

Articoli originali

Original articles

Identificazione degli allergeni maggiori dell'ananas

Identification of the major allergens of the pineapple Fruit

V. PRAVETTONI, F. RIVOLTA, L. FARIOLI, M. ISPARO*, R. ANSALONI*, C. INCORVAIA, G. VIGANÒ,
E.A. PASTORELLO

Centro di Allergologia, Cattedra di Medicina Interna, Università di Milano

* Divisione Bizzozzero, Ospedale «Ca' Granda Niguarda», Milano

PAROLE CHIAVE. — Ananas - Sindrome orale allergica - SDS-PAGE/immunoblotting - Allergeni maggiori

KEY WORDS. — Pineapple - Oral allergy syndrome - SDS-PAGE/immunoblotting - Major allergens

Summary

In this study we identified the major allergens of pineapple using the sera from 10 patients suffering from oral allergy syndrome to pineapple and presenting positive skin prick test, specific serum IgE, and positive open food challenge for this fruit.

Different polypeptidic components were identified by SDS-PAGE with the pineapple extract, which were then analyzed by immunoblotting. Two groups of major allergens were identified in the extract, one with molecular weight (m.w.) ranging from 27 to 33 kd, with a highest reactivity against the band at 31 kd, the other from 16 to 22 kd with a highest reactivity at 20 kd; the two allergens of 31 and 20 kd bound specific IgE of all patients' sera, and have to be considered major allergens. Others bands at 38, 43, 50, and 60 kd were considered as minor allergens. Because of the correspondence between the m.w. of the major allergen at 30 kd and the m. w. of 33 kd described in literature for bromeline, an enzyme belonging to the cysteine proteases family, of which pineapple is very rich, bromeline is likely to be the main allergenic component of this fruit.

Introduzione

La caratterizzazione degli allergeni rappresenta un aspetto di notevole importanza nell'ambito dello studio delle malattie allergiche, in quanto consente sia l'approfondimento dei meccanismi patogenetici delle allergopatie sia la messa a punto di estratti diagnostici più affidabili. Diversamente dagli allergeni respiratori per molti dei quali sono stati identificati gli allergeni maggiori e minori, i dati disponibili sugli allergeni alimentari sono relativamente scarsi¹. Questo è dovuto principalmente

alla difficoltà di reclutare un numero di pazienti con sintomi clinici ed IgE specifiche per un determinato alimento sufficientemente elevato da poter costituire un campione statisticamente valido. Di recente tuttavia è stato possibile osservare che esiste una forma di allergia alimentare di frequente riscontro nell'adulto rappresentata dalla sindrome orale allergica da alimenti vegetali. Tale tipo di allergia alimentare in passato era stata sottostimata sia per la moderata gravità dei sintomi da essa evocati sia per l'impossibilità di verificare la diagnosi effettuando test *in vitro* con estratto del commercio. L'introduzione delle prove cutanee con alimento fresco e la sempre più frequente descrizione di una sintomatologia più grave della esclusiva localizzazione alla mucosa orolabiale hanno attualmente contribuito a un pieno riconoscimento della dignità clinica di questo tipo di allergopatia².

La sindrome orale allergica è in realtà di comune riscontro nell'adulto³, in quanto si associa spesso a pollinosi soprattutto da betulla, ma anche da graminacee ed artemisia. Questo rende possibile reperire un numero sufficientemente elevato di soggetti sensibilizzati ad un alimento sul cui siero effettuare le indagini di laboratorio atte ad identificare gli allergeni più rilevanti.

In una casistica di soggetti affetti da sindrome orale allergica per alimenti vegetali abbiamo identificato una popolazione di pazienti con storia clinica di reazioni allergiche all'ingestione di ananas.

Scopo di questo lavoro è stata l'identificazione degli allergeni maggiori e minori dell'ananas mediante tecniche di separazione elettroforetica e di immunoblotting.

