

Maria Concetta D'Ovidio¹, Agnese Martini¹, Paola Melis¹, Stefano Signorini²

Il *microarray* proteico per lo studio dell'allergia da animali da laboratorio (LAA): principi e prospettive

¹ INAIL - Dipartimento Medicina del Lavoro - ex ISPESL - Monte Porzio Catone (Roma)

² INAIL - ex ISPESL - Roma

RIASSUNTO. Sin dal 1989, il *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) ha ritenuto la allergia da animali da laboratorio (*Laboratory Animal Allergy* - LAA) un rischio per i lavoratori e nel 1998 la LAA è stata ufficialmente riconosciuta un rischio occupazionale negli USA. I topi e i ratti sono la principale sorgente di allergeni, non tanto per un maggior potere allergizzante di questi animali, quanto perché rappresentano quelli maggiormente utilizzati nella ricerca. Molti degli allergeni animali sono membri della superfamiglia delle lipocaline, piccole proteine extracellulari rappresentate da un gruppo di almeno 50 proteine che principalmente legano o trasportano piccole molecole idrofobiche. Le tecnologie molecolari di recente e attuale innovazione, quali il *microarray*, hanno consentito la caratterizzazione di numerosi allergeni. Il *microarray* proteico ha inoltre permesso lo studio del profilo delle IgE nei singoli soggetti, l'analisi simultanea di un vasto numero di parametri relativi alle allergie, nuove opportunità diagnostiche e terapeutiche per le allergie. Nello studio delle allergie occupazionali - quali la LAA - l'utilizzo del *microarray* proteico potrà migliorare l'identificazione e la caratterizzazione di nuovi allergeni; l'individuazione dei lavoratori suscettibili; lo studio delle risposte immunologiche nei lavoratori esposti; le strategie di prevenzione e protezione; le condizioni ambientali e di stabulazione. La partecipazione, la formazione, l'informazione dei lavoratori potranno migliorare le pratiche comportamentali e occupazionali, l'utilizzo dei dispositivi di protezione individuale e/o collettiva al fine di ridurre l'esposizione da LAA in ambito occupazionale.

Parole chiave: *microarray*, allergia, LAA, lavoratori, prevenzione.

ABSTRACT. VALUE OF THE MICROARRAY FOR THE STUDY OF LABORATORY ANIMAL ALLERGY (LAA). Since 1989, the *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) considers the *Laboratory Animal Allergy* - LAA a risk for workers and in 1998 the LAA has been recognized as occupational risk in the USA. Rat and mouse are the most source of allergens, not so much for the higher power of allergy respect to the other animals, but because represent the more utilized species in the research. Most of the allergens are members of the lipocalin superfamily, small extracellular proteins represented by at least 50 proteins that mainly bind or carry small hydrophobic molecules. The recent and innovative molecular techniques, as the *microarray*, have allow the characterization of numerous allergens. The protein *microarray* gives the possibility to study of IgE profile for each individual, simultaneous analysis of a wide number of parameters concerning the allergy, giving new diagnostic and therapeutic opportunities for the allergies. In the study of occupational allergy - as LAA - the protein *microarray* could improve: the identification and characterization of new allergens; the individuation of susceptible workers; the study of immunological responses in exposed workers; the strategies of prevention and protection; the environmental and housing conditions. The participation, formation and information of the workers could improve the behavioural and occupational practices, the use of personal and collective protective devices in order to reduce the exposure to LAA in occupational context.

Key words: *microarray*, allergy, LAA, workers, prevention.

Introduzione

Allergia da animali da laboratorio

Sin dal 1989 il *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH), ha ritenuto la allergia da animali da laboratorio (*Laboratory Animal Allergy* - LAA) un rischio per i lavoratori e nel 1998 la LAA è stata ufficialmente riconosciuta come un rischio occupazionale negli USA (1-2). Gli animali da laboratorio, in particolare topi e ratti, sono una importante causa di malattia allergica occupazionale, tanto che lo SWORD (*Surveillance of Work and Occupationally-related Respiratory Disease*) riporta che gli animali da laboratorio figurano in cima alle principali cause di asma occupazionale negli *United Kingdom* (3-4). È ormai confermato che molti lavoratori addetti a vario titolo agli stabulari sono a rischio di esposizione di LAA (5-12).

Studi epidemiologici hanno dimostrato che la patogenesi della LAA è comune a livello mondiale e che tipicamente un terzo delle persone esposte a tale rischio occupazionale può manifestare sintomi allergici. In particolare è stato stimato che circa un terzo dei *Laboratory Animal Workers* (LAWs) potrebbe manifestare sintomi attribuibili alla LAA, più del 10% di tali lavoratori potrebbe sviluppare asma occupazionale e rinite, con episodi di persistenza che spesso si verificano anche al termine dell'esposizione agli allergeni incriminati (13-19). Negli USA l'incidenza della LAA è stimata intorno al 5% e l'incidenza dell'asma dovuta alla LAA intorno al 2%; la prevalenza dell'asma indotta da LAA derivante da stime complessive è stimata tra il 4-22% e l'11-44% (9, 17). L'ampia variazione di questa prevalenza può essere dovuta al metodo utilizzato per la diagnosi di LAA, ovvero risposta positiva al questionario vs. valutazione medica di conferma. In ogni caso, la LAA è comune nei luoghi di lavoro dove si utilizzano animali a scopi di ricerca (4-12) con conseguenze che si differenziano in relazione alla suscettibilità individuale e alla mansione lavorativa. Alcune stime effettuate negli USA riportano che almeno 90.000 lavoratori hanno contatto diretto con gli animali in strutture di ricerca o industriali (20-21); quei lavoratori che sono regolarmente a contatto con animali con pelo possono sviluppare una suscettibilità nei confronti di tali animali, comportando una prevalenza di LAA intorno al 21%, come riportato da alcuni studi indipendenti (22-25).

L'insorgenza della sintomatologia - dall'inizio dell'esposizione alla comparsa dei sintomi - sembra manifestarsi entro tre anni dall'inizio dell'attività lavorativa; circa un terzo dei lavoratori sviluppa i sintomi entro il primo anno e una percentuale intorno al 70% manifesta la sintomatologia entro i tre anni con interessamento nasale, cutaneo e respiratorio (9, 26-27).

Notevole importanza riveste la comprensione dei numerosi fattori coinvolti nella patogenesi della LAA, tra cui la modalità di esposizione e i livelli di allergene che possono causare la malattia (28-29). L'esposizione agli allergeni inizia con la loro inalazione nei polmoni; le sostanze inalate sono spesso rappresentate da proteine urinarie, derivati dermici degli animali. I topi e i ratti sono la principale sorgente di allergeni, non tanto per un maggior potere allergizzante di questi animali, quanto perché essi rappresentano quelli maggiormente utilizzati nella ricerca. Gli allergeni sono presenti nel pelo, nella saliva, nei derivati dermici dei ratti e dei topi, ma poiché i roditori hanno una persistente proteinuria, la loro urina rappresenta una importante sorgente di allergeni. Gli allergeni sono trasportati su piccole particelle, così che possono rimanere nell'aria ed essere facilmente respirabili (8, 11, 30). L'esposizione include una potente, complessa miscela di allergeni, adiuvanti biologici come endotossine e irritanti. Le relazioni *dose-risposta* tra esposizione, sensibilità e sintomi sono difficili da definire: studi trasversali identificano molti lavoratori sensibili all'esposizione moderata agli animali da laboratorio, ma non all'esposizione più alta. La stima dell'esposizione basata su medie giorni/lavoro sottostima picchi di esposizione che possono essere significativi per sintomi e malattia. Benché sia stato considerato che i lavoratori senza sintomi non siano sensibili agli allergeni da animali da laboratorio, molti lavoratori asintomatici sviluppano risposte immuni specifiche agli animali da laboratorio, tali da prevenire la malattia sintomatica (17-18, 26-27, 31-34).

