

ISSN 2038-2553

Anno 37 - 2018 • Volume 36, n. 1

NOTIZIARIO ALLERGOLOGICO



**La Sindrome
della Enterocolite
Allergica (SEA)**

**La celiachia: cause
e meccanismi patogenetici
di una malattia complessa**

**Test di provocazione nasale
allergene-specifico
Pratica clinica e frontiere della ricerca**

**Linfociti B regolatori:
ruolo nello sviluppo e nella terapia
delle malattie allergiche**

NOTIZIARIO ALLERGOLOGICO

Anno 37, 2018 - Volume 36, n. 1

DIRETTORE RESPONSABILE
Gianni Mistrello

PROGETTO GRAFICO
Maura Fattorini

Stampato da:
Ancora Arti Grafiche
via Benigno Crespi, 30 - 20159 Milano



AMMINISTRAZIONE E PUBBLICITÀ

Lofarma S.p.A.
Viale Cassala 40, 20143 - Milano
tel. +39 02 581981
fax +39 02 8322512
e-mail: redazione@lofarma.it
www.lofarma.it
www.lofarma.com

Registrazione Tribunale di Milano n. 306 dell' 1.8.1980
Pubblicazione Quadrimestrale

Il Notiziario Allergologico è on-line su
www.lofarma.it

In copertina:

*La magia del deserto algerino
ricoperto di neve*

Quando ci si mette la natura offre degli spettacoli senza eguali. La foto immortala uno scenario, decisamente straordinario avvenuto pochi mesi fa nel deserto del Sahara, uno dei luoghi più caldi e secchi del pianeta dove le temperature in inverno superano spesso i 40°C. Tutto è da attribuire ad un fenomeno meteorologico particolare, che ha portato sulla zona desertica correnti di aria gelida che hanno trasformato quella fetta di mondo desertico in una sorta di scenario marziano, ricoprendo di un manto bianco di neve, le dune solitamente ricoperte di sabbia color arancione. E' probabile che questa alchemica mescolanza di caldo e gelo sia l'effetto di un meteo impazzito se non, come ipotizzato da alcuni, l'inizio di un cambiamento climatico che trasformerà il deserto del Sahara in un verde giardino nel giro di soli 15.000 anni. Temo di non poter assistere al nuovo spettacolo.



Fotografia: Discover_DZ



SOMMARIO

Notiziario Allergologico, Anno 37 - 2018 - Volume 36, n. 1

EDITORIALE

2

Giovanni Mistrello



AGGIORNAMENTI

La Sindrome della Enterocolite Allergica (SEA): 3

Aggiornamento pratico, in particolare sulla forma acuta

Stefano Miceli Sopo, Serena Monaco, Claudia Fantacci, Alberto Romano, Giulia Bersani.

La celiachia: cause e meccanismi patogenetici 13

di una malattia complessa

Barbara Frossi, Marco De Carli.

Test di provocazione nasale allergene-specifico 23

Pratica clinica e frontiere della ricerca

Stefania Arasi, MD, PhD.

Linfociti B regolatori: ruolo nello sviluppo 31

e nella terapia delle malattie allergiche

Francesca Mion e Carlo E.M. Pucillo.



SHORT REPORT

Reazioni avverse ai tatuaggi 42

Francesco Furci



RECENSIONI

Gianni Mistrello

Uova di pesce, delizia e croce 44

J. Minhas, J.A. Saryan and D. S.Balekian.

Un'emergenza sottostimata: la sindrome di Kounis 45

Yanagawa Y. et al.

Interazione Pru p 3/ligando: possibili effetti sul legame con le IgE. 46

Dubiela P. et al.

Un curioso caso di shock anafilattico: attenzione alle collane 47

Coattrenec Y. et al.



EDITORIALE

a cura di Gianni Mistrello

Nel meditare sulla presentazione di questo numero del Notiziario mi è venuta alla mente la scena di “Un americano a Roma”, in cui Sordi, nei panni di giovanottone di borgata ossessionato dall’America e dai suoi miti, rientrando in casa a tarda notte, respinge con sdegno il piatto di spaghetti lasciatogli dalla madre sul tavolo della cucina, in favore di un pasto (“ammericano” secondo lui) costituito da



pane, mostarda, marmellata e condito con un po’ di latte. La scena continua con Sordi che dopo il primo boccone del disgustoso intruglio (“Ammazza che zozzeria!”), rivolge lo sguardo verso il piatto di spaghetti e di fronte alla provocazione insistente di quel piatto fumante cede alla tentazione, divorandoli ma non prima di aver esclamato la famosa frase: “Macarò...m’hai provocato e io te distruggo, I mo’ te magno!”.

Ecco purtroppo chi è affetto da celiachia deve continuare a resistere alla tentazione di divorare quel piatto di spaghetti fumante (immagino assai ricco di glutine). La celiachia è uno degli argomenti presi in considerazione in questo numero. Ne trattano in maniera chiara, con uno sguardo proiettato verso il futuro, la Dottoressa Frossi e il Dottor De Carli. Come noto la celiachia è una malattia infiammatoria cronica intestinale che si manifesta in soggetti geneticamente predisposti in seguito all’ingestione del glutine contenuto in diversi cereali. Nell’articolo gli autori si soffermano inizialmente sugli elementi che caratterizzano questa patologia non IgE-mediata; successivamente essi arricchiscono il loro contributo illustrando le scoperte più recenti dei meccanismi patogenetici della celiachia, sottolineando in particolare il possibile ruolo di un nuovo attore, rappresentato dal mastocita.

La celiachia è solo una delle reazioni indesiderate (non –IgE mediate) del nostro organismo in qualche modo associata all’alimentazione. Un altro esempio è rappresentato dalla sindrome della enterocolite allergica (FPIES, Food Protein Induced Enterocolitis Syndrome), scatenata dall’ingestione di uno o più alimenti. In questo numero il dottor Miceli Sopo ed il suo gruppo presentano un aggiornamento sulla forma acuta (la più frequente) di questa patologia che colpisce soprattutto i neonati e i bambini. Si tratta di una allergia alimentare non –IgE mediata, quindi con test allergologici negativi, e diver-

samente dalle forme IgE-mediate, i sintomi (vomito associato nelle forme più gravi a pallore e letargia, più raramente a diarrea e sangue nelle feci) non compaiono subito dopo l’assunzione dell’alimento responsabile, bensì qualche ora dopo. Gli autori dell’articolo illustrano le peculiarità della FPIES, fornendo un quadro esaustivo su come conoscere e riconoscere tale patologia. Degli altri due articoli che troverete in questo numero,

il primo riguarda una sorta di rivalutazione del test di provocazione nasale (TPN) anche alla luce della individuazione di una nuova entità clinica, la rinite allergica locale (LAR), uno specifico fenotipo di rinite allergica (AR). Questa patologia, caratterizzata da una negatività IgE ai test allergologici, sia cutanei che sierici, a fronte di una storia suggestiva di AR, può essere evidenziata dall’esecuzione di un TPN specifico. Autrice dell’articolo la Dottoressa Arasi che sottolinea come il TPN specifico rappresenti uno strumento cruciale per identificare in maniera precoce i soggetti affetti da LAR, evitando così in questi soggetti l’aggravamento della sintomatologia allergica visto che l’infiammazione del naso si può poi facilmente propagare per contiguità anatomica ad altri tessuti con conseguente rischio di congiuntivite e asma. Il secondo articolo (autori Dottoressa Mion e Prof. Puccillo) concentra l’attenzione su un nuovo attore della risposta immunologica rappresentato da un particolare sottogruppo di linfocita B, i linfociti B regolatori (Breg). Queste cellule sono in grado di sopprimere le risposte immunitarie evitando, attraverso la produzione di citochine quali IL-10, IL 35 e TGF- β , che le suddette risposte si perpetuino con conseguente rischio di fenomeni autoimmuni. Gli autori dell’interessantissimo articolo forniscono una panoramica aggiornata sul ruolo svolto da queste cellule nella patogenesi di alcune manifestazioni allergiche (asma, allergie alimentari e dermatite da contatto) e come stimolarne la loro attivazione al fine di indurre fenomeni di tolleranza specifica. Particolarmente intrigante la conclusione dell’articolo; sulla base di recenti evidenze gli autori sottolineano il possibile legame tra linfociti Breg e ipotesi igienica, aprendo così nuovi orizzonti sul possibile management terapeutico delle malattie allergiche.

Auguro a tutti una buona lettura



La Sindrome della Enterocolite Allergica (SEA)

Aggiornamento pratico, in particolare sulla forma acuta.

Not Allergol 2018; vol. 36: n. 1 : 3-12

Stefano Miceli Sopo,
Serena Monaco,
Claudia Fantacci,
Alberto Romano,
Giulia Bersani

Allergologia Pediatrica, UOC Pediatria,
Area Pediatrica, Polo delle Scienze della Salute
della Donna e del Bambino
Fondazione Policlinico Universitario
Agostino Gemelli
Facoltà di Medicina e Chirurgia,
Università Cattolica del Sacro Cuore,

INTRODUZIONE

La Sindrome della Enterocolite Allergica (SEA) è detta in inglese Food Protein Induced Enterocolitis Syndrome (FPIES) ed è classificata tra le allergie alimentari non IgE-mediate (1) o, più specificatamente, cellulose-mediate (2). La SEA si divide in acuta e cronica. Di quest'ultima forma si dirà solo un breve cenno, oggi giorno è molto rara. Era di certo più frequente negli scorsi decenni: le prime segnalazioni di Geraldine Powell sulla SEA (3), alla fine degli anni '70, hanno riguardato appunto forme croniche.

LA SEA CRONICA

Interviene a seguito dell'ingestione quotidiana dell'alimento colpevole in lattanti molto piccoli, prima dei sei mesi di vita, pertanto in causa sono sempre latte vaccino o di soia. Sono stati segnalati

casi di SEA cronica in cui l'ingestione dell'alimento colpevole era avvenuta attraverso il latte materno (4-6). I sintomi includono piccoli vomiti intermittenti,

diarrea cronica, sangue nelle feci (macroscopico o solamente microscopico) e, soprattutto, riduzione della velocità di crescita ponderale. Laboratoristicamente

RIASSUNTO

Parole chiave e acronimi

- SEA (sindrome della enterocolite allergica)
- TPO (test di provocazione orale)

La Sindrome della Enterocolite Allergica acuta è oggi la più frequente delle allergie alimentari non IgE-mediate ad espressione gastrointestinale, conoscerla per riconoscerla è dunque importante. Il sintomo peculiare è il vomito, ripetuto ed a proiettile, che insorge ad 1-4 ore dall'inizio della ingestione dell'alimento colpevole. Nelle forme più gravi sono presenti pallore e letargia, più raramente anche la diarrea. Peculiare è anche la rapida risoluzione dei sintomi, di solito entro 6 ore dall'esordio (salvo che per la diarrea). La terapia dell'episodio acuto consiste nella somministrazione di liquidi (per via venosa nelle forme moderate e gravi), la somministrazione di cortisone è tradizionale ma senza documentata efficacia, promettente è la terapia con ondansetrone, per via intramuscolare o venosa. La terapia a lungo termine prevede la eliminazione dell'alimento colpevole dalla dieta. L'acquisizione della tolleranza è pressochè la regola, la verifica tramite test di provocazione orale è opportuna a 12-18 mesi dall'ultima reazione avversa.



sono o possono essere presenti: aumento dei globuli bianchi (in particolare neutrofili ed eosinofili), aumento del numero delle piastrine, anemia, acidosi metabolica, metemoglobinemia, ipoalbuminemia, ipoprotidemia.

Il lattante con SEA cronica torna alla normalità da 3 a 10 giorni dopo la eliminazione dalla dieta dell'alimento colpevole e l'inizio della assunzione di una formula estensivamente ipoallergenica.

Se, dopo un periodo di eliminazione dell'alimento colpevole, il lattante con SEA cronica viene riesposto ad esso, egli manifesterà sintomi acuti compatibili, appunto, con la SEA acuta: ciò, per esempio, è quanto avviene a seguito di un eventuale test di provocazione orale (TPO), messo in atto al fine di emettere una diagnosi definitiva di SEA. Ma potrebbe avvenire anche per una ingestione accidentale dell'alimento colpevole, e basterebbe.

LA DIAGNOSI DI SEA

La SEA, infatti, può essere diagnosticata anche solamente sulla base della anamnesi, non è sempre necessario il TPO per giungere alla diagnosi definitiva e alla dieta di eliminazione terapeutica riguardando l'alimento colpevole. Nel tempo sono stati pubblicati diversi pannelli di criteri diagnostici per la SEA, nella tabella 1 sono elencati i più frequentemente citati (7-12).

Dai primi, di Powell (7), agli ultimi, della prima Consensus internazionale sulla SEA (12), è possibile notare come il vomito (ripetuto, a proiettile) acquisti



sempre più importanza, fino a che la sua presenza diventa l'unico criterio maggiore (12); l'altro sintomo gastrointestinale, la diarrea, compie invece il percorso inverso, perde rilevanza (come è normale, visto che si è nel tempo passati da una prevalenza di forme croniche ad una di forme acute). Insomma, la SEA, e intendiamo da adesso riferirci solamente alla sua forma acuta, è caratterizzata dal vomito. Esso appare solitamente con una latenza media di 2 ore (range: 1-4 ore) dall'inizio dell'ingestione dell'alimento colpevole, senza prodromi (quindi in un bambino in pieno benessere clinico), è a proiettile e ripetuto (raramente durante un episodio acuto di SEA si manifestano meno di 4 vomiti). Nelle forme moderato-gravi il vomito è accompagnato da pallore e letargia, anche profondi. L'episodio acuto di SEA si risolve in poche ore, nella maggioranza dei casi il bambino torna alla normalità nell'arco di 6 ore dall'esordio dei sintomi, anche se può comparire più tardivamente diarrea lieve, comunque anche questa si risolve abitualmente entro 24 ore dall'inizio dell'episodio.

La maggior parte dei pannelli relativi ai

criteri diagnostici della SEA (Tabella 1) prevedono che nella storia siano presenti almeno 2 episodi a seguito della ingestione dello stesso alimento: con 2 episodi si riduce molto la probabilità che si tratti di altro che la SEA. In caso contrario, se l'episodio è stato solamente uno, il TPO è abitualmente richiesto per l'emissione di una diagnosi ed una dieta di eliminazione definitive. Ciò non vale per i criteri elaborati dalla Consensus internazionale del 2017 (12), riportati anch'essi nella tabella 1: per essi potrebbe essere sufficiente anche un solo episodio, magari grave e con accesso al pronto soccorso, ma unico. Per questi nuovi ed importanti criteri, infatti, per emettere la diagnosi di SEA acuta bisogna che siano soddisfatti il criterio maggiore e 3 dei minori (Tabella 1); il problema è che un bambino con un episodio importante di gastroenterite acuta facilmente soddisferà il criterio maggiore e i criteri 5, 6 e 7 (tabella 1) e la diagnosi di SEA acuta potrebbe formalmente essere emessa. Gli estensori della Consensus del 2017, consapevoli di ciò, hanno, nelle note alla tabella dei criteri, precisato che: "Se è accaduto solamente un episodio, un TPO diagnostico deve essere fortemente preso in considerazione ai fini della conferma della diagnosi, specialmente perché la gastroenterite acuta virale è molto comune in questa fascia d'età". Sempre nelle note, è sottolineato il fatto che nella SEA acuta, diversamente che nella maggioranza degli episodi di gastroenterite acuta, i sintomi si risolvono in poche ore. Peccato che questi due importanti aspetti siano presenti solamente nelle note e non nei criteri strettamente detti. Noi preferiamo



Tabella 1

Criteria diagnostici per la SEA pubblicati tra il 1986 e il 2017

Powell, 1986 (vb 7)	Sicherer, 1998 (vb 8)	Leonard, 2012 (vb 9)
<ol style="list-style-type: none"> 1. Risoluzione del vomito, della diarrea e dei ritrovamenti diagnostici nelle feci (sangue e leu-cociti) dopo l'esclusione di tutti gli antigeni dalla dieta. 2. Nessun'altra causa di colite di-mostrabile. 3. I sintomi non si ripresentano e la crescita è normale per un mese con una formula ipoaller-genica, come il latte materno o l'idrolisato di caseina, come unico alimento. 4. Il test di provocazione con il latte vaccino o il latte di soia, o altri alimenti offendenti, induce la ricomparsa dei sintomi. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Età inferiore ai 9 mesi all'esordio. 2. L'esposizione ripetuta all'alimento incriminato provoca diarrea e/o vomito ripetuto entro 24 ore, in assenza di altre spiegazioni per i sintomi. 3. L'alimento incriminato non provoca altri sintomi al di fuori di quelli gastrointestinali. 4. L'esclusione della proteina offendente dalla dieta comporta una risoluzione dei sintomi e/o un test di provocazione orale standardizzato provoca diarrea e/o vomito entro 24 ore dalla somministrazione dell'alimento. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Età inferiore ai 9 mesi alla diagnosi. 2. L'esposizione ripetuta all'alimento responsabile provoca sintomi gastrointestinali in assenza di una causa alternativa. 3. Assenza di sintomi che potrebbero suggerire una reazione IgE-mediata. 4. L'esclusione dell'alimento responsabile dalla dieta comporta una risoluzione dei sintomi. 5. La riesposizione o il test di provocazione orale provocano i sintomi tipici entro 4 ore.
Miceli Sopo, 2013 (vb 10)	Leonard, 2015 (vb 11)	Nowak-Węgrzyn, 2017 (vb 12)
<ol style="list-style-type: none"> 1. Età inferiore ai 2 anni all'esordio (caratteristica frequente ma non mandatoria). 2. L'esposizione all'alimento incriminato provoca vomito ripetuto e importante, pallore, iporeattività, e letargia tra 2 e 4 ore. La diarrea può essere presente, molto meno frequentemente e più tardivamente. I sintomi durano alcune ore, generalmente meno di 6. 3. Assenza di sintomi che potrebbero suggerire una reazione IgE-mediata. 4. L'esclusione della proteina offendente dalla dieta comporta la risoluzione dei sintomi. 5. La riesposizione o il test di provocazione orale provocano i sintomi tipici tra 2 e 4 ore. Due episodi tipici sono necessari per emettere la diagnosi definitiva 	<p>Criteria maggiori</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Vomito ripetuto o diarrea entro 6 ore dall'ingestione dell'alimento. 2. Assenza di manifestazioni cutanee o respiratorie suggestive di un'allergia IgE-mediata. 3. L'esclusione dell'alimento responsabile dalla dieta comporta una risoluzione dei sintomi. 4. La riesposizione o il test di provocazione provocano i sintomi tipici. <p>Criteria minori</p> <ol style="list-style-type: none"> a) Ipotensione. b) Letargia, pallore, o ipotono. c) Negatività degli skin prick test e delle IgE specifiche. d) Assenza di febbre o ipotermia (< 36°C). 	<p>Criteria maggiori</p> <p>Vomito nelle 1-4 ore successive all'ingestione dell'alimento sospetto e assenza dei classici sintomi cutanei o respiratori delle reazione IgE-mEDIATE.</p> <p>Criteria minori</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Un secondo (o più) episodio di vomito ripetuto dopo l'ingestione dello stesso alimento sospetto. 2. Episodio di vomito ripetuto 1-4 ore dopo l'ingestione di un differente alimento. 3. Estrema letargia durante una reazione sospetta. 4. Pallore marcato durante una reazione sospetta. 5. Necessità di accesso al Pronto Soccorso durante una reazione sospetta. 6. Necessità di supporto fluido endovenoso durante una reazione sospetta. 7. Diarrea entro 24 ore (generalmente 5-10 ore). 8. Ipotensione. 9. Ipotermia.



emettere la diagnosi di SEA acuta se nella storia sono presenti 2 o più episodi, di cui almeno uno con pallore e letargia; in caso contrario la diagnosi sarà solamente presuntiva ed il TPO di conferma sarà necessario per arrivare ad una diagnosi definitiva. Quindi, siamo senz'altro a favore dei criteri proposti dalla Consensus internazionale del 2017 (12), considerando però le note alla tabella come parte integrante dei criteri stessi (Tabella 1). Un dettaglio importante dei vari pannelli di criteri diagnostici riguarda l'età del bambino all'esordio della SEA. Per la pioniera Geraldine Powell doveva essere inferiore ai 2 mesi (3), ma, come detto, lei descriveva la SEA cronica. Il limite si è spostato a 9 mesi con Scott Sicherer (8), a 2 anni con Miceli Sopo et al (10) (che proposero questo avanzamento per via della SEA da pesce che può anche



avere un esordio appunto intorno ai 2 anni), per poi scomparire del tutto, ad esempio dai criteri della Consensus internazionale (12). Serafini et al (13) hanno infatti descritto una ragazza con una SEA acuta da funghi esordita a 7 anni, fino ad allora non aveva mai mangiato funghi. La SEA acuta, pur raramente, esordisce anche in età adulta (14). Insomma, il criterio diagnostico della età è stato abolito, la SEA acuta si può presentare a qualunque età.

IL TPO PER LA SEA

Se la storia non è sufficiente ad emettere la diagnosi definitiva di SEA, allora il TPO si rende necessario (sempre che non ci si accontenti di una diagnosi solamente probabile): infatti, i test allergometrici cutanei o sierici non sono di aiuto, circa nell'80%-90% dei casi risultano negativi e anche quando risultano positivi non sono per nulla definitivi. Geraldine Powell (7) a suo tempo enunciò dei parametri la cui presenza era considerata necessaria per considerare un TPO per SEA fallito (= positivo) e quindi per rendere definitiva una diagnosi fino a quel momento solamente sospettata; si richiedeva, tra l'altro, un netto aumento dei globuli bianchi, rispetto al livello basale, in caso di reazione avversa acuta. Questo dettaglio è ancora richiesto nei TPO effettuati a scopo di ricerca, ma non più, almeno non obbligatoriamente, nella pratica clinica: il medico giudica un TPO fallito o passato sulla base della comparsa del vomito ripetuto, possibilmente anche del pallore e della letargia, nella tabella 2 sono riportati i criteri che la Consensus

internazionale del 2017 (12) ha redatto. E' da tenere presente, come precisato nelle note della tabella stessa, che l'utilizzo dell'ondansetron, di cui ridiremo a proposito del trattamento dell'episodio acuto, può bloccare la reazione avversa e quindi non tutti i criteri potrebbero essere assolti, per esempio potrebbero mancare il pallore e la letargia. Ebbene, il medico ha la facoltà di giudicare fallito il TPO anche in assenza del completo rispetto dei suddetti criteri, basta il vomito ripetuto come già detto.

Le modalità di conduzione del TPO, le precauzioni da prendere e la tempistica di somministrazione dell'alimento incriminato sono considerabili strettamente specialistici e non verranno trattati in questa revisione (Tabella 2).

DIAGNOSI DIFFERENZIALE

I sintomi ed i segni clinici della SEA acuta non sono specifici e quindi la diagnosi differenziale è vasta. Certamente però ciò che bisogna escludere per prima cosa è la gastroenterite acuta: anche in assenza di febbre, è la malattia che più può assomigliare da un episodio acuto di SEA. Tuttavia, noi dobbiamo sempre tener presenti due caratteristiche abbastanza peculiari della SEA acuta: a) il vomito ripetuto insorge a 1-4 ore di distanza dall'ingestione colpevole in un bambino che sta peraltro bene; b) i sintomi acuti si risolvono in poche ore (massimo 6) ed il bambino torna a stare bene come prima. Altre frequenti misdiagnosi sono la sepsi (a causa del pallore e della letargia a volte molto marcati, e della leucocitosi neutrofila), l'addome acuto (a causa naturalmente del



vomito ripetuto e a proiettile), l'anafilassi (soprattutto in presenza di ipotensione sistolica). Anche le malattie metaboliche rientrano nella diagnosi differenziale della SEA (15). Il ritardo diagnostico riguardo la SEA è ancora la regola (16).

ALIMENTI COLPEVOLI

Virtualmente tutti gli alimenti sono in grado di causare la SEA acuta (17, 18). In Europa e negli USA, gli alimenti più frequentemente in causa sono il latte vaccino, la soia, i cereali. Il riso, considerato abitualmente un cibo molto poco allergizzante, è invece il più frequente responsabile di SEA acuta in Australia (19). In Italia, il pesce è l'alimento solido più frequentemente causa di SEA acuta (20), ed in assoluto è secondo solamente al latte vaccino; l'uovo si colloca in terza posizione, seguito dal riso (16). Anche in Spagna il pesce è l'alimento solido più frequentemente in causa (21). Vi sono quindi variazioni geografiche riguardo la frequenza degli alimenti incriminati, ed esse non sono spiegate a sufficienza dalle variazioni nelle abitudini alimentari.

