunoreattività e che la quantità di allergeni può variare con la maturazione del vegetale. L'esistenza di reattività crociata tra frutta e verdura filogeneticamente lontane, hanno portato a ipotizzare che gli allergeni sensibilizzanti fossero proteine funzionalmente indispensabili e quindi conservate, con qualche lieve mutazione, nel corso dell'evoluzione. Queste proteine sono denominate pan-allergeni¹. Ne sono stati individuati vari gruppi.

Profiline: ubiquitarie del citoscheletro delle cellule eucariote. Sono espresse in vari tessuti (polline, frutto, ecc.) di specie filogeneticamente lontane. Hanno un peso molecolare (PM) tra 12 e 16 kDa.

Pathogenesis related proteins (PRP): prodotte e accumulate all'interno di piante superiori, con PM tra 16 e 18 kDa. Rappresentano una sorta di immunità naturale.

Enzimi: le proteasi presentano omologia parziale con proteine vegetali (es. papaina e bromelina dei frutti esotici e ficina del fico) e le amilasi la cui omologia è responsabile di reazioni crociate tra farine di cereali.

Pan-allergeni di elevato PM: di 60-90 kDa, responsabili di reattività crociata tra pollini e frutti.

Proteine di accumulo: rappresentate dalle viciline, che hanno probabilmente compiti di difesa. Infatti in alcuni legumi legano la chitina che è il maggior costituente dei micofiti svolgendo un'attività antifungina. Le 2S Albumine (allergene maggiore della noce brasiliana, della noce comune, ecc.) e le conglutine.

Lipid transfer proteins (LTP): proteine allergeniche di 9-10 kDa resistenti alla digestione enzimatica ed al calore. Sono particolarmente rappresentate nella cuticola di alcuni frutti e potrebbero avere un ruolo

nel trasporto di monomeri di cutina agli strati più superficiali. Le LTP dei vegetali sono molto simili tra loro e svolgono un'attività di difesa antimicrobica verso batteri, virus e funghi, ma anche nei confronti di stress ambientali. Per questa ragione, l'espressione delle proteine varia con il variare delle condizioni ambientali e questo potrebbe spiegare l'aumento di sensibilizzazione ai cibi vegetali verificatosi negli ultimi tempi. Ad esempio i trattamenti con salicilati, attivando i meccanismi di difesa della pianta, migliorano la produttività mediante la resistenza ai patogeni ed aumentano notevolmente il contenuto allergenico della stessa.

Pectato-liasi: proteine con PM tra 40 e 60 kDa resistenti alla tripsina e al calore ².

Da tempo è nota l'esistenza di reattività crociata tra alimenti appartenenti alla stessa famiglia, ma anche con alimenti non correlati e con allergeni pollinici. Le più frequenti associazioni sono state indicate come *clusters* di ipersensibilità. Clinicamente gli allergeni cross-reattivi possono essere divisi in tre gruppi:

- I. Allergeni tassonomicamente correlati, responsabili di manifestazioni cliniche.
- II. Allergeni tassonomicamente correlati che non sempre danno sintomi.
- III. Allergeni cross-reattivi che non danno origine a sintomi e che rappresenterebbero un fenomeno esclusivamente biologico ¹.

Rassegna della letteratura

Gli alimenti appartenenti alla famiglia delle *Leguminosae* hanno destato interesse negli ultimi anni, in quanto causa di ipersensibilità IgE-mediata. Le reazioni alla lenticchia (*Lens esculenta*) non sono rare nell'area mediterranea. Possono esordire sin dai primi anni di vita e gli allergeni principali, responsabili di reazioni da ingestione e/o da inalazione, hanno PM tra 14 e 84 kDa e sono dotati di elevata resistenza termica, chimica e proteolitica. Pascual et al. hanno dimostrato un'alta percentuale di reattività di sieri dei pazienti verso le proteine di 38 (81%), 54 (77%), 68, 30, 40 e 70-72 e 60 kDa della lenticchia, ed anche una reattività crociata tra le lenticchie e i ceci ³. Nel 1999 Ibañez Sandín et al. dimostrarono, mediante *immunoblotting*, che il siero del 92% dei soggetti con sintomi clinici da ingestione di lenticchie, reagiva verso la banda proteica di 53 kDa, presente nell'estratto di lenticchie cotte, e l'80% dei pazienti reattivi alle lenticchie aveva storia di reazioni ai ceci. Gli stessi Autori hanno anche dimostrato che la cottura delle lenticchie determina la neoformazione di allergeni, utili per la diagnosi in vitro della sensibilità alle lenticchie ⁴.

Nel 2001 è stato realizzato il profilo dell'estratto proteico di ceci (*Cicer arietinum*) e rilevate 21 bande con *range* tra 10 e 80 kDa. Il siero dei pazienti sensibili ai

ceci mostrava IgE leganti le bande tra 20 e 80 kDa ed i principali allergeni erano proteine di 20, 26, 35, 64 e 70 kDa ⁵. Individui con manifestazioni cliniche da ceci, lenticchie e fagioli possono mostrare cross-reattività dopo ingestione di lupini (*Lupinus albus*) e nel 1999 sono state dimostrate IgE leganti bande proteiche tra 12,5 e 61 kDa ⁶. La letteratura riporta dati riguardo l'allergia ai lupini soprattutto come conseguenza di esposizione professionale. Secondo alcuni autori, si manifesterebbe raramente da sola, ma più spesso in soggetti con allergia ad altri legumi. La cross-reattività con l'arachide è dovuta alla somiglianza tra l'allergene Ara h8 dell'arachide e il PRP-10 del lupino; altra omologia riguarda l'Ara h1 e il precursore della β -conglutina presente nel lupino ⁷. Secondo altri Autori, invece, sarebbe possibile l'esistenza di una reazione allergica isolata al lupino senza evidenza di cross-reattività con altri legumi, come arachide e soia ⁸.