La LAA rappresenta quindi una complessa e importante patologia, che necessita di ulteriori studi e approcci multidisciplinari finalizzati sia a una comprensione maggiore dei meccanismi fisiopatologici, che alla pianificazione e attuazione di programmi e misure preventive al fine di individuare quanto più precocemente possibile i soggetti ipersuscettibili, ridurre e/o eliminare l'esposizione agli allergeni e l'insorgenza di patologie allergiche e respiratorie attribuibili alla LAA in ambito occupazionale. Gli studi devono essere indirizzati a valutazioni riguardanti diversi aspetti tra loro complementari. In tale lavoro, si considera l'utilizzo di una tecnologia innovativa - quale il *microarray* proteico - nello studio di una patologia nota da molti anni - quale la LAA - per rafforzare il principio della validità degli approcci multidisciplinari finalizzati all'analisi, alla valutazione, alla gestione del rischio delle allergie occupazionali.

Allergeni

Gli allergeni coinvolti nella eziologia della LAA sono prevalentemente attribuibili a ratti e topi, non perché tali animali siano più allergenici di altri, ma perché sono quelli maggiormente utilizzati nell'ambito della ri-

cerca. Un vasto studio epidemiologico condotto in Giappone sui LAWs, ha evidenziato come la LAA sia attribuibile anche ad altre specie di animali; in particolare sono stati riportati dati riguardanti lavoratori esposti con sintomatologie riferibili a LAA con le seguenti percentuali: 26% a topi, 25% a ratti, 31% a porcellini d'India, 30% a conigli, 26% a criceti, 30% a gatti, 25% a cani, 24% a scimmie (22).

Per quanto riguarda la fonte di esposizione è noto già da tempo che le urine dei ratti e dei topi rappresentano un'importante sorgente di allergeni (35-36). I roditori infatti hanno persistente proteiunuria e la loro urina rappresenta la maggior sorgente di allergeni; anche i peli, i derivati dermici e - in minor misura - la saliva sono importanti sorgenti di allergeni nei topi e nei ratti. Al contrario, in altre specie di animali da laboratorio, come ad esempio il coniglio, le principali sorgenti di allergeni sono rappresentate dal pelo e dalla saliva (37).

È stato dimostrato che molti degli allergeni animali sono membri della superfamiglia delle lipocaline, piccole proteine extracellulari rappresentate da un gruppo di almeno 50 proteine che principalmente legano o trasportano piccole molecole idrofobiche (30, 38-42). Benché l'omologia della sequenza di aminoacidi non sia estesa tra questi allergeni, le lipocaline hanno tre sequenze altamente conservate. Riguardo agli allergeni degli animali, sembra che molte delle lipocaline funzionino come feromoni o feromoni leganti proteine. Nelle lipocaline sono compresi alcuni allergeni di diverse specie animali, quali Rat n1A e Rat n1B (Rat n1.01, Rat n1.02) di ratto (39, 43), Mus m1 di topo (44), Can f1 (45) di cane, Bos d2 di bestiame (46) e Equ c1 di cavallo (47).

Studi di laboratorio hanno identificato i maggiori allergeni urinari e hanno dimostrato come l'età e il sesso dell'animale, particolarmente nei ratti, possano influenzare la composizione allergenica delle urine (35-36, 48-49). In particolare, i maschi adulti dei topi e dei ratti rappresentano importanti sorgenti dei maggiori allergeni Mus m1 e Rat n1.02 (chiamata anche α_{2u} -globulina); l'omologia di sequenza tra Mus m1 e Rat n1.02 è alta (66%) (50); entrambi gli allergeni sono proteine globulari con proprietà di feromoni (51-52) le cui produzioni sono sotto il complesso controllo ormonale (53-54). Rat n1 è molto efficace nel legare le tossine responsabili di una progressiva nefropatia renale (55); soprattutto le escrezioni urinarie finali dei ratti contengono una aumentata quantità di proteine sieriche; riguardo al sesso le femmine di topi e ratti sembrano essere meno propense a determinare tali effetti.

Nel topo sono stati identificati e caratterizzati almeno tre distinti allergeni (8, 44, 56-60). Il principale allergene del topo, Mus m1, la maggiore delle proteine urinarie del topo (*Major Urinary Protein* - MUP) è una prealbumina con un peso molecolare di 19 kD. È stato clonato a livello molecolare il gene della proteina e ne è stata dedotta la sequenza amminoacidica (59). Riguardo la presenza di tale allergene nei vari fluidi/tessuti biologici esso è presente nelle urine così come nei follicoli piliferi e nei derivati dermici; è prodotto dalle cellule del fegato, i livelli nel siero e nelle urine sono circa quattro volte più alti nei ma-

schì del topo rispetto alle femmine, come conseguenza della relazione testosterone-dipendente dell'espressione del gene. Un secondo allergene Mus m 2, è una glicoproteina con peso molecolare di 16 kD, è stato trovato nei peli e nei derivati dermici ma non nelle urine. Il terzo allergene è l'albumina, che è allergenica in circa il 30% degli individui sensibili al topo (8, 11).

Anche alcuni degli allergeni prodotti dai ratti sono stati caratterizzati, ed è correntemente accettato che le urine dei ratti maschi adulti sono la più importante sorgente di allergeni (49). Nel ratto sono stati identificati due allergeni nelle urine, nella saliva e nel pelo (43, 58, 61). Uno, designato Rat n 1A, è stato considerato una prealbumina con un peso molecolare di 20-21 kD; l'altro, designato Rat n 1B, è stato considerato una α_{2u} globulina con peso molecolare compreso tra 16-18 kD. Questa proteina di 18 kD è prodotta nel fegato, dove è androgeno-dipendente, così come in un numero di ghiandole esocrine, salivari, mammarie, dove la produzione non è androgeno-dipendente (43, 62-63). Come nel caso del topo, è stato dimostrato che anche l'albumina del ratto ha la stessa attività antigenica, con una percentuale del 24% di soggetti allergici ai ratti che manifestano sensibilità all'albumina (8, 30).

Le tecnologie molecolari di recente e attuale innovazione, hanno consentito la caratterizzazione di numerosi allergeni (64-65). La *Allergen Nomenclature Subcommittee of the International Union of Immunological Societies* delle *International Union of Immunological Societies* (IUIS) e del *World Health Organization* (WHO) ha tra gli obiettivi quello di mantenere una nomenclatura unica e non ambigua per le molecole di allergeni e una lista ufficiale di allergeni (<http://www.allergen.org>); la prima nomenclatura di allergeni del WHO/IUIS è stata pubblicata nel 1986 (66-67). Esiste attualmente un'ampia letteratura che fornisce una panoramica vasta e dettagliata di numerosi allergeni sia di origine animale che di altra origine. La varietà numerica è determinata non solo dalla diversa origine degli allergeni, ma anche dalla diversità determinata, per molte proteine allergeniche, dalle isoforme proteiche con il risultato che singoli allergeni possono avere decine di isoforme (68-69); tutto questo contribuisce quindi a incrementare la grande varietà di molecole proteiche con potenzialità allergeniche.