Materiale e metodi

Pazienti

I pazienti ammessi allo studio sono stati selezionati tra quelli afferiti al Centro di Allergologia dell'Ospedale Maggiore Policlinico di Milano e alla Divisione Bizzozzero dell'Ospedale Niguarda Ca' Granda di Milano per sindrome orale allergica da alimenti vegetali. Principale criterio di ammissione allo studio è stato considerato un'anamnesi positiva per sindrome orale allergica dopo assunzione di ananas oltre che test cutanei e sierici positivi per ananas.

A tali pazienti sono stati eseguiti:

- prove cutanee con alimento fresco;
- determinazione delle IgE sieriche mediante metodica del CAP System;
- scatenamento orale in aperto con l'alimento fresco.

Anamnesi

L'anamnesi è stata raccolta accuratamente per ogni paziente accertando la relazione tra assunzione di ananas e comparsa della sintomatologia. In particolare il paziente doveva riferire il tipo di sintomi e la loro gravità, il tempo di latenza tra assunzione dell'alimento e la comparsa dei sintomi, il tempo necessario per la loro risoluzione ed eventuali sintomi per altri alimenti.

La sintomatologia valutata era caratterizzata da:

- prurito alle labbra, al palato e alla mucosa orale;
- papule, vescicole e/o angioedema orolabiale;
- edema della glottide;
- gastralgie e disturbi addominali come vomito e/o diarrea.

Cutireazioni

A tutti i pazienti sono state eseguite cutireazioni sulla superficie volare dell'avambraccio con ananas fresco utilizzando la metodica del prick + prick. Tale metodica consiste nell'introduzione per alcuni secondi di una lancetta per scarificazione nel frutto intero e la successiva sua utilizzazione per pungere la cute dell'avambraccio. Una batteria di alimenti (mela, pera, limone, pomodoro, zuccina, arachide, carota, finocchio, melone, pisello) è stata usata per identificare il controllo negativo da usare per lo scatenamento orale in aperto.

Scatenamento orale in aperto

Il test è stato eseguito da un allergologo non coinvolto nello studio, iniziando da una piccola quantità di ananas fresco (pari a circa 2 gr) e proseguendo con dosi successivamente crescenti. Il paziente doveva masticare il frutto per circa 30 secondi e quindi sputarlo. Se entro 15 minuti non comparivano sintomi, il test veniva ripetuto con un quantitativo doppio di ananas. In seguito, se non si manifestavano segni e/o sintomi di sindrome orale allergica, la prova veniva ripetuta ad intervalli di 15 minuti raddoppiando la quantità fino ad un massimo di 64 gr. Se la dose di 32 gr. non dava

alcuna reazione, al paziente veniva richiesto di inghiottire tale dose e la stessa procedura veniva usata con la dose finale di ananas. Il test è stato considerato positivo se vi era un'evidenza oggettiva di sindrome orale allergica.

Se il paziente riportava solo prurito delle labbra e/o della bocca, ma non altri sintomi, la prova veniva ripetuta due volte in giorni diversi prima di considerare il test negativo. Se, tuttavia, i sintomi soggettivi si ripetevano nella seconda e terza prova, il test era considerato positivo.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a test di controllo negativo utilizzando per la provocazione un alimento fresco per il quale anamnesi e prove cutanee risultavano negative. Alla parte *in vitro* dello studio sono stati ammessi solo i pazienti con test clinico positivo per l'ananas, mentre quelli con una risposta dubbia al test di provocazione con ananas o una risposta positiva alla provocazione con l'alimento di controllo non sono stati presi in considerazione.

Metodi in vitro

Estratto di ananas

La polpa del frutto fresco è stata omogenata (1:2 peso/volume) in un tampone 0.1 M di fosfato di potassio (pH 7) contenente in 500 ml, 10 gr di polivinilpirrolidone (Carlo Erba Reagenti), 0.8 gr di dietilditiocarbamato (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.), 0.327 gr di etilendiamino tetracetato sale disodico (Sigma) e 0.09 gr di sodiazide (Carlo Erba) e poi agitato dolcemente per 2 ore a 8°C.

L'omogenato è stato centrifugato a 40.000 giri per 30 minuti e il supernatante è stato poi dializzato contro un tampone fosfato 0.1 M per 48 ore a 4°C. Alla fine delle 48 ore l'estratto è stato di nuovo centrifugato a 10.000 giri per 5 minuti per rimuovere i precipitati e conservato a -20°C.