Segnalato in letteratura un caso di anafilassi indotta da fagiolini verdi (*Phaseolus vulgaris*) cotti, una varietà di fagiolo. È stata identificata nel vegetale cotto una proteina di 35 kDa, stabile al calore, ed una da 32 kDa labile al calore, classificata come chitinasi I, anche descritta nel fagiolo verde ⁹. In quest'ultimo, responsabile di riniti ed asma dopo manipolazione professionale e/o inalazione dei vapori di cottura, l'*immunoblotting*, eseguito con estratti di alimento sia cotto che crudo, ha mostrato IgE leganti bande proteiche con PM di 41,1 e 70,6 kDa e nel crudo anche una banda di 47 kDa ¹⁰.

Esisterebbe una reattività crociata clinicamente rilevante, anche se rara, tra la noce (*Juglans regia*) e la noce di cocco (*Cocos nucifera*), sostenuta dalla cross-reattività immunologica tra gli allergeni di PM 35, 36,5 e 55 kDa. In particolare un omologo della proteina di 55 kDa è presente nelle noci e probabilmente anche nelle arachidi e nella soia con possibile cross-reattività fra noce di cocco e *leguminosae* ¹¹.

Mediatori delle note cross-reattività tra alimenti vegetali e pollini sono i panallergeni come le profiline. Responsabile della cross-reattività fra pomodoro (*Lycopersicon esculentum*) e polline di betulla è una profilina di 14 kDa. Di recente è stato studiato il profilo allergenico del pomodoro transgenico e dimostrato che la manipolazione genetica non limita la potenza allergenica. Gli allergeni del pomodoro sono il Lyc e1 (rappresentato da due isoforme Lyc e1.01 e Lyc e1.02), il Lyc e2 (β -fructofuranosidasi) e il Lyc e3 (LTP). Con la manipolazione genetica si riesce a reprimere l'espressione dell'allergene minore Lyc e1 ed a creare un ortaggio che non mostra la banda corrispondente al Lyc e1. L'estratto di questo organismo transgenico produce una reazione cutanea meno intensa ed una riduzione di dieci volte dell'ELISA-inibizione di Lyc e1 ¹².

Si conoscono pochi casi di reazioni, anche sistemiche, da ingestione di lattuga (*Lactuca sativa*), vegetale ap-

partenente alla famiglia delle *Compositae*. Nel '98 sono state descritte alcune proteine estratte dalle sue foglie, con PM di 16, 39, 43 e 50 kDa leganti le IgE sieriche di soggetti sensibilizzati sia alla lattuga che a pollini di artemisia. La mancanza nello spettro proteico dell'estratto di lattuga della proteina di 17-18 kDa, tipica della carota, smentisce studi precedenti che ipotizzavano la possibile cross-reattività tra i due ortaggi. La proteina di 16 kDa, reperita nella lattuga, sarebbe un panallergene comune ad alimenti di origine vegetale e ad alcune varietà di polline¹³. La letteratura riporta alcuni *case report* che riguardano la lattuga. Per esempio, la reattività crociata tra lattuga e polline del platano. È stata anche descritta una rara reazione anafilattica da ingestione di lattuga in un soggetto sensibilizzato al polline di platano ed artemisia., interpretata come possibile polisensibilizzazione oppure espressione di epitopi simili in proteine diverse¹⁴. Più di recente è stata identificata una proteina di 9 kDa (nsLTP) come il maggiore allergene della lattuga (Lac s1) e successivamente confermata l'omologia di struttura tra Lac s1 della lattuga e Pru p3 della pesca e Pla a3 del platano, che spiegava la cross-reattività nei soggetti allergici alla lattuga con concomitante allergia al polline di platano e a diversi alimenti vegetali tra cui la pesca^{15 16}.

Epitopi in comune, responsabili di una possibile reattività crociata, potrebbero essere condivisi anche da alimenti come gli spinaci (*Spinacia oleracea*) appartenenti alla famiglia delle *Chenopodiaceae*, nel cui estratto sono state identificate proteine con PM tra 14 e 25 kDa e il fungo appartenente ai Basidiomiceti il cui estratto mostrava proteine con PM tra 14 e 35 kDa¹⁷.

La reazione all'ingestione della carota (*Daucus carota L.*), ortaggio appartenente alla famiglia delle *Umbelliferae* (*Apiaceae*), si associa a quella del sedano nella sindrome carota-betulla-sedano-spezie. La reattività crociata è sostenuta dal principale allergene del polline della betulla (Bet v 1) e dalla sua proteina omologa, appartenente alla famiglia delle PRP-10, presente negli alimenti di origine vegetale. Sono stati caratterizzati alcuni allergeni della carota: l'allergene Dau c1 (PM 16 – 18 kDa), identificato come una proteina omologa della Bet v 1; Dau c 4, una profilina; Dau Cyclofilina di 20 kDa. Individuate anche una proteina di 35 kDa imparentata con la Bet v5 (isoflavone-reduttasi) ed una proteina di circa 30-35 kDa (fenilcumaran-benzilic-etere-reduttasi) imparentata con la Bet v6, presente negli alimenti vegetali, nei quali svolgerebbe funzioni difensive. Di recente è stato studiato il ruolo dell'allergene Dau c1, in tre diversi modelli di asma indotta da carota ed è stato dimostrato che sarebbe in grado di indurre sensibilizzazione senza una precedente allergia a pollini¹⁸.

Cadot et al. hanno descritto reazioni alla cicoria (*Cichorium intybus ssp. Sativum*), vegetale appartenente alla famiglia delle *Compositae* (*Asteraceae*), in soggetti con asma allergica da polline di betulla ed hanno

identificato, mediante *immunoblotting*, la proteina di 51 kDa come responsabile della reazione crociata¹⁹. L'omologia tra gli allergeni della betulla Bet v1 e Bet v2 e alcune proteine di 14 e 17 kDa presenti nel peperone (*Capsicum annuum*), potrebbe spiegare il rischio di reazioni dopo ingestione di peperoni in soggetti con storia di allergia alla betulla²⁰.