La conoscenza della biologia degli allergeni, della loro distribuzione e diffusione rappresenta un tassello necessario nell'ambito dello studio allergologico riguardante la LAA, al fine di consentire un approccio sempre più dettagliato e *conoscitivo* ai fini della gestione del rischio di LAA in ambito occupazionale.

Microarray proteico

Grazie al sequenziamento dell'intero genoma, si è sviluppata l'analisi proteomica con possibilità di diversi utilizzi applicativi; tra questi la localizzazione subcellulare proteica, l'analisi di interazione proteina-proteina e di funzionalità proteica. A seguito dell'identificazione dei geni responsabili di specifiche patologie, gli studi *post-genomici* hanno reso quindi possibili numerose applicazioni sia nel campo della ricerca che della diagnostica.

La proteomica è un'area di ricerca il cui scopo è identificare e caratterizzare i prodotti delle PROTEINE espresse dal genOMA di un organismo, o PROTEOMA (70). "Con il termine proteoma si identifica il complemento proteico del genoma, così come con il termine genoma si intende il complemento genico dei cromosomi" (71). Attualmente tale termine è utilizzato "per indicare la procedura di identificazione di un elevato numero di proteine in miscele molto complesse provenienti da organelli cellulari, cellule intere o addirittura organismi" (72). Gli studi sul proteoma riguardano sia l'espressione che la funzionalità proteica. In particolare attraverso tali studi è possibile effettuare una valutazione quali/quantitativa delle proteine di interesse e delle loro proprietà funzionali, tra cui la via di trasduzione del segnale; in ogni caso è necessario il frazionamento e l'identificazione delle bande proteiche a partire da miscele proteiche complesse (72-75). La proteomica è *figlia naturale* della genomica dato che attraverso gli *array* proteici è possibile analizzare le proteine presenti in cellule e tessuti, valutare le differenze tra stati fisiologici e patologici, strutturali e conformazionali, le localizzazioni cellulari, le modificazioni funzionali anche in relazione alle variazioni del microambiente (71-72, 76-87). "La comprensione del ruolo che il *network* proteico gioca nelle patologie umane creerà probabilmente in un prossimo futuro grandi opportunità cliniche, in quanto se è vero che nel DNA risiede l'archivio di tutte le informazioni, è altrettanto vero che gli effettori di queste informazioni a livello cellulare sono le proteine e che sono le proteine a determinare il fenotipo cellulare. Procedure basate sull'analisi proteomica possono fornire un contributo basilare all'identificazione dei componenti dei complessi multi proteici" (71).

Le nuove tecnologie di *microarray* proteico - consentendo di analizzare le attività di un gran numero di proteine - hanno di fatto rivoluzionato la possibilità di analisi di interi proteomi (88-93); il *microarray* proteico costituisce una parte delle tecnologie che si stanno sviluppando per analizzare e comprendere il proteoma e le sue alterazioni (78, 84, 94). Il *microarray* consente di analizzare piccole quantità di materiale biologico, numerosi analiti su supporti miniaturizzati, con una procedura in continua evoluzione (72, 95-97). Le procedure sperimentali tengono conto delle specifiche indagini a cui sono sottoposte le proteine in studio, attraverso l'utilizzo di *chip disegnati* per studiare i campioni biologici sfruttando metodi di marcatura con fluorocromi, *scanner* o microscopi adatti a evidenziare il *segnale* fluorescente ricercato (72, 76, 84, 88, 90).

Negli anni più recenti, un settore di interesse applicativo della proteomica è quello delle patologie allergiche, consentendo sia la ricerca di nuovi allergeni che la determinazione simultanea di numerosi anticorpi anti-IgE attraverso un singolo *format multiplex* (98-110). In particolare, nel settore delle allergie lo sviluppo del *microarray* proteico ha permesso di ottenere il profilo degli anticorpi IgE utile a fini diagnostici. Tra i primi sistemi sperimentali di *microarray* per la diagnosi delle allergie vi è quello riportato da Wiltshire *et al.* (98) dove è descritta la produzione di estratti multipli di allergeni e dimostrata la validità di

tale metodologia in combinazione con il *rolling-circle amplification* per la rilevazione simultanea di IgE specifiche di allergeni multipli. Successivamente, altri autori hanno utilizzato estratti grezzi di varia origine, allergeni nativi purificati, allergeni ricombinanti nonché modificazioni sia nei supporti che nei sistemi di rilevazione (100, 102, 111-114). La tecnica del *microarray* rappresenta un metodo *immunoassay* multiplo in fase solida in cui le proteine - native o ricombinanti - sono immobilizzate e incubate con minime quantità di siero o altro materiale biologico in condizioni standardizzate. Gli anticorpi presenti nel materiale biologico sono catturati da specifici allergeni e, a seguito di *step* di lavaggio finalizzati all'eliminazione delle componenti *non legate*, gli anticorpi sono rilevati grazie a un cosiddetto anticorpo secondario opportunamente marcato, utilizzando per la rilevazione uno *scanner* o un microscopio. Con la tecnica del *microarray* è possibile determinare, nello stesso campione biologico, componenti allergeniche multiple e simultaneamente altre classi di immunoglobuline oltre alle IgE. Le ulteriori e recenti ricerche nell'ambito di tale metodologia sono indirizzate allo sviluppo di materiali certificati e di modelli di standardizzazione internazionale (115-117), con la possibilità quindi di poter ampliare lo scenario alle opportunità diagnostiche e vaccinali per lo studio delle allergie riguardanti sia la popolazione generale che i lavoratori, con l'obiettivo della tutela della salute pubblica e occupazionale.

Bioinformatica

La bioinformatica rappresenta una disciplina che studia i fenomeni biologici utilizzando strumenti informatici. La bioinformatica rappresenta un settore attraverso il quale è possibile ottenere modelli statistici validi per: l'interpretazione di dati di origine biologica; la creazione di nuovi modelli per l'analisi di sequenze di DNA, RNA e proteine e della frequenza di sequenze rilevanti; l'organizzazione dei dati ottenuti e la loro accessibilità attraverso banche dati consultabili *online* (118-132). Le informazioni ricercate possono essere ottenute attraverso l'utilizzo dei cosiddetti strumenti di bioinformatica che consentono la ricerca di sequenze simili di acidi nucleici o di proteine, strutture proteiche simili e previsione di possibili strutture tridimensionali. In particolare: ricerca di sequenze simili; studio della funzionalità proteica; analisi strutturali e di sequenza. In campo biomedico, è possibile studiare i geni associati a diverse patologie al fine di approfondire la conoscenza delle basi molecolari da trasferire a fini preventivi e terapeutici.