Il contenuto proteico dell'estratto di ananas è stato determinato usando il reagente di Folin secondo la metodica di Lowry et al.; esso è risultato corrispondere a 1,5 mg/ml⁴.

Subito prima della SDS-PAGE, l'estratto di ananas è stato concentrato con concentratori Centriprep 3 (Amicon). Partendo da un volume iniziale di 15 ml di estratto si è ottenuto un volume finale di 1 ml.

L'estratto di ananas è stato immesso nei concentratori e centrifugato una prima volta a 3.000 giri a 4°C per 150 minuti; in seguito ne è stato rimosso il filtrato giungendo ad un volume di 3 ml. L'estratto è stato quindi centrifugato una seconda volta a 3000 giri a 4°C per 40 minuti. Il volume finale ottenuto è stato di 1 ml. Il contenuto proteico valutato con la metodica di Lowry dopo concentrazione era di 4 mg/ml.

SDS- PAGE e Immunoblotting

L'estratto allergenico è stato separato in un sistema a

tampone discontinuo in un gel a gradiente di poliacrilamide-sodiododecil solfato (SDS-PAGE) con 6% di stacking gel e 7.5-20% di gel a gradiente di separazione a 6mA per 16 ore in una BIORAD Protein IIXI elettroforesi verticale Slab Cell (BIORAD Laboratories, Richmond, CA, USA), in accordo con la metodica di Neville⁵. Prima di essere introdotto nel gel l'estratto è stato diluito 1:2 in un tampone contenente TRIS (idrossimetil-aminometano) portato a pH 6.1 con acido solforico concentrato, 2% SDS, 3% di 2-mercaptoetanolo, 5% di glicerolo e 0.001% di Blu Bromofenolo. L'estratto diluito e i markers di basso peso molecolare (Pharmacia Biotech, Uppsala, Svezia) sono stati denaturati al calore a 100°C per 5 minuti per rimuovere carboidrati e lipidi precipitati.

I markers usati sono: fosforilasi B muscolare di coniglio di 94 kd; sieroalbumina bovina di 67 kd; ovalbumina di 43 kd; anidraasi carbonica eritrocitaria bovina di 30 kd; inibitore della tripsina di 20.1 kd e alfa-lattalbumina bovina di 14.4 kd.

Per l'ananas sono stati usati 100 µl/cm di gel ad una concentrazione finale di 1 mg/ml. Dopo la separazione una parte di gel è stata fissata in una soluzione di 30% di metanolo e 7% di acido acetico glaciale in acqua distillata messa per 2 ore su un agitatore basculante orizzontale, poi in una soluzione con Blu Coomassie Brillante R-250 (Pharmacia) per la colorazione delle bande proteiche per 1 ora e infine messa in una soluzione con metanolo e acido acetico per la decolorazione.

Gli allergeni separati su una parte di gel di SDS-PAGE che non sono stati colorati sono stati blottati su carta nitrocellulosa (diametro dei pori di 0.45 µm, Amersham, Buckinghamshire, UK), usando un Trans-Blot Cell della BIORAD (Richmond, CA, USA) a 0.45 A, 100 V, per 4 ore a 4°C. La soluzione blot è composta da 25 mMol di TRIS, 192 mMol di glicina e 20% di metanolo. La carta è stata prima bloccata immergendola in una soluzione bloccante (tampone fosfato salino [PBS] a pH 7.4 con 0.5% di Tween 20) per 30 minuti a temperatura ambiente e tagliata in strisce che sono state incubate per tutta la notte con il siero testato diluito 1:4 nella soluzione

bloccante. Per rivelare le IgE legate all'allergene, ogni striscia è stata lavata 3 volte in una soluzione fisiologica con 0.5% di Tween 20 per 10 minuti, agitata su un agitatore orizzontale e poi incubata per 6 ore con antisiero anti IgE umane marcato con I125 (Pharmacia) diluito 1:4 nella soluzione bloccante. Dopo lavaggio il blotting è stato esposto su film a raggi x per 5 giorni⁶.