Cuesta-Herranz et al. si sono occupati di identificare le proteine allergeniche del melone (*melo del Cucumis* – famiglia *Cucurbitaceae*). Hanno individuato una serie di proteine di PM 67, 54, 49, 36, 26 e 14 kDa. La proteina di 67 kDa è stata identificata con la cucusimina, un enzima che mostra autolisi, limitata a produrre una proteasi di 54 kDa e un polipeptide di 14 kDa. Le bande da 49, 36 e 26 kDa corrispondono a frammenti di degradazione della cucusimina. Parecchie forme molecolari di cucusimina sono i principali allergeni del melone, la Cuc m1.01 (67 kDa), la Cuc m1.02 (54 kDa) e la Cuc m1.03 (36 kDa). La banda da 36 kDa veniva riconosciuta dal 100% dei sieri esaminati. Interessante notare che le proteasi della serina sono enzimi ubiquitari e la cucusimina mostra identità di sequenza con altre proteasi vegetali, come la serina della soia, del pomodoro, del lattice, del riso, dell'orzo. La distribuzione ubiquitaria di questa famiglia proteica tra molte specie vegetali e la relativa somiglianza strutturale suggeriscono il possibile ruolo come nuovo panallergene in alimenti vegetali²¹.

Identificazione e caratterizzazione delle proteine allergeniche alimentari

L'identificazione e caratterizzazione degli allergeni alimentari presenta notevoli difficoltà tecniche e pratiche. Le cause sono riconducibili alla bassa frequenza di reali allergie alimentari, alla varietà di alimenti utilizzati nelle varie parti del mondo ed alle relative differenti modalità di preparazione. Inoltre, la presenza frequente negli alimenti nativi di sostanze diverse, introdotte per esigenze di lavorazione industriale (conservanti, coloranti, aromatizzanti, ecc.) o residui di operazioni agricole (soprattutto pesticidi), ne complicano ulteriormente l'affidabilità della diagnostica allergologica. Le modalità di cottura non sembrano, invece, avere, nella maggioranza dei casi, conseguenze sulle caratteristiche degli allergeni alimentari, la cui capacità di legare le IgE appare poco influenzata dal pH, dalla temperatura, dalla proteolisi e dalla denaturazione. Queste considerazioni non valgono per la frutta che è consumata cruda.

La caratterizzazione, l'identificazione, la purificazione ed il *sequencing* degli allergeni alimentari, permettendo la messa a punto di estratti diagnostici più affidabili, è di grande importanza nel migliorare la comprensione dei meccanismi patogenetici e la attendibilità della diagnostica allergologica. La qualità e

composizione di un estratto allergenico dipende dalle caratteristiche e dalla composizione della materia prima, la quale deve necessariamente essere rappresentativa della fonte allergenica alla quale il soggetto sensibilizzato è esposto in natura ^{22 23}.

L'estratto allergenico utilizza l'alimento, come materia prima, allo stato nativo oppure cotto, congelato o sotto forma di vapori di cottura. Questi ultimi possono essere responsabili della comparsa di manifestazioni cliniche, soprattutto respiratorie. Avvalendosi di un'apposita strumentazione, si riproduce il procedimento di cottura e si raccolgono i vapori, nei quali è possibile identificare la componente proteica (Fig. 1). L'allergenicità di un alimento varia con le modalità di conservazione o di cottura. Le proteine allergeniche possono essere termo-resistenti, ma in alcuni casi la cottura può determinare la formazione di neoallergeni ²⁴.

Estrazione delle proteine

L'estrazione degli allergeni dalla fonte deve essere realizzata in modo da assicurarne un completo passaggio in soluzione, senza alterare il relativo rapporto tra le diverse componenti ed evitando la loro denaturazione o alterazione. Gli allergeni sono normalmente caratterizzati da una rapida solubilizzazione in solventi acquosi, che può essere ulteriormente facilitata da una preventiva triturazione e sgrassaggio. I tempi brevi di estrazione garantiscono un completo rilascio di allergeni da parte della materia prima, limitando la

proliferazione microbica e la denaturazione e degradazione delle proteine. Per gli allergeni alimentari le soluzioni estraenti utilizzate sono PBS, Tris – HCl, Björkstén buffer, ecc.

La miscela composta da materia prima e liquido estraente viene centrifugata per eliminare il materiale insolubile sotto forma di sedimento e trattenere il sovranatante, nel quale vi saranno disciolte le proteine da ricercare. Il sovrinatante come tale è il primo estratto, definito grezzo, nel quale sono presenti soluti che devono essere allontanati mediante una dialisi/filtrazione. L'estratto filtrato come tale contiene le proteine e la loro concentrazione viene determinata mediante metodo colorimetrico o spettrofotometrico ^{25 26}. Previa liofilizzazione oppure congelamento a -20°C l'estratto può essere conservato a lungo.

Spettro proteico

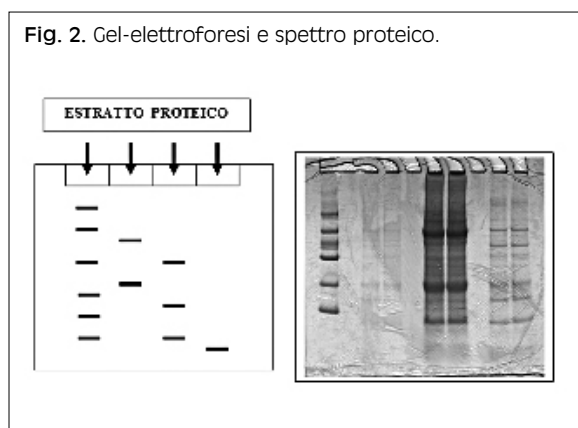
Per definizione è il risultato della migrazione elettroforetica delle proteine contenute nell'estratto. Le proteine sono definite dal PM, dalla conformazione spaziale e dalla carica elettrica, tutti fattori che ne caratterizzano la mobilità elettroforetica. Per la verifica dello spettro proteico si esegue un'elettroforesi in gel di poliacrilamide in presenza del tensioattivo anionico Sodio-Dodecil-Solfato (SDS-PAGE), il quale determina una variazione della conformazione spaziale delle proteine, formando complessi SDS-catena polipeptidica la cui carica elettrica e dimensione spaziale sono proporzionali al PM della proteina, come descritto per la prima volta da Laemmli ²⁷. In questo modo la mobilità elettroforetica della proteina sarà inversamente proporzionale al suo PM. I gel di poliacrilamide possono avere una diversa porosità ed una diversa concentrazione di acrilamide, entrambi fattori da considerare per ottenere una separazione ottimale delle proteine ²⁸.