Per lo studio degli allergeni la bioinformatica fornisce strumenti utili e complementari alle tradizionali tecniche di laboratorio; gli strumenti utilizzati per i *database* di sonde e l'archivio di dati appartengono a diverse categorie quali analisi di sequenza e comparazione, predizione e analisi strutturale. Strumenti di analisi di sequenza e comparazione si focalizzano sulla classificazione e caratterizzazione dei geni e delle proteine di allergeni confermati e putativi (133-134). Gli strumenti predittivi di analisi funzionale e strutturale di geni e proteine conducono all'identificazione di quelle con potenzialità allergenica (135-136) e di *cross*-reattività degli allergeni (137). Il ricono-

scimento di allergeni da anticorpi IgE e IgG coinvolge il legame a epitopi lineari o conformazionali sulla superficie degli allergeni (138-139); l'identificazione degli epitopi delle cellule B è importante per la caratterizzazione degli allergeni e per comprendere meglio le complesse reazioni allergiche. Sono stati riportati diversi approcci per l'identificazione di potenziali candidati epitopi delle cellule B tra cui quelli di scansione di idrofilità o di proprietà di aminoacidi (140-142). Negli studi relativi all'allergia sono stati utilizzati sia strumenti generali che specializzati di bioinformatica. L'analisi *standard* della sequenza delle proteine è comunemente utilizzata per la caratterizzazione delle sequenze di DNA, delle proteine di allergeni e per l'identificazione delle loro caratteristiche comuni. Le tecniche *standard* utilizzano comparazioni di sequenza, *data base searching* e *pattern searching*, identificazione di varie proprietà di sequenza di proteine. Proteine omologhe spesso hanno simili strutture 3-D e, simili forme possono implicare simili funzioni. Quindi il primo *step* nello studio di una nuova proteina è una ricerca su *database* accessibili per lo studio delle omologie e allineamenti di sequenza (143-148). Gli strumenti di bioinformatica consentono e potranno consentire analisi sempre più sofisticate e approfondite delle proprietà allergiche delle proteine, attraverso l'utilizzo di *database* che: raggruppano gli allergeni in specifici gruppi struttura-funzioni; consentono analisi di sequenza multiple e analisi strutturali per l'identificazione degli epitopi delle cellule B e T; permettono il riconoscimento di *pattern* utili per poter predire l'allergenicità (69, 128-129, 149-153).

Gli strumenti di bioinformatica saranno sempre più specializzati e finalizzati a supportare e integrare i diversi settori della ricerca, della clinica e dello *screening* di nuove molecole sia nel settore allergologico che nelle varie discipline biomediche, anche attraverso uno scambio di informazioni/conoscenze disponibili su piattaforme *online* (154-158). L'utilizzo della bioinformatica nel *microarray* proteico potrà contribuire sempre più a migliorare l'applicazione di tale metodologia nello studio delle allergie in generale e della LAA in particolare.

Conclusioni

La patologia allergica è complessa, sono stati descritti centinaia di comuni allergeni, vi è la necessità di massimizzare l'efficienza diagnostica per la determinazione di allergeni multipli. I progressi compiuti dalle discipline biomediche sono stati e sono enormi; attualmente parlare di sequenziamento, di *microarray*, di proteomica, di strumenti di bioinformatica significa parlare di argomenti *parte integrante* degli approcci ampiamente condivisi e soprattutto condivisibili per lo studio delle allergie e di altre patologie.

Nello studio delle allergie, il *microarray* proteico consente di rispondere a varie limitazioni che caratterizzano la diagnostica delle patologie allergiche. La natura eterogenea degli allergeni presenta molte sfide nei vari aspetti di sviluppo del *microarray* - immobilizzazione, cattura delle molecole, *detection* del ligando - per la sierodiagnosi delle allergie e di altre condizioni cliniche. Tale metodologia ha

dimostrato un buona *performance* analitica e clinica, significativi vantaggi in termini di convenienza e costi rispetto al tradizionale test ELISA, possibilità di testare contemporaneamente più allergeni e/o più campioni biologici e di ottenere dei *serum profiling* dei soggetti in studio. Tutto questo si traduce in maggiore capacità di *screening*, tempi e costi ridotti, minor consumo di reagenti e campioni. L'avvento della tecnologia del *microarray* proteico ha di fatto consentito applicazioni immunologiche di multianaliti con analisi simultanea di un vasto numero di parametri relativi alle allergie, dando nuovo *input* alla ricerca allergologica, alla conoscenza di nuove proteine e alle sfide terapeutiche.

Il DNA *microarray* ha cambiato il campo delle scienze biomediche negli ultimi anni; il *microarray* con anticorpi o proteine ha fatto emergere un importante settore a complemento del DNA *microarray*. Inoltre, il *microarray* delle proteine si è rivelato un efficiente strumento nella rilevazione di batteri e tossine, identificazione di reattività allergica e autoanticorpi. Oltre alla possibilità di effettuare diagnosi *parallele*, il *microarray* può migliorare la sensibilità rispetto ai metodi tradizionali quali *immunoassay*, spettrometria di massa, o HPLC; al tempo stesso l'avvento di tali tecnologie dovrebbe anche modificare il "modo di pensare e di porci i problemi" nell'ambito della ricerca biomedica (159).

I progressi raggiunti nell'ambito di tale metodologia hanno di fatto migliorato gli strumenti diagnostici a disposizione dei vari centri/servizi e accresciuto l'efficienza diagnostica, offrendo al tempo stesso nuove prospettive e opportunità di sviluppo (86-87, 103, 112, 160-163).

Nell'ambito delle allergie, il *microarray* proteico - utilizzando un gran numero di allergeni - fornisce un'elegante soluzione per la determinazione multipla della reattività IgE-specifica. Come principio base, il *microarray* nello studio delle allergie, rappresenta un metodo immunologico indiretto in fase solida di multianaliti per la cattura di anticorpi nel siero dei soggetti in studio, successivo monitoraggio a seguito dell'aggiunta di anticorpi secondari marcati con fluorocromi. Contrariamente alla diagnosi convenzionale delle allergie, il *microarray* allergico è un test multiplo che permette una ricerca simultanea fino a diverse centinaia di allergeni in un singolo *step* analitico, con il vantaggio di un utilizzo minimo di materiale biologico - quale il siero - rispetto ai metodi immunologici convenzionali. Inoltre, l'uso di differenti marcatori fluorescenti in combinazione con la rilevazione di specifici anticorpi permette la misura di diversi analiti in un singolo *assay*.

Negli ultimi anni, le conoscenze sugli allergeni animali e sulla loro distribuzione si è accresciuta; molti allergeni di origine animale sono stati estensivamente caratterizzati, ed è diventato sempre più chiaro che molti di loro appartengono a una singola famiglia di proteine chiamate lipocaline (30, 38-39). La caratterizzazione e lo studio degli allergeni offre nuove possibilità di individuare gli individui suscettibili e di attuare mirati interventi preventivi e/o terapeutici sia collettivi che individuali. Una migliore conoscenza della biologia degli allergeni rappresenta sicuramente un valido e indispensabile punto di partenza per la

messa in atto di procedure relative alla gestione del rischio allergologico occupazionale.

Nell'ambito delle allergie occupazionali e in particolare nello studio della LAA, l'utilizzo del *microarray* proteico potrà contribuire a migliorare: l'identificazione e la caratterizzazione di nuovi allergeni degli animali stabulati; l'individuazione della suscettibilità dei singoli lavoratori agli allergeni degli animali stabulati; lo studio delle risposte immunologiche specificamente dirette verso allergeni delle specie animali stabulate; l'utilizzo di metodi non invasivi di prelievo di fluidi biologici - quali la saliva - su lavoratori potenzialmente esposti; le strategie di prevenzione e protezione dei lavoratori; le condizioni ambientali e di stabulazione a vantaggio sia degli animali che dei lavoratori. Le procedure finalizzate alla tutela della salute e sicurezza occupazionale dovrebbero prevedere il coinvolgimento di tutti gli attori della prevenzione, opportunamente educati/formati/informati/addestrati sui fattori di rischio e sulle procedure/modalità/fasi operative. Lavoratori ben informati e resi partecipi saranno maggiormente propensi a migliorare le pratiche comportamentali e occupazionali, utilizzare i dispositivi di protezione individuale e/o collettiva in maniera appropriata al fine di ridurre l'esposizione.