Le variazioni geografiche riguardano anche altri aspetti della SEA acuta: per esempio, nella maggioranza dei casi la SEA è determinata solamente da un alimento, tuttavia la prevalenza della SEA determinata da più alimenti (cosiddetta SEA multipla) varia in relazione all'area geografica, ed è decisamente più frequente negli USA che in Italia. Questa variazione può anche dipendere dall'adozione di criteri diagnostici più o meno conservativi. Infatti, Ruffner et al (22) hanno rilevato il pallore in circa il 5% dei loro



Tabella 2

Criteri diagnostici per l'interpretazione del TPO in pazienti con una storia di SEA possibile o certa

CRITERIO MAGGIORE	CRITERI MINORI
Vomito nell'intervallo tra 1 e 4 ore dopo l'ingestione dell'alimento sospetto e assenza dei classici sintomi allergici cutanei o respiratori IgE-mediati	<ol style="list-style-type: none"> 1. Letargia 2. Pallore 3. Diarrea 5-10 ore dopo l'ingestione dell'alimento 4. Ipotensione 5. Ipotermia 6. Aumentata conta dei neutrofilici di ≥ 1500 neutrofilici al di sopra della conta basale
<p><i>Il TPO sarà considerato diagnostico di SEA (cioè positivo) se il criterio maggiore è accompagnato da ≥ 2 criteri minori. Vengono tuttavia suggeriti 2 importanti puntualizzazioni: (1) con il rapido uso dell'ondansetron, molti dei criteri minori come il vomito ripetuto, il pallore e la letargia possono essere evitati, e (2) non tutte le strutture in cui si svolgono TPO hanno la possibilità di eseguire conte di neutrofilici tempestivamente. Pertanto il medico curante potrebbe decidere di giudicare un TPO come diagnostico in alcuni casi, anche se è soddisfatto solo il criterio maggiore. Tuttavia, nei TPO eseguiti per scopi di ricerca, gli operatori dovrebbero attenersi rigorosamente ai criteri per la positività del TPO.</i></p> <p style="text-align: right;"><i>modificato dalla vb 12</i></p>	

casi, tra i quali meno del 50% aveva una SEA da un solo alimento; Miceli Sopo et al (16) hanno rilevato il pallore in circa l'80% dei loro casi, tra i quali l'85% aveva una SEA da un solo alimento: ciò significa che i criteri adottati da Ruffner et al (22) sono stati meno restrittivi, veniva accettata come diagnosi definitiva di SEA anche una storia priva di pallore e letargia, che sono segni di gravità maggiore dell'episodio, e questo può aver condizionato con molta probabilità anche la prevalenza di SEA multipla.

La questione della SEA multipla o meno non è propriamente di poco conto, da essa sono scaturiti suggerimenti per un divezzamento abbastanza prudente (23)

che sono rimasti in vigore per circa un decennio e che solamente di recente sono stati empiricamente modificati nel senso di una lievemente maggiore libertà (12). Oggi viene quindi suggerito di iniziare a domicilio con frutta e vegetali, seguiti da carne rossa e cereali (17); la tolleranza ad un alimento è considerato fattore prognostico favorevole per gli altri alimenti appartenenti allo stesso gruppo. Nella tabella 3 sono riprodotti i suggerimenti "empirici" della Consensus Internazionale sulla SEA (12) per un divezzamento a domicilio, i cibi sono divisi in 3 categorie di rischio (basso, moderato, alto) (Tabella 3). Noi, invece, abbiamo pensato che se un rischio c'è, esso non dovrebbe essere corso



Tabella 3

Suggerimenti empirici per la scelta degli alimenti per lo svezzamento dei bambini con SEA

Età e stadi	Alimenti a rischio minore*	Alimenti a rischio intermedio*	Alimenti a rischio maggiore*
4-6 mesi	Verdure		
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Cominciare con passati più fini e passare progressivamente a quelli più spessi ➤ Scegliere alimenti ricchi di ferro ➤ Aggiungere verdure e frutta 	Broccolo cavolfiore pastinaca rapa zucca	Zucchini carota patata bianca fagiolo verde	Patata dolce pisello verde
6 mesi	Frutta		
I cibi complementari non dovrebbero essere introdotti dopo i 6 mesi di età: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Nel bambino allattato al seno, cibi ad alto contenuto di ferro o una supplementazione marziale (1 mg/Kg/die) sono indicate ai 6 mesi di età ➤ Continuare ad aumentare la varietà di frutta, verdura, legumi, cereali, carni e altri alimenti una volta tollerati 	Mirtillo fragola prugna anguria pesca avocado	Mela pera arancia	Banana
8 mesi di età	Alimenti ad alto contenuto di ferro		
Offrire alimenti cucinati con cottura delicata e soffici dagli 8 mesi di età	Agnello, miglio, quinoa arricchita	Manzo, fiocchi d'avena e mais arricchiti, frumento (frumento integrale e arricchito), orzo arricchito	Alimenti a più alto contenuto di ferro, riso e avena arricchiti
12 mesi di età	Altro		
Offrire alimenti come carni tritate, verdura cucinata con cottura delicata, frutta e cereali	Burro di noci e di semi (sesamo, girasole, etc.)	Arachidi, altri legumi (diversi dal pisello verde)	Latte, soia, pollame, uova, pesce

Questa tabella dovrebbe essere considerata tenendo conto delle seguenti osservazioni:

A. Allattamento al seno esclusivo fino a 4-6 mesi di età e prosecuzione dell'allattamento al seno attraverso durante il primo anno di vita o più fino a quando sia reciprocamente desiderato dalla madre e dal bambino. B. Se un lattante tollera molteplici alimenti precoci, la successiva introduzione può essere più liberale. In più, la tolleranza a un alimento all'interno di un gruppo di alimenti (pisello verde) è considerata un indicatore prognostico favorevole di tolleranza nei confronti degli altri alimenti dello stesso gruppo.

*La valutazione del rischio è basata sull'esperienza clinica e sui report pubblicati sui trigger della SEA.

modificato dalla vb 12



STORIA NATURALE

a domicilio: e quindi, abbiamo proposto l'ingestione di una miscela di alimenti considerati appunto a rischio (cereali [in particolare riso], legumi, pollame) nel corso di un TPO in ambiente ospedaliero (24). Nel tempo, abbiamo valutato questa procedura oltre al limitato numero di pazienti oggetto della pubblicazione e abbiamo osservato un solo caso di reazione avversa al TPO con la miscela suddetta, e particolarmente in un bambino con SEA da riso. In quel caso, tramite singoli TPO, fu individuato il grano come secondo alimento causante SEA (oltre al riso). In base alla nostra esperienza, dunque, noi suggeriamo che, almeno per i bambini italiani affetti da SEA, non è necessario adottare cautele durante il divezzamento (salvo naturalmente che per l'alimento noto come offendente e la categoria a cui appartiene, per esempio riso e grano sono entrambi cereali) e come noi consigliamo gli autori spagnoli (21) per i bambini spagnoli (la precisazione della nazionalità è dovuta alla già citata variabilità geografica dell'espressione clinica della SEA acuta). Per la categoria cui l'alimento indice appartiene la prudenza è d'obbligo: se un bambino riceve la diagnosi di SEA da merluzzo è giusto e doveroso presumere che sia allergico a tutti i pesci. Per questo specifico esempio, anche una possibile reazione avversa a crostacei-celenterati-molluschi deve essere considerata possibile, anche se non probabile: noi suggeriamo di effettuare un TPO in ambiente ospedaliero con una miscela di gamberetti, seppie, vongole e anche in questo caso abbiamo osservato una reazione avversa alla suddetta miscela solamente in un caso. Noi adoperiamo le miscele di alimenti quando consideriamo

che il rischio di reazione avversa sia basso. Quando il rischio è alto, proponiamo il TPO con il singolo alimento: è il caso della soia nel caso di un bambino con SEA da legumi, per esempio da piselli; oppure del grano in un bambino con SEA da riso, come già detto; o del tonno in uno con SEA da merluzzo. Quindi, noi adottiamo la prudenza (che consiste nell'effettuare TPO con i singoli alimenti) per gli alimenti appartenenti alla stessa categoria dell'alimento offendente.

E talvolta non basta neanche questa prudenza. In due casi di SEA da pesce che avevano tollerato (nel corso di TPO in ospedale e poi anche a domicilio) pesci diversi da quello offendente, abbiamo osservato in seguito la perdita della tolleranza anche nei confronti di questi altri pesci nel corso di alcuni mesi (25). Ciò dimostra che molto dobbiamo ancora imparare sulla SEA ed ogni nuova conoscenza può portare a modifiche dei suggerimenti gestionali, soprattutto dietetici, come è giusto che sia. Per esempio, una domanda che ci si potrebbe porre nel caso della SEA da latte vaccino o da uovo di gallina riguarda la possibilità che la cottura renda tollerabile l'alimento offendente, cosa che, come è noto, accade per le allergie alimentari IgE-mediate per la maggioranza dei bambini affetti (26, 27). Per la SEA la questione non è ben definita, esistono ancora pochi casi pubblicati (28, 29), pare che sia più possibile per il latte vaccino che per l'uovo, il suggerimento attuale è di eliminare l'alimento offendente sotto tutte le sue forme, anche cotto. L'evitamento di prodotti sulla cui etichetta è riportata la frase precauzionale "può contenere tracce di ..." non sembra però necessario (18).

Come già scritto, la SEA può esordire a qualunque età, anche adulta, tuttavia è pure vero che la stragrande maggioranza dei casi inizia nel primo anno di vita, in particolare la SEA da latte vaccino o da latte di soia esordiscono più frequentemente nei primi sei mesi di vita. La SEA da alimenti solidi esordisce invece più frequentemente nel secondo semestre di vita, molto probabilmente seguendo le epoche di introduzione dei vari cibi. Per quanto possa apparire insolito, la SEA può esordire anche dopo numerose ingestioni innocue.

Molto più di rilievo dell'epoca di esordio, almeno dal punto di vista pratico, sono la probabilità e l'epoca di risoluzione, ovvero di acquisizione della tolleranza. "Guarirà?" domandano i genitori, e per il momento si può rispondere che quasi certamente sì, non sono descritti in letteratura casi di SEA persistenti a vita, anche se almeno fino alla soglia dell'adolescenza è possibile (30). L'epoca di acquisizione della tolleranza varia a seconda dell'alimento implicato e delle zone geografiche innanzitutto. La SEA da latte vaccino e da soia sono quelle a più rapida acquisizione della tolleranza: per la maggioranza dei bambini affetti l'età è intorno ai 2 anni, almeno per quelli italiani (23), per i bambini statunitensi sembra spostata fino ai 5 anni e per i bambini con IgE specifiche positive (la cosiddetta SEA atipica) per latte vaccino anche più avanti (30). Tra i 3 ed i 5 anni di vita si colloca l'acquisizione della tolleranza per i cibi solidi, dai cereali al pesce (12).

Conoscere l'epoca di acquisizione della



Tabella 4

Gestione dell'episodio di SEA acuta presso la struttura sanitaria

Sintomi di presentazione		
Lieve	Moderato	Severo
Sintomi		
1-2 episodi di vomito No letargia	>3 episodi di vomito e letargia lieve	>3 episodi di vomito, con letargia severa, ipotono, aspetto cianotico
Gestione		
<ol style="list-style-type: none"> 1. Tentare reidratazione per via orale (es, allattamento al seno o liquidi chiari) 2. In caso di età uguale o superiore 6 mesi: considerare ondansetron im, 0.15 mg/Kg/dose; dose massima 16 mg 3. Attendere la risoluzione per circa 4-6 ore dopo l'inizio di una reazione 	<ol style="list-style-type: none"> 1. In caso di età superiore a 6 mesi: somministrare ondansetron im, 0.15 mg/Kg/dose; dose massima 16 mg 2. Considerare il posizionamento di un accesso venoso periferico per un bolo di 20 ml/Kg di soluzione fisiologica, da ripetere se necessario 3. Trasferire il paziente al Pronto Soccorso o in Terapia Intensiva in caso di ipotensione persistente o severa, shock, estrema letargia, o distress respiratorio 4. Monitorare i segni vitali 5. Attendere la risoluzione per almeno 4-6 ore dopo l'inizio di una reazione 6. Dimettere a domicilio se il paziente è in grado di tollerare liquidi chiari 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Posizionare un accesso venoso periferico e somministrare un bolo di 20 ml/Kg di soluzione fisiologica rapidamente: ripetere se necessario per correggere l'ipotensione 2. In caso di età uguale o superiore a 6 mesi: somministrare ondansetron ev, 0.15 mg/Kg/dose; dose massima 16 mg 3. Se il posizionamento dell'accesso venoso periferico è ritardato dalla difficoltà di reperirlo e l'età è uguale o superiore a 6 mesi, somministrare ondansetron im, 0.15 mg/Kg/dose; dose massima 16 mg 4. Considerare la somministrazione di metilprednisolone ev, 1 mg/Kg; dose massima 60-80mg 5. Monitorare e correggere squilibri acido-base ed elettrolitici 6. Correggere la metemoglobinemia, se presente 7. Monitorare i segni vitali 8. Dimettere dopo 4-6 ore dall'esordio della reazione, quando il paziente è tornato nelle sue condizioni basali e tollera fluidi orali 9. Trasferire il paziente al Pronto Soccorso o in Terapia Intensiva in caso di ipotensione persistente o severa, shock, estrema letargia, o distress respiratorio

modificato dalla vb 12

tolleranza serve per stabilire il momento opportuno per effettuare un TPO, appunto con lo scopo di questa verifica. Se la diagnosi definitiva di SEA si può fare tramite la raccolta della storia e appellandosi ai pannelli di criteri pubblicati, per la verifica della eventuale acquisizione della tolleranza non si può prescindere

re dal TPO (a meno che i genitori non ci abbiano audacemente provato a domicilio per fatti loro, evenienza non rara). Comunque, queste epoche di acquisizione della tolleranza non sono frutto di studi ad hoc con TPO seriati, davvero difficili da condurre; per cui non è inverosimile che esse possano in futuro essere

anticipate. Per esempio, noi abbiamo osservato che la maggioranza dei bambini con SEA da uovo acquisisce la tolleranza in media intorno ai 30 mesi, almeno per quanto riguarda l'uovo cotto (dati non pubblicati), invece che in media intorno ai 50 mesi come si evince dagli studi pubblicati in merito ad oggi (21, 22).



Comunque, a causa della debolezza dei dati raccolti in merito, seguire la regola empirica di effettuare un TPO a 12-18 mesi dall'ultima reazione avversa è ancora ragionevole (12).

TRATTAMENTO DELL'EPISODIO ACUTO

Nelle tabelle 4 e 5 sono descritte le possibilità di trattamento di un episodio acuto di SEA a seconda della sua gravità e a seconda se accade a seguito di un TPO (e quindi in ospedale) oppure per ingestione accidentale dell'alimento colpevole (e quindi a domicilio o comunque non in ospedale). La reazione acuta di grado lieve-moderato può essere trattata con reidratazione per via orale (anche somministrando latte materno se disponibile), anche a domicilio. Ma la SEA acuta potrebbe anche esitare in shock ipovolemico e quindi è molto importante essere pronti a ripristinare l'equilibrio emodinamico attraverso l'infusione di liquidi per via venosa. La somministrazione di cortisone, sempre per via venosa, è tradizionalmente prevista, tenuto conto della presunta immunopatogenesi cellulo-mediata, ma non vi sono studi che supportino questa raccomandazione (12).

Studi preliminari riportano come efficace e promettente la terapia con ondansetron, un antagonista del recettore per la serotonina adoperato come antiemetico nel vomito post-chemioterapia e gravidico, somministrato per via intramuscolare o venosa (31). E' necessaria cautela nei pazienti con cardiopatie perché può causare aritmie fatali so-

prattutto nei portatori di sindrome del QT lungo: per questo motivo, alcuni autori suggeriscono la esecuzione di un ECG prima della sua somministrazione (31) (Tabella 4 e Tabella 5).

TRATTAMENTO A LUNGO TERMINE

Come facilmente immaginabile, esso deve comprendere l'eliminazione dell'alimento colpevole dalla dieta del bambino, la sua sostituzione con un idrolisato estensivo nel caso del latte vaccino (i lattini di altri mammiferi ad oggi non sono consigliati per via di possibili reazioni avverse da cross-reattività), il monitoraggio della possibile acquisizione della tolleranza, la consegna di un piano di azione in caso di reazioni avverse acute

da ingestione accidentale dell'alimento colpevole. Nel caso della SEA acuta da latte vaccino, la eventuale introduzione del latte cotto al forno deve essere effettuata per la prima volta in ospedale sotto sorveglianza medica (28); ciò vale anche per il latte di soia.

Dell'introduzione di altri cibi, diversi da quello colpevole anche come categoria, si è già detto e comunque si può, in caso di scelta di gestione prudente, fare riferimento alla tabella 4.

L'allattamento materno va naturalmente proseguito e favorito e la dieta della madre nutrice deve essere libera a riguardo dell'alimento colpevole a meno che non siano rilevabili manifestazioni sintomatiche nel lattante a seguito dell'assunzione dello stesso attraverso il latte materno (rarissime).



Tabella 5

Gestione dell'episodio di SEA acuta a domicilio

Episodio corrente	Lieve *	Moderato-severo
Sintomi	1-2 episodi di vomito No letargia o letargia lieve	>3 episodi di vomito e letargia moderata-severa
Gestione	Tentare reidratazione per via orale a domicilio (es, allattamento al seno o liquidi chiari)	Chiamare il 118 o recarsi in Pronto Soccorso

* Questo comportamento può essere posto in essere nel caso il bambino non abbia una storia di reazione grave. Se l'ha, bisogna chiamare il 118 o recarsi in pronto soccorso se l'alimento offendente è stato certamente ingerito, anche in assenza di sintomi o in presenza di qualsiasi sintomo indipendentemente dalla gravità

modificato dalla vb 12



Bibliografia

1. Sampson HA, Aceves S, Bock SA, et al.-Food allergy: a practice parameter update-2014. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134:1016-25.e43.
2. Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, et al.-EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy.* 2014;69:1008-25.
3. Powell GK. Milk- and soy-induced enterocolitis of infancy. Clinical features and standardization of challenge. *J Pediatr.* 1978;93:553-60.
4. Miceli Sopo S, Monaco S, Greco M, et al.-Chronic food protein-induced enterocolitis syndrome caused by cow's milk proteins passed through breast milk. *Int Arch Allergy Immunol.* 2014;164:207-9.
5. Monti G, Castagno E, Liguori SA, et al.-Food protein-induced enterocolitis syndrome by cow's milk proteins passed through breast milk. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127:679-680.
6. Tan J, Campbell D, Mehr S. Food protein-induced enterocolitis syndrome in an exclusively breast-fed infant-an uncommon entity. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:873.
7. Powell GK. Food protein-induced enterocolitis of infancy: differential diagnosis and management. *Compr Ther.* 1986 Feb;12(2):28-37.
8. Sicherer SH, Eigenmann PA, Sampson HA. Clinical features of food protein-induced enterocolitis syndrome. *J Pediatr.* 1998;133:214-9.
9. Leonard SA, Nowak-Węgrzyn A. Clinical diagnosis and management of food protein-induced enterocolitis syndrome. *Curr Opin Pediatr.* 2012;24:739-45.
10. Miceli Sopo S, Greco M, Monaco S, et al. Food protein-induced enterocolitis syndrome, from practice to theory. *Expert Rev Clin Immunol.* 2013;9:707-15.
11. Leonard SA, Nowak-Węgrzyn A. Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome. *Pediatr Clin North Am.* 2015;62:1463-77.
12. Nowak-Węgrzyn A, Chehade M, Groetch M, et al.-International Consensus Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome-Executive Summary. *J Allergy Clin Immunol.* 2017; 139:1111-1126.
13. Serafini S, Bergmann MM, Nowak-Węgrzyn A, et al.-A case of food protein-induced enterocolitis syndrome to mushrooms challenging currently used diagnostic criteria. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2015;3:135-7.
14. Fernandes BN, Boyle RJ, Gore C, et al.-Food protein-induced enterocolitis syndrome can occur in adults. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130:1199-200.
15. Fiocchi A, Dionisi-Vici C, Cotugno G, et al.-Fruit-induced FPIES masquerading as hereditary fructose intolerance. *Pediatrics.* 2014 Aug;134(2):e602-5.
16. Miceli Sopo S, Giorgio V, Dello Iacono I, et al.-A multicentre retrospective study of 66 Italian children with food protein induced enterocolitis syndrome: different management for different phenotypes. *Clin Exp Allergy* 2012; 42:1257-1265.
17. Nowak-Węgrzyn A, Jarocka-Cyrta E, Moschione Castro A. Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2017;27:1-18.
18. Michelet M, Schluckebier D, Petit LM, et al.-Food protein-induced enterocolitis syndrome - a review of the literature with focus on clinical management. *J Asthma Allergy.* 2017;10:197-207.
19. Mehr SS, Kakakios AM, Kemp AS. Rice: a common and severe cause of food protein-induced enterocolitis syndrome. *Arch Dis Child.* 2009;94:220-3.
20. Miceli Sopo S, Monaco S, Badina L, et al.-Food protein-induced enterocolitis syndrome caused by fish and/or shellfish in Italy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2015;26:731-6.
21. Vazquez-Ortiz M, Machinena A, Dominguez O, et al.-Food protein-induced enterocolitis syndrome to fish and egg usually resolves by age 5 years in Spanish children. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017;5:512-515.e1.
22. Ruffner MA, Ruyman K, Barni S, et al.-Food protein-induced enterocolitis syndrome: insights from review of a large referral population. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017;1:343-9.
23. Sicherer SH. Food protein-induced enterocolitis syndrome: case presentations and management lessons. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:149-56.
24. Miceli Sopo S, Bersani G, Cerchiara G, et al.-Oral food challenge with a mixture of 'at risk' foods in children with FPIES. *Pediatr Allergy Immunol.* 2016;27:874-876.
25. Miceli Sopo S, Fantacci C, Bersani G, et al.-Loss of tolerance for fishes previously tolerated in children with fish food protein induced enterocolitis syndrome. *Allergologia et Immunopathologia,* in press.
26. Miceli Sopo S, Greco M, Monaco S, et al.-Matrix effect on baked milk tolerance in children with IgE cow milk allergy. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2016;44:517-523.
27. Miceli Sopo S, Greco M, Cuomo B, et al.-Matrix effect on baked egg tolerance in children with IgE-mediated hen's egg allergy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2016;27:465-70.
28. Miceli Sopo S, Buonsenso D, Monaco S, et al.-Food protein-induced enterocolitis syndrome (FPIES) and well cooked foods: a working hypothesis. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2013;41:346-8.
29. Mehr S, Frith K, Barnes EH, et al.-Food protein-induced enterocolitis syndrome in Australia: A population-based study, 2012-2014. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140:1323-1330.
30. Caubet JC, Ford LS, Sickles L, et al.-Clinical features and resolution of food protein-induced enterocolitis syndrome: 10-year experience. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134:382-9.
31. Miceli Sopo S, Bersani G, Monaco S, et al.-Ondansetron in acute food protein-induced enterocolitis syndrome, a retrospective case-control study. *Allergy.* 2017;72:545-551.