Per eseguire l'elettroforesi, all'estratto si aggiunge il *sample buffer* (tampone costituito da SDS-Blu-Bromofenolo e glicerolo) ed in alcuni casi, con lo scopo di rompere i ponti disolfuro tra i residui di cisteina, anche una sostanza riducente (solitamente β -mercaptoetanolo). Quindi la miscela si riscalda a 100°C per 5 min. In parallelo si esegue la corsa con un mix di proteine a PM noto (standard di riferimento), per poter confrontare il PM delle proteine presenti nell'estratto. La corsa elettroforetica viene eseguita per circa 1h a 190 V in un'apposita camera elettroforetica con l'aggiunta di *running buffer*. Al termine della corsa, la posizione delle proteine può essere resa visibile mediante colorazione con blue Coomassie (Fig. 2).

Fig. 1. Strumentazione per recupero vapori di cottura.



Fig. 2. Gel-elettroforesi e spettro proteico.



Trasferimento delle proteine

La tecnica fin qui descritta separa soltanto le proteine presenti nell'estratto senza differenziare in alcun modo quelle con caratteristiche allergeniche rispetto alle altre. L'identificazione delle proteine allergeniche sfrutta la capacità di queste ultime di legare IgE specifiche, presenti nel siero di soggetti clinicamente sensibilizzati. Le proteine, separate con la procedura descritta, vengono trasferite su una membrana porosa in nitrocellulosa con porosità da 0,2 a 0,45 μm , adatta ad essere incubata con il siero. Questa tecnica è generalmente detta *Western blotting* (Fig. 3). Per il trasferimento ci si avvale di una camera per *blotting* e di un *buffer* di trasferimento. Il tempo impiegato per il trasferimento delle proteine è di circa 1,5 h a 25 V ²⁹.

Interazione immunologica

Le membrane con le proteine adese, allo scopo di impedire legami aspecifici delle IgE, vengono saturate con *buffer* composto da Tris-HCl, Tween e latte in polvere sgrassato e successivamente incubate per una

notte a 4°C con il siero del paziente sensibilizzato. Eliminato il siero, dopo lavaggi con lo scopo di eliminare eccessi di IgE non legate, si lasciano interagire con anticorpi (es. di capra) anti-IgE umane coniugati con perossidasi. L'avvenuto legame delle IgE-specifiche alle proteine allergeniche sarà rivelato mediante una sostanza chemiluminescente (es. luminolo) (Fig. 4). La presenza e posizione delle macchie così ottenute rappresenteranno lo spettro allergenico ³⁰.

Le nostre esperienze

Negli ultimi anni abbiamo avuto l'occasione di studiare alcuni casi suggestivi di reazione avversa ad alimenti vegetali, provocata sia dalla ingestione che dalla esposizione ai vapori di cottura degli stessi o alle loro polveri presenti in ambito professionale.

MUSCARI COMOSUM ("CHICCO DI GIACINTO")

Una donna, di circa 32 anni, arrivata alla nostra osservazione, raccontava di aver avuto reazioni clinicamente rilevanti in tre diverse occasioni riferibili ai bulbi di *Muscari comosum* (*Leopoldia comosa*). Il primo episodio di orticaria-angioedema, era imputabile alla ingestione dei bulbi. Il secondo, caratterizzato da prurito in gola e sensazione di soffocamento, comparve dopo esposizione ai vapori di cottura dei bulbi. Il terzo, anch'esso di tipo orticaria-angioedema, fu provocato dalla contaminazione di una posata con olio nel quale erano conservati i bulbi. In tutti gli episodi fu necessario l'uso di farmaci per controllare i sintomi.

Il *M. comosum*, comunemente conosciuto come chicco di giacinto, è una pianta perenne nativa dell'area mediterranea. I bulbi possono essere consumati cotti, usualmente dopo una prolungata bollitura per ridurre il loro sapore amaro. L'uso alimentare di questi bulbi, risale agli antichi greci, ed è comune in Turchia, Grecia e sud Italia. In Puglia sono chiamati

Fig. 3. Trasferimento delle proteine.

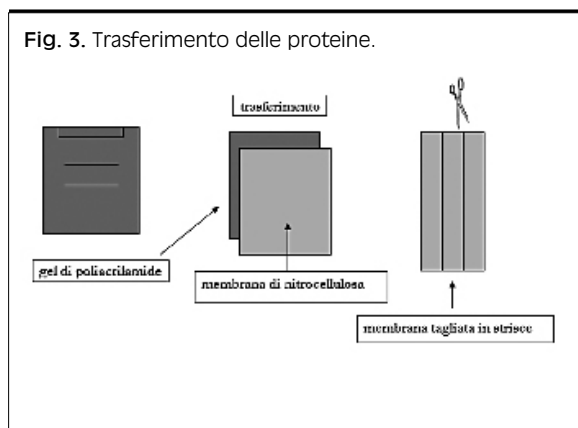
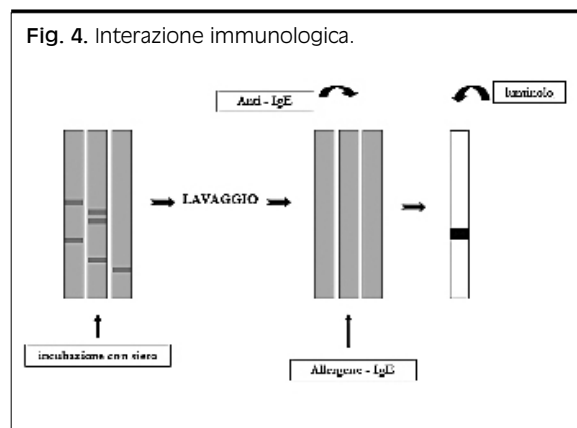


Fig. 4. Interazione immunologica.