Per quanto riguarda gli sviluppi futuri, molto importante sarà accrescere il valore diagnostico del *microarray* per lo studio delle allergie, attraverso diversi aspetti, tra cui la produzione di *standard* internazionali e la validazione metodologica (115-117). La crescita di dati relativi all'allergia è entrata in una fase esponenziale per l'avanzamento della biologia molecolare, della genomica, della proteomica e della bioinformatica. Negli ultimi anni gli strumenti di bioinformatica, la disponibilità e l'accesso a piattaforme e banche dati *online* hanno consentito uno scambio enorme di conoscenza e disponibilità di dati (118-132, 154-158).

La LAA rappresenta una patologia allergica che necessita di approcci multidisciplinari finalizzati da una parte alla conoscenza sempre più dettagliata e approfondita degli allergeni delle diverse specie animali da laboratorio, dall'altra all'analisi della valutazione e gestione dell'esposizione ad allergeni nei lavoratori addetti agli stabulari. La patologia allergica pone infatti diversi interrogativi che devono essere affrontati in ambito occupazionale; tra questi la definizione di valori soglia degli allergeni, la valutazione delle condizioni ambientali e di stabulazione, la diffusione della conoscenza di tale patologia allergica in ambito occupazionale.

In conclusione, deve essere favorito l'approccio multidisciplinare con il coinvolgimento di più figure in grado di collaborare tra loro in una visione di interscambio molto ampia e condivisibile, rendere partecipi tutti gli attori della prevenzione - ciascuno nell'ambito delle proprie competenze - al fine di conoscere e valutare tutti gli aspetti utili per una corretta valutazione e gestione del rischio allergologico da animali da laboratorio. L'obiettivo principale e finale condiviso da tutti deve essere il miglioramento della conoscenza dei molteplici fattori coinvolti nella eziopatogenesi della LAA per garantire una tutela sempre più efficace della salute e sicurezza dei lavoratori.

Bibliografia

- 1) National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). NIOSH ALERT. Preventing asthma in animal handlers 1998. DHHS (NIOSH) 1998; Publication no. 97-116.
- 2) Bush R. Mechanism and epidemiology of laboratory animal allergy. *ILAR J* 2001; 42: 4-11.
- 3) Ross DJ, Keynes HL, McDonald JC. SWORD 96: surveillance of work-related and occupational respiratory disease in the UK. *Occup Med* 1997; 47: 377-381.
- 4) Gordon S. Laboratory animal allergy: a British perspective on a global problem. *ILAR J* 2001; 42: 37-46.
- 5) Bland SM, Evans R3rd, Rivera JC. Allergy to laboratory animals in health care personnel. *Occup Med* 1987; 2: 525-546.
- 6) Venables KM, Tee RD, Hawkins ER, *et al.* Laboratory animal allergy in a pharmaceutical company. *Br J Ind Med* 1988; 45: 660-666.
- 7) Gordon S. Occupational sensitization to laboratory animals. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 603-605.
- 8) Bush R, Wood R, Eggleston PA. Laboratory animal allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 99-112.
- 9) Seward JP. Occupational allergy to animals. *Occup Med* 1999; 14: 285-302.
- 10) Larese Filon F, Siracusa A, Rui F, *et al.* Prevalence of occupational allergy to laboratory animals in two towns of northern and central Italy. *Med Lav* 2002; 93: 87-94.
- 11) Bush RK, Stave GM. Laboratory animal allergy: an update. *ILAR J* 2003; 44: 28-51.
- 12) Acton D, McCauley L. Laboratory animal allergy: an occupational hazard. *AAOHN J* 2007; 55: 241-244.
- 13) Platts-Mills TA, Longbottom J, Edwards J, Heymann PW. Asthma and rhinitis related to laboratory rats: use of a purified rat urinary allergen to study exposure in laboratories and the human immune response. *N Engl J Allergy Proc* 1987; 8: 245-251.
- 14) Platts-Mills TA, Longbottom J, Edwards J, Cockcroft A, Wilkins S. Occupational asthma and rhinitis related to laboratory rats: serum IgG and IgE antibodies to the rat urinary allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79: 505-515.
- 15) Gordon S, Newman Taylor AJ. Animal, insect and shell fish allergy. In: Bernstein IL, Chan-Yeung M, Malo JL, Bernstein DI, Eds. *Asthma in the workplace*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1999, 399-424.
- 16) Gordon S, Preece R. Prevention of laboratory animal allergy. *Occup Med* 2003; 53: 371-377.
- 17) Elliott L, Heederik D, Marshall S, Peden D, Loomis D. Incidence of allergy and allergy symptoms among workers exposed to laboratory animals. *Occup Environ Med* 2005; 62: 766-771.
- 18) Elliott L, Heederik D, Marshall S, Peden D. Progression of self-reported symptoms in laboratory animal allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 127-132.
- 19) Jang JH, Kim DW, Kim SW, *et al.* Allergic rhinitis in laboratory animal workers and its risk factors. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2009; 102: 373-377.
- 20) Eggleston PA, Wood RA. Management of allergies to animals. *Allergy Proc* 1992; 13: 289-292.
- 21) Newill CA, Evans R III, Khoury M. Preemployment screening for allergy to laboratory animals: epidemiologic evaluation of its potential usefulness. *J Occup Med* 1986; 28: 1158-1164.
- 22) Aoyama K, Ueda A, Manda F, Malsushita T, Ueda T, Yamauchi C. Allergy to laboratory animals: an epidemiologic study. *Br J Ind Med* 1992; 49: 41-47.