La celiachia: cause e meccanismi patogenetici di una malattia complessa

Barbara Frossi
Marco De Carli

Dipartimento di Area Medica,
Università di Udine
Medicina Interna,
Azienda Sanitaria Santa Maria
della Misericordia

Not Allergol 2018; vol. 36: n. 1 : 13-22

INTRODUZIONE

La malattia celiachia (CD) è il risultato di complesse interazioni tra fattori intrinseci (genetici) e fattori estrinseci (ambientali) che esitano in un danno flogistico alla mucosa intestinale caratterizzato dalla distruzione dei villi intestinali e dall'iperplasia delle cripte (1,2). Tale danno deriva da una risposta immunitaria inappropriata nei confronti della componente insolubile del glutine, la gliadina, attraverso molteplici meccanismi immunologici propri sia dell'immunità innata che acquisita. Infatti, tra le malattie immuno-mediate del tratto gastrointestinale, la malattia celiaca rappresenta il modello esemplare di interazioni multiple tra i due compartimenti del sistema immunitario. Essa è il prototipo di una risposta immunitaria antigene-specifica guidata da una risposta T-polarizzata che si sovrappone finemente alla risposta verso le componenti del glutine

da parte delle cellule immunitarie innate quali macrofagi, cellule dendritiche, cellule mieloidi granulocitiche. La natura dell'agente scatenante, i mec-

canismi patogenetici e la complessa sintomatologia clinica della celiaca concorrono a rendere difficile classificare questa malattia secondo i comuni criteri im-

RIASSUNTO

Parole chiave e acronimi

• Celiachia • autoanticorpi • IgA • permeabilità intestinale • mastociti

La celiachia è una malattia infiammatoria cronica intestinale che si manifesta in soggetti geneticamente predisposti in seguito all'ingestione del glutine contenuto in diversi cereali. Ad oggi non è ancora chiaro il motivo per cui nei pazienti celiaci la tolleranza al glutine sia rotta o non si sia mai stabilita, ma è invece evidente che la celiachia è una malattia multifattoriale in cui diversi fattori partecipano al danno intestinale. Se da un lato gli elementi che la caratterizzano (la natura della causa scatenante, la suscettibilità genetica dei pazienti, i meccanismi autoimmuni di perpetuazione del danno intestinale, la quasi completa risoluzione dei sintomi a seguito della dieta aglutinata) possono apparire tra loro incongruenti, dall'altro conferiscono peculiarità alla malattia celiaca che resta unica nel suo genere, non classificabile in base ai criteri immunologici classici. Lo studio approfondito dei meccanismi patogenetici alla base della celiachia è necessario per comprendere meglio la malattia al fine di una formulare una preventiva e corretta diagnosi, ma potrebbe anche aprire a nuove considerazioni in ambito immunologico.



munopatologici. In effetti la celiachia, benché sia generalmente definita come malattia autoimmune non è esattamente una malattia autoimmune, né tantomeno una malattia allergica classica (IgE mediata), piuttosto risulta una malattia borderline, a sé stante. In tale malattia, infatti, si realizza una risposta ad una proteina estranea (= allergia) ma nella quale l'infiammazione che ne deriva si attua con meccanismi non IgE mediati e con fenomeni autoimmuni, quali la produzione di autoanticorpi.

In questo articolo verranno illustrate le recenti scoperte nel campo dei meccanismi patogenetici della celiachia ed in particolare il contributo delle componenti dell'immunità innata. Queste nuove evidenze mettono in luce le molteplici incongruenze che caratterizzano la celiachia e possono offrire un nuovo punto di osservazione della malattia.

dosati sia nella componente IgG che IgA; gli AGA IgG hanno una sensibilità dell'82-87% e specificità del 67-80%, mentre per gli AGA IgA i valori sono rispettivamente 85-90% e 83-91%. La falsa positività degli AGA IgG è un fenomeno abbastanza comune in quanto questi anticorpi possono risultare positivi anche in altre patologie gastrointestinali mentre gli AGA di classe IgA sono specifici per la celiachia e pertanto una loro falsa positività si osserva più raramente. La ricerca di anticorpi anti-endomisio ha una sensibilità e specificità più elevata, rispettivamente del 99% e 95%. La ricerca degli anticorpi TGA di classe IgA è anch'esso un test dotato di sensibilità (95-98%) e specificità (94-95%) elevate, ma, rispetto alla ricerca degli EMA, offre il vantaggio di una maggiore facilità di esecuzione e di un costo più contenuto. Nei soggetti con deficit

di IgA, condizione che frequentemente si associa alla celiachia, viene effettuata il dosaggio delle immunoglobuline totali e la ricerca degli AGA di tipo IgG che, in caso di difetto completo delle IgA (3). Attualmente lo screening sierologico si basa sulla ricerca degli anticorpi anti-TGA di classe IgA associato alla determinazione dei livelli sierici delle IgA. In caso di deficit di IgA (IgA < 7 mg/dl), si ricercano le IgG anti-TGA (3).

La biopsia del piccolo intestino, in accordo con i criteri dell'ESPGAN (European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition), ampiamente riveduti e semplificati nel 1990, è ritenuta necessaria per la conferma diagnostica di celiachia (1). La diagnosi di certezza si basa sulla evidenza di danno della mucosa intestinale che si manifesta con alterazione dell'architettura dei villi, associata ad iperplasia delle cripte e ad un

DIAGNOSI E CLASSIFICAZIONE

Le manifestazioni cliniche della celiachia sono molto variabili e i fattori che concorrono alla variabilità sono l'età del paziente, la durata e l'estensione della malattia.

La diagnosi di celiachia associa la ricerca nel sangue di anticorpi specifici della malattia alla biopsia intestinale. Il primo approccio diagnostico è costituito dalla ricerca di anticorpi specifici anti-gliadina (AGA), e di autoanticorpi, ovvero anticorpi anti-endomisio (EMA) e anti-tranglutaminasi tessutale (TGA) (2,3), la cui patogenesi verrà spiegata più avanti in questo articolo. Gli AGA vengono



Tabella 1

Classificazione delle lesioni intestinali in base all'indice di Marsh.

Marsh 0	Normale architettura della mucosa senza significativo infiltrato linfocitario intraepiteliale
Marsh 1	Normale architettura della mucosa con infiltrato linfocitario dell'epitelio dei villi (> di 30 linfociti per 100 enterociti)
Marsh 2	Linfocitosi intraepiteliale e iperplasia delle cripte
Marsh 3a	Linfocitosi intraepiteliale, iperplasia delle cripte e atrofia dei villi parziale (rapporto villi/cripte inferiore a 1)
Marsh 3b	Linfocitosi intraepiteliale, iperplasia delle cripte e atrofia dei villi subtotale (villi chiaramente atrofici ma ancora riconoscibili)
Marsh 3c	Linfocitosi intraepiteliale, iperplasia delle cripte e atrofia dei villi totale



infiltrato infiammatorio della lamina propria costituito da plasmacellule e linfociti T intraepiteliali, prevalentemente CD8+ esprimenti TCR γ/δ . La sequenza della gravità delle lesioni che caratterizzano la progressione del danno alla mucosa intestinale è stata descritta da Marsh e poi modificata da Oberhuber (4) e classifica il danno istologico con un indice numerico progressivo (Tabella 1). Il classico quadro istopatologico della celiachia caratterizzato da atrofia totale dei villi, iperplasia delle cripte, aumento dei linfociti intraepiteliali e delle cellule mononucleate nella lamina propria rappresenta lo stadio finale delle modificazioni patologiche che caratterizzano la celiachia, indicato come grado Marsh 3c. È opportuno però ricordare che le lesioni della mucosa intestinale descritte nella celiachia non sono specifiche della malattia celiaca in quanto possono essere presenti anche in altre patologie dell'apparato gastrointestinale e possono analogamente evolvere in un danno infiammatorio delle strutture villari. A seconda della sintomatologia, del quadro istologico e immunologico al momento della diagnosi, la celiachia può essere suddivisa in diverse forme cliniche con caratteristiche parzialmente sovrapponibili.

Nella sua forma classica e maggiormente conosciuta, la celiachia si manifesta con diarrea cronica e malassorbimento che si traducono in un arresto di crescita nel bambino o in perdita di peso nell'adulto. Altri sintomi caratteristici sono l'inappetenza, la distensione e il dolore addominale, l'ipotonia muscolare, l'irritabilità. Generalmente questi pazienti presentano marcatori serologici e istolo-

gici positivi (1). Nella sua presentazione atipica, la celiachia è caratterizzata da sintomi gastroenterici modesti, assenti o sfumati, come ad esempio il meteorismo, la stipsi persistente o alternata ad episodi di diarrea, mentre sono presenti altri sintomi extraintestinali che possono presentarsi da soli o associati e che costituiscono spesso gli unici segni di malattia. Anche tale sintomatologia tende a essere modesta e limitata ad alcuni organi o apparati: l'anemia da carenza di ferro, l'ipertransaminasemia, la comparsa e la persistenza di afte, la bassa statura nel bambino, l'anomalia dello smalto dentario, l'artrite e le artralgie, la dermatite erpetiforme. A queste manifestazioni si possono aggiungere l'osteoporosi giovanile in donne in premenopausa o nei maschi, le alterazioni del metabolismo calcio-fosforo (ipocalcemia e iperfosfatemia), la poliabortività e le irregolarità mestruali (1). Esiste anche una forma silente della malattia che si caratterizza per la presenza, in soggetti apparentemente asintomatici, di serologia positiva per la ricerca dei marker diagnostici di celiachia e per la presenza di lesioni istologiche della mucosa intestinale tipiche della celiachia. Questa forma di celiachia è spesso riscontrata in soggetti nei quali viene ricercata la malattia perché parenti di celiaci, o perché affetti da malattie autoimmuni che tendono ad associarsi con la malattia celiaca (es. diabete, tiroiditi autoimmuni). In molti casi l'assenza di sintomi è solo apparente e una valutazione clinica più attenta può rivelare infatti malassorbimenti selettivi di micronutrienti, quali sideropenia associata o meno ad anemia, osteopenia, aste-

nia (3). Nella forma di celiachia detta potenziale i pazienti presentano esami sierologici suggestivi di celiachia, sono portatori dei geni HLA DQ2 e/o DQ8, ma la biopsia intestinale risulta essere normale. Probabilmente la celiachia potenziale è l'espressione di una predisposizione genetica allo sviluppo della malattia. I pazienti con celiachia latente sono soggetti sintomatici con serologia positiva ma mucosa intestinale normale. Questi soggetti presentano infatti sensibilizzazione al glutine pur in assenza di celiachia conclamata; in alcuni di essi un'inappropriata risposta immunologica alla gliadina si può rilevare in organi diversi dall'intestino come la cute (dermatite erpetiforme), la bocca (afte ricorrenti), i reni (nefropatia da IgA) e le articolazioni (artrite). I parenti di primo grado dei celiaci sono il gruppo nel quale è più elevata la probabilità di individuare soggetti con celiachia potenziale o latente (5).

LE CAUSE:

LA GENETICA E IL GLUTINE

Due sono gli elementi che determinano lo sviluppo della celiachia: il primo è l'introduzione con la dieta della componente proteica – il glutine – presente nella farina di diversi cereali (frumento, orzo, avena e segale); il secondo è la predisposizione genetica dell'individuo. Il glutine è costituito da due componenti proteiche distinte: la frazione glutenica idro-solubile, poco coinvolta nella tossicità, e la frazione prolaminica alcool-solubile che è implicata nella pa-



togenesi della malattia. Le prolamine sono proteine caratterizzate da un alto contenuto in glutamina e prolina. Le prolamine del frumento sono suddivise in α -, β -, γ -, ω -gliadine; la gliadina A è la componente più importante delle α -gliadine del frumento ed è la frazione direttamente responsabile dell'insorgenza della malattia celiaca, analoga alla secalina per la segale e all'ordeina per l'orzo. L'alto contenuto di residui di prolina e glutamina conferiscono alle prolamine una struttura stabile e resistente alle tecniche di lavorazione e cottura delle farine, permettendo di ottenere un prodotto alimentare di alta palatabilità. Le prolamine, tuttavia, sono anche responsabili della resistenza del glutine all'azione degli enzimi proteolitici gastrointestinali e sono un substrato eccellente per l'attività enzimatica delle transglutaminasi tissutali (τ TG) presenti a livello intestinale, due fattori che concorrono a determinare la tossicità del glutine.

Sono stati identificati diversi frammenti della gliadina che resistendo alla digestione pancreatica e gastrica, giungono nell'intestino dove, in seguito a modificazioni delle giunzioni intercellulari e all'aumento della permeabilità intestinale, possono attraversare la barriera intestinale ed arrivare alla lamina propria (6). Questi frammenti contengono sia sequenze non immunogene che sequenze immunogene (Figura 1) (7).

Il frammento 25-mer (LGQQQPFPPQ QPYPQPQPFPSQQPY), contiene diversi peptidi non immunogeni (detti peptidi tossici) in grado di indurre risposte immuni innate ma non adattati-



Figura 1

Schema dei peptidi immunogeni e non immunogeni della gliadina di frumento

Frammento 25mer

LGQQQPFPPQ QPYPQPQPFPSQQPY

LGQQQPFPPQ QPYPQPQPFPSQQPY (p31-43)

Frammento 33mer

LQLQPFPPQQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF

LQLQ**PFPPQQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF**

LQLQPFPPQ**QLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF**

LQLQPFPPQQL**PYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF**

LQLQPFPPQQLPYP**QPQLPYPQPQLPYPQPQPF**

LQLQPFPPQQLPYPQPL**QYPQPQLPYPQPQPF**

LQLQPFPPQQLPYPQPL**QYPQPQLPYPQPQPF**

Sequenza amminoacidica dei frammenti 25-mer e 33-mer presenti nella gliadina-alfa. In rosso sono evidenziati gli epitopi immunogeni, in blu la sequenza del peptide non immunogeno p31-43.

ve. Tra questi il frammento p31-43 è il più tossico. Il frammento 33-mer (LQLQPFPPQQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF) presenta diversi epitopi antigenici, tra loro parzialmente sovrapposti, contenenti residui di glutamina che sono il substrato ideale per le TG (Figura 1). Per azione delle τ TG, in particolare della TG2, queste sequenze vengono deaminate e diventano potenti peptidi immunogeni che una volta associati alle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (in particolare il sottotipo HLA-DQ2 e DQ8) causano l'attivazione specifica delle cellule T in

individui geneticamente predisposti.

Diversi sono i geni coinvolti nello sviluppo della celiachia, ma sicuramente i geni del complesso HLA/MHC situati sul cromosoma 6 hanno una notevole influenza. La maggior parte dei pazienti celiaci (90%) infatti esprime HLA-DQ2.5 (DQA1 * 05, DQB1 * 02). I restanti pazienti esprimono in ugual percentuale HLA-DQ2.2 (DQA1 * 02: 01, DQB1 * 02: 02) o HLA-DQ8 (DQA1 * 03, DQB1 * 03: 02). Questi allotipi HLA predisponenti sono necessari, ma non sufficienti per lo sviluppo della malattia. La prevalenza di



HLA-DQ2, infatti, è alta anche tra gli individui non-celiaci (25%-30%), suggerendo il coinvolgimento di ulteriori geni, probabilmente non-HLA, nella patogenesi della malattia. Studi recenti hanno individuato alcuni di questi geni sul cromosoma 5 (5q31-33), 2 (2q33), 4 (4q27) e 19 (19p13). Sono tutti geni direttamente o indirettamente implicati nella regolazione di vari aspetti del sistema immunitario, codificando per citochine (IL-21, IL-2) o per molecole costimolatorie (CTLA4, CD28 e ICOS) con effetti importanti sulla regolazione delle cellule T e delle cellule B. Molti di questi geni non correlati al HLA sono associati ad altre malattie autoimmuni, come il diabete di tipo 1 e l'artrite reumatoide (8).

GLI ATTORI DELLA MALATTIA CELIACA: UNA SCENEGGIATURA MOLTO COMPLESSA

Affinché si realizzi la reazione immunitaria responsabile della malattia è necessario che i peptidi della gliadina superino l'epitelio intestinale e raggiungano la lamina propria, sede in cui ha inizio la anomala risposta del sistema immunitario cui consegnerà il danno tissutale. In condizioni fisiologiche l'epitelio intestinale, grazie alle strette giunzioni intercellulari (tight junctions), forma una barriera al passaggio di macromolecole quali il glutine; in condizioni normali solo piccole quantità di frazioni antigeniche superano la barriera epiteliale. Gran parte di queste proteine oltrepassa

la barriera attraverso la via transcellulare; durante questo percorso i peptidi subiscono una degradazione lisosomiale che li rende inattivi dal punto di vista immunologico.

Non è chiaro come i frammenti della gliadina superino la mucosa ma si ritiene che un evento scatenante preceda l'esordio della malattia, quale un'infezione virale o batterica, o un trauma che alteri l'integrità delle tight junctions. Probabilmente nelle fasi iniziali della celiachia l'aumentata permeabilità dell'epitelio intestinale, permette un maggiore assorbimento di macromolecole, tra cui le proteine del glutine. Anche l'aumentata produzione di zonulina - proteina responsabile della regolazione delle tight junctions - che si osserva nei soggetti celiaci sembrerebbe concorrere all'alterazione della permeabilità intestinale, favorendo l'attraversamento della barriera intestinale dei derivati del glutine (9). Una volta superata la barriera intestinale i frammenti della gliadina possono diventare substrato per la TG2 costitutivamente presente nel tessuto. Si verifica pertanto un accumulo a livello della mucosa intestinale di peptidi immunogeni e peptidi non immunogeni, di peptidi deaminati e di complessi peptidi-tTG, che con modalità differenti possono indurre attivazione della risposta immunitaria innata e adattativa (Figura 2A).

Immunità acquisita

La reazione immune specifica ha inizio grazie alla capacità delle cellule presentanti l'antigene (cellule B, macrofagi e cellule dendritiche) di legare, attraverso i loro recettori, le molecole di gliadina immodi-

ficcate, la gliadina deaminata e i complessi gliadina-tTG (Figura 2B) (10). Questi peptidi vengono endocitati e, dopo essere stati processati, sono esposti sulla membrana cellulare associati alle molecole HLA-DQ2 e HLA-DQ8 e presentati alle cellule T-helper CD4+. La conversione ad opera della TG2 di un residuo di glutammina in acido glutammico amplifica la carica negativa dei peptidi immunogeni della gliadina incrementando la loro affinità di legame con le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità e aumentando l'efficacia dell'attivazione specifica delle cellule CD4+.

Le cellule T così stimulate secernono una serie di citochine che inducono una risposta immunitaria infiammatoria con rimodellamento tissutale (risposta Th1) o la produzione di anticorpi (risposta Th2). Le citochine Th1 (soprattutto INF- γ , TNF- α , IL-21 e IL-17) richiamano ed attivano localmente diverse componenti dell'immunità innata ed acquisita nell'intestino esercitando un effetto citotossico diretto sull'epitelio. Invece le citochine Th2 (IL-4 e IL-10) prodotte dai linfociti T specifici per la gliadina stimolano l'espansione di cloni di cellule B e quindi la produzione di anticorpi antigeni specifici. Un segno distintivo importante della celiachia è la produzione, oltre ad anticorpi contro la gliadina, di autoanticorpi diretti contro verso la tTG tissutale e verso complessi proteici tTG-gliadina che, analogamente a quanto avviene in altre patologie autoimmuni, innescano i meccanismi del danno tissutale. Mentre gli anticorpi verso il glutine possono essere rilevati in molti individui sani, gli anticorpi verso



il glutine deamidato e gli autoanticorpi specifici per la TG2 sono considerati marcatori altamente specifici della malattia. Ciò non è affatto casuale, poiché l'attività enzimatica del TG2 è implicata nella modificazione post-traduzionale dei peptidi del glutine e poiché l'espressione di TG2 nelle cellule epiteliali intestinali è più alta nei pazienti celiaci rispetto ai controlli. Questo aumento, tuttavia, non è specifico per la celiachia ed è stato anche osservato in altre condizioni infiammatorie dell'intestino tenue che non si accompagnano alla produzione di autoanticorpi (11). Pertanto, ad oggi, non è stato ancora completamente individuato il meccanismo esatto mediante il quale la TG2 diventi l'autoantigene principale della celiachia.

Immunità innata

I componenti dell'immunità innata nell'intestino sono le cellule epiteliali, le cellule dendritiche ed i linfociti intraepiteliali (IELs), cioè una miscela di linfociti T con TCR γ/δ e linfociti NK (Natural Killer) (10). L'attività citotossica di queste cellule è fortemente condizionata dai mediatori solubili rilasciati dalle cellule CD4+ in risposta alla gliadina. Classicamente l'IFN- γ prodotto dai linfociti CD4+ potenzia l'attività citotossica delle cellule CD8+ e la capacità fagocitica dei macrofagi tissutali; studi recenti di sequenziamento di geni differenzialmente espressi (RNA-seq) nei pazienti celiaci hanno infatti dimostrato che l'mRNA del l'INF- γ è 25 volte più espresso nei soggetti celiaci rispetto ai soggetti sani (12). Il TNF- α , inoltre, stimola la secrezione da parte dei fibro-

blasti intestinali di metalloproteinasi che degradano le proteine della matrice distruggendo il tessuto connettivo. Così facendo il TNF- α , oltre a causare danno tissutale, aumenta l'afflusso di plasmacellule e linfociti T alla lamina propria dove si trovano le APC. I linfociti T CD4+ così richiamati e attivati producono grandi quantità di INF- γ che mantiene l'infiammazione tissutale, riduce la resistenza delle tight junctions amplificando il processo flogistico.

Un altro elemento chiave della risposta dell'immunità innata è rappresentato dall'aumento dei livelli di IL-15 (10,13). Questa citochina non è normalmente presente nella mucosa sana, e infatti l'analisi di biopsie intestinali di pazienti con celiachia che effettuano dieta priva di glutine non mostra alcun incremento di IL-15. Essa tuttavia aumenta notevolmente in seguito all'esposizione anche sporadica al glutine. La IL-15 agisce stimolando la migrazione e l'attivazione degli IELs nel comparto intra-epiteliale e favorendo l'attivazione incontrollata e la sopravvivenza abnorme dei linfociti T CD4+ specifici per la gliadina presenti nella sottomucosa, impedendone la morte per apoptosi. La IL-15, inoltre, induce l'espressione sulla membrana plasmatica delle cellule epiteliali di molecole come MICA e MICB (13). Queste molecole appartengono alla famiglia delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) ma non possiedono funzioni relate alla presentazione dell'antigene. Esse possono invece legare i recettori NKGD2 espressi dalle cellule NK e dagli IELs TCR γ/δ . L'interazione MIC/NKGD2 induce la

morte della cellula epiteliale causando il danno tissutale che si osserva nella celiachia (13).

I diversi meccanismi di amplificazione del danno tissutale ad opera delle cellule dell'immunità innata non trovano tuttavia risposta se non ammettendo anche un ruolo diretto delle cellule dell'immunità innata nella reazione alla gliadina. In particolare, negli ultimi anni gran parte dell'attenzione della comunità scientifica si è rivolta ai peptidi non immunogeni generati dalla digestione della gliadina che sono capaci di penetrare la barriera intestinale. Tra questi il peptide p31-43, benché non venga riconosciuto specificamente dalle cellule CD4+ si è dimostrato essere capace di indurre direttamente una risposta sia da parte degli enterociti e dei macrofagi che, come vedremo successivamente, dai mastociti (Figura 2C).

Il gruppo italiano guidato da Luigi Maiuri (14) ha dimostrato che diversi peptidi della gliadina vengono internalizzati dalle cellule epiteliali intestinali mediante endocitosi, ma solo il peptide p31-43 resiste alla digestione enzimatica e si accumula nei lisosomi. L'accumulo di p31-43 dentro la cellula induce un significativo aumento di produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che inibiscono la ubiquitinazione e quindi l'inattivazione delle tTG che risultano aumentate. È stato osservato dagli stessi autori che l'aumento dei ROS induce parallelamente l'aumentata espressione di geni pro-infiammatori (14). Un altro gruppo di ricercatori italiani guidati da Vittoria Barone ha messo in evidenza che il peptide p31-43 aumenta l'espres-



sione di IL-15 sulla membrana degli enterociti aumentando il traffico vescicolare e la proliferazione cellulare delle cripte intestinali (6).