“lampascioni”. Il genere *Muscari*, insieme alle *Alliaceae* (cipolla e aglio) e le *Asparagaceae* (asparagi), appartiene alla famiglia delle *Hyacinthaceae* (ordine *Asparagales*). Sono documentate reazioni IgE-mediate da inalazione o ingestione provocate da tali vegetali³¹⁻³³.

Per l'estrazione proteica è stato utilizzato il metodo in passato adoperato per altre *Liliaceae*. I bulbi cotti e crudi, separatamente, sono stati omogeneizzati in Bjorkstén buffer 1:1 (w/vol) per 24 h^{34,35}; dopo centrifugazione a 15000 g per 1h il sovrantante è stato dializzato contro acqua distillata per una notte. La concentrazione proteica di 2,13 e 0,62 mg/ml per gli estratti crudo e cotto, è stata determinata con metodo Bradford. Gli spettri proteici, con gel di poliaccrilamide al 4-12%, hanno mostrato bande comprese tra 14 e 30 kDa con una banda più intensa di 29-30 kDa (Fig. 5).

Gli estratti di *M. comosum* sono stati diluiti con una miscela al 50% di soluzione salina e glicerolo (1:10, 1:100, 1:1000)³⁶ ed utilizzati per eseguire sulla paziente *skin prick test* (SPT), che, opportunamente controllati, sono risultati positivi. Le proteine, contenute negli estratti di *M. comosum* cotti e crudi, dopo migrazione su gel di poliaccrilamide sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa 0,45 µm e quest'ultima incubata per una notte con il siero della paziente²⁹. Dopo l'incubazione ed i lavaggi, l'aggiunta di anticorpi di capra anti-IgE umane coniugate con perossidasi e successivamente di luminolo, si è evidenziata la reattività della proteina di PM 29-30 kDa, presente negli estratti di bulbi cotti e crudi, verso le IgE specifiche³⁷ (Fig. 6).

Fig. 5. Gel-elettroforesi con standard ed estratti di:

1. *Muscari comosum* cotto.
2. *Muscari comosum* crudo.
3. *Punica granatum*.
4. *Hilocereus undatus*.
5. Polvere di gusci di mandorla.
6. Polvere di *Boletus edulis*.
7. *Boletus edulis* decongelato.
8. *Vicia faba*.
9. Chicchi cotti di *Oryza sativa*.
10. Vapori di cottura di *Oryza sativa*.

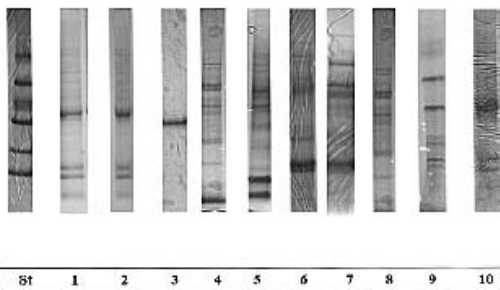
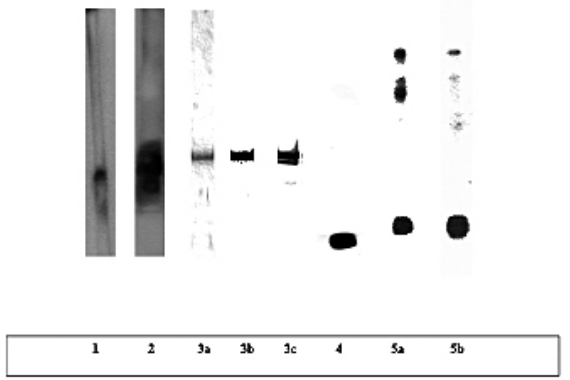


Fig. 6. Reattività sierica e chemiluminescenza con estratti di:

1. *Muscari comosum* cotto.
2. *Muscari comosum* crudo.
- 3a, 3b, 3c. *Punica granatum*.
4. *Hilocereus undatus*.
- 5a, 5b. *Boletus edulis* polvere e decongelato



Per spiegare l'episodio di reazione alla esposizione dei vapori di cottura dei bulbi, avvalendoci di una apposita strumentazione, sono stati recuperati i vapori che si sprigionavano durante la loro cottura (Fig. 1). Le proteine, nella quantità di 0,08 mg/ml sono state dosate con metodo Bradford. L'elettroforesi e la successiva colorazione hanno confermato la presenza di proteine anche nei vapori di cottura dei bulbi.

PUNICA GRANATUM (MELAGRANA)

Sono stati studiati 3 pazienti che riferivano reazioni dopo ingestione di melagrana (*Punica granatum*). Si trattava in tutti i casi di una sindrome orticaria-angioedema.

La melagrana appartiene alla famiglia delle *Punicaceae* nativa del sud-est asiatico e coltivata nell'area mediterranea. La polpa è formata da gruppetti, ben separabili, di chicchi di colore rosso-volaceo; matura in autunno ed è consumata solitamente da settembre a dicembre. Igea et al. e Gaig et al. rispettivamente nel 1991 e 1999, identificarono la presenza di una proteina di 29 kDa nell'estratto del frutto^{38,39}. Studi successivi hanno identificato altre proteine di PM 12 e 9 kDa^{40,41}.

Abbiamo utilizzato il frutto coltivato in Puglia, estratto in PBS con un rapporto 1:5 (w/vol). La miscela è stata centrifugata a 15000 g per 30 min a 4°C e la concentrazione proteica di 5,4 mg/ml determinata con metodo Bradford. Dopo diluizione con sample buffer e β-mercaptoetanolo e riscaldamento a 100°C per 5min, sono state separate 20 µg di proteine su gel di poliaccrilamide al 12% per 1h a 190 V. La colorazione con blue Comassie ha rivelato la presenza di una banda di PM 29 kDa ed una meno intensa di 12 kDa (Fig. 5). Per lo studio, l'estratto è stato diluito (1:10, 1:100

e 1:1000) in una miscela al 50% di soluzione salina e glicerolo ed utilizzato per eseguire sui pazienti SPT, risultando positivi. Il siero di tutti i pazienti è stato poi utilizzato per l'immunoblotting rivelando reattività della sola proteina di 29 kDa (Fig. 6). Tale risultato farebbe supporre che questa proteina sia il maggiore allergene della melagrana.