Risultati

Alla parte in vitro dello studio sono stati ammessi 10 soggetti (6 femmine e 4 maschi di età compresa fra i 24 e i 30 anni) con anamnesi positiva per sindrome orale allergica da ananas, cutireazioni, CAP/RAST e test di provocazione orale positivi. Di questi, otto pazienti hanno presentato una sintomatologia caratterizzata da prurito orolabiale e manifestazioni obiettive di eritema e vescicole a livello del cavo orale, 2 invece hanno presentato anche angioedema orolabiale; in nessun caso si sono verificate reazioni gravi quali edema della glottide. Come riportato in tabella I tutti i pazienti avevano prove cutanee e CAP/RAST positivi. Il 50% aveva un'anamnesi positiva per rinocongiuntivite allergica stagionale con cutireazioni e CAP/RAST positivi per polline di graminacee mentre solo 1 presentava asma da Dermatofagoide pteronyssinus (inserito nel pannello poiché il suo allergene maggiore è una proteasi). Tutti i pazienti sono stati indagati relativamente alla presenza di reazioni da kiwi data la correlazione biochimica tra questi frutti. Solo un soggetto aveva sindrome orale allergica e prove allergiche positive per il kiwi mentre tutti gli altri tolleravano perfettamente questo alimento.

SDS-PAGE

L'estratto di ananas analizzato in SDS-PAGE e colorato con soluzione Blue Coomassie Brillante ha evidenziato una serie di componenti proteiche con peso molecolare compreso tra 12 e 64 kd. In particolare si è osservato un gruppo di tre bande principali di peso molecolare di 31, 28.5 e 27 kd ed altre tre bande di peso molecolare

Tab. I.

Caratteristiche demografiche e risultati delle cutireazioni e dei livelli di IgE specifiche (KU/L) per ananas, kiwi, graminacee e D. pteronyssinus nei 10 pazienti con sindrome orale allergica da ananas.

Pz. n.	Sesso	Età	Ananas	Kiwi	D. Pter.	Graminacee
1	F	24	3+ / 4.01	0 / 0	0 / 0	0 / 0
2	M	22	1+ / 0.44	3+ / 0.5	3+ / 0.4	0 / 0
3	M	35	2+ / 18.4	4+ / 10	1+ / 0	3+ / 45.5
4	F	37	4+ / 0.9	3+ / 0	0 / 0	3+ / 17.3
5	F	31	2+ / 2.1	0 / 0	0 / 0	0 / 0
6	M	26	2+ / 0.7	0 / 0	0 / 0	3+ / 80
7	M	22	2+ / 14.5	2+ / 0.6	0 / 0	4+ / 100
8	F	27	2+ / 4.59	1+ / 0	1+ / 0	3+ / 36.7
9	F	30	2+ / 1.44	4+ / 0.4	0 / 0	0 / 0
10	F	30	3+ / 2.44	0 / 0	3+ / 54.5	0 / 0