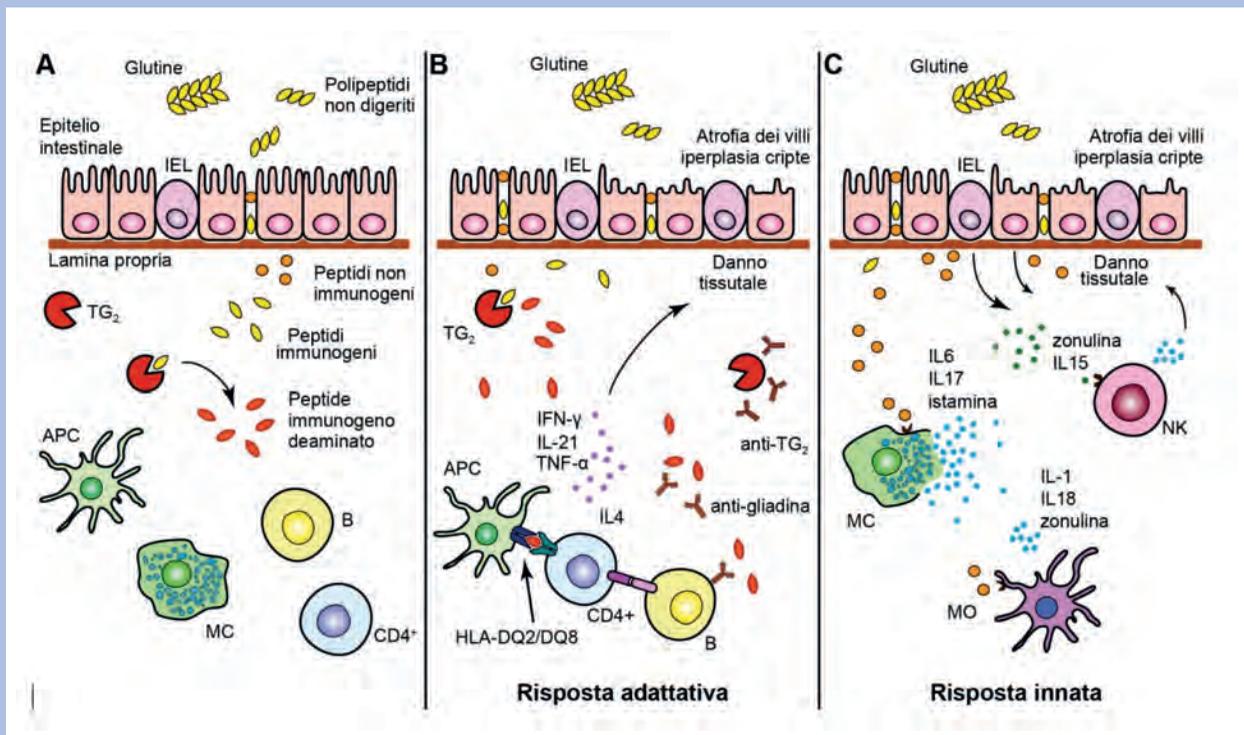
Linee cellulari di monociti /macrofagi umani e cellule mononucleate di soggetti sani e celiaci incubate con prodotti di digestione della gliadina producono elevate

quantità di IL-1, IL-1 e IL-18 attraverso l'attivazione dell'inflammosoma (15,16). Dal punto di vista molecolare, è stato visto che l'aumento intracellulare di ROS indotto dal peptide p31-43 sulle linee cellulari di macrofagi umani, THP-1 e U-937, e murini, RAW 264.7, causa l'attivazione del fattore di trascrizione NF-

KB che regola a sua volta la trascrizione dei geni codificanti per i prodotti infiammatori (17). I derivati della gliadina e in particolare il peptide p31-43 si sono dimostrati efficaci anche nell'indurre la produzione da parte degli enterociti e dei macrofagi di zonulina che aumenta la permeabilità intestinale favorendo l'as-

Figura 2

Meccanismi patogenetici della risposta alla gliadina.



A) In condizioni fisiologiche l'integrità della mucosa intestinale è garantita dalle giunzioni strette tra le cellule epiteliali che separano il lume intestinale dalle cellule della lamina propria e dalle cellule del sistema immunitario presenti sottostante.

I frammenti proteici del glutine possono in parte attraversare la barriera e venire deaminati dalle tTG costitutivamente presenti.

B) Risposta delle cellule dell'immunità acquisita ai peptidi immunogeni deaminati della gliadina.

C) Risposta delle cellule dell'immunità innata ai peptidi non immunogeni della gliadina.

APC, cellula presentante l'antigene; IEL, linfociti intraepiteliali; tTG, transglutaminasi tissutale, MC, mastocita; MO, macrofago; NK, natural killer.



sorbimento di glutine e l'aggravarsi del quadro fisiopatologico (18,19).

Benché non esistano modelli animali validi per lo studio della celiachia, studi in vitro hanno dimostrato che le cellule del sistema immunitario del topo al pari di quelle dell'uomo sono reattive ai derivati della gliadina. Questo ha permesso di approfondire la ricerca facendo uso di topi geneticamente modificati. Ad esempio è stato dimostrato che la mancanza della molecola adattatrice Myd88, fondamentale per la trasduzione del segnale dei recettori toll like receptor (TLR), riduce la risposta dei macrofagi al peptide p31-43. Essendo i TLRs capaci di legare diverse componenti microbiche, questi esperimenti hanno permesso di dimostrare che i peptidi della gliadina possono attivare le cellule dell'immunità innata attraverso i recettori normalmente deputati al riconoscimento di antigeni batterici e virali (20).

Il mastocita: nuovo attore della celiachia

Il mastocita è una cellula dell'immunità innata classicamente nota per il suo ruolo chiave nelle reazioni allergiche IgE-mediate. Tuttavia negli ultimi anni diversi studi hanno dimostrato che i mastociti hanno un ruolo cruciale anche nell'autoimmunità, nelle infezioni e nel cancro, grazie alla loro capacità di rispondere a molteplici stimoli attivatori e di rilasciare mediatori sia pro-infiammatori che anti-infiammatori (21). I mastociti hanno la peculiarità di essere presenti in tutti i tessuti vascolarizzati, in prossimità dei vasi sanguigni e dei vasi linfatici, ed in particolare a livello delle superfici mucosali

all'interfaccia con l'ambiente esterno. In particolare, l'aumento del numero di mastociti a livello della mucosa intestinale sembra essere un tratto comune di tutte le patologie infiammatorie a carico del sistema gastrointestinale. L'evidenza di accumulo di mastociti in biopsie di soggetti celiaci è nota da tempo, ma solo di recente è stato preso in considerazione un ruolo attivo del mastocita nella celiachia.

In uno studio del 2016 condotto su linee cellulari e colture primarie di mastociti intestinali abbiamo dimostrato un ruolo diretto di queste cellule nell'innescamento della risposta immune alla gliadina, e nelle fasi di progressione della patologia (22). Abbiamo osservato che sia la linea cellulare di mastociti umani LAD2 che i mastociti isolati da mucose intestinali reagiscono selettivamente al trattamento con il peptide non immunogeno della gliadina p31-43 ma non alle proteine del glutine, né ai peptidi immunogeni della gliadina. Il frammento p31-43 è l'unico in grado di indurre il rilascio di istamina e di specifiche citochine pro-infiammatorie attraverso la generazione di ROS e l'attivazione del fattore di trascrizione NFκB. L'uso di mastociti ottenuti da topi geneticamente privi della molecola adattatrice Myd88 ha permesso di dimostrare che la via di riconoscimento del peptide p31-43 è mediata dai TLRs che normalmente vengono impegnati per riconoscere derivati microbici.

Abbiamo inoltre dimostrato che tra tutte le cellule infiltranti la mucosa intestinale dei soggetti celiaci il mastocita è l'unica cellula che si accumula proporzionalmente all'aggravarsi dell'entità del danno tissutale. Tale aumento numerico è ac-

compagnato da un cambiamento fenotipico del mastocita, che progressivamente diventa fonte cellulare di TNF- α , IL-6 e IL-17. Questi esperimenti condotti in vitro e ex vivo indicano che il mastocita può agire sia innescando direttamente la reazione contro specifiche componenti della gliadina, sia amplificando la reazione infiammatoria. Un aspetto molto interessante è anche la diversa reattività in vitro alla stimolazione con il peptide p31-43: non solo i mastociti intestinali isolati da soggetti sani rispondono meno rispetto a mastociti isolati da soggetti celiaci, ma l'entità della risposta dei mastociti è direttamente associata alla gravità delle lesioni intestinali da cui essi derivano; ovvero mastociti isolati da mucose intestinali di celiaci classificati come Marsh 3 rilasciano in risposta al peptide p31-43 più istamina rispetto a mastociti isolati da pazienti con Marsh 1. In altre parole i mastociti della mucosa intestinale rappresentano una "fotografia istantanea" della gravità della malattia.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Alla luce di quanto descritto finora, risulta chiaro che la celiachia è una condizione patologica estremamente complessa, con elementi che la rendono unica nel suo genere.

Nei soggetti celiaci la normale tolleranza al glutine viene sostituita da una massiva risposta immunitaria sia verso la componente proteica del grano (anticorpi e cellule specifiche per derivati della gliadina) sia verso alcuni componenti self del mi-



croambiente intestinale (autoanticorpi anti-TG e anti endomisio). Questa risposta immune aberrante è scatenata da un agente esogeno ma è accompagnata dalla produzione di autoanticorpi e dalla reattività di cellule contro componenti endogene dell'organismo. Per la natura autoimmune di questi meccanismi la malattia è comunemente considerata una patologia autoimmune. Tuttavia, la grande peculiarità della celiachia rispetto ad altre patologie autoimmuni è indubbiamente la natura non autologa del fattore scatenante la malattia: la gliadina non è ovviamente un agente self e dovrebbe essere considerata a tutti gli effetti un allergene. Nei soggetti celiaci la gliadina scatena una risposta immunitaria con modalità diverse da quelle IgE-dipendenti, più simile dal punto di vista infiammatorio alle malattie autoimmuni. È per questo che gli immunologi tendono a classificarla come un'allergia alimentare non IgE mediata. Possiamo quindi tranquillamente dichiarare che la celiachia è una patologia unica nel suo genere, caratterizzata da meccanismi patogenetici tipici delle reazioni di ipersensibilità - nell'accezione IgE-indipendente - che si associa a fenomeni autoimmuni che la rendono di facile identificazione e che sono peculiari per la diagnosi (anticorpi anti-TG).

Altre caratteristiche peculiari della celiachia sono l'assenza al momento attuale di una terapia farmacologica mirata e la positiva risposta clinica alla dieta priva di glutine che comporta la risoluzione dei sintomi secondari al malassorbimento e delle lesioni istologiche nella quasi totalità dei casi. Analogamente a quanto

accade nei casi di allergia e ipersensibilità, evitare l'esposizione allo specifico antigene/allergene previene la sintomatologia e protegge da eventuali danni tissutali secondari. Nei soggetti celiaci in dieta senza glutine, il titolo degli anti-TGA tende a ridursi progressivamente con la dieta aglutinata e la sierologia può negativizzarsi nella stragrande maggioranza dei pazienti. La determinazione degli Anti-TGA, pertanto, non è solo utile per la diagnosi, ma anche per monitorare la risposta e l'aderenza alla dieta (24). Una certa percentuale di pazienti permane con anticorpi anti-TG, ma le lesioni intestinali si risolvono. Solo alcuni celiaci, malgrado la dieta, presentano persistenza di anticorpi anti-TG e di lesioni intestinali tipiche, configurando il quadro della celiachia refrattaria (25). Diversi studi recenti hanno confrontato la suscettibilità genetica dei soggetti celiaci con quella di pazienti affetti da altri disordini infiammatori (8,23) e hanno confermato l'ipotesi che la celiachia abbia alcune caratteristiche in comune con le malattie autoimmuni rispetto alle allergie alimentari e ad altre patologie immunitarie indotte da alimenti. Tuttavia suggerisce anche il coinvolgimento attivo dell'immunità innata nello sviluppo della malattia e nel mantenimento dei meccanismi di risposta autoimmune in tutte le fasi della malattia.

Infatti gli studi più recenti nel campo dei meccanismi patogenetici della celiachia hanno messo in luce un ruolo prominente delle cellule dell'immunità innata nell'avvio della malattia. Macrofagi, cellule dendritiche, IELs e cellule epiteliali non sono semplici comparse

a fianco dei linfociti T e B specifici per la gliadina e devono essere considerati attori protagonisti a tutti gli effetti. La scoperta di un ruolo attivo del mastocita (21) in questo contesto sottolinea ancor di più l'unicità della celiachia e apre a nuove interpretazioni della malattia. Il mastocita essendo costitutivamente presente nella mucosa intestinale sana può innescare per primo il processo infiammatorio contro le frazioni non immunogene della gliadina anche in assenza del coinvolgimento attivo di linfociti T e B specifici. Inoltre l'associazione osservata tra aggravamento del danno tissutale e aumento progressivo del numero di mastociti nella mucosa intestinale suggerisce che il mastocita oltre ad essere causa diretta del danno, ne sia anche il suo amplificatore attraverso il rilascio di mediatori infiammatori che localmente richiamano e modulano l'attività delle cellule dell'immunità innata ed acquisita.

In conclusione il mastocita, la cellula storicamente nota per il suo ruolo nei processi allergici, può essere ragionevolmente considerata uno degli elementi distintivi e patogenomici della malattia celiaca. Sicuramente c'è ancora molto da capire sui meccanismi che sottendono lo sviluppo della celiachia e che possono permettere un'adeguata interpretazione. In quest'ottica il contributo del mastocita nella malattia apre a nuove prospettive diagnostiche e a nuovi approcci terapeutici.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano il Dott. Marco Zanoni per il supporto nella preparazione del materiale illustrativo.



Bibliografia

1. Parzanese I, Qehajaj D, Patrinicola F, et al.-Celiac disease: From pathophysiology to treatment. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2017; 8:27-38.
2. Gujral N, Freeman HJ, Thomson AB. Celiac disease: prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J Gastroenterol.* 2012; 18:6036-59.
3. Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CPP, et al.-ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2013; 108:656-76.
4. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1999; 11:1185-94.
5. Troncone R, Greco L, Mayer M, et al. Latent and potential coeliac disease. *Acta Paediatr Suppl.* 1996; 412:10-4.
6. Barone MV, Troncone R, Auricchio S. Gliadin peptides as triggers of the proliferative and stress/innate immune response of the celiac small intestinal mucosa. *Int J Mol Sci.* 2014; 15:20518-37.
7. Mamone G, Ferranti P, Rossi M, et al.-Identification of a peptide from alpha-gliadin resistant to digestive enzymes: implications for celiac disease. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007; 855:236-41.
8. Sollid LM. The roles of MHC class II genes and post-translational modification in celiac disease. *Immunogenetics.* 2017; 69:605-616.
9. Fasano A, Not T, Wang W, et al.-Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet.* 2000; 355:1518-9.
10. Cukrowska B, Sowinska A, Bierla JB, et al.-Intestinal epithelium, intraepithelial lymphocytes and the gut microbiota - Key players in the pathogenesis of celiac disease. *World J Gastroenterol.* 2017; 23:7505-7518.
11. Gatti S, Rossi M, Alfonsi S, et al.-Beyond the Intestinal Celiac Mucosa: Diagnostic Role of Anti-TG2 Deposits, a Systematic Review. *Front Med (Lausanne).* 2014; 1:9
12. Quinn EM, Coleman C, Molloy B et al.-Transcriptome Analysis of CD4+ T Cells in Coeliac Disease Reveals Imprint of BACH2 and IFN γ Regulation. *PLoS ONE.* 2015; 10:e0140049
13. Abadie V1, Jabri B. IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology *Immunol Rev.* 2014 Jul;260(1):221-34.
14. Maiuri L, Luciani A, Vilella VR, et al.-Lysosomal accumulation of gliadin p31-43 peptide induces oxidative stress and tissue transglutaminase-mediated PPARgamma downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. *Gut.* 2010; 59:311-9.
15. Cinova J, Palová-Jelínková L, Smythies LE, et al.-Gliadin peptides activate blood monocytes from patients with celiac disease. *J. Clin. Immunol.* 2007; 27:201-9.
16. Palová-Jelínková L, Dášová K, Drašarová H, et al. Pepsin digest of wheat gliadin fraction increases production of IL-1 β via TLR4/MyD88/TRIF/MAPK/NF- κ B signaling pathway and an NLRP3 inflammasome activation. *PLoS ONE.* 2013; 8:e62426.
17. Maiuri MC, De Stefano D, Mele G, et al.-Gliadin increases iNOS gene expression in interferon-gamma-stimulated RAW 264.7 cells through a mechanism involving NF-kappa
18. Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, et al.-Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand. J. Gastroenterol.* 2006; 41:408-19.
19. Lammers KM, Lu R, Brownley J, et al.-Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology.* 2008; 135:194-204.e3.
20. Thomas KE, Sapone A, Fasano A, et al.-Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. *J. Immunol.* 2006; 176:2512-21.
21. Frossi B, Mion F, Tripodo C et al.-Rheostatic Functions of Mast Cells in the Control of Innate and Adaptive Immune Responses. *Trends Immunol.* 2017; 38:648-656.
22. Frossi B, Tripodo C, Guarotta C, et al.-Mast cells are associated with the onset and progression of celiac disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017; 139:1266-1274.
23. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB et al.-Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29:493-525.
24. Downey L, Houten R, Murch S, et al.-Recognition, assessment, and management of coeliac disease: summary of updated NICE guidance. *BMJ.* 2015 Sep 2; 351:355
25. Rubio-Tapia A, Murray JA. Classification and management of refractory coeliac disease. *Gut.* 2010; 59:547-57



Test di provocazione nasale allergene-specifico

Pratica clinica e frontiere della ricerca

Not Allergol 2018; vol. 36: n. 1 : 23-30.

Stefania Arasi,
MD, PhD

Unità di Allergologia,
Dipartimento di pediatria,
Università di Messina, Messina, Italia;
SIAF- Schweizerisches Institut
für Allergie-und Asthmaforschung,
Davos, Svizzera

INTRODUZIONE

La rinite allergica (RA) è una patologia allergica altamente diffusa e talora disabilitante. Si stima che circa 500.000 persone ne soffrano nel mondo (ossia il 20% della popolazione) (1). L'impatto può essere grave non solo sul singolo individuo che ne è affetto con un serio deterioramento della sua qualità di vita, ma anche sulla società *in toto* con incremento dei costi sanitari, riduzione della produttività economica ed effetti persino sulle attività quotidiane (assenteismo scolastico e lavorativo). Il fardello può essere altresì aggravato dal frequente associarsi di comorbidità, quali ad esempio asma ed eczema atopico (1).

Una corretta diagnosi è fondamentale ai fini di un corretto trattamento della patologia. Un'accurata raccolta anamnestica (con riguardo particolare alla tipologia dei sintomi, alla stagionalità, oltre che alla familiarità), l'esame obiettivo ed

RIASSUNTO

Parole chiave e acronimi

- AIT, immunoterapia allergene-specifica
- RA, rinite allergica
- NAC, test di provocazione nasale allergene-specifico ("Nasal Allergen Challenge")
- PNIF, picco di flusso inspiratorio nasale
- SPT, skin prick test

Una diagnosi corretta è cruciale per un corretto trattamento. Nell'ambito della diagnosi della rinite allergica (RA), il test di provocazione nasale allergene-specifico (NAC) costituisce uno strumento importante. Questa tecnica sicura e di semplice esecuzione riproduce una reazione allergica del naso in condizioni standardizzate e controllate. Il suo ruolo è fondamentale in molti quadri clinici, ad esempio quando sensibilizzazione e storia clinica del paziente sono discordanti o in assenza di evidenza di atopia sistemica nonostante l'anamnesi suggerisca una RA. Il NAC è altresì utile per la precisa identificazione degli allergeni clinicamente significativi e, quindi, per una eventuale corretta prescrizione di immunoterapia allergene-specifica, specialmente nei paesi dell'Europa meridionale, in cui la gran parte dei pazienti è polisensibilizzata. Negli studi clinici, il NAC costituisce spesso uno dei più importanti parametri di valutazione di esito terapeutico. Inoltre, la misurazione di biomarcatori locali migliora la conoscenza dei meccanismi immuno-patogenetici che sottendono la RA. Ne conseguono importanti implicazioni cliniche nel concetto di "endotipi di malattia" (il cosiddetto "approccio di medicina di precisione"), verso cui è oggi proiettato il mondo scientifico.



i test di sensibilizzazione allergica cutanea (skin prick test, SPT) e/o su siero (IgE specifiche) possono di per sé condurre alla diagnosi nella maggioranza dei casi (2). Tuttavia, il test di provocazione nasale allergene-specifico (NAC) costituisce uno strumento sicuro, diretto e raccomandato per l'identificazione degli specifici fenotipi della rinite allergica, nella prospettiva di una gestione più mirata ed idonea della patologia (3). Rive-
ste, inoltre, un importante ruolo anche nel contesto specifico dell'immunoterapia allergene specifica (AIT), l'unico trattamento ad oggi in grado di modificare la storia naturale della malattia, perché in grado di modulare la risposta immunitaria all'antigene (4). Il NAC, infatti, è utile sia prima di intraprendere l'AIT -per verificare la gravità dei sintomi e selezionare più accuratamente il prodotto da impiegare per quel soggetto

che, quindi, durante il trattamento per accertarne la risposta clinica (3). Il presente documento ha uno scopo preminentemente divulgativo. Esso si prefigge non solo di valorizzare il ruolo chiave nella ricerca scientifica allergologica, ma anche di sensibilizzare i medici verso un test sicuro, facile ed economico che può migliorare la diagnostica e la gestione terapeutica del paziente con RA. In questa prospettiva, vengono elucidate le principali indicazioni al test nonché forniti gli elementi procedurali principali per una sua corretta esecuzione secondo le evidenze scientifiche correnti.

CENNI STORICI

Nel mondo scientifico, c'è sempre più attenzione allo studio locale delle patologie, tra cui la stessa RA, al fine di una valutazione più accurata, nella sede stessa



in cui si essa si appalesa (cosiddetto “organo shock”) e di una migliore definizione dei meccanismi eziopatogenetici che le sottendono (5). La storia della diagnostica allergologica ha avuto inizio con il patch test (descritto per la prima volta nel 1894), che è da considerarsi esso stesso un test di provocazione. Altri test di provocazione sono seguiti nel tempo: dapprima quello congiuntivale (1907), quindi, il NAC (1914) e, più recentemente, il test bronchiale (1925). Dalle prime modalità di stimolazione del naso, svariati tentativi di standardizzazione del NAC hanno fatto seguito, sia in merito alle modalità di stimolazione che a quelle di interpretazione del test (2,3).

DEFINIZIONE

Il test di provocazione nasale riproduce in vivo una reazione allergica IgE-mediata del naso in condizioni standardizzate e controllate (3). L'applicazione di un allergene nella mucosa nasale di un soggetto ad esso allergi-

Tabella 1

Principali indicazioni cliniche al test di provocazione nasale allergene-specifico (NAC)

Indicazioni cliniche al NAC

- **Diagnosi di** Rinite allergica persistente
Rinite allergica intermittente
Rinite allergica locale
Rinite professionale
- **Correlazione con sintomi extranasali**
- **Diagnosi differenziale dei sintomi oculari**
- **Supporto della diagnostica di allergia alimentare**
- **Designare la composizione degli allergeni per l'immunoterapia**
- **Monitorare l'efficacia clinica dell'immunoterapia**

Adattato da (3)



co, provoca, infatti, una reazione immediata, caratterizzata dai segni e sintomi della rinite: starnutazione, rinorrea acquosa ed edema della mucosa nasale con incremento della resistenza all'aria e, pertanto, ostruzione nasale. Talora si possono associare sintomi oculari, quali lacrimazione, prurito ed eritema congiuntivale. Reazioni sistemiche, seppure possibili, non risultano essere state sinora descritte. Durante l'esecuzione del NAC le suddette modifiche cliniche possono essere valutate e registrate in modo soggettivo e oggettivo mediante l'impiego di punteggi dei sintomi e vari metodi di misurazione della pervietà nasale, rispettivamente (3).

INDICAZIONI

Il test di provocazione nasale è uno strumento che riproduce il quadro clinico della malattia nel singolo soggetto. Essendo, inoltre, una metodica sicura, specifica e di facile esecuzione ben si presta all'impiego nella pratica clinica. Una panoramica delle principali indicazioni attualmente riconosciute viene illustrata in Tabella 1.

Una delle indicazioni a maggiore rilevanza clinica per l'impiego del NAC ricorre nei casi in cui i tradizionali strumenti diagnostici risultino inefficaci, ossia nei casi in cui sensibilizzazione e storia clinica del paziente siano discordanti (3). Il NAC può, infatti, discriminare tra la cosiddetta "rinite allergica locale"- uno specifico fenotipo di AR caratterizzato da mancata evidenza di atopia sistemica nonostante una storia suggestiva di AR (6) - e fenotipi di rinite a patogenesi non allergica (7). Una corretta diagnosi differenziale è ivi cruciale, in considerazione del diverso

Tabella 2 Principali indicazioni cliniche al test di provocazione nasale allergene-specifico

Controindicazioni assolute
<ul style="list-style-type: none"> • Precedente reazione anafilattica all'allergene • Durante una flogosi acuta del naso o dei seni paranasali • Gravi comorbidità (es. malattie cardiopolmonari, compromissione della funzionalità polmonare) • Sensibilizzazione estremamente alta (es. asma bronchiale grave, malattie autoimmuni) • Altre gravi malattie sistemiche (es. tumori maligni, malattie autoimmuni) • Immunoterapia sistemica • Durante la gravidanza
Controindicazioni relative
<ul style="list-style-type: none"> • Età inferiore ai 5 anni • Estratti di allergeni non standardizzati a causa della mancanza di comparabilità e riproducibilità
Controindicazioni temporanee
<ul style="list-style-type: none"> • Trattamento in corso con farmaci antireattivi (anti-istaminici, steroidi, FANS, immunosoppressori, omalizumab) • Reazioni allergiche acute in altri organi • Vaccinazione (attendere una settimana) • Infezione virale o batterica acuta (attendere 4 settimane) • Chirurgia del naso o dei seni paranasali (posticipare per 6-8 settimane) • Uso recente di alcol o tabacco (24-48 ore prima del NAC)
<i>Adattato da (3)</i>

management terapeutico tra queste diverse condizioni.