HILOCEREUS UNDATUS (PITAYA)

Il caso di una donna di 19 anni, che aveva manifestato orticaria-angioedema dopo ingestione di un'insalata di frutta composta da pitaya, kiwi, arancia, anguria e uva, è stato oggetto di studio.

La pitaya (anche chiamato frutto del drago) o *Hilocereus undatus* appartiene alla famiglia delle *Cactaceae* ed è presente in commercio in due varietà, la pitaya rossa originaria della Colombia e la pitaya gialla originaria del Vietnam. La polpa di questo frutto è usualmente consumata cruda ed utilizzata per la preparazione di succhi ⁴².

Le proteine contenute nella polpa e nella pelle della pitaya rossa sono state estratte, omogeneizzando il frutto per 2 h a 4°C in 0,15 mol/L di PBS (pH 7,2); la parte insolubile è stata rimossa dopo centrifugazione a 15000 g a 4°C per 30 min ed il sovratanante dializzato contro acqua distillata per una notte. La proteine risultarono di 2,4 µg/µl per la polpa e 2,7 µg/µl per la pelle. Il profilo proteico di entrambi gli estratti mostrò una banda di circa 10 kDa (Fig. 5). Alla paziente furono eseguiti *patch test* serie standard SIDAPA, SPT con estratti commerciali di alimenti ed inalanti (inclusi arancia, kiwi, anguria e uva), *prick by prick* con fico d'India e dosaggio IgE specifiche per alimenti (inclusi arancia, kiwi, anguria e uva), risultati tutti negativi. Positivo fu, invece, il *prick by prick* con polpa e pelle di pitaya e lo SPT con estratto di polpa di pitaya. Per spiegare i risultati ottenuti fu eseguito l'*immunoblotting* facendo interagire il siero della paziente con il solo estratto di polpa di pitaya, rilevando reattività della proteina di 10 kDa verso le IgE specifiche sieriche (Fig. 6).

GUSCI DI MANDORLE

È arrivato alla nostra osservazione un soggetto con storia di rinite e dispnea dopo esposizione professionale alla polvere di gusci di mandorle. In precedenza era stato eseguito un test di provocazione bronchiale specifico con polvere di gusci mandorle risultato positivo. In anamnesi non emergevano reazioni ad alimenti, compresi quelli appartenenti alla famiglia delle *Rosaceae*, famiglia alla quale appartengono le mandorle.

La polvere di gusci di mandorle, conservata a 4°C, fu sottoposta ad estrazione proteica miscelandola 1:5 (w/vol) in Tris-HCl per una notte. Il sovratanante fu recuperato dopo centrifugazione a 15000 g per 30 min e la concentrazione proteica fu di 2,03 mg/ml. Il

profilo proteico su gel di poliacrilamide al 4-12%, dopo colorazione, mostrava due bande tra 10-11 e 14 kDa (Fig. 5). Furono eseguiti SPT con estratti commerciali di alimenti, comprese le *Rosaceae* e dosaggio delle IgE specifiche per mandorla ad altre *Rosaceae*, risultando tutti negativi. Negativi furono anche gli SPT eseguiti con i nostri estratti, allestiti nelle diluizioni 1:10, 1:100 e 1:1000 in soluzione salina diluita al 50% con glicerolo. Le proteine furono separate su gel, trasferite su membrana in nitrocellulosa e incubate per una notte a 4°C con il siero del paziente. La successiva interazione con anticorpi di capra anti-IgE umane coniugate con perossidasi e successivamente con luminolo non rilevarono alcuna reattività verso le proteine presenti nell'estratto. Il caso ci lasciò perplessi. La negatività all'*immunoblotting* poteva essere dovuta alla perdita naturale delle IgE sieriche, poiché le manifestazioni riferite dal paziente si erano verificate 10 aa prima della nostra osservazione. Si è potuto comunque dimostrare che oltre, alla proteina da PM 14 kDa, comunemente presente nel seme della mandorla, un'altra proteina si può rinvenire nel guscio della stessa ⁴³.

BOLETUS EDULIS (FUNGO PORCINO)

Un paziente, operaio in un pastificio, inizialmente aveva manifestato solo sintomi respiratori alcune ore dopo aver manipolato la polvere di funghi porcini (*Boletus edulis*), a tali sintomi seguirono orticaria e angioedema sempre dopo esposizione alla polvere di funghi porcini.

Per la preparazione dell'estratto proteico furono utilizzati sia il fungo porcino fresco congelato che la polvere di fungo porcino che il paziente adoperava durante la propria attività lavorativa. Fu eseguita estrazione in PBS 1:2,5 (w/vol) per il fungo fresco decongelato e 1:10 (w/vol) per il fungo in polvere ⁴⁴. Dopo centrifugazione a 15000 g per 45 min, 6,4 e 12,4 mg/ml di proteine risultarono contenute negli estratti di fungo fresco e fungo in polvere, rispettivamente. L'elettroforesi su gel di poliacrilamide al 4-12% evidenziò bande proteiche con PM tra 17 e 55 kDa ed una banda molto più intensa di circa 88 kDa (Fig. 5). Gli estratti alle diluizioni 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000 con soluzione salina e glicerolo furono utilizzati per gli SPT, che risultarono positivi. Si eseguì l'*immunoblotting* con il siero del paziente, che mostrò una reattività più marcata in corrispondenza della banda da 17 kDa e meno marcata per le proteine con PM maggiore (Fig. 6).

VICIA FABA (FAVA)

L'osservazione di un caso di reazione alla ingestione di fave (*Vicia faba*), pianta della famiglia delle *Fabaceae*, ci portò all'estrazione dalla fava di eventuali proteine. L'estrazione fu eseguita mescolando 20 gr di fava secca (deprivata della cuticola esterna e polverizzata) in 100 ml di PBS. Dopo centrifugazione a 15000

g per 30 min a 4°C l'estratto grezzo fu dializzato per una notte contro acqua distillata. Le proteine in esso contenute risultarono di 2,01 mg/ml e lo spettro proteico su gel di poliacrilamide al 10%, in condizioni non riducenti, evidenziò bande proteiche di circa 22, 32 e 60-65 kDa (Fig. 5).