- 23) Bland SM, Levine MS, Wilson PD, Fox NL, Rivera JC. Occupational allergy to laboratory animals: an epidemiologic study. *J Occup Med* 1986; 28: 1151-1157.
- 24) Hunskaar S, Fosse RT. Allergy to laboratory mice and rats: a review of the pathophysiology, epidemiology and clinical aspects. *Lab Anim* 1990; 24: 358-374.
- 25) Slovak AJM, Hill RN. Laboratory animal allergy: a clinical survey of an exposed population. *Br J Ind Med* 1981; 38: 38-41.
- 26) Cullinan P, Lowson D, Nieuwenhuijsen MJ, Gordon S, Tee RD, Venables KM. Work related symptoms, sensitization and estimated exposure in workers not previously exposed to laboratory rats. *Occup Environ Med* 1994; 51: 589-592.
- 27) Draper A, Newman Taylor A, Cullinan P. Estimating the incidence of occupational asthma and rhinitis from laboratory animal allergens in the UK, 1999-2000. *Occup Environ Med* 2003; 60: 604-605.
- 28) Cullinan P, Cook A, Gordon S, *et al.* Allergen exposure, atopy and smoking as determinants of allergy to rats in a cohort of laboratory employees. *Eur Respir J* 1999; 13: 1139-1143.
- 29) Korpi A, Lappalainen S, Kaliste E, Kalliokoski P, Reijula K, Pasanen AL. A multi-faceted approach to risk assessment of laboratory animal allergens at two facilities. *Am J Ind Med* 2007; 50: 127-135.
- 30) Wood RA. Laboratory animal allergens. *ILAR J* 2001; 42: 12-16.
- 31) Nieuwenhuijsen MJ, Putcha V, Gordon S, *et al.* Exposure-response relations among laboratory animal workers exposed to rats. *Occup Environ Med* 2003; 60: 104-108.
- 32) Pacheco KA. New insights into laboratory animal exposures and allergic responses. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7: 156-161.
- 33) Krakowiak A, Wiszniewska M, Krawczyk P, *et al.* Risk factors associated with airway allergic diseases from exposure to laboratory animal allergens among veterinarians. *Int Arch Occup Environ Health* 2007; 80: 465-475.
- 34) Bush RK, Peden D. Advances in environmental and occupational respiratory disease in 2007. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 1359-1362.
- 35) Price JA, Longbottom JL. Allergy to mice. I. Identification of two major mouse allergens (Ag 1 and Ag 3) and investigation of their possible origin. *Clin Allergy* 1987; 17: 43-53.
- 36) Longbottom JL, Price JA. Allergy to laboratory animals: characterization and source of two major mouse allergens, Ag 1 and Ag 3. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 82: 450-452.
- 37) Baker J, Berry A, Boscato LM, Gordon S, Walsh BJ, Stuart MC. Identification of some rabbit allergens as lipocalins. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 303-312.
- 38) Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 1996; 318: 1-14.
- 39) Virtanen T, Zeiler T, Mantylarvi R. Important animal allergens are lipocalin proteins: why are they allergenic? *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 120: 247-258.
- 40) Mantylarvi R, Rautiainen J, Virtanen T. Lipocalins as allergens. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1482: 308-317.
- 41) Virtanen T. Lipocalin allergens. *Allergy* 2001; 56: 48-51.
- 42) Saarelainen S, Rytönen-Nissinen M, Rouvinen J, *et al.* Animal-derived lipocalin allergens exhibit immunoglobulin E cross-reactivity. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 374-381.
- 43) Bayard C, Holmquist L, Vesterberg O. Purification and identification of allergenic alpha (2u)-globulin species of rat urine. *Biochem Biophys Acta* 1996; 1290:129-134.
- 44) Robertson DH, Cox KA, Gaskell SJ, Evershed RP, Benyon RJ. Molecular heterogeneity in the major mouse urinary proteins on the house mouse *Mus musculus*. *Biochem J* 1996; 316: 265-272.
- 45) Konieczny A, Morgenstern JP, Bizinkauskas CB, Lilley CH, Brauer AW, Bond JF. The major dog allergen, Can f 1 and Can f 2, are salivary lipocalin proteins. *Immunology* 1997; 92: 577-586.
- 46) Mantylarvi R, Parkkinen S, Rytönen M, *et al.* Complementary DNA cloning of the predominant allergen of bovine dander: a new member of the lipocalin family. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 1297-1303.
- 47) Gregoire C, Rosinski-Chupin I, Rabillon J, Alzari PM, David B, Dandeu JP. cDNA cloning and sequencing reveal the major horse allergen Equ c 1 to be a glycoprotein member of the lipocalin superfamily. *J Biol Chem* 1996; 271: 951-959.
- 48) Hollander A, van Run P, Spithoven J, Heederik D, Doekes G. Exposure of laboratory animal workers to airborne rat and mouse urine allergens. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 617-626.
- 49) Gordon S, Tee RD, Newman Taylor AJ. Analysis of rat urine proteins and allergens by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 298-305.
- 50) Hastie ND, Held WA, Toole JJ. Multiple genes coding for the androgen regulated major urinary proteins of the mouse. *Cell* 1979; 17: 449-457.
- 51) Adams P, Sawyer L. Structure of rodent proteins. *Biochem Soc Trans* 1990; 18: 936-937.
- 52) Bacchini A, Gaetani E, Cavaggioni A. Pheromone binding properties of the mouse, *Mus musculus*. *Experientia* 1992; 48: 419-421.
- 53) Roy AK, Chatterjee B, Demyan WF, Milin BS, *et al.* Hormonal and age-dependent regulation of alpha 2u-globulin gene expression. *Rec Prog Horm Res* 1983; 39: 425-461.
- 54) Reuter AM, Kennes F, Leonard A, Sassen A. Variations of the prealbumin in serum and urine of mice according to strain and sex. *Comp Biochem Physiol* 1968; 25: 921-928.