La rinite occupazionale costituisce un'ulteriore indicazione al test di provocazione nasale, tanto più che allergeni standardizzati specifici sono in genere non disponibili nei comuni kit per SPT e nel pannello delle IgE specifiche titolabili (3).

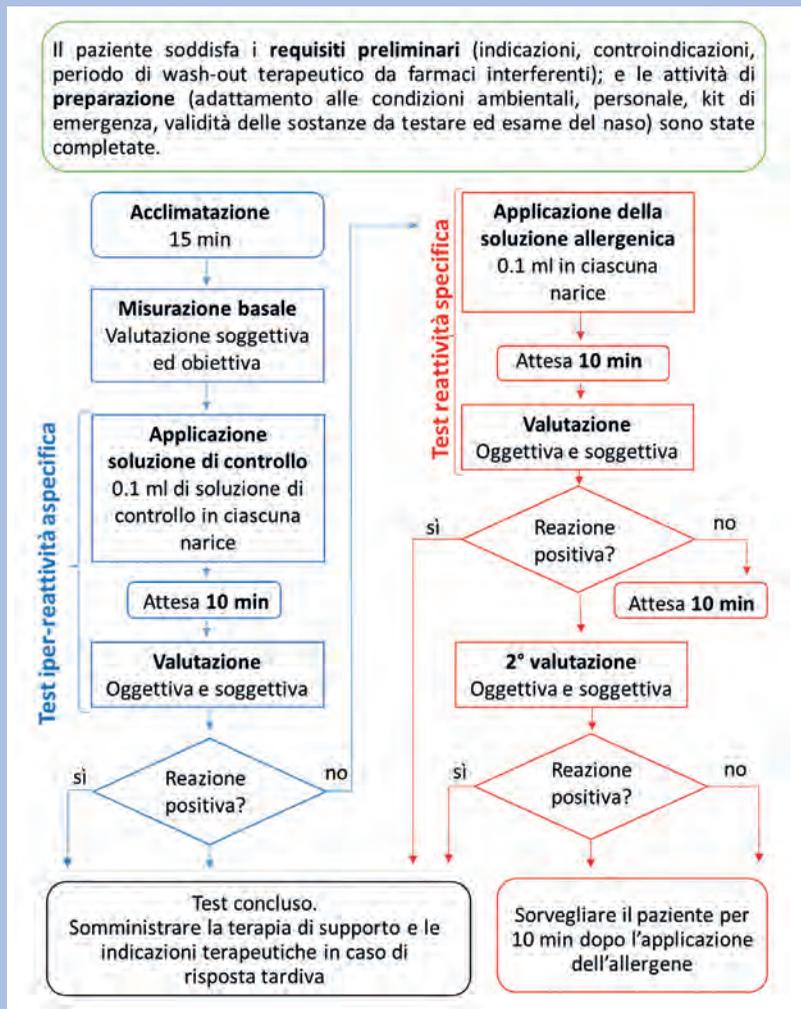
Inoltre, soprattutto nell'area mediterranea,

ad elevata complessità aero-biologica, molti pazienti con RA risultano sensibilizzati a più allergeni (poli-sensibilizzazione). In tali casi, il NAC può essere utile prima di intraprendere un trattamento con AIT non solo per verificare la gravità dei sintomi ma anche al fine di selezionare il prodotto da impiegare per quello specifico (nell'ottica di una "medicina di



Figura 1

Algoritmo procedurale del test di provocazione nasale allergene-specifico (NAC)



Adattato da (3)

precisione”) (3). Nell’ambito della ricerca clinica, gli orizzonti si estendono ulteriormente. Rimanendo nel contesto di un approccio di

“medicina di precisione”, il NAC è utile, ad esempio, per lo studio dei meccanismi fisiopatogenetici della rinite e, quindi, al riconoscimento di diversi “endotipi”

della malattia che nell’era della cosiddetta “-omica” abbraccia universi vastissimi (metabol-omica, prote-omica, microbi-omica, trascritt-omica, per citarne solo alcuni). Il NAC è altresì utile per valutare l’efficacia di un trattamento ed in particolare dell’AIT, mediante l’identificazione della dose massima necessaria per riprodurre sintomi nasali (dose soglia). Pertanto, è impiegato spesso in studi clinici come uno dei principali parametri di risposta terapeutica (4).

CONTROINDICAZIONI

Prima di intraprendere il NAC occorre valutare l’ammissibilità del paziente allo stesso. Diversi fattori possono falsare l’interpretazione del test e dovrebbero essere considerati prima di avviarlo (ad esempio farmaci, esposizione ambientale all’allergene, rinite infettiva). Qualsiasi trattamento ad elevato rischio non solo di interferenza ma anche di reazione allergica o intolleranza dovrebbe essere discontinuato per un idoneo periodo di tempo. Le principali controindicazioni al test sono elencate in Tabella 2.

PROCEDURA

Una recentissima position paper europea sulla standardizzazione del NAC (3) fornisce una linea guida per l’impiego quotidiano del test nella pratica clinica. Purtroppo ad oggi l’evidenza scientifica è inficiata da eterogeneità e discrepanze metodologiche tra i diversi documenti pubblicati (8,9). Ne conseguono difficoltà nella comparazione dei risultati e, pertanto, rimangono ancora questioni



irrisolte da chiarire. Tuttavia, il documento europeo delinea chiari e pratiche indicazioni (3). L'armonizzazione delle procedure tra i diversi paesi è elemento imprescindibile per colmare le lacune sopra menzionate.

Di seguito, vengono tracciati gli elementi chiave per una corretta esecuzione del test, secondo le indicazioni vigenti (3). Un algoritmo procedurale è schematizzato in Figura 1.

Requisiti preliminari del paziente

Al pari di ogni altro test, in pazienti eleggibili (vedi § Indicazioni) e che abbiano sottoscritto il consenso informato, si procede preliminarmente alla valutazione di eventuali contro-indicazioni (vedi § Controindicazioni). Un ruolo chiave è giocato dall'anamnesi e dall'esame obiettivo, includente il ricorso alla rinoscopia anteriore.

Stagionalità

Nel caso di allergeni stagionali, il NAC dovrebbe essere eseguito al di fuori della stagione pollinica. In ogni caso, è importante che il soggetto non presenti sintomatologia allergica o nasale al momento dell'esecuzione del test, in quanto questa potrebbe interferire con l'interpretazione del test.

Equipment e preparazione al test

Condizioni ambientali

Le condizioni della stanza devono essere confortevoli: temperatura intorno ai 20° C e umidità 40-60%, in assenza di contaminazione da altre sostanze (ad es. metacolina, ...). Inoltre, si raccomanda che la procedura si svolga a digiuno, e che il paziente soggiorni per almeno 15 minuti

a temperatura ambiente, nell'intento di limitare gli effetti di fumo, aria fredda, cibo piccante ed esercizio fisico, che potrebbero interferire con la lettura del test.

Personale e terapia di emergenza

Sebbene non siano state riportate reazioni anafilattiche dopo il test, un pre-requisito fondamentale è la presenza di personale qualificato per il riconoscimento e la gestione di emergenze quali anafilassi e broncospasmo. Il kit di emergenza deve includere un'unità di ossigeno a flusso libero, anti-istaminici (orali/i.m), corticosteroidi (orali/i.m), beta2 agonisti a breve durata di azione (inalatorio) ed adrenalina (autoiniettore). Un'unità di terapia deve essere disponibile entro 30 minuti, in caso di necessità.

Allergeni

In commercio sono disponibili preparazioni standardizzate in forma di soluzioni pronte all'uso o liofilizzate che devono essere sospesi in soluzione acquosa immediatamente prima dell'uso. L'impiego deve essere conforme alle indicazioni del produttore. In ogni caso, è importante che le soluzioni vengano portate a temperatura ambiente prima dell'uso per evitare irritazioni della mucosa. La titolazione allergenica è, in genere, limitata al campo della ricerca, a valutare la risposta ad un trattamento (dose soglia che elicitava la risposta clinica) o in pazienti con elevato grado di sensibilizzazione, in cui le concentrazioni standard potrebbero potenzialmente evocare anafilassi o attacco asmatico.

Le recenti indicazioni europee, raccomandano che sia l'applicazione dello sti-

molo che l'interpretazione della pervietà nasale, siano bilaterali.

Preparazione del naso

La soffiatura del naso è una attività preliminare imprescindibile al fine di eliminare grossolane secrezioni mucose ed impurità ad esse adese.

Valutazione

Dal momento che i parametri soggettivi e oggettivi valutano aspetti differenti dell'ostruzione nasale, è importante che quest'ultima sia valutata dalla combinazione di almeno un parametro soggettivo ed uno oggettivo. La valutazione dei sintomi clinici (starnutazione, prurito nasale, rinorrea, ostruzione nasale e sintomi oculari) può essere valutata con diverse modalità. Tra le più comunemente usate e di facile applicazione, si rammenta la "Visual Analogue Scale", in cui il paziente riporta la gravità per ciascuno dei sintomi su una scala orizzontale 0-100 mm (lieve: 0-30 mm, moderata: 31-70 mm e grave: 71-100 mm), assistito dallo sperimentatore che valuta insieme i sintomi starnuti, rinorrea o sintomi oculari.

La valutazione tecnica del flusso d'aria nasale si basa sul principio secondo cui la resistenza delle vie aeree nasali si correla alla quarta potenza dell'area della sezione trasversale del naso, così che variazioni minime del diametro causano grandi cambiamenti nella resistenza (legge di Hagen-Poiseuille). Né l'occhio umano può stimare il grado di compromissione della pervietà nasale, né le misure del diametro del naso sono sufficientemente correlate alla resistenza delle vie aeree nasali (4,10,11). Ad oggi sono stati validati e



Tabella 3

Raccomandazioni per valutare positivo il test di provocazione nasale allergene-specifico (NAC)

Metodo	Chiaramente positivo	Moderatamente positivo
Valutazioni soggettive		
Visual Analogue Scale	Sintomi ≥ 55 mm	$23 \leq$ sintomi < 55 mm
Valutazioni oggettive		
Picco di flusso inspiratorio nasale (PNIF)	Riduzione flusso $\geq 40\%$	Riduzione flusso $\geq 20\%$
Rinomanometria anteriore attiva	Riduzione flusso $\geq 40\%$ a 150 Pa	$20\% \leq$ riduzione flusso $< 40\%$ a 150 Pa
Rinometrica acustica	riduzione area della sezione trasversale $\geq 40\%$	incremento della somma di 2-6 cm $^3 \geq 27\%$ bilaterale
Rinometria a quattro fasi	incremento del logaritmo della resistenza effettiva $\geq 40\%$	incremento del logaritmo della resistenza effettiva $\geq 20\%$

Adattato da (3)

standardizzati diversi metodi tecnici: a) il picco di flusso inspiratorio nasale (PNIF), è il metodo più semplice ed economico per misurare il flusso d'aria nasale, ma è fortemente dipendente dalla collaborazione dei pazienti e dalla funzionalità polmonare; b) la rinometria acustica, è veloce, facile da eseguire ed indipendente dalla collaborazione del paziente; c) la rinomanometria anteriore attiva, sensibile ed altamente specifica, è attualmente riconosciuta come metodo standard internazionale per le misurazioni oggettive di pervietà nasale; d) la rinomanometria a 4 fasi, è considerata il metodo tecnico più affidabile per valutare la ventilazione nasale e la pervietà, nonché la regione della valvola nasale (3).

Per considerare positivo il test di provocazione nasale è sufficiente un solo criterio

(soggettivo o oggettivo) se è fortemente positivo, entrambi se moderatamente positivi (Tabella 3 e Figura 2).

Procedura

Il NAC si articola in tre step principali: a) valutazione basale, b) test di controllo (ossia di iperreattività aspecifica) e c) test allergene specifico.

a. Valutazione basale- da effettuarsi prima di applicare qualsiasi stimolo, al fine di comparare i dati con il test di controllo. Include: l'ispezione del naso (esame rinoscopico anteriore) da parte di un medico allo scopo di ispezionare le condizioni di base (turbinati, mucosa nasale, croste, secrezioni, edema, setto nasale, rinofaringe, polipi); la registrazione degli score clinici; il test di funzionalità nasale, mediante rinomanometria anteriore bilaterale, PNIF

o rinometria acustica bilaterale.

b. Valutazione iper-responsività aspecifica - i diluenti presenti nelle soluzioni allergeniche contengono conservanti che possono reagire con la mucosa nasale. Pertanto, è importante verificare che lo specifico diluente presente nella soluzione allergenica non falsi la lettura del test con la soluzione allergenica. L'applicatore dell'erogatore viene inserito nel vestibolo nasale e rivolto in alto e lateralmente verso il canto mediale dell'occhio omolaterale in modo da depositare la soluzione sulla mucosa dei turbinati medio ed inferiore. Durante l'applicazione, il paziente deve inclinare la testa verso il basso e trattenere il respiro per evitare di inalare la soluzione nelle basse vie aeree. La lettura del test viene effettuata 10 minuti dopo l'applicazione della soluzione di controllo. Se il



test è negativo, la valutazione può essere ripetuta dopo ulteriori 10 minuti; se positivo, non occorrono ulteriori valutazioni di conferma ed il test si interrompe.

c. Valutazione iper-responsività specifica: se il test aspecifico è negativo si procede con le medesime modalità alla somministrazione dello stimolo allergenico specifico e alla interpretazione del test.

Follow-up

Il paziente deve essere tenuto sotto osservazione per almeno 30 minuti e fintanto che la reazione non cessa. I pazienti dovrebbero avere accesso a decongestionanti nasali topici ed anti-istaminici topici o sistemici. Le reazioni sistemiche dovrebbero essere trattate secondo le linee guida. Sono rare ma possibili risposte tardive al test.

TEST AMBIENTALE

Sinora è stata discussa l'applicazione diretta e controllata sulla mucosa nasale di una concentrazione specifica di allergene che può essere facilmente effettuata nella pratica clinica o in un setting di ricerca. Tuttavia, questa richiede in genere l'impiego di dosi allergeniche di gran lunga superiori all'esposizione naturale. Per esaminare gli effetti dell'esposizione naturale all'aperto durante la stagione pollinica, sono stati effettuati studi in parchi o campi (12,13). Tuttavia, questi studi sono potenzialmente influenzati da diverse variabili confondenti che possono determinare fluttuazioni nella conta pollinica. Quest'ultima si modifica nel tempo (da una stagione all'altra e all'interno di una stagione) e a seconda dell'area geografica. Tali fattori possono compromettere l'affidabilità e la ripro-

ducibilità degli studi in parchi o campi. Inoltre, le esposizioni individuali ai pollini sono influenzate dalle abitudini di vita del soggetto. Il coordinamento degli studi multicentrici può essere impegnativo in quanto, in base alla loro progettazione, essi devono essere condotti entro una finestra ristretta di tempo durante la stagione pollinica. Sopperendo alle suddette limitazioni, le "environmental exposure chambers" o camere di esposizione ambientale consentono l'esposizione ad una quantità definita di allergene purificato o pollini a dosi che riproducono l'esposizione naturale in un ambiente controllato (12,13,14).

BIO-MARKERS

In contesti di ricerca, c'è fervente interesse verso lo studio di marcatori biologici,

cellulari e non, determinati in loco, su secrezioni nasali e biopsie della mucosa (15,16). Tali bio-markers possono essere analizzati e quantificati prima, durante e dopo il NAC (17,18). Sia mediatori che cellule infiammatorie risentono dei tempi di prelievo, aprendo una finestra ideale sui meccanismi fisio-patogenetici della RA nelle sue fasi iniziali e tardive. La raccolta delle secrezioni nasali costituisce un metodo di gran lunga meno invasivo delle biopsie. Tuttavia, la procedura di raccolta delle secrezioni influenza direttamente i risultati, quindi, è di fondamentale importanza convalidare e standardizzare il processo di campionamento (5). Le tecniche attualmente disponibili si basano principalmente su tre principi: raccolta di secrezioni spontanee, lavaggi nasali e assorbimento. La raccolta di secrezioni sponta-



Figura 2

Risultato positivo al test di provocazione nasale allergene-specifico (NAC)



O, valutazione oggettiva chiaramente positiva; o, valutazione oggettiva moderatamente positiva; s, valutazione soggettiva moderatamente positiva; S, valutazione soggettiva chiaramente positiva. Estratto da (3)



nee è appropriato nei soggetti con ipersecrezione nasale, mentre in individui sani il volume raccolto è spesso insufficiente. I lavaggi nasali si associano a una diluizione imprevedibile e spesso marcatori ad elevate concentrazioni cadono al di sotto dei limiti di rilevazione dei test immunologici. Le tecniche di assorbimento sembrano fornire il miglior compromesso tra quantità sufficienti di campione e rilevanza dei mediatori biologici (immunoglobuline E, citochine, ...) spesso rappresentati in concentrazioni molto basse (5).

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Il NAC costituisce uno strumento importante nella diagnostica della rinite allergica, con conseguenti importanti implicazioni terapeutiche. Si tratta di una tecnica sicura e di semplice esecuzione, di grande utilità nella diagnostica della AR. Riproducendo una reazione allergica del naso in condizioni standardizzate e controllate, esso ben si presta allo studio dei meccanismi

immuno-patogenetici che sottendono la RA, in particolare attraverso la misurazione di biomarcatori locali. Le implicazioni cliniche che ne potrebbero derivare sono straordinariamente promettenti. Infatti, l'identificazione dei cosiddetti "endotipi di malattia" potrebbe consentire un approccio di "medicina di precisione", attraverso un trattamento "cucito addosso" allo specifico individuo: è proprio questo l'orientamento verso cui oggi si proietta il mondo scientifico.



Bibliografia

1. Ait-Khaled N, Pearce N, Anderson HR, et al.-Global map of the prevalence of symptoms of rhinoconjunctivitis in children: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISA-AC) Phase Three. *Allergy* 2009;64(5):123-148.
2. Agache I, Bilò M, Braunstahl GJ, et al.-In vivo diagnosis of allergic diseases-allergen provocation tests. *Allergy* 2015;70(4):355-65.
3. Augé J, Vent J, Agache I, et al.-Position Paper on the Standardization of Nasal Allergen Challenges. *Allergy* 2018. doi: 10.1111/all.13416.
4. Dhami S, Nurmatov U, Arasi S, et al.-Allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis: A systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2017;72:1597-1631.
5. Castelli S, Arasi S, Pawankar R, et al.-Collection of nasal secretions and tears and their use in allergology. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology* 2018;18:1-9.
6. Arasi S, Pajno GB, Lau S, et al.-Local allergic rhinitis: a critical reappraisal from a paediatric perspective. *Pediatr Allergy Immunol* 2016;27:569-73.
7. Papadopoulos NG, Bernstein JA, Demoly P, et al.-Phenotypes and endotypes of rhinitis and their impact on management: a PRACTALL report. *Allergy* 2015;70:474-494.
8. Riechelmann H, Bachert C, Goldschmidt O, et al.-[Application of the nasal provocation test on diseases of the upper airways. Position paper of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (ENT Section) in cooperation with the Working Team for Clinical Immunology]. *Laryngorhinootologie* 2003;82(3):183-188.
9. Dordal MT, Lluch-Bernal M, Sanchez MC, et al.-Allergen-specific nasal provocation testing: review by the rhinoconjunctivitis committee of the Spanish Society of Allergy and Clinical Immunology. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2011;21(1):1-12.
10. Garcia GJ, Hariri BM, Patel RG, et al.-The relationship between nasal resistance to airflow and the airspace minimal cross-sectional area. *J Biomech* 2016;49(9):1670-1678.
11. Malm L, Gerth van Wijk R, et al.-Guidelines for nasal provocations with aspects on nasal patency, airflow, and airflow resistance. *International Committee on Objective Assessment of the Nasal Airways, International Rhinologic Society*. *Rhinology* 2000;38(1):1-6.
12. Pepper AN, Ledford DK. Nasal and Ocular Challenges. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Feb 28. pii: S0091-6749(18)30301-4.
13. Zuberbier T, Abelson MB, Akdis CA et al.-Validation of the Global Allergy and Asthma European Network (GA2LEN) chamber for trials in allergy: Innovation of a mobile allergen exposure chamber. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(4):1158-1166.
14. Rosner-Friese K, Kaul S, Vieths S, et al.-Environmental exposure chambers in allergen immunotherapy trials: Current status and clinical validation needs. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(3):636-43.
15. Berings M*, Arasi S*, De Ruyck N, et al.-Reliable mite-specific IgE testing in nasal secretions by means of allergen microarray. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140:301-303.* Both authors contributed equally to the manuscript.
16. Scadding GW, Eifan AO, Lao-Araya M, et al.-Effect of grass pollen immunotherapy on clinical and local immune response to nasal allergen challenge. *Allergy*. 2015;70(6):689-96.
17. Pelikan Z. Seasonal and perennial allergic conjunctivitis: the possible role of nasal allergy. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 2009; 37: 448-457.
18. Pelikan Z. Cytological changes in nasal secretions accompanying delayed nasal response to allergen challenge. *Am J Rhinol Allergy*. 2013;27(5):345-53.



Linfociti B regolatori: ruolo nello sviluppo e nella terapia delle malattie allergiche

Francesca Mion
e Carlo E.M. Pucillo

Dipartimento di Area Medica,
Università di Udine.

Not Allergol 2018; vol. 36: n. 1 : 31-41

INTRODUZIONE

Le malattie allergiche sono disturbi multifattoriali di natura complessa che vedono il coinvolgimento di fattori genetici, ambientali e socioeconomi- ci. Da ciò ne conseguono le diverse espressioni, fenotipi e comportamenti della patologia (1). L'incidenza delle manifestazioni allergiche è considerevolmente aumentata negli ultimi decenni, sia nei paesi ad alto reddito che in quelli in via di sviluppo, al punto da rappresentare un problema di salute pubblica globale (2). Nel caso specifico dell'Italia, è stato riscontrato un incremento della prevalenza delle allergie nelle popolazioni adulte ma, ancor di più, tra i bambini (dal 7 al 25% negli ultimi 20 anni) (3). Come per molte altre patologie, alla base dell'insorgenza delle manifestazioni allergiche vi è una disregolazione del sistema immunitario e numerosi lavori presenti in

RIASSUNTO

Parole chiave e acronimi

• Cellule Breg • IL-10 • TLR • Toll-like receptor • malattie allergiche

Le malattie allergiche sono in costante aumento specie nei paesi più ricchi e sviluppati, e incidono notevolmente sulla qualità della vita di coloro che ne soffrono. Nonostante l'efficacia di numerosi farmaci in grado di ridurre la sintomatologia, uno degli obiettivi della medicina moderna è quello di trovare nuove terapie che agiscano sui meccanismi che stanno alla base di questi disturbi cronici. L'immunoterapia con allergeni costituisce la nuova frontiera terapeutica e, fra i diversi meccanismi d'azione, riveste grande importanza l'espansione di popolazioni ad azione regolatoria quali le cellule Breg. Le cellule Breg costituiscono una popolazione immunologica di recente caratterizzazione e, attraverso la produzione della citochina IL-10, contribuiscono alla tolleranza a lungo termine agli allergeni. Diversi studi descrivono la capacità delle cellule Breg di sopprimere la progressione e/o favorire il recupero da infiammazioni immuno-mediate. In questa recensione daremo il benvenuto a questo nuovo attore sul palcoscenico delle malattie allergiche e dell'immunoterapia con allergeni.

letteratura forniscono una sempre più completa panoramica dei diversi attori appartenenti sia all'immunità innata che adattativa, e sui risvolti delle loro interazioni sul processo allergico (4).