ORYZA SATIVA (RISO)

Un piccolo paziente, con storia di asma dopo esposizione ai vapori di cottura del riso, cariossido (fruttoseme) della *Oryza sativa* L. (pianta erbacea appartenente alle *Graminacee*), ci indusse a ricercare la presenza di proteine del riso all'interno dei vapori, sprigionati durante la cottura. Un comune riso fu cotto in acqua utilizzando un'apposita strumentazione che consentiva il recupero dei vapori (Fig. 1) e a cottura ultimata furono estratte proteine dal riso cotto, dall'acqua di cottura e dai vapori. Per l'estrazione furono mescolati per 2 h in PBS, con un rapporto 2:1 (w/vol), i chicchi di riso cotto e l'acqua di cottura, mentre fu utilizzato un rapporto 1:1 (vol/vol) per i vapori di cottura. Le miscele furono successivamente centrifugate a 15000 g per 30 min e gli estratti ottenuti dai chicchi e dall'acqua di cottura furono dializzati per una notte contro acqua distillata. La concentrazione proteica determinata con metodo Bradford risultò di 0,77, 0,21 e 0,46 mg/ml per i chicchi, l'acqua e i vapori di cottura, rispettivamente. Il profilo proteico degli estratti di riso

in chicchi e dei vapori, allestiti in condizioni riducenti, mostrò la presenza di bande proteiche di 22-23, 35 e 65 kDa, mancava la banda di PM 65 kDa nel profilo dei vapori di cottura (Fig. 5).

Considerazioni conclusive

Attualmente esistono molti aspetti problematici riguardanti la caratterizzazione epitopica degli allergeni alimentari, la standardizzazione e la purificazione dei loro estratti. Gli allergeni, compresi quelli crocianti, possono essere estremamente labili, sia spontaneamente che a causa delle condizioni di conservazione o di manipolazioni industriali; inoltre la cottura può alterare il potere allergenico (estinguendolo, attenuandolo o slatentizzandolo). Per questo è indispensabile che la identificazione e la caratterizzazione epitopica delle molecole allergeniche sia quanto mai precisa e completa. L'*immunoblotting* ne permette l'identificazione e ne permette anche l'impiego diagnostico nei casi in cui non si possa disporre di estratti commerciali standardizzati ed affidabili. Laddove richiesto, caso per caso, la stessa procedura metodologica permette approfondimenti e può dare risposte a quesiti altrimenti irrisolvibili. Tutti gli alimenti disponibili in natura, ad eccezione di quelli privi di proteine, possono essere sensibilizzanti ed allergizzanti e pertanto studiabili⁴⁵.

Bibliografia

- Perino A. *Allergia e Intolleranza Alimentare*. Pisa: Pacini Editore 2001, pp. 61-82.
- Patafi M, Giannetto L, Minciullo PL, Merenghino RA, Ferlazzo B, Gangemi S. *Sindrome orale allergica e cross-reattività*. Giorn It Allergol Immunol Clin 2003;13:200-10.
- Pascual CY, Fernandez-Crespo J, Sanchez-Pastor S, Padial MA, Diaz-Pena JM, Martin-Muñoz F, et al. *Allergy to lentils in Mediterranean pediatric patients*. J Allergy Clin Immunol 1999;103:154-8.
- Ibañez Sandín D, Martínez San Ireneo M, Marañón Lizana F, Fernández-Caldas E, Alonso Lebrero E, Laso Borrego T. *Specific IgE determinations to crude and boiled lentil (*Lens culinaris*) extracts in lentil-sensitive children and controls*. Allergy 1999;54:1209-14.
- Patil SP, Niphadkar PV, Bapat MM. *Chickpea: a major food allergen in the Indian subcontinent and its clinical and immunochemical correlation*. Ann Allergy Asthma Immunol 2001;87:140-5.
- Matheu V, de Barrio M, Sierra Z, Gracia-Bara MT, Tornero P, Baeza ML. *Lupine-induced anaphylaxis*. Ann Allergy Asthma Immunol 1999;83:406-8.
- Brennecke S, Becker WM, Lepp U, Jappe U. *Anaphylactic reaction to lupine*. JDDG 2007;5:774-6.
- Peeters KA, Nordlee JA, Penninks AH, Chen L, Goodman RE, Bruijnzeel-Koomen CA, et al. *Lupine allergy: not simply cross-reactivity with peanut or soy*. J Allergy Clin Immunol 2007;120:647-53.
- Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, van Ree R. *String bean-induced anaphylaxis*. Allergy 2001;56:259-60.
- Daroca P, Crespo JF, Reaño M, James JM, Lopez-Rubio A, Rodriguez J. *Asthma and rhinitis induced by exposure to raw green beans and chards*. Ann Allergy Asthma Immunol 2000;85:215-8.
- Teuber SS, Peterson WR. *Systemic allergic reaction to coconut (*Cocos nucifera*) in 2 subjects with hypersensitivity to tree nut and demonstration of cross-reactivity to legumin-like seed storage proteins: new coconut and walnut food allergens*. J Allergy Clin Immunol 1999;103:1180-5.
- Quynh Le L, Mahler V, Lorenz Y, Scheurer S, Biemelt S, Vieths S, et al. *Reduced allergenicity of tomato fruits harvested from *Lyc e 1*-silenced transgenic tomato plants*. J Allergy Clin Immunol 2006;118:1176-83.
- Vila L, Sanchez G, Sanz ML, Diéguez I, Matinéz A, Palacios R, et al. *Study of a case of hypersensitivity to lettuce (*Lactuca sativa*)*. Clin Exp Allergy 1998;28:1031-5.
- Olive-Perez A, Pineda F. *Anaphylactic reaction to "Tudela" lettuce hearts*. Allergy 2003;58:1205-6.
- Miguel-Moncini M, Krail M, Scheurer S, Enrique E, Alonso R, Conti A, et al. *Lettuce anaphylaxis: identification of a lipid transfer protein as the major allergen*. Allergy 2003;58:511-7.
- Hartz C, San Miguel-Moncín MM, Cisteró-Bahíma A, Föti-