- 55) Swenberg JA, Short B, Borghoff S, Strasser J, Charbonneau M. The comparative pathobiology of alpha 2u-globulin nephropathy. *Toxicol Appl Pharm* 1989; 97: 35-46.
- 56) Siraganian R, Sandberg A. Characterization of mouse allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1979; 63: 435-442.
- 57) Schumacher MJ. Characterization of allergens from urine and pelts of laboratory mice. *Mol Immunol* 1980; 17: 1087-1095.
- 58) Longbottom J. Purification and characterization of allergens from the urine of mice and rats. In: Oehling A, Ed. *Advances in allergology and immunology*. Oxford: Peragon Press, 1980, 483-490.
- 59) Clark AJ, Clissold PM, Shawl RA, Beatie F, Bishop J. Structure of the mouse major urinary protein genes: different splicing configurations in the 3' non-coding region. *EMBO J* 1984; 3: 1045-1052.
- 60) Price JA, Longbottom J. Allergy to mice. Further characterization of two major mouse allergens (Ag 1 and Ag 3) and immunohistochemical investigations of their sources. *Clin Exp Allergy* 1990; 20: 71-77.
- 61) Walls AF, Longbottom JL. Quantitative immunoelectrophoretic analysis of rat allergen extracts. II. Fur, urine and saliva studied by crossed radio-immunoelectrophoresis. *Allergy* 1983; 38: 501-512.
- 62) Mancini MA, Majumdar D, Chatterjee B, Roy AK. Alpha 2u-globulin in modified sebaceous glands with pheromonal functions: localization of the protein and its mRNA in preputial, meibomian and perianal glands. *J Histochem Cytochem* 1989; 37: 149-157.
- 63) Schou C. Defining allergens of mammalian origin. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 7-14.
- 64) Davies DE, Djukanovic R, Holgate ST. Application of functional genomics to study of inflammatory airways disease. *Thorax* 1999; 54: 79-81.
- 65) Westergren-Thorsson G, Malmstrom J, Marko-Varga G. Proteomics - the protein expression technology to study connective tissue biology. *J Pharm Biomed Anal* 2001; 24: 815-824.
- 66) Marsh DG, Goodfriend L, King TP, Lowenstein H, Platts-Mills TA. Allergen nomenclature. *Bull World Health Organ* 1986; 64: 767-774.
- 67) King TP, Hoffman D, Lowenstein H, Marsh DG, Platts-Mills TA, Thomas W. Allergen nomenclature. *Allergy* 1995; 50: 765-774.
- 68) Swoboda I, Jilek A, Ferreira F, *et al*. Isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry, and cDNA cloning. *J Biol Chem* 1995; 270: 2607-2613.
- 69) Brusica V, Petrovsky N, Gendel SM, Millot M, Gigonzac O, Stelman SJ. Computational tools for the study of allergens. *Allergy* 2003; 58: 1083-1092.
- 70) Fields S. Proteomics in genomics. *Science* 2001; 291: 1221-1224.
- 71) Caldini A. Lo studio del proteoma e le sue applicazioni nella diagnostica di laboratorio. *RIMeL/IJLaM* 2003; 4: 11-12.
- 72) Facco M, Miorin M, Agostini C. Microarrays proteici e proteomica: nuove tecnologie per l'identificazione di marker biologici. *Riv Med Lab/JLM* 2003; 4: 34-36.
- 73) Patterson SD, Aebersold R. Mass spectrometric approaches for the identification of gel-separated proteins. *Electrophoresis* 1995; 16: 1791-1814.
- 74) Yates JR3rd. Mass spectrometry and the age of the proteome. *J Mass Spectrom* 1998; 33: 1-19.
- 75) Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Ann Rev Biochem* 2001; 70: 437-473.
- 76) MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* 2000; 289: 1760-1763.
- 77) Miklos GLG, Maleszka R. Integrating molecular medicine with functional proteomics: Realities and expectations. *Proteomics* 2001; 1: 30-41.
- 78) Huels C, Muellner S, Meyer HE, Cahill DJ. The impact of protein biochips and microarrays on the drug development process. *Drug Discov Today* 2002; 7:S119-124.
- 79) MacBeath G. Protein microarrays and proteomics. *Nat Genet* 2002; 32: 526-532.
- 80) Chen GY, Uttamchandani M, Lue RY, Lesaichere ML, Yao SQ. Array-based technologies and their applications in proteomics. *Curr Top Med Chem* 2003; 3: 705-724.
- 81) Pucci P. Proteomica: concetti e prospettive. *Riv Med Lab/JLM* 2003; 4: 9-10.
- 82) Dufva M, Christensen CB. Diagnostic and analytical applications of protein microarrays. *Expert Rev Proteomics* 2005; 2: 41-48.
- 83) Zhou M, Veenstra TD. Proteomic analysis of protein complexes. *Proteomics* 2007; 7: 2688-2697.
- 84) Polci ML, Petrucci TC. Arrays di proteine: tecnologie ed applicazioni in campo clinico. In: *I Microarray. Caledoscopia Italiano*. A cura di Anna Di Lonardo, Corrado Fagnani, Simonetta Pulciani. Medical Systems Editore Genova, 2008; 221: 43-58.
- 85) Rimini R, Schwenk JM, Sundberg M, *et al*. Validation of serum protein profiles by a dual antibody array approach. *J Proteomics* 2009 Sep 23 [Epub ahead of print].
- 86) Yu X, Schneiderhan-Marra N, Hsu HY, Bachmann J, Joos TO. Protein microarrays: effective tools for the study of inflammatory diseases. *Methods Mol Biol* 2009; 577: 199-214.
- 87) Spisák S, Guttman A. Biomedical applications of protein microarrays. *Curr Med Chem* 2009; 16: 2806-2815.
- 88) Zhu H, Klemic JF, Chang S, *et al*. Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat Genet* 2000; 26: 283-289.
- 89) Zhu H, Snyder M. Protein arrays and microarrays. *Curr Opin Chem Biol* 2001; 5: 40-45.
- 90) Zhu H, Bilgin M, Bangham R, *et al*. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 2001; 293: 2101-2105.
- 91) Cekaite L, Hovig E, Sioud D. Protein arrays: a versatile toolbox for target identification and monitoring of patient immune responses. *Methods Mol Biol* 2006; 360: 335-348.
- 92) Valentini O, Milanese B. Microarray: le matrici a sonda. *RIMeL/IJLaM* 2007; 3: 240-255.
- 93) González-Buitrago JM, Ferreira L, Lorenzo I. Urinary proteomics. *Clin Chim Acta* 2007; 375: 49-56.
- 94) Hanash S. Disease proteomics. *Nature* 2003; 422: 226-232.
- 95) Lal SP, Christopherson RI, dos Remedios CG. Antibody arrays: an embryonic but rapidly growing technology. *Drug Discov Today* 2002; 7: S143-149.
- 96) He M, Taussig MJ. DiscernArray technology: a cellfree method for the generation of protein arrays from PCR DNA. *J Immunol Methods* 2003; 274: 265-270.
- 97) Elrick MM, Walgren JL, Mitchell MD, Thompson DC. Proteomics: recent applications and new technologies. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 98: 432-441.
- 98) Wiltshire S, O'Malley S, Lambert J, *et al*. Detection of multiple allergen-specific IgEs on microarrays by immunoassay with rolling circle amplification. *Clin Chem* 2000; 46: 1990-1993.
- 99) Mullenix MC, Wiltshire S, Shao W, Kitos G, Schweitzer B. Allergen-specific IgE detection on microarrays using rolling circle amplification: correlation with in vitro assays for serum IgE. *Clin Chem* 2001; 47: 1926-1929.
- 100) Kim TE, Park SW, Cho NY, *et al*. Quantitative measurement of serum allergen-specific IgE on protein chip. *Exp Mol Med* 2002; 34: 152-158.
- 101) Harwanegg C, Laffer S, Hiller R, *et al*. Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 7-13.
- 102) Fall BI, Eberlein-König B, Behrendt H, Niessner R, Ring J, Weller MG. Microarrays for the screening of allergen-specific IgE in human serum. *Anal Chem* 2003; 75: 556-562.
- 103) Bacarese-Hamilton T, Ardizzoni A, Gray J, Crisanti A. Protein arrays for serodiagnosis of disease. *Methods Mol Biol* 2004; 264: 271-283.
- 104) Harwanegg C, Hiller R. Protein microarrays in diagnosing IgE-mediated diseases: spotting allergy at the molecular level. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4: 539-548.
- 105) Lebrun SJ, Petchpud WN, Hui A, McLaughlin CS. Development of a sensitive, colorimetric microarray assay for allergen-responsive human IgE. *J Immunol Methods* 2005; 300: 24-31.
- 106) Bacarese-Hamilton T, Gray J, Ardizzoni A, Crisanti A. Allergen microarrays. *Methods Mol Med* 2005; 114: 195-207.
- 107) González-Buitrago JM, Ferreira L, Isidoro-García M, Sanz C, Lorente F, Dávila I. Proteomic approaches for identifying new allergens and diagnosing allergic diseases. *Clin Chim Acta* 2007; 385: 21-27.
- 108) Mari A. When does a protein become an allergen? Searching for a dynamic definition based on most advanced technology tools. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 1089-1094.
- 109) Brunetto B, Pini C, Tinghino R, Iacovacci P. Impiego degli allergeni ricombinanti nello sviluppo di sistemi microarray per la diagnosi delle patologie allergiche. In: *Applicazioni dei microarray (2)*. Caledoscopia Italiano. A cura di Anna Di Lonardo, Corrado Fagnani, Simonetta Pulciani. Medical Systems Editore Genova, 2009; 223: 31-40.
- 110) Lin J, Bardina L, Shreffler WG. Microarrayed allergen molecules for diagnostics of allergy. *Methods Mol Biol* 2009; 524: 259-272.
- 111) Hiller R, Laffer S, Harwanegg C, *et al*. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB J* 2002; 16: 414-416.
- 112) Jahn-Schmid B, Harwanegg C, Hiller R, *et al*. Allergen microarrays: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen specific serum immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1443-1449.