In questo palcoscenico, il coinvolgimento del linfocita B è stato a lungo considerato esclusivamente in relazione alla produzione di anticorpi IgE ad alta affinità, principali responsabili



delle manifestazioni allergiche. Questa panoramica è però cambiata a seguito di una delle scoperte più rilevanti degli ultimi decenni nel campo dei linfociti B: la individuazione e caratterizzazione delle cellule B regolatorie (Breg). Questo sottogruppo di cellule B si distingue per le sue funzioni immunosoppressive e contribuisce al mantenimento della tolleranza, principalmente attraverso la produzione di IL-10 e di altri mediatori ad azione anti-infiammatoria (5). Diversi lavori hanno dimostrato la correlazione fra l'assenza o la perdita di queste cellule Breg e l'aggravarsi di sintomatologie sia di tipo allergico che autoimmune (6). Più nello specifico, nel contesto allergico, alcuni sottoinsiemi di cellule Breg che producono IL-10 sono stati recentemente descritti come potenti cellule soppressive in grado di contenere la risposta infiammatoria sia direttamente, attraverso l'inibizione dell'infiammazione mediata da cellule T effettrici, che indirettamente promuovendo la differenziazione delle cellule T regolatorie (7).

In questa recensione descriveremo i principali tipi di cellule Breg caratterizzati nell'uomo e nel topo e i loro meccanismi di soppressione, e forniremo lo stato dell'arte del loro ruolo nella patogenesi di diverse manifestazioni allergiche quali asma, allergia alimentare e ipersensibilità da contatto. Concluderemo presentando una serie di studi che rivelano l'esistenza di un'intrigante relazione fra le malattie allergiche, le cellule Breg e la cosiddetta "ipotesi igienica".

CELLULE B REGOLATORIE: UN MONDO ANCORA DA SCOPRIRE

Prima di passare ad affrontare quello che è lo specifico ruolo delle cellule Breg nei disturbi allergici, vorremmo accompagnare il lettore attraverso un breve excursus all'interno del complesso mondo di questo subset immunologico di relativamente giovane scoperta. Difatti, sebbene le prime evidenze di un ruolo soppressivo del linfocita B risalgano agli anni '70 quando fu dimostrato che splenociti privati della componente B non erano in grado di sopprimere l'ipersensibilità di tipo ritardato nel porcellino d'India, la vera esplosione degli studi sulle cellule Breg si ha appena alla fine degli anni '90-inizi 2000. Janeway e colleghi furono i primi a dimostrare l'esistenza di un sottogruppo di cellule B capaci di regolare la risposta immunitaria in modo tale da avere un completo recupero da una condizione di encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE) acuta (8); mentre invece il merito della scoperta che questo effetto era mediato dalla produzione della citochina IL-10 si deve al gruppo di Anderson (9). Nel corso degli anni diventa sempre più concreta l'evidenza che, in aggiunta al loro ruolo essenziale nell'immunità umorale, le cellule B svolgono una funzione regolatoria: una serie di studi condotti in diversi modelli murini di autoimmunità e infiammazione cronica descrivono difatti la capacità di distinti sottogruppi di cellule B di sopprimere la progressione e/o favorire il recupero da infiammazioni immuno-mediate (10-

12). Tuttavia, nonostante i grandi sforzi impiegati al fine di identificare un marcatore specifico della cellula Breg, analogo al fattore di trascrizione Foxp3 descritto per le cellule T regolatorie (Treg), ad oggi non è ancora possibile stabilire se esistono uno o più sottogruppi di cellule Breg e sempre nuovi fenotipi e meccanismi di soppressione vengono descritti per questo subset funzionale.

CELLULE BREG: ORIGINE, MECCANISMI D'INDUZIONE E FENOTIPI

Sebbene la comunità scientifica ha ormai raggiunto un consenso in merito alle funzioni effettrici delle cellule Breg, lo stesso non si può dire per quanto concerne il loro fenotipo. Ad oggi, sia nell'uomo che nel topo, sono stati descritti diversi sottogruppi di cellule Breg e i principali sono riepilogati in Tabella 1.

Fra questi troviamo le cellule B T2-MZP, ampiamente studiate dal gruppo di Claudia Mauri. Tra i diversi sottotipi di cellule B che risiedono nella milza di un topo affetto da artrite, le cellule B T2-MZP sono risultate essere le principali produttrici di IL-10 dopo stimolazione con collagene e le uniche a presentare una capacità soppressiva sia in vivo che in vitro (11). Dopo questo primo studio del 2007, si sono susseguiti tutta una serie di lavori che hanno confermato le funzioni soppressive delle cellule B T2-MZP in diverse altre patologie quali l'allergia e il cancro. Un altro sottogruppo che ha ampiamente calcato il palcoscenico è rappresentato dalle cellule B10, caratterizzate dalla co-espres-



Tabella 1

Principali sottogruppi di cellule Breg nell'uomo e nel topo

Origine	Sottogruppo	Fenotipo	Meccanismo solubile di soppressione
Topo	T2-MZP	CD19+CD1dhiCD21hiCD23hiCD24hi	IL-10
	Cellule B della zona marginale (MZ)	CD19+CD1dhiCD21hiCD23-	IL-10
	Cellule B10	CD19hiCD1dhiCD5+	IL-10
	Cellule B-1a	CD19+CD5+	IL-10, TGF- β
	Plasmablasti	CD138+CD44hi	IL-10
	Plasmacellule	B220+CD1dhiCD138+ CD138+IgA+PD-L1+	IL-10, IL-35
	Cellule B killer	CD5+CD1dhiFasL+	IL-10
	-	CD19+CD9+	IL-10
	-	CD19+TIM-1+	IL-10
Uomo	Cellule B immature	CD19+CD24hiCD38hi	IL-10
	Cellule B10	CD19+CD24hiCD27+	IL-10
	Cellule Br1	CD19+CD25hiCD71hi	IL-10, IgG4
	Plasmablasti	CD19+CD24hiCD27int	IL-10

Note: da Rosser E. and Mauri C., 2015, *Immunity* (23)

per maggiori informazioni sulle specifiche funzioni e contesti patologici d'azione dei diversi sottogruppi indicati in tabella.

sione delle molecole di superficie CD1d e CD5 e dalla produzione di IL-10 (10, 13). Analogamente alle cellule B T2MZP, anche le cellule B10 si sono dimostrate in grado di sopprimere la risposta infiammatoria in una varietà di disturbi immuno-correlati. Più di recente è stato dimostrato che anche cellule B ad uno stadio di maturazione più avanzato possono esercitare una funzione regolatoria.

Attraverso il rilascio delle citochine IL-10 e IL-35, le cellule spleniche CD138+ possono ad esempio sopprimere l'infiammazione nell'EAE, così come la risposta immunitaria all'infezione da Salmonella enterica serovar Typhimurium (14). Analogamente al contesto murino, in assenza di un fenotipo condiviso anche le cellule Breg umane vengono identificate principalmente in base alla loro capacità di pro-

duurre IL-10. A seguito della stimolazione in vitro via CD40, le cellule B immature CD19+CD24hiCD38hi si sono dimostrate le maggiori produttrici di IL-10 tra i sottogruppi di cellule B presenti nel sangue periferico. Inoltre, difetti numerici e funzionali a carico di questa popolazione sono stati descritti in associazione a diverse malattie autoimmuni, incluso il lupus eritematoso sistemico e l'artrite reumatoi-



de (15). L'analogo del subset B10 murino è stato descritto all'interno della sottopopolazione CD19+CD24hiCD27+. Un'aumentata frequenza di queste cellule è stata descritta in diverse malattie autoimmuni sistemiche e, a differenza delle cellule Breg CD24hiCD38hi, rispondono alla stimolazione con lipopolisaccaride (LPS) e CpG (16).

La diretta conseguenza di questa eterogeneità di fenotipi è stata un ampio dibattito su quella che è l'origine delle cellule Breg, e la teoria oramai più accreditata è quella ipotizzata da Mauri e Bosma secondo la quale esiste un progenitore comune che ha però il potenziale di differenziarsi nei vari sottotipi di cellule Breg dopo esposizione a specifici fattori ambientali (17). Ecco quindi che diventa di fondamentale importanza la caratterizzazione dello specifico contesto in cui la cellula B si viene a trovare e l'identificazione degli stimoli necessari per indurre le cellule B ad assumere un fenotipo regolatorio. I ligandi dei recettori Toll-like e la molecola CD40L sono i segnali meglio conosciuti nel contesto della differenziazione delle cellule Breg ma anche altri fattori, quali ad esempio diverse citochine pro-infiammatorie, sono state descritte avere un ruolo molto rilevante (17).

COSA RENDE UNA CELLULA B "REGOLATORIA": MECCANISMI E MEDIATORI DI SOPPRESSIONE

Le cellule Breg hanno a disposizione molteplici meccanismi per modulare la risposta immunitaria e questo ampio armamen-

tario consente loro di agire su diversi partner cellulari, fra cui le cellule dendritiche, i macrofagi, le cellule T helper 1 (Th1) e Th2 e le cellule Treg (Figura 1). Di particolare interesse per i lettori di questo articolo divulgativo è inoltre la capacità delle cellule Breg CD5+ di inibire l'attivazione IgE-mediata dei mastociti attraverso un meccanismo dipendente dal contatto diretto cellula-cellula. L'interazione fra la molecola CD40 espressa sulle cellule B CD5+ e il CD40L dei mastociti porta alla produzione di IL-10 da parte delle cellule B CD5+, e la conseguente inibizione dell'attivazione della tirosina chinasi Syk e della degranolazione dei mastociti (18).

Come fin qui ribadito diverse volte, la funzione effettrice più nota e importante delle cellule Breg è la produzione della citochina immunosoppressiva IL-10 e, a riprova di ciò, la loro funzione protettiva in patologie quali l'artrite, l'EAE, il diabete e disturbi infiammatori intestinali viene a mancare se le cellule B sono inibite nella loro capacità di produrre IL-10. Tuttavia, è stato dimostrato che alcuni sottogruppi di cellule Breg producono la citochina TGF- β che, similmente a IL-10, agisce sopprimendo la produzione di citochine infiammatorie da parte delle cellule T e inibendo la funzione di presentazione dell'antigene nelle cellule dendritiche e nei macrofagi (19). Indipendentemente dalla secrezione di queste citochine, le cellule Breg sono in grado di sopprimere le cellule bersaglio anche attraverso meccanismi di contatto cellulare. Diverse sono le molecole di superficie delle cellule B implicate nelle funzioni soppressive delle cellule Breg e fra queste è importante ricordare CD1d, CD40L, CD80 e CD86. Inoltre, diverse evidenze hanno

dimostrato la capacità delle cellule Breg di indurre l'apoptosi delle cellule bersaglio attraverso molecole di superficie quali FasL e PD-L1 (17).

CELLULE B REGOLATORIE E MALATTIE ALLERGICHE

Il termine "allergia" fu coniato nel 1906 da Clemens von Pirquet per richiamare l'attenzione sull'insolita propensione di alcuni individui a sviluppare segni e sintomi di reattività, o "reazioni di ipersensibilità", quando esposti a determinate sostanze. Considerando l'estrema eterogeneità delle manifestazioni allergiche, risulta difficile formulare una definizione esaustiva ma, nel loro complesso, sono il risultato di una risposta immunitaria anormale o di un'induzione difettosa dei meccanismi di tolleranza contro i cosiddetti allergeni, sostanze ambientali non infettive e altrimenti innocue (20). Disturbi allergici quali anafilassi, rinite allergica, asma allergica e alcuni tipi di allergie alimentari sono classificati come reazioni allergiche di tipo immediato e sono caratterizzati dal coinvolgimento di anticorpi IgE prodotti da cellule B stimulate da cellule Th2 allergene-specifiche. La fase effettrice ha inizio quando l'allergene riesce a legare due o più molecole di IgE in modo da indurre il crosslink dei recettori Fc ϵ RI su mastociti o basofili, innescando così il rilascio di citochine e mediatori proinfiammatori che causano le manifestazioni cliniche dei disturbi allergici (21). In altri tipi di manifestazioni allergiche, come la dermatite allergica da contatto, si ritiene



che le IgE non siano importanti. Le reazioni immunitarie di tipo ritardato si basano difatti sull'attivazione di cellule T CD4+ e CD8+ specifiche per l'antigene, e necessitano di uno sviluppo da 24 a 48 ore. In questo intricato scenario, le cellule Breg svolgono un ruolo rilevante sia nelle fasi iniziali, scatenanti la patologia, che quando ormai le complesse interazioni tra cellule infiammatorie, mediatori flogistici e citochine hanno scatenato il quadro completo dell'infiammazione

allergica.

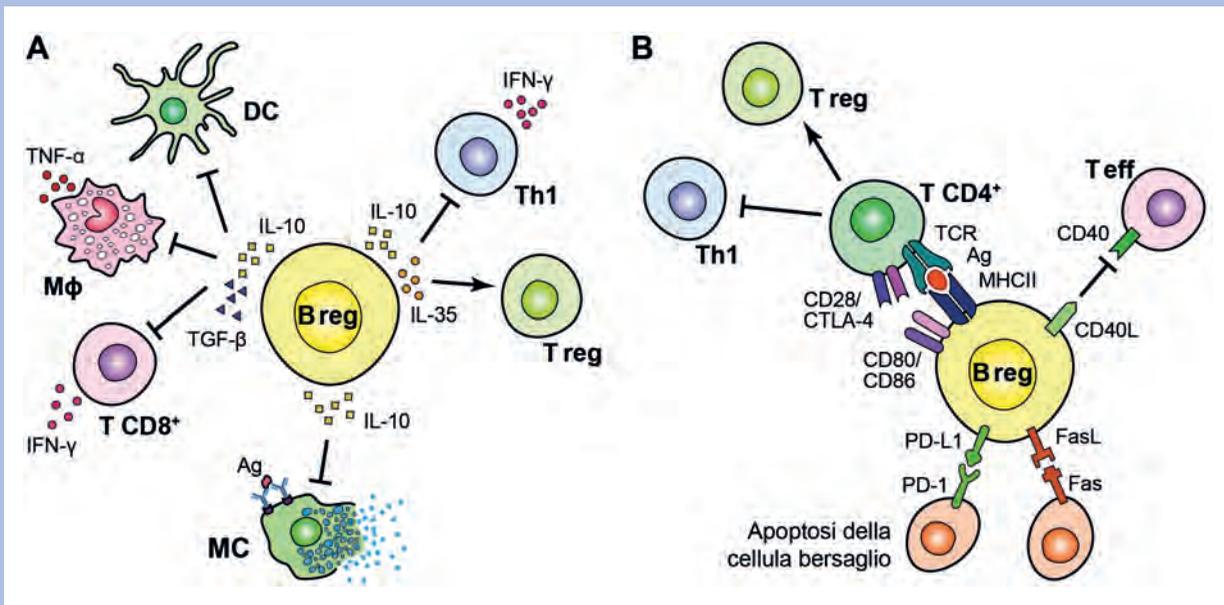
L'induzione e il mantenimento della tolleranza agli allergeni è il segno distintivo di una corretta risposta immunitaria ad agenti ambientali non infettivi, e le cellule Breg contribuiscono a mantenere questa tolleranza, non solo in soggetti sani, ma anche nel ripristino della corretta risposta immunitaria dopo immunoterapia con allergeni (AIT) (22). I meccanismi attraverso i quali le cellule Breg possono mantenere e ripristinare la

tolleranza agli allergeni sono molteplici e comprendono l'induzione delle cellule Treg, la soppressione diretta delle cellule T effettrici ma anche quella indiretta, dovuta all'inibizione della maturazione delle cellule dendritiche, e la produzione di anticorpi di tipo IgG4 (23). Di tutte queste armi della cellula Breg, la produzione dell'isotipo IgG4 richiama grande interesse nel contesto dell'induzione della tolleranza agli allergeni umani. L'IgG4 è difatti un'immunoglobulina



Figura 1

Funzioni soppressive delle cellule Breg



(A) Attraverso il rilascio di citochine quali IL-10, TGF-β e IL-35, le cellule Breg sono in grado di indurre le cellule Treg e, al tempo stesso, inibire l'attivazione IgE-mediata dei mastociti e sopprimere la funzione delle cellule T effettrici e di diverse cellule presentanti l'antigene.

(B) Le funzioni soppressive delle cellule Breg possono essere mediate anche da meccanismi di contatto cellulare. Le interazioni Fas/FasL e PD-1/PD-L1 possono indurre la morte cellulare della cellula bersaglio mentre il legame CD40/CD40L inibisce la proliferazione delle cellule T effettrici. L'interazione tra CD80/CD86 e CD28 favorisce invece l'induzione di cellule Treg e la soppressione delle cellule Th1.



anti-infiammatoria che compete con le IgE per il legame all'allergene e, così facendo, ha un'attività bloccante che impedisce l'attivazione indesiderata di mastociti e basofili. Il gruppo di ricerca guidato da Akdis Cezmi e Mubecel ha investigato a fondo il ruolo delle cellule Breg nella tolleranza immunitaria agli allergeni e nella AIT e uno dei primi studi è stato condotto su apicoltori sani e su soggetti allergici al veleno d'api, prima e dopo essere stati sottoposti a immunoterapia specifica. I risultati di questa ricerca hanno mostrato che le cellule B specifiche per la fosfolipasi A2, il più importante allergene del veleno d'api, isolate dagli apicoltori sani, presentavano elevati livelli di IL-10 e di IgG4. Ancor più rilevante è il dato ottenuto nei pazienti allergici al veleno d'api nei quali la frequenza delle cellule B fosfolipasi A2-specifiche e producenti IL-10 subisce un incremento da due a cinque volte dopo quattro mesi di AIT (24).

L'importanza delle cellule Breg nell'induzione della tolleranza agli allergeni è stata dimostrata anche nel contesto murino (23). Un esempio è dato dallo studio di Singh e collaboratori i quali hanno mostrato come le cellule B isolate dai linfonodi ilari di topi cronicamente esposti all'ovalbumina siano in grado di sopprimere l'infiammazione allergica delle vie aeree che si sviluppa in topi solamente sensibilizzati con la stessa ovalbumina. In questo caso la citochina IL-10 non è responsabile dell'effetto soppressivo in quanto gli autori dimostrano che l'effetto è mediato dalla conversione di cellu-

le T effettrici CD4+CD25- in cellule Treg CD4+CD25+Foxp3+ indotta da TGF- β (25).

Questo ultimo esempio mette in risalto ancora una volta la diversità delle cellule B ad azione regolatoria e il ventaglio di meccanismi attraverso i quali può essere esercitata l'azione soppressiva. La diretta conseguenza di questa eterogeneità è che, a seconda dello specifico disturbo allergico in esame, incontreremo popolazioni diverse di cellule Breg e questo aspetto è da tenere in particolare considerazione nell'ottica dell'immunoterapia con allergeni. A questo scopo, qui di seguito verranno presentati gli specifici meccanismi d'azione e l'impatto delle cellule Breg sulla modulazione di tre diverse malattie allergiche: l'asma allergica, l'allergia alimentare e la dermatite allergica da contatto (Figura 2 A, B, C).

Asma allergica

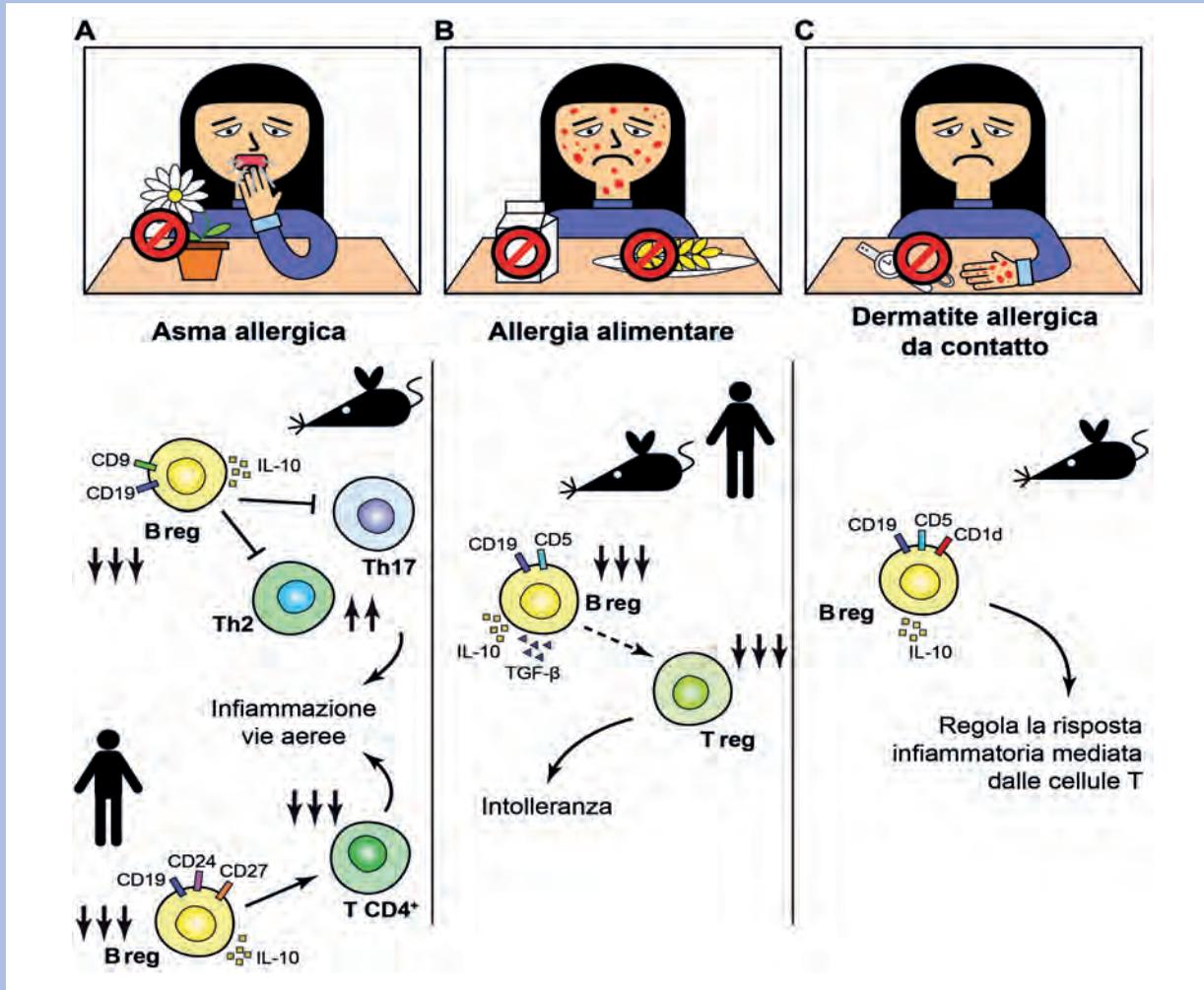
L'asma allergica è una malattia infiammatoria cronica delle vie aeree caratterizzata da diversi sintomi quali dispnea, respiro sibilante, senso di costrizione toracica e tosse. Questa patologia è il risultato di complesse interazioni fra fattori genetici e ambientali ed è caratterizzata da una grande eterogeneità sia nella presentazione clinica dei sintomi che nel tipo e intensità di infiammazione e rimodellamento delle vie aeree (26). Come spesso accade in questi casi, diverse evidenze riguardo al ruolo delle cellule Breg nel contesto dell'asma allergica derivano dall'analisi di specifici modelli murini della patologia in questione. Molto elegante è lo studio

condotto dal gruppo di Sophie Brouard che mette a confronto la popolazione B di topi sani e di topi affetti da asma allergica indotta da sensibilizzazione percutanea e somministrazione per via aerea di un estratto di acaro della polvere di casa (27). Nello specifico, gli autori osservano una ridotta percentuale di cellule B producenti IL-10 nei polmoni dei topi malati e una contemporanea aumentata produzione di citochine pro-infiammatorie da parte del compartimento B. Ancora più interessante è il risultato ottenuto dall'iniezione di cellule B esprimenti il marker di superficie CD9 nei topi affetti da asma allergica. Gli autori mostrano infatti che le cellule Breg producenti IL-10 sono arricchite nel subset CD9+ e la somministrazione di queste cellule riduce l'infiammazione delle vie aeree e ripristina l'omeostasi polmonare inibendo l'azione delle cellule Th2 e Th17 (27). Una ridotta frequenza di cellule Breg caratterizzate dal fenotipo CD24hiCD27+ è stata rilevata anche in soggetti affetti da asma allergica reclutati in uno studio condotto alcuni anni fa da van der Vlugt e collaboratori (28). Questa popolazione, oltre a essere meno rappresentata in percentuale, presentava anche una ridotta capacità di produrre IL-10 in risposta al trattamento con LPS rispetto alla controparte sana. Il risvolto funzionale di tutto questo è ancora una volta una disregolazione della tolleranza agli allergeni: in presenza dell'allergene dell'acaro della polvere, le cellule T CD4+ producono meno IL-10 quando messe in co-cultura con cellule B attivate con LPS isolate da pa-



Figura 2

Eterogeneità delle popolazioni Breg nei diversi disturbi allergici



(A) Sia nel contesto umano che murino, una ridotta percentuale di cellule B producenti IL-10 favorisce l'infiammazione delle vie aeree caratterizzante l'asma allergica. Nel topo le cellule Breg producenti IL-10 sono arricchite nel subset CD19+CD9+ mentre nell'uomo sono caratterizzate dal fenotipo CD19+CD24hiCD27+.