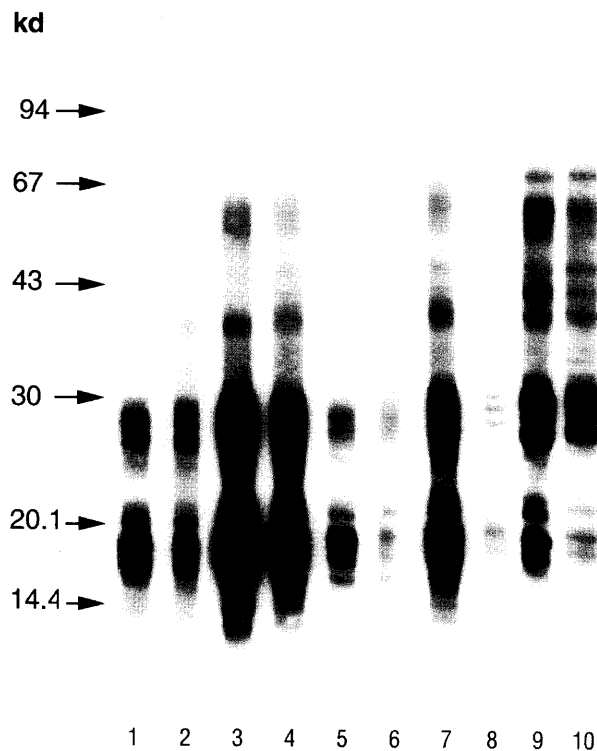


Fig. 1. Immunoblotting dell'estratto di ananas con i sieri di 10 pazienti con sindrome orale allergica da ananas. Il peso molecolare dei markers è riportato a lato della Figura.

inferiore, di 16, 18 e 20.1 kD. Per verificare l'allergenicità di tali frazioni proteiche tali bande sono state esaminate successivamente in immunoblotting.

Componenti di estratto di ananas che legano IgE specifiche

Per identificare le componenti allergeniche dell'estratto di ananas e determinarne la relativa importanza, abbiamo confrontato l'immunoblotting dei 10 pazienti valutando poi la percentuale di legame delle IgE alle rispettive bande allergeniche. L'immunoblotting IgE è riportato nella Figura 1. Tutti i sieri hanno reagito con un gruppo di bande di peso molecolare di circa 31 kD ma con reattività estesa da 27 a 33 kD e con un gruppo di bande di peso molecolare intorno a 20 kD ma con reattività estesa da 16 a 22 kD. Gli allergeni di 31 e 20 kD possono essere considerati gli allergeni maggiori dell'ananas. Altre componenti allergeniche rilevanti sono quelle di 38 e di 60 kD; essi possono essere considerati allergeni di importanza intermedia dal momento che sono state riconosciute dal 50% dei sieri. Infine si sono evidenziate bande di 50 e 43 kD che possono essere considerate invece come allergeni minori poiché sono stati riconosciuti da meno del 30% dei sieri.

Discussione

In questo studio sono stati identificati gli allergeni maggiori e minori dell'ananas in base al profilo di reattività IgE evidenziato *in vitro* dai sieri di un gruppo di pazienti con sensibilizzazione clinicamente accertata nei confronti dell'ananas. La positività del test di provocazione orale, a conferma della storia clinica, e quella di cutiriazioni e CAP/RAST costituiscono una caratterizzazione clinica completa della sensibilizzazione all'ananas dei pazienti da noi studiati. Questo consente di attribuire un valore significativo ai risultati ottenuti con SDS-PAGE e immunoblotting in base ai quali abbiamo osservato che gli allergeni dell'ananas sono costituiti da componenti polipeptidiche di peso molecolare compreso fra 12 e 64 kD. Analizzando la frequenza di reattività IgE-specifica verso le singole componenti proteiche è emerso che tutti i sieri dei soggetti in esame presentavano IgE specifiche sia verso un gruppo di allergeni compresi fra 27 e 33 kD, con un massimo di reattività nei confronti di una banda di circa 31 kD, sia con un gruppo di allergeni fra 16 e 22 kD, con un massimo di reattività nei confronti di una banda di 20 kD. Gli allergeni di 31 e 20 kD possono pertanto essere considerati non solo gli allergeni maggiori ma anche quelli di più rilevante interesse dell'ananas. Altri allergeni di significativo interesse per l'elevata frequenza di legame IgE sono risultati quelli a 38 e 60 kD, verso i quali hanno reagito il 50% dei sieri dei soggetti in esame.