- 113) Deinhofer K, Sevcik H, Balic N, *et al.* Microarrayed allergens for IgE profiling. *Methods* 2004; 32: 249-254.
- 114) Ferrer M, Sanz ML, Sastre J, *et al.* Molecular diagnosis in allergology: application of the microarray technique. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009; 19: 19-24.
- 115) Chapman MD, Ferreira F, Villalba M, *et al.* The European Union CREATE project: a model for international standardization of allergy diagnostics and vaccines. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 882-889.
- 116) van Ree R, Chapman MD, Ferreira F, *et al.* The CREATE project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification. *Allergy* 2008; 63: 310-326.
- 117) Zangar RC, Daly DS, White AM, Servoss SL, Tan RM, Collett JR. ProMAT calibrator: a tool for reducing experimental bias in antibody microarrays. *J Proteome Res* 2009; 8: 3937-3943.
- 118) Reif DM, White BC, Moore JH. Integrated analysis of genetic, genomic and proteomic data. *Expert Rev Proteomics* 2004; 1: 67-75.
- 119) Cristoni S, Bernardi LR. Bioinformatics in mass spectrometry data analysis for proteomics studies. *Expert Rev Proteomics* 2004; 1: 469-483.
- 120) Smith J, Protti D. Bioinformatics meets clinical informatics. *Stud Health Technol Inform* 2005; 116: 27-32.
- 121) Furmonaviciene R, Sutton BJ, Glaser F, *et al.* An attempt to define allergen-specific molecular surface features: a bioinformatic approach. *Bioinformatics* 2005; 21: 4201-4204.
- 122) Truffer R, Stadler MB, Vogel M, Mari A, Stadler BM. Computational resources: a regulatory need, a tool for research. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M* 2006; 95: 11-15.
- 123) Akalin PK. Introduction to bioinformatics. *Mol Nutr Food Res* 2006; 50: 610-619.
- 124) Mari A. Bioinformatics: managing the knowledge on allergens. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2006; 38: 237-239.
- 125) Mari A, Scala E, Palazzo P, Ridolfi S, Zennaro D, Carabella G. Bioinformatics applied to allergy: allergen databases, from collecting sequence information to data integration. The Allergome platform as a model. *Cell Immunol* 2006; 244: 97-100.
- 126) Jain VV, Perkins DL, Finn PW. Costimulation and allergic responses: immune and bioinformatic analyses. *Pharmacol Ther* 2008; 117: 385-392.
- 127) Bromham L. Putting the 'bio' into bioinformatics. *Biol Lett* 2009; 5: 391-393.
- 128) Brusic V, Zeleznikow J. Knowledge discovery and data mining in biological databases. *Know Eng Rev* 1999; 14: 257-7.
- 129) Mjosness E, DeCoste D. Machine learning for science: state of the art and future prospects. *Science* 2001; 293: 2051-2055.
- 130) Mari A. Importance of databases in experimental and clinical allergology. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 138: 88-96.
- 131) Gendel SM. Allergen databases and allergen semantics. *Regul Toxicol Pharmacol* 2009; 54: S7-10.
- 132) Mari A, Rasi C, Palazzo P, Scala E. Allergen databases: current status and perspectives. *Curr Allergy Asthma Rep* 2009; 9: 376-383.
- 133) Midoro-Horiuti T, Goldblum RM, Brooks EG. Identification of mutations in the genes for the pollen allergens of eastern red cedar (*Juniperus virginiana*). *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 771-778.
- 134) Yang CY, Wu JD, Wu CH. Sequence analysis of the first complete cDNA clone encoding an American cockroach *Per a 1* allergen. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1517: 153-158.
- 135) Bredehorst R, David K. What establishes a protein as an allergen? *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000; 756: 33-40.
- 136) Furmonaviciene R, Shakib F. The molecular basis of allergenicity: comparative analysis of the three dimensional structures of diverse allergens reveals a common structural motif. *Mol Pathol* 2001; 54: 155-159.
- 137) Smith AM, Benjamin DC, Hozic N, *et al.* The molecular basis of antigenic cross-reactivity between the group 2 mite allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 977-984.
- 138) Van Regenmortel MH, Pellequer JL. Predicting antigenic determinants in proteins: looking for unidimensional solutions to a three-dimensional problem? *Pept Res* 1994; 7: 224-228.
- 139) van Kampen V, Liebers V, Sander I, *et al.* B-cell epitopes of the allergen Chi t 1.01: peptide mapping of epitopes recognized by rabbit, murine, and human antibodies. *Allergy* 2001; 56: 118-125.
- 140) Parker JM, Guo D, Hodges RS. New hydrophilicity scale derived from high performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* 1986; 25: 5425-5432.
- 141) Welling GW, Weijer WJ, van der Zee R, Welling-Wester S. Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Lett* 1985; 188: 215-218.
- 142) Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett* 1990; 276: 172-174.
- 143) Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2444-2448.
- 144) Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403-410.
- 145) Smith TF, Waterman MS. Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* 1981; 147: 195-197.
- 146) Hobohm U, Sander C. A sequence property approach to searching protein databases. *J Mol Biol* 1995; 251: 390-399.
- 147) Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTALW, improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 1994; 22: 4673-4680.
- 148) Smith, RF, Smith, TF. Pattern-induced multi-sequence alignment (PIMA) algorithm employing secondary structure dependent gap penalties for use in comparative protein modelling. *Protein Eng* 1992; 5: 35-41.
- 149) Kriventseva EV, Biswas M, Apweiler R. Clustering and analysis of protein families. *Curr Opin Struct Biol* 2001; 11: 334-339.
- 150) Myers G. Optimally separating sequences. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform* 2001; 12: 165-174.
- 151) Hammer J, Bono E, Gallazzi F, Belunis C, Nagy Z, Sinigaglia F. Precise prediction of major histocompatibility complex class II-peptide interaction based on peptide side chain scanning. *J Exp Med* 1994; 180: 2353-2358.
- 152) Brusic V, Rudy G, Honeyman G, Hammer J, Harrison LC. Prediction of MHC class II-binding peptides using an evolutionary algorithm and artificial neural network. *Bioinformatics* 1998; 14: 121-130.
- 153) Brusic V, Petrovsky N, Zhang G, Bajic VB. Prediction of promiscuous peptides that bind HLA class I molecules. *Immunol Cell Biol* 2002; 80: 280-285.
- 154) Pang S, Smith J, Onley D, Reeve J, Walker M, Foy C. A comparability study of the emerging protein array platforms with established ELISA procedures. *J Immunol Methods* 2005; 302: 1-12.
- 155) Mari A, Scala E. Allergome: a unifying platform. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M* 2006; 95: 29-39.
- 156) Liu X, Wu J, Wang J, *et al.* WebLab: a data-centric, knowledge-sharing bioinformatic platform. *Nucleic Acids Res* 2009; 37 (Web Server issue): W33-W39.
- 157) Pamelard F, Even G, Apostol C, *et al.* PASE: A web-based platform for peptide/protein microarray experiments. *Methods Mol Biol* 2009; 570: 413-430.
- 158) Nikolsky Y, Kirillov E, Zuev R, Rakhmatulin E, Nikolskaya T. Functional analysis of OMICs data and small molecule compounds in an integrated "knowledge-based" platform. *Methods Mol Biol* 2009; 563: 177-196.
- 159) Giuliani A. Analisi dei dati negli esperimenti di microarray. In: *I microarray. Caleidoscopio Italiano*. A cura di Anna Di Leonardo, Corrado Fagnani, Simonetta Pulciani. Medical Systems Editore Genova, 2008; 221: 59-89.
- 160) D'Ovidio MC, Martini A, Signorini S. New tools for the study of occupational allergies related to animals. *G Ital Med Lav Erg* 2007; 29: 489-491.
- 161) Pennington K, Pedersen KJ, McManus CA. From genome to proteome: back to the future. Report on the 7th Siena meeting, September 3-7, 2006. *Proteomics* 2007; 7: 332-336.
- 162) Borrebaeck CA, Wingren C. Design of high-density antibody microarrays for disease proteomics: key technological issues. *J Proteomics* 2009; 72: 928-935.
- 163) Venkataramani S, Naik DN. Studying the effects of correlation on protein selection in proteomics data. *Proteomics* 2009; 9: 2883-2887.

Richiesta estratti: Maria Concetta D'Ovidio - INAIL - Dipartimento Medicina del Lavoro - ex ISPESEL, Via Fontana Candida 1, 00040 Monte Porzio Catone, Roma, Italy - Tel. +39 06 9789 6114 +39 06 94181 272 - E-mail: mariaconcetta.dovidio@ispesl.it m.dovidio@inail.it