(B) Sia nell'uomo che nel topo, l'assenza della popolazione Breg CD19+CD5+ produttrice TGF-β e/o IL-10 comporta una ridotta induzione delle cellule Treg e quindi la mancata soppressione della risposta allergica indotta da caseina.

(C) Nel modello murino di dermatite allergica da contatto la popolazione Breg caratterizzata dal fenotipo CD19hiCD1dhiCD5+ è in grado di regolare la risposta infiammatoria T-dipendente attraverso la produzione di IL-10.



zienti allergici e non da soggetti sani, suggerendo che le cellule Breg possono istruire le cellule T verso l'acquisizione di una funzione soppressiva (28).

Allergia alimentare

A differenza delle intolleranze alimentari, alla cui base vi sono fattori non immuno-relati, l'allergia alimentare è una manifestazione patologica generata da una risposta inappropriata del sistema immunitario nei confronti di un determinato antigene proteico alimentare. Gli allergeni alimentari possono scatenare sintomi clinici come disturbi gastrointestinali, orticaria e infiammazione delle vie aeree, e la gravità della sintomatologia è molto variabile (29). Le allergie alimentari includono le risposte immuni IgE-mediate, non-IgE mediate e la combinazione di entrambe, e la loro incidenza è significativamente aumentata negli ultimi vent'anni. Alimenti quali le arachidi, il latte, le uova e i crostacei sono ben noti come possibili responsabili di sintomi allergici in pazienti affetti da allergia alimentare gastrointestinale, dermatite atopica e anafilassi (30). Fra questi, il latte vaccino è una delle principali cause di allergia alimentare fra neonati e bambini, e diverse ricerche hanno preso in considerazione questo specifico disturbo per investigare il ruolo delle cellule Breg. In un primo studio esplorativo, sono stati selezionati otto soggetti allergici e tredici soggetti tolleranti al latte con dermatite atopica e il risultato ottenuto è che il trattamento delle loro cellule mononucleate del sangue periferico con la casei-

na induce una significativa riduzione delle cellule CD19+CD5+ producenti IL-10 nel gruppo dei pazienti allergici al latte ma non in quello dei soggetti tolleranti (31). La spiegazione di questa osservazione preliminare viene pubblicata poco dopo dallo stesso gruppo di ricerca e sta nel diverso target dell'effetto proliferativo indotto dalla caseina. Difatti, mentre nei soggetti tolleranti l'allergene indurrebbe la proliferazione di cellule producenti IL-10, nel gruppo dei pazienti allergici al latte la caseina favorirebbe l'espansione della controparte non-IL-10 produttrice (32). Un dato molto rilevante è che questo stesso meccanismo sta anche alla base delle differenze osservate nella popolazione Breg CD19+CD5+ produttore TGF- β fra soggetti allergici e tolleranti al latte con una storia ripetuta di reazioni eczematose tardive o esacerbazioni di dermatite atopica (33). Più di recente il ruolo delle cellule CD5+IL-10+ nel controllo dell'allergia alimentare indotta da caseina è stato confermato anche nel topo. Nello specifico, Kim e collaboratori hanno dimostrato che le cellule CD5+ isolate dai linfonodi mesenterici, ma non dalla milza o dal peritoneo, sono in grado di sopprimere la risposta allergica indotta da questa proteina del latte attraverso l'induzione delle cellule Treg e tramite un meccanismo IL-10-dipendente (34). Le caseine costituiscono circa l'80% delle proteine del latte vaccino mentre il restante 20% è dato dalle proteine del siero. L'idrolisi delle proteine del latte è una strategia utilizzata nella terapia delle intolleranze a questo alimento e uno studio pub-

blicato nel 2017 ha dimostrato come l'effetto immunomodulatore del siero parzialmente idrolizzato è associato ad un aumento non solo di cellule Treg, ma anche Breg, nella milza (35).

Dermatite allergica da contatto

La pelle è uno dei siti dell'organismo ad essere maggiormente esposto a sostanze chimiche e ambientali e la dermatite da contatto, sia di origine allergica che irritativa, è fra le più comuni malattie della cute. Le manifestazioni cutanee associate alle dermatiti da contatto includono eczema, gonfiore e vesciche e possono compromettere sensibilmente la qualità della vita dei pazienti. Sebbene entrambe le forme di dermatite da contatto prevedano un processo infiammatorio, le reazioni cutanee della dermatite irritativa da contatto (DIC) sono di tipo non-immunologico e derivano direttamente dal danno tissutale generato dal contatto con lo stimolo (36). A differenza della maggior parte delle malattie allergiche, le quali presentano una risposta di ipersensibilità immediata che coinvolge le IgE, la dermatite allergica da contatto (DAC) è il prototipo di reazione di ipersensibilità di tipo ritardato ed è causata dal contatto con apteni che attivano le cellule T antigene-specifiche in pazienti sensibilizzati (37). Nell'ultimo decennio nuovi sottogruppi di cellule immunitarie, come le cellule Treg e le cellule Th17, sono stati identificati sia nell'uomo che nel topo e l'importante ruolo svolto da queste popolazioni nell'ACD è stato rilevato grazie allo studio del modello murino dell'ipersensibilità al



contatto (CHS, contact hypersensitivity). Ed è proprio in questo modello che il gruppo di Tedder ha descritto per la prima volta l'esistenza delle cellule B10 CD19hiCD1dhiCD5+ e la loro capacità di regolare la risposta infiammatoria T-dipendente attraverso la produzione di IL-10. Difatti, l'inoculo di cellule CD1dhiCD5+ isolate da un topo wild-type, ma non IL-10^{-/-}, in topi privi di cellule B è in grado di normalizzare la risposta CHS (13). Più di recente, un lavoro pubblicato sulla rivista *Contact Dermatitis* ha dimostrato che l'esposizione a dosi immunosoppressive di raggi UVB altera la funzione regolatoria delle cellule B nei tessuti linfoidi inducendo l'espansione delle cellule Breg. Rilevante dal punto di vista clinico è il dato che le cellule Breg così indotte sono in grado di inibire la proliferazione delle cellule T e portare ad un miglioramento della CHS (38).

MANIFESTAZIONI ALLERGICHE, CELLULE BREG E IPOTESI IGIENICA

A livello mondiale si è osservato un costante aumento delle malattie allergiche in parallelo ad una diminuzione delle infezioni parassitarie. Questo andamento inverso suggerisce che alla base vi sia un'associazione causale e una possibile spiegazione risiede nella cosiddetta ipotesi igienica formulata da Strachan negli anni '80, secondo la quale gli ambienti sempre più puliti e sterili della vita moderna hanno promosso lo sviluppo di

molte malattie, tra cui l'asma (39). Le infezioni da elminti inducono forti risposte Th2 e la produzione di IgE, e l'incidenza dei disturbi allergici è inferiore nei soggetti affetti da infezioni da elminti rispetto ad individui sani (40). L'intrigante legame fra ipotesi igienica, manifestazioni allergiche e cellule Breg risiede nelle evidenze riportate da diversi studi secondo le quali le infezioni batteriche e parassitarie possono indurre un'espansione delle cellule Breg. Partendo dall'associazione negativa fra le infezioni croniche da elminti e i disturbi allergici, van der Vlugt e collaboratori hanno dimostrato come la protezione dall'infiammazione allergica delle vie aeree mediata da *Schistosoma mansoni* fosse specificatamente dipendente dalle cellule B produttrici di IL-10. Attraverso un sistema di coltura in vitro, gli autori dimostrano che questo elminto è in grado di indurre cellule CD1dhiIL-10+ e che il trasferimento di questa specifica popolazione di cellule Breg sopprime l'infiammazione allergica delle vie aeree in topi sensibilizzati con l'ovalbumina (41). L'infezione da *Schistosoma mansoni* è anche in grado di conferire protezione ai topi in un modello sperimentale di anafilassi fatale sistemica e, anche in questo caso, studi di deplezione in vivo hanno dimostrato un ruolo fondamentale delle cellule B e della citochina IL-10 nella protezione conferita da questo parassita (42). Quelli appena citati sono solamente due dei diversi studi presenti in letteratura su questa tematica ma, ciò nonostante, sono sufficienti a trasmettere l'importante considerazione che, in assenza degli stimoli infettivi, alcune componenti del sistema immunitario non risul-

tano più adeguatamente controllate dagli elementi regolatori, con la conseguente insorgenza di disturbi allergici e non solo.

CONCLUSIONI

L'identificazione di una funzione regolatoria specifica del compartimento B del sistema immunitario ha suscitato notevole interesse nel campo scientifico, soprattutto alla luce delle potenzialità delle cellule Breg nell'ambito della messa a punto di nuove modalità diagnostiche e di terapie innovative per il trattamento di diverse malattie autoimmuni. La rilevanza che lo studio di questo subset cellulare può rivestire in ambito clinico è stata presto compresa anche nel contesto dei disturbi allergici, e diversi studi hanno dimostrato il ruolo delle cellule Breg nella tolleranza immunitaria agli allergeni e nella AIT. La maggiore problematica legata all'effettiva applicabilità di una terapia basata sulle cellule Breg è data dall'enorme eterogeneità di questo subset funzionale, eterogeneità che si manifesta sia nel fenotipo che nelle funzioni effettrici. Assodata l'importanza delle cellule Breg è dunque prioritario definirne la precisa identità nello specifico contesto allergico in esame e comprendere come manipolarle al fine di ottenere una sempre più efficiente soppressione della risposta immunitaria agli allergeni nei pazienti affetti da disturbi allergici.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano il Dott. Marco Zanon per il supporto nella preparazione delle figure.



Bibliografia

1. Pinart M, Albang R, Maier D, et al.-Systematic Review on the Definition of Allergic Diseases in Children: The MeDALL Study. *International archives of allergy and immunology* 2015; 168: 110-21.
2. Yoo Y, Perzanowski MS. Allergic sensitization and the environment: latest update. *Current allergy and asthma reports* 2014; 14: 465.
3. Tchidjou HK, Vescio MF, Serafinelli J, et al.-Susceptibility to allergy in adoptive children: a cross-sectional study at "Bambino Gesù Children's Hospital". *Italian journal of pediatrics* 2018; 44: 3.
4. Leite-de-Moraes M, Hammad H, Dy M. Crosstalk between Innate and Adaptive Cells on Allergic Process. *Journal of Allergy* 2012; 2012: 720568.
5. Mauri C, Menon M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *The Journal of clinical investigation* 2017; 127: 772-9.
6. Noh G, Lee JH. Regulatory B cells and allergic diseases. *Allergy, asthma & immunology research* 2011; 3: 168-77.
7. Braza F, Chesne J, Castagnet S, et al.-Regulatory functions of B cells in allergic diseases. *Allergy* 2014; 69: 1454-63.
8. Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, et al.-Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 1996; 184: 2271-8.
9. Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, et al.-B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature immunology* 2002; 3: 944-50.
10. Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, et al.-The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *Journal of Immunology* 2009; 182: 7459-72.
11. Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, et al.-Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *Journal of Immunology* 2007; 178: 7868-78.
12. Lampropoulou V, Hoehlig K, Roch T, et al.-TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *Journal of Immunology* 2008; 180: 4763-73.
13. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, et al.-A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 2008; 28: 639-50.
14. Shen P, Roch T, Lampropoulou V, et al.-IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* 2014; 507: 366-70.
15. Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, et al.-CD19(+) CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* 2010; 32: 129-40.
16. Kalampokis I, Yoshizaki A, Tedder TF. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis research & therapy* 2013; 15 Suppl 1: S1.
17. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annual Review of Immunology* 2012; 30: 221-41.
18. Kim HS, Kim AR, Kim DK, et al.-Interleukin-10-producing CD5+ B cells inhibit mast cells during immunoglobulin E-mediated allergic responses. *Science signaling* 2015; 8: ra28.
19. Rosser E, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* 2015; 42: 607-12.
20. Averbeck M, Gebhardt C, Emmrich F, et al.-Immunologic principles of allergic disease. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 2007; 5: 1015-28.
21. He SH, Zhang HY, Zeng XN, et al.-Mast cells and basophils are essential for allergies: mechanisms of allergic inflammation and a proposed procedure for diagnosis. *Acta pharmacologica Sinica* 2013; 34: 1270-83.
22. Palomares O, Akdis M, Martín-Fontecha M, et al.-Mechanisms of immune regulation in allergic diseases: the role of regulatory T and B cells. *Immunological reviews* 2017; 278: 219-36.
23. van de Veen W. The role of regulatory B cells in allergen immunotherapy. *Current opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2017; 17: 447-52.
24. van de Veen W, Stanic B, Yaman G, et al.-IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2013; 131: 1204-12.
25. Singh A, Carson WFT, Secor ER, Jr, et al.-Regulatory role of B cells in a murine model of allergic airway disease. *Journal of Immunology* 2008; 180: 7318-26.
26. Papi A, Brightling C, Pedersen SE, et al. Asthma. *Lancet* 2017.
27. Braza F, Chesne J, Durand M, et al.-A regulatory CD9(+) B-cell subset inhibits HDM-induced allergic airway inflammation. *Allergy* 2015; 70: 1421-31.
28. van der Vlugt LE, Mlejnek E, Ozir-Fazalalikhani A, et al.-CD24(hi)CD27(+) B cells from patients with allergic asthma have impaired regulatory activity in response to lipopolysaccharide. *Clinical and Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2014; 44: 517-28.
29. Yu W, Freeland DMH, Nadeau KC. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nature reviews Immunology* 2016; 16: 751-65.
30. Sicherer SH, Wood RA, Stablein D, et al.-Immunologic features of infants with milk or egg allergy enrolled in an observational study (Consortium of



Bibliografia

Food Allergy Research) of food allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010; 125: 1077-83 e8.

- 31. Lee JH, Noh J, Noh G, et al.-Allergen-specific B cell subset responses in cow's milk allergy of late eczematous reactions in atopic dermatitis. *Cellular Immunology* 2010; 262: 44-51.
- 32. Noh J, Lee JH, Noh G, et al.-Characterisation of allergen-specific responses of IL-10-producing regulatory B cells (Br1) in Cow Milk Allergy. *Cellular Immunology* 2010; 264: 143-9.
- 33. Lee JH, Noh J, Noh G, et al.-Allergen-specific transforming growth factor-beta-producing CD19+CD5+ regulatory B-cell (Br3) responses in human late eczematous allergic reactions to cow's milk. *Journal of interferon & cytokine research : the Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 2011; 31: 441-9.

- 34. Kim AR, Kim HS, Kim DK, et al.-Mesenteric IL-10-producing CD5+ regulatory B cells suppress cow's milk casein-induced allergic responses in mice. *Scientific reports* 2016; 6: 19685.
- 35. Kiewiet MBG, van Esch B, Garssen J, et al.-Partially hydrolyzed whey proteins prevent clinical symptoms in a cow's milk allergy mouse model and enhance regulatory T and B cell frequencies. *Molecular nutrition & food research* 2017; 61.
- 36. Mark BJ, Slavin RG. Allergic contact dermatitis. *The Medical clinics of North America* 2006; 90: 169-85.
- 37. Gittler JK, Krueger JG, Guttman-Yassky E. Atopic dermatitis results in intrinsic barrier and immune abnormalities: implications for contact dermatitis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2013; 131: 300-13.
- 38. Liu X, Huang H, Gao H, et al.-Regulatory B cells

- induced by ultraviolet B through toll-like receptor 4 signalling contribute to the suppression of contact hypersensitivity responses in mice. *Contact Dermatitis* 2018; 78: 117-30.
- 39. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj* 1989; 299: 1259-60.
- 40. Fallon PG, Mangan NE. Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection. *Nature reviews Immunology* 2007; 7: 220-30.
- 41. Van der Vlugt LE, Labuda LA, Ozir-Fazalalikhan A, et al.-Schistosomes induce regulatory features in human and mouse CD1d(hi) B cells: inhibition of allergic inflammation by IL-10 and regulatory T cells. *PLoS One* 2012; 7: e30883.
- 42. Mangan NE, Fallon RE, Smith P, et al.-Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. *Journal of Immunology* 2004; 173: 6346-56.



Lofarma

IN THE WORLD

Headquarters
ITALY

Affiliates

- GERMANY**
- PORTUGAL**
- SPAIN**
- GREECE**
- HUNGARY**
- ALBANIA**
- KOREA**
- RUSSIA**
- MEXICO**
- SWITZERLAND**





Reazioni avverse ai tatuaggi

Francesco Furci

*Servizio di Allergologia territoriale,
Asp 5 Reggio Calabria e Fabiana Furci,
Specializzanda in Allergologia
ed Immunologia Clinica,
Università degli Studi di Messina*

Not Allergol 2018; vol. 36: n.1: 42-43

Fu' nel 1769 che il Capitano inglese James Cook trascrisse per la prima volta, a Tahiti, la parola Tattow, poi Tattoo, che deriva dalla parola tahitiana "tattau" ovvero "segnare qualcosa". L'esecuzione del tatuaggio prevede l'inserimento nel derma del soggetto del pigmento di inchiostro del colore desiderato. La pratica del tatuaggio, inizialmente limitata ad alcune classi sociali, ebbe un picco di diffusione negli anni '70; oggi tale pratica gode, soprattutto tra i giovani, di un grande successo, quest'ultimo favorito dal superamento di una forma di pregiudizio che ne limitava la diffusione (Figura 1).

Era inevitabile però che l'incremento rilevante della pratica dei tatuaggi determinasse un corrispondente aumento della casistica delle reazioni avverse. I tatuaggi possono essere temporanei, la cui durata è solitamente di alcune settimane, o permanenti, la cui durata è per tutta la vita. Tra i tatuaggi permanenti ricordiamo i tatuaggi decorativi, il trucco permanente e i tatuaggi traumatici. Oggi sempre di più si riscontra il ricorso

ai tatuaggi anche in caso di patologie che presentano una notevole compromissione della cute, quali la vitiligine. Le reazioni avverse ai tatuaggi (Figura

2) possono essere classificate in acute, la cui insorgenza è immediata o nelle prime settimane dopo l'esecuzione del tatuaggio, e tardive, la cui insorgenza è a distanza di mesi o anni (1).

Tra le reazioni acute si ricordano: l'infezione asettica dei tessuti (che si risolve generalmente in 20-30 giorni ed è dovuta al trauma del tatuaggio), le infezioni acute (follicoliti, pio-derma, herpes), ematomi e porpora, reazioni dei linfonodi locali (2-4). Prurito, edema localizzato, rash eczematoso, dermatite da contatto sono invece le manifestazioni cutanee più comunemente riscontrate in caso di reazione acuta al tatuaggio. Le reazioni ritardate (lichen, sarcoidosi, tumori, lesioni granulomatose) costituiscono il 6% delle reazioni ai tatuaggi e si riscontrano prevalentemente nei tatuaggi colorati, in particolare quando effettuati con il pigmento rosso. Tra le reazioni ritardate le più comuni sono quelle lichenoidi ed è importante ricordare che una reazione cutanea di tipo sarcoideo può essere la manifestazione di una sarcoidosi sistemica (5-7).

Oggi i pigmenti utilizzati sono per lo

Figura 1 Senza reazione avversa



*Paziente di sesso femminile, 28 anni.
Es. di tatuaggio senza alcuna
reazione avversa.*



Figura 2

Con reazione
avversa

Paziente di sesso femminile, 30 anni.
Es. di tatuaggio con reazione avversa
evidenziabile dalle lesioni granulomatose
comparse dopo 10 giorni dall'esecuzione
dello stesso.

più pigmenti organici di sintesi e appartengono per il 65% ai pigmenti azoici. Questi pigmenti, in realtà sintetizzati per uso industriale, contengono un 30% di impurezze e contengono inoltre additivi (responsabili della liberazione di formaldeide).

In caso di comparsa in sede di tatuaggio di una reazione eczematosa/lichenoidale è importante rivolgersi all'allergologo per comprendere il tipo di reazione avversa e per eseguire un patch test, precisando che spesso, non essendo noto il colorante o il mix di coloranti usati, la gestione

della reazione avversa al tatuaggio rappresenta una vera e propria sfida (8).

Le manifestazioni cutanee sono spesso trattate con corticosteroidi topici, intralesionali o sistemici. Di notevole importanza è l'applicazione di una crema idratante dopo l'utilizzo dello steroide al fine di mantenere il trofismo cutaneo. Inoltre il paziente dovrà evitare l'esposizione solare e la rimozione del tatuaggio mediante laser, in quanto quest'ultimo frantuma e disperde il pigmento.

Pertanto, in tali circostanze, sarebbe preferibile ricorrere alla rimozione chirurgica.

Spesso in ambulatorio giungono pazienti che richiedono l'esecuzione del patch test prima di fare un tatuaggio, ma, non

avendo il patch test alcuna predittività, si precisa che la reazione al tatuaggio può avvenire in qualsiasi momento. Infatti la sensibilizzazione al pigmento dell'inchiostro o ai suoi componenti si può verificare a distanza di tempo dall'esecuzione di un tatuaggio.

Le controindicazioni assolute da riferire ed attenzionare prima dell'esecuzione di un tatuaggio sono: una precedente reazione ad un tatuaggio dello stesso colore con il quale il paziente intenderebbe tatuarsi, familiarità o precedente anamnesi positiva per melanoma (in quanto quest'ultimo potrebbe insorgere nella zona del tatuaggio, non venendo così identificato) e la sindrome del nevo displastico (9).



Bibliografia

1. Pesapane F, Nazzaro G, Giannotti R et al.-A short history of tattoo. *JAMA Dermatol.* 2014; 150:145.
2. Deeken A, Jefferson J, Hawkinson D et al.-Localized chronic fibrosing vasculitis in a tattoo: a unique adverse tattoo reaction. *Am J Dermatopathol.* 2014;36(4):81-3.
3. Laux P, Tralau T, Tentschert J et al.-A medical toxicological view of tattooing. *Lancet.* 2016;387:395-402.
4. Mortimer NJ, Chave TA, Johnston GA-Red tattoo reactions. *Clin Exp Dermatol.* 2003;28:508-10.
5. Tang MM, Beltraminelli H, Perruchoud D et al.-A tattoo complicated by allergic contact dermatitis and panniculitis. *J Acad Dermatol Venereol.* 2014;28:127-8.
6. Wollina U-Nodular skin reactions in eyebrow permanent makeup: Two case reports and an infection by *Mycobacterium haemophilum*. *J Cosmet Dermatol.* 2011;10:235-9.
7. Wollina U-Severe adverse events related to tattooing: An retrospective analysis of 11 years. *Indian J Dermatol.* 2012;57:439-43.
8. Tamaro A, Toniolo C, Giulianelli V et al.-Chemical research on red pigments after adverse reactions to tattoo. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2016;48(2):46-8.
9. Serup J-Individual risk and prevention of complications: doctors' advice to persons wishing a new tattoo. *Curr Probl Dermatol.* 2017;52:18-29.



RECENSIONI

Uova di pesce, croce e delizia

Salmon roe (ikura)
induced anaphylaxis in a child.