- sch K, Metzner KJ, Fortunato D, et al. *Molecular characterization of Lac s 1, the major allergen from lettuce (Lactuca sativa)*. Mol Immunol 2007;44:2820-30.
- 17 Herrera I, Moneo I, Caballero ML, de Paz S, Perez Pimiento A, Rebollo S. *Food allergy to spinach and mushroom*. Allergy 2002;57:261-2.
 - 18 Moreno-Ancillo A, Gil-Adrados AC, Cosmes PM, Domínguez-Noche C, Pineda F. *Role of Dau c 1 in three different patterns of carrot-induced asthma*. Allergol Immunopathol 2006;34(3):116-20.
 - 19 Cadot P, Kochuyt AM, van Ree R, Ceuppens JL. *Oral allergy syndrome to chicory associated with birch pollen allergy*. Int Arch Allergy Immunol 2003;131:19-24.
 - 20 Jensen-Jarolim E, Santner B, Leitner A, Grimm R, Scheiner O, Ebner C, et al. *Bell peppers (Capsicum annuum) express allergens (profilin, pathogenesis-related protein P23 and Bet v 1) depending on the horticultural strain*. Int Arch Allergy Immunol 1998;116:103-9.
 - 21 Cuesta-Herranz J, Pastor C, Figueredo E, Vidarte L, De Las Heras M, Durán C, et al. *Identification of Cucumisin (Cuc m1), a subtilisin-like endopeptidase, as the major allergen of melon fruit*. Clin Exp Allergy 2003;33:827-33.
 - 22 Hefle SL. *Impact of processing on food allergens*. Adv Exp Med Biol 1999;459:107-19.
 - 23 Parmiani S. *Trattato italiano di Allergologia*. Pavia: Selecta Medica Editore 2002, pp. 193-250.
 - 24 Nettis E, Pannofino A, Dambra P, Loria MP, Di Maggio G, Damiani E, et al. *IgE-mediated Urticaria/Angioedema after ingestion of mussels*. Acta Derm Venereol 2001;81:1.
 - 25 Lowry OH, Rosebrough B, Fair AL, Randall RJ. *Protein measurement with the folin phenol reagent*. J Biol Chem 1951;193:265-7.
 - 26 Bradford M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem 1976;72:248.
 - 27 Laemmli UK. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T*. Nature 1970;227:680-5.
 - 28 Qinwei S, George J. *Gel electrophoresis of proteins. A practical approach*. Oxford: B.D. Hames 2002.
 - 29 Towbin H, Staehelin I, Gordon J. *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76:4350-4.
 - 30 Becker WM, Reese G. *Immunological identification and characterization of individual food allergens*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2001;756:131-40.
 - 31 Doussi MA, Thanos CA. *Ecophysiology of seed germination in Mediterranean geophytes 1 Muscaris spp.* Seed Sci Res 2002;12:193-201.
 - 32 Sýkorová E, Lim KY, Kunická K, Chase MU, Bennett MD, Fajkus J, et al. *Telomere variability in the monocotyledonous plant order Asparagales*. Proc Biol Sci 2003;270:1893-904.
 - 33 Sanchez-Hernandez MC, Hernandez M, Del Grado J, Guardia P, Monte Seirin J, Bartolomé B. *Allergenic cross-reactivity in the Liliaceae family*. Allergy 2000;55:297-9.
 - 34 Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Antonioti PL, Falagiani P. *A case of garlic allergy*. J Allergy Clin Immunol 1998;101:427-8.
 - 35 Björkstén F, Halmepuro L, Hannuksela M, Lahti A. *Extraction and properties of apple allergens*. Allergy 1980;35:671-77.
 - 36 Skamstrup Hansen K, Bindsløv-Jensen C, Skov P.S, Sparholm T.S.H, Nordskov Hansen G, Niemejer N.R, et al. *Standardization of food allergen extracts for skin prick test*. Journal of chromatography B. 2001;756:57-69.
 - 37 Foti C, Nettis E, Cassano N, Damiani E, Ferrannini A, Vena G.A. *Allergy to Muscari Comosum bulb*. Allergy. 2007;62(10):1217-18.
 - 38 Igea J.M, Cuesta J, Cuevas M, Elias L.M, Marcos C, Labaro M, et al. *Adverse reaction to pomegranate ingestion*. Allergy. 1991;46:472-74.
 - 39 Gaig P, Bartolomé B, Leonart R, García-Ortega P, Palacios R, Richart C. *Allergy to pomegranate (Punica granatum)*. Allergy. 1999;54:287-89.
 - 40 Zoccatelli G, Olivieri M, Peruffo A. *Allergy to pomegranate: a case report*. Allergy Clin Immunol Int:J World Allergy Org. 2005;Suppl 1:580.
 - 41 Enrique E, Utz M, De Mateo J.A, Castello J.V, Malek T, Pineta F. *Allergy to lipid transfer proteins: cross-reactivity among pomegranate, hazelnut, and peanut*. Ann Allergy Asthma Immunol. 2006;96(1):122-23.
 - 42 *La pitaya*. http://www.ricettecooking.com/view.php/id_838/lingua_0/.
 - 43 Foti C, Nettis E, Cassano N, Damiani E, Carino M, Vena G.A. *Non-allergic occupational asthma due to almond shell dust*. Allergy. In Press.
 - 44 Roncarolo D, Minale P, Mistrello G, Voltolini S, Falagiani P. *Food allergy to Boletus edulis*. J Allergy Clin Immunol. 1998;101:850-51.
 - 45 Damiani E. *Allergia alimentare: studi di caratterizzazioni mediante tecniche di immunoblotting*. Tesi Dottorato di ricerca in Immunologia Clinica, Epidemiologia e Prevenzione e Scienze Infettivologiche (XX ciclo). Università degli studi di Bari, 2008.