Il peso molecolare di 31 kD induce a ritenere che tale allergene sia costituito dalla bromelina, enzima di cui è ricco l'ananas, il cui peso molecolare è stato riportato essere di 33.5 kD⁷. Solo la deduzione della sequenza aminoacidica potrà tuttavia dimostrare la veridicità di tale ipotesi. La bromelina è un enzima proteolitico della famiglia delle endopeptidasi che contiene un gruppo thiolico necessario per l'espletamento della sua attività enzimatica; esso appartiene alla classe delle thiol-proteasi vegetali di cui fanno parte l'actinidina del kiwi, la papaina della papaia, la ficina del fico e l'aleurina dell'orzo⁷ con le quali condivide la maggior parte delle caratteristiche fisico-chimiche. Pur in assenza di studi specifici è possibile ipotizzare che tali enzimi si comportino come allergeni cross-reattivi in analogia a quanto è stato dimostrato per altre proteine funzionalmente simili come le profiline⁸ o alcune proteine della famiglia delle «pathogenesis related proteins»⁹. Poiché di recente noi abbiamo dimostrato che l'allergene maggiore del kiwi è l'actinidina (lavoro sottoposto per pubblicazione), è ragionevole supporre che anche per l'ananas l'allergene principale sia rappresentato proprio dalla bromelina.

In conclusione, in questo studio noi abbiamo caratterizzato il peso molecolare degli allergeni maggiori dell'ananas, rappresentati da due proteine di peso molecolare rispettivamente di 31 e 20 kD il cui significato funzionale andrà indagato in studi successivi.

Riassunto

In questo studio abbiamo identificato gli allergeni maggiori dell'ananas analizzando il siero di 10 pazienti con sindrome orale allergica da ananas e positività di prove cutanee, IgE sieriche e scatenamento orale con tale frutto.

Le diverse componenti polipeptidiche ottenute dall'estratto di ananas sono state separate in SDS-PAGE e analizzate in immunoblotting. Sono stati identificati due gruppi di allergeni principali, l'uno di peso molecolare compreso tra 27 e 33 kd con una maggior reattività a 31 kd, l'altro compreso tra 16 e 22 kd con maggior reattività a 20 kd. Entrambi gli allergeni di 31 e 20 kd possono essere definiti allergeni maggiori in quanto hanno legato le IgE di tutti i pazienti. Altri allergeni, definibili come minori, sono stati riscontrati a 38, 43, 50 e 60 kd. Data la buona corrispondenza del peso molecolare dell'allergene maggiore di 31 kd con il peso molecolare di 33 kd descritto in letteratura per la bromelina, enzima della famiglia delle cistein proteasi di cui è ricco l'ananas, è probabile che proprio la bromelina sia il principale componente allergenico di questo frutto.

Bibliografia

¹ Ipsen H, Klysner SS, Nedergaard Larsen J, et al. *Allergenic Extracts*.

In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy principles and practice*. St. Louis: Mosby-Year 1993:529-553.

² Ortolani C, Ispano M, Pastorello EA, Bigi A, Ansaloni R. *The oral allergy syndrome*. *Ann Allergy* 1988;61:47-52.

³ Pravettoni V, Incorvaia C, Viganò G, et al.

Prevalenza di Sindrome da Allergia Orale (SAO) in pazienti pollinosici e analisi quantitativa della reattività cutanea ai pollini in soggetti con o senza SAO.

L'Internista 1996;4:39-42.

⁴ Lowry OH, Rosebrough NS, Fair AI, Randall RJ.

Protein measurement with the folin phenol reagent.

J Biol Chem 1951;93:265-275.

⁵ Neville DM.

Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system.

J Biol Chem 1971;246:6328-6363.

⁶ Bengtsson A, Borga A, Rolfsen W, et al.

Detection of allergens in mould and mite preparation by nitrocellulose electroblotting technique.

Int Arch Allergy Appl Immunol 1986;80:383-390.

⁷ Kamphuis G, Drenth J, Baker EN.

Comparative studies based on the high resolution structures of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for Cathepsins B and H, and stem bromelain.

J Mol Biol 1985;182:317-319.

⁸ van Ree R, Voitenko V, Aalberse RC.

Profilin is a cross-reactive allergen in pollen and vegetable foods.

Int Arch Allergy Immunol 1992;98:97-104.

⁹ Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Kauffmann S, Geoffroy P, Legrand M, Fritig B.

Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens.

Biochimie 1993;75:687-706.

Le richieste di estratti vanno indirizzate a: prof. Elide A. Pastorello, Ospedale Maggiore di Milano, Padiglione Granelli, Via F. Sforza 35, 20122 Milano - Tel. 02/55033324 - Fax 02/55192842.