J. Minhas, J.A. Saryan and D. S.Balekian.
Ann Allergy Asthma Immunol. 2017;118:365-366

L'anafilassi è una reazione allergica potenzialmente fatale e una percentuale significativa di questa reazione è causata dalla ingestione di alimenti quali latte, uova, cereali, soia, arachidi, pesce. In particolare negli Stati Uniti, si racconta che un bambino su 13 al di sotto di 18 anni ha avuto una reazione allergica ad alimenti. E' abbastanza scontato che l'introduzione di "nuovi cibi" nelle abitudini alimentari di una popolazione può comportare un aumentato rischio di sviluppare "nuove" allergie nella popolazione stessa. E' questo il caso della allergia alle uova di pesce (bottarga). In Giappone le suddette uova sono comunemente consumate e servite nei piatti di sushi e diversi casi di allergia sono stati riportati. Negli Stati Uniti il sushi è diventato popolare negli ultimi anni e in questo articolo viene descritto il primo caso di allergia alle uova di pesce in un ragazzo riscontrato nel Paese. In particolare gli autori descrivono un caso di anafilassi conseguente all'assunzione di uova di salmone in un bambino di 18 mesi con un storia clinica costellata di ripetuti episodi di dispnea



da infezioni delle vie respiratorie superiori e da un eczema all'età di 2 mesi. L'episodio anafilattico si è manifestato 15 minuti dopo l'ingestione di Thai food che comprendeva ravioli di gamberetti, riso e sushi di salmone ricoperto di uova di salmone. Precedentemente aveva già mangiato il Thai food senza avere reazioni ma questa era la prima volta che lo mangiava al ristorante. Una analisi della storia familiare ha evidenziato la presenza nel fratello di una allergia alle arachidi mentre la madre risultava affetta da allergie stagionali. Il bambino fu sottoposto ad una prima indagine diagnostica mediante skin prick test con esito negativo verso numerosi alimenti inclusi diversi tipi di pesce e molluschi. L'esecuzione di un prick by prick con le uova di salmone diede al contrario esito decisamente positivo con un pomfo di 15 mm e un arrossamento di 28 mm. Questa positività fu poi successivamente confermata da un test sierologico specifico. Le uova di pesce o di altre specie acquatiche sono incluse nella membrana ovarica e possono variare in termini di dimensione e colore. Le uova possono derivare da varie specie di pesce o sea food (salmone, merluzzo, aringa, trota, riccio di mare...) e sono spesso mangiate crude. In Giappone il sea food in genere è riconosciuto da tempo come possibile causa di allergia ma solo nel 2001 le Autorità Sanitarie hanno incluso le uova di pesce nell'elenco dei poten-



ziali allergeni. Gli autori dell'articolo riportano in particolare uno studio di un gruppo giapponese il quale esaminando campioni di siero di 20 bambini allergici alle uova di salmone mise in evidenza una positività IgE verso due componenti, la lipovitellina e la β - vitellogenina. Nessuna positività venne al contrario riscontrata nei confronti della carne di salmone, né tantomeno verso le proteine dell'uovo di gallina. Vista la popolarità assunta negli Stati Uniti dal sushi, in cui le uova di pesce sono servite insieme ad altri sea food, gli autori concludono raccomandando gli operatori sanitari ad includere un test per l'allergia alle uova di pesce in tutti quei casi in cui, a fronte di un test negativo a molluschi o carne di pesce, ci sia però un forte sospetto di una sea food allergy.

Anche in Italia il sushi sta diventando popolare. A questo proposito mi preme sottolineare che proprio recentemente ci è capitato di indagare su un siero di un soggetto con una presunta allergia alla bottarga di muggine. L'indagine sierologica ha messo in evidenza una forte positività nei confronti del suddetto alimento, assunto dal paziente in varie occasioni, e in linea con quanto osservato precedentemente, per quanto riguarda la contemporanea negatività verso la carne di diverse specie di pesci. La positività IgE è stata poi confermata dall'immunoblotting che ha evidenziato la presenza di due bande, molto probabilmente corrispondenti alla lipovitellina e alla β - vitellogenina come descritto in letteratura. **G.M.**

Un'emergenza sottostimata: la sindrome di Kounis

Kounis syndrome should be excluded
when physicians treat patients with anaphylaxis

Yanagawa Y. et al.

Ann Allergy Asthma Immunol. 2017 Oct;119(4):392.

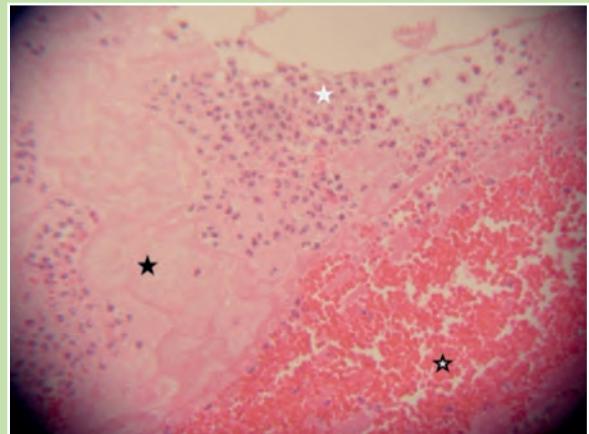
Il breve commentario di Yanagawa et al., pubblicato sulla rivista *Ann Allergy Asthma Immunol*, parte dalla lettura dall'articolo intitolato "Epinephrine Use for Anaphylaxis: Too

Seldom, Too Late" (1), riguardante il trattamento d'emergenza delle reazioni anafilattiche, per porre l'attenzione su una sindrome che, sebbene rara, è associata a significativa morbilità e mortalità in individui sensibilizzati. Si tratta della sindrome di Kounis, anche conosciuta come angina allergica. E' una sindrome coronarica acuta che si presenta in concomitanza con una reazione allergica, solitamente di tipo anafilattico, dovuta a cibo, punture d'insetto o farmaci o anche alla presenza di stent coronarico.

La sindrome è causata dal rilascio massivo di mediatori dell'infiammazione durante la reazione allergica, principalmente istamina, fattore attivante le piastrine, prodotti del metabolismo dell'acido arachidonico, proteasi, citochine e chemochine, che possono indurre spasmo coronarico.

La sindrome di Kounis è stata descritta nel 1991 da Kounis e Zavras (2) e in letteratura sono state definite tre varianti; brevemente, il tipo I (angina allergica vasospastica) si presenta in pazienti con arterie coronarie normali, senza fattori di ri-

Figura 1 Trombo aspirato di un paziente con sindrome di Kounis di tipo III



L'asterisco bianco indica il trombo infiltrato da numerosi eosinofili; quello nero un deposito di fibrina mentre quello bianco-nero un accumulo di globuli rossi insieme a numerosi eosinofili.



schio per la malattia coronarica; il tipo II (infarto miocardico allergico) in pazienti con una malattia coronarica asintomatica sottostante e arterie coronariche aterosclerotiche. Infine, il tipo III si verifica nel contesto di trombosi dello stent coronarico con trombo occlusivo infiltrato da cellule infiammatorie, come eosinofili e mastociti (Figura1).

In questo articolo, gli autori riportano qualche dato relativo all'incidenza della malattia. Uno studio prospettico condotto su 138,911 pazienti ammessi al pronto soccorso in un anno (2012), ha dimostrato che la percentuale di casi con sindrome di Kounis tra i pazienti allergici era del 3,4% (27 su 793). In aggiunta gli autori riportano altri due studi, riferiti a pazienti con anafilassi, in cui la percentuale era rispettivamente del 2% (2 su 100) e del 2.2% (3 su 138). Di questi ultimi 5 soggetti 2 hanno avuto arresto cardiaco: purtroppo uno non è sopravvissuto, mentre l'altro è sopravvissuto ma con un'encefalopatia anossica conseguente all'arresto cardiaco. In entrambi i casi la reazione era stata indotta da farmaci. Gli autori ritengono che la sindrome di Kounis sia molto più diffusa di quanto riportato in letteratura poiché spesso non viene riconosciuta. Inoltre, come dimostrano i casi citati, la suddetta sindrome è potenzialmente fatale e la gestione terapeutica impegnativa poiché richiede il trattamento simultaneo di sintomi cardiaci ed allergici. In caso di pazienti con anafilassi, è quindi necessario escludere immediatamente la sindrome di Kounis, attraverso esami elettrocardiografici e la misurazione i livelli di troponina I (marker specifico per la diagnosi di lesioni acute miocardiche).

G.M.



Bibliografia

1. Chooniedass R, Temple B, Becker A. Epinephrine use for anaphylaxis: Too seldom, too late: Current practices and guidelines in health care. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2017 Aug;119(2):108-110. doi: 10.1016/j.anaai.2017.06.004. Epub 2017 Jul 1. PubMed PMID: 28676208.
2. Kounis NG, Zavras GM. Histamine-induced coronary artery spasm: the concept of allergic angina. *Br J Clin Pract.* 1991 Summer;45(2):121-8. Review. PubMed PMID: 1793697.

Interazione Pru p 3/ligando: possibili effetti sul legame con le IgE.

Enhanced Pru p 3 IgE-binding activity
by selective free fatty acid-interaction.

Dubiela P. et al.

J Allergy Clin Immunol. 2017;140:1728-1731.

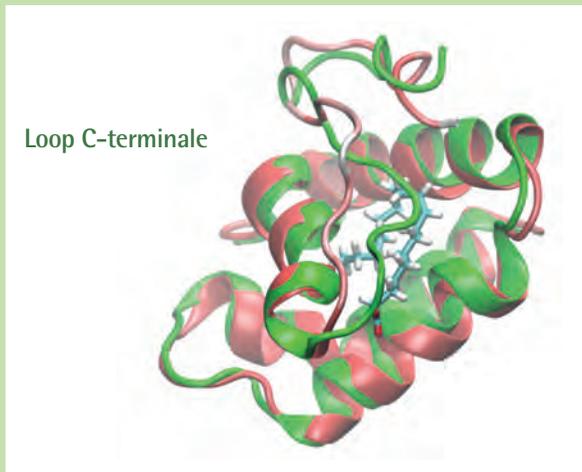
Le *non-specific lipid transfer protein* (nsLTP) sono importanti allergeni di origine vegetale; sono considerati panallergeni poiché presenti in moltissimi alimenti, in diversi pollini e anche nel lattice di *Hevea Brasiliensis*. In particolare le nsLTP rappresentano allergeni maggiori nei frutti della famiglia delle *Rosaceae* (pesca, albicocca, prugna, mela, pera, ciliegia...) e l'allergene più frequentemente responsabile di sensibilizzazione allergica, soprattutto nei paesi del Mediterraneo, è Pru p 3, la nsLTP di pesca. Le nsLTP sono molto studiate e diverse strutture cristallografiche sono disponibili in banca dati (<http://www.rcsb.org/>). Si tratta di proteine basiche, di basso peso molecolare, la cui struttura tridimensionale è rappresentata da 4-eliche, stabilizzate da 4 ponti disolfuro, con una coda C-terminale libera e una cavità idrofobica, dove si trova il sito di legame per molecole lipidiche. Questa struttura, molto compatta e stabile, rende le nsLTP altamente resistenti alla degradazione (digestione peptica, denaturazione termica), e per questo motivo sono allergeni molto diffusi anche nei prodotti alimentari lavorati.

Come suggerito dal nome, le nsLTP possono legare svariati tipi di molecole lipidiche (come ad esempio acidi grassi, glicolipidi, fosfolipidi...), e la capacità di legame può variare tra le diverse nsLTP. E' stato inoltre osservato che il legame con una molecola lipidica può avere un impatto sulla flessibilità della cavità interna e sulla conformazione della proteina.

Tuttavia, le informazioni riguardanti la capacità di legame di Pru p 3 e l'eventuale effetto della interazione con un ligando sulla sua struttura, sono limitate. Partendo da quest'osservazione, i ricercatori dell'Università di Vienna (Austria), in collaborazione con gruppi di ricerca italiani e polacchi, hanno studiato la specificità di legame di Pru p 3 per diversi ligandi e hanno valutato l'ef-



Figura 1 Sovrapposizione di strutture di Pru



In verde la proteina senza ligando,
in rosso Pru p 3 dopo legame con l'acido oleico (in azzurro)

fetto dell'interazione sulla conformazione della proteina e sulla capacità di legame con IgE specifiche. Lo studio è stato condotto applicando una strategia multidisciplinare, basata su approcci biochimici, immunologici, spettroscopici e computazionali, che ha portato ad interessanti risultati.

Innanzitutto, la proteina ricombinante Pru p 3 è stata prodotta nel lievito *Pichia pastoris* ed è anche stata purificata la forma naturale da frutti di pesce. Dopo aver caratterizzato dal punto di vista biochimico le proteine isolate, sono stati condotti saggi per analizzare il legame con diversi acidi grassi. Sono stati testati 7 diversi ligandi: 3 acidi grassi insaturi (acido oleico, elaidico e linoleico), 3 acidi grassi saturi (acido stearico, palmitico e laurico) e l'acido idrossi-palmitico. L'interazione allergene/ligando è stata prima verificata attraverso un saggio, chiamato ANS *displacement assay*, basato sull'utilizzo di una sonda fluorescente che compete con il ligando per il legame con la proteina. I risultati hanno mostrato che Pru p 3 lega preferenzialmente gli acidi grassi insaturi, in particolare l'acido oleico, mentre presenta una capacità di legame minore verso gli acidi grassi saturi, soprattutto per l'acido stearico. Il legame con l'acido oleico e con l'acido stearico è stato

poi ulteriormente analizzato mediante esperimenti di risonanza magnetica nucleare (NMR), utilizzando una particolare tecnica, W-LOGSY (*Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy*), che ha confermato i risultati del saggio ANS.

Per valutare l'effetto del legame con l'acido oleico sulla struttura di Pru p 3, sono state condotte simulazioni in silico di dinamica molecolare. È emerso che il legame con l'acido oleico altera la struttura tridimensionale dell'allergene, e nello specifico induce uno spostamento della parte C-terminale di Pru p 3 verso la superficie della molecola, una modifica che interessa una regione identificata come un importante epitopo IgE (Figura 1).

Sulla base di questa osservazione, sono stati condotti esperimenti IgE-ELISA, utilizzando sieri di 10 pazienti allergici alla pesca (positivi per Pru p 3) e BAT assay (basophil activation test) per verificare cambiamenti nella capacità di legame alle IgE di Pru p 3, dopo pre-incubazione con acido oleico o con acido stearico. I risultati hanno mostrato che l'interazione con l'acido oleico aumenta in modo significativo sia il legame con le IgE nel test ELISA sia l'attivazione dei basofili. Al contrario, la presenza di acido stearico non induce alcun cambiamento significativo.

In conclusione, gli autori hanno identificato differenze nella capacità di legame di Pru p 3 nei confronti di diversi ligandi, mostrando una preferenza per gli acidi grassi insaturi e specialmente l'acido oleico. L'interazione tra Pru p 3 e l'acido oleico può indurre cambiamenti conformazionali in grado, a loro volta, di aumentare l'attività allergenica di Pru p 3.

G.M.

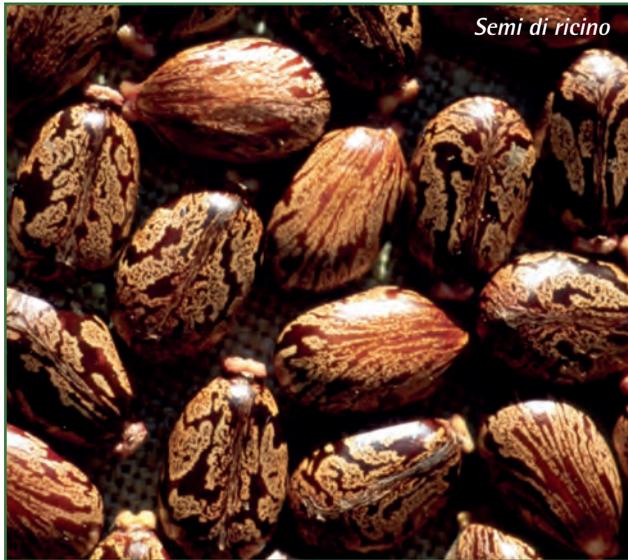
Un curioso caso di shock anafilattico: attenzione alle collane

Anaphylactic shock following castor bean contact: a case report

Coattrevec Y. et al.

Allergy Asthma Clin Immunol. 2017; 13:50.

Il lavoro di Coattrevec e colleghi, pubblicato sulla rivista "*Allergy, Asthma & Clinical Immunology*", è un case report riguar-



Semi di ricino

dante un caso di shock anafilattico dovuto a contatto con semi di ricino.

Il ricino (*Ricinus communis L.*) è una pianta della famiglia delle *Euphorbiaceae*. Oggi è diffusa in diverse parti del mondo e coltivata principalmente per la produzione di olio di ricino estratto dai suoi semi (*castor bean*; Figura 1); alcune varietà sono anche impiegate a scopi ornamentali.

L'olio di ricino (*castor oil*) è impiegato in diversi settori, soprattutto in quello meccanico come lubrificante, ma anche nell'industria cosmetica e in quella farmaceutica. L'olio è anche noto per le sue proprietà lassative dovute alla presenza di acido ricinoleico, che si trova nei semi sotto forma di trigliceride (ricinoleina).

I semi di ricino sono altamente tossici poiché contengono la ricina, una glicoproteina citotossica in grado di bloccare l'attività di sintesi proteica dei ribosomi. Se ingerita, può indurre gastroenteriti acute e portare a disidratazione. Oltre ad essere tossici, i semi di ricino esprimono anche un potenziale allergenico. Contengono, infatti, allergeni appartenenti alla famiglia delle 2S albumine (Ric c1), sono resistenti alle alte temperature e sono presenti anche nel polline della pianta. L'allergia ai semi di ricino è considerata principalmente un'allergia respiratoria e le persone più esposte sono i lavoratori negli impianti di produzione dell'olio di ricino e coloro che vivono in prossimità degli stabilimenti.

In letteratura sono riportati solo pochi casi di reazione anafilattica ai semi di ricino.

L'articolo degli studiosi svizzeri descrive il caso del tutto particolare di una donna di 30 anni che si è presentata al pronto soccorso con grave angioedema, orticaria, ipotensione e tachicardia. La crisi anafilattica era sopraggiunta diverse ore dopo che la donna aveva consumato un pasto a base di carne, senape, frutta, legumi, cereali, formaggi, bevendo birra e vodka. La reazione è stata classificata di IV grado (secondo Mueller), e sono stati rilevati elevati livelli di triptasi.

La paziente è stata sottoposta a trattamento con adrenalina nebulizzata e le sono stati somministrati corticosteroidi e liquidi per via endovenosa. Dopo il ricovero in terapia intensiva, la donna si è rimessa nell'arco di 24 ore.

L'assunzione di cibo è stata giudicata dai medici una causa poco probabile di reazione anafilattica, per via del tempo intercorso tra il pasto e la crisi. Nessun alimento o farmaco è stato, infatti, identificato come causa scatenante la reazione, sulla base di approfondite indagini allergologiche, inclusi test cutanei, dosaggi IgE specifiche per svariati alimenti, spezie, pollini vari, acari della polvere, muffe e altro, e anche test di provocazione orale per birra e cioccolato.

Il caso ha trovato soluzione quando, alla rivalutazione, la donna si è ricordata di aver dato un morso a una collana poco prima della reazione anafilattica. In effetti, la collana era formata da diversi elementi, tra cui alcuni semi di ricino. Il prick by prick test con questi semi è risultato fortemente positivo, così come i livelli di IgE specifiche per semi di ricino (91,8 kU/l). Gli autori non hanno purtroppo fornito informazioni sul fatto che la paziente fosse solita "mordere", in tal modo inducendo una sensibilizzazione allergica che ha poi scatenato la crisi anafilattica al successivo morso.

Il lavoro Coattreñec et al. è comunque molto interessante per diverse ragioni. Innanzitutto, porta l'attenzione sul potenziale allergenico dei semi di ricino e sul rischio di reazioni anafilattiche conseguente all'esposizione verso gli stessi. Infine, evidenzia chiaramente quanto sia importante un'indagine approfondita della storia clinica del paziente, anche di quegli aspetti all'apparenza insignificanti che possono invece consentire l'individuazione dell'allergene responsabile dell'evento allergico.

G.M.

Istruzioni per gli autori

Il **Notiziario Allergologico** è una pubblicazione quadrimestrale di aggiornamento nel campo della Allergologia e delle discipline ad essa correlate, rivolta ai Medici ed ai Ricercatori. Il Notiziario Allergologico non pubblica articoli sperimentali, ma aggiornamenti e rassegne concordati tra la Redazione e gli Autori, sia per quanto riguarda i contenuti che la lunghezza. Il Comitato Scientifico partecipa al reperimento delle informazioni e controlla la correttezza scientifica della rivista; comunque le affermazioni e le opinioni espresse negli articoli sono quelle degli Autori e non esprimono necessariamente il parere del Comitato Scientifico o della Redazione.

• I **manoscritti** per la pubblicazione devono venire inviati tramite posta elettronica a: **redazione@lofarma.it**

Nei manoscritti, oltre al nome completo degli Autori, dovrà essere indicata l'affiliazione degli stessi e l'indirizzo postale dell'Autore al quale verranno inviate le bozze.

• Il **testo** dovrà essere in formato Word o analogo senza usare programmi di impaginazione specifici.

• Le **illustrazioni**, le fotografie e le tabelle dovranno essere salvate e inviate in files separati (JPG, TIFF, PDF).

RIASSUNTO E SUMMARY

Ogni articolo sarà preceduto da un riassunto breve (250 parole, 1700 caratteri spazi inclusi) e da un summary in inglese più ampio (450 parole, 3000 caratteri spazi inclusi).

• **Parole chiave:** la lista di 4-8 parole chiave deve mettere in evidenza gli argomenti più significativi trattati nel lavoro.

BIBLIOGRAFIA

La bibliografia verrà scritta in base alle indicazioni riportate di seguito:

• **Lavori comparsi in periodici:** cognome e iniziale del nome degli Autori, titolo del lavoro, titolo abbreviato del periodico, anno, numero del volume, pagina iniziale e finale.

Es: Holt PG - *Mucosal immunity in relation to the development of oral tolerance/sensitization. Allergy 1998;4:16-19.*

• **Monografie e i trattati:** cognome e iniziale del nome degli Autori, titolo, editore, luogo e anno di pubblicazione.

Es: Errigo E - *Malattie allergiche. Etiopatogenesi, diagnostica e terapia. Lombardo Editore, Roma, 1994.*

• **Lavori pubblicati come capitoli di volumi:** indicare cognome e iniziale dei nomi degli Autori, titolo del capitolo, titolo del volume in cui il lavoro è pubblicato, preceduto dall'indicazione del Curatore, e seguita da quella dell'Editore, luogo e anno di pubblicazione, pagina iniziale e finale del capitolo citato.

Es: Philips SP, Whisnant JP - *Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM (Eds.) Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. 2nd ed., New York, Raven Press, 1995, p. 465-478.*

La bibliografia verrà ordinata in ordine di citazione nel corso del testo e ogni citazione verrà contrassegnata da un numero progressivo di identificazione. In casi particolare, quando la bibliografia sia composta da riviste sintetiche, trattati, monografie e sia limitata a poche voci, non verrà citata nel testo ma raggruppata alla fine del lavoro sotto il titolo "Lecture consigliate". I titoli delle riviste dovranno essere abbreviati secondo le indicazioni del Cumulated Index Medicus.

CITAZIONI DI SPECIALITÀ

Ogni composto farmaceutico deve essere citato in base al suo nome chimico e/o alla sua denominazione comune internazionale, evitando di citare il nome del marchio. Quest'ultimo potrà essere indicato solo se inevitabile e con la lettera iniziale in maiuscolo.

ABBREVIAZIONI

Abbreviazioni e simboli usati, secondo gli standard indicati in Science 1954; 120: 1078.

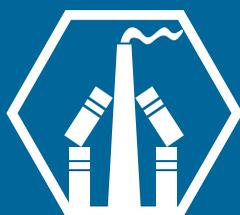
Una volta definiti, essi possono venire usati come tali nel corso del testo.

BOZZE

Le prime bozze verranno inviate al primo Autore, a meno che non venga altrimenti indicato. Le seconde bozze verranno corrette in Redazione. Le bozze dovranno venire restituite nello spazio di sette giorni dalla data di arrivo, con l'approvazione dell'Autore.

Unità di misura Unit

conte per minuto	<i>counts per minute</i>	cpm
curie	<i>curie</i>	Ci
millicurie	<i>millicurie</i>	mCi
microcurie	<i>microcurie</i>	μC
chilogrammo	<i>kilogram</i>	Kg
grammo	<i>gram</i>	g
milligrammo	<i>milligram</i>	mg
microgrammo	<i>microgram</i>	μg
nanogrammo	<i>nanogram</i>	ng
picogrammo	<i>picogram</i>	pg
femtogrammo	<i>femtogram</i>	fg
litro	<i>litre</i>	L
millilitro	<i>millilitre</i>	mL
microlitro	<i>microlitre</i>	μL
nanolitro	<i>nanolitre</i>	nL
picolitro	<i>picolitre</i>	pL
chilometro	<i>kilometre</i>	Km
metro	<i>metre</i>	m
centimetro	<i>centimetre</i>	cm
millimetro	<i>millimetre</i>	mm
micrometro	<i>micrometre</i>	μm
nanometro	<i>nanometre</i>	nm
picometro	<i>picometre</i>	pm
Angstrom	<i>Angstrom</i>	Å
kilo Daltons	<i>kilo Daltons</i>	kDa
ora	<i>hour</i>	h
minuto primo	<i>minute</i>	min
minuto secondo	<i>second</i>	sec



Lofarma nel mondo



www.lofarma.it