

NOTIZIARIO ALLERGOLOGICO

ISSN 2038-2553

Anno 37 - 2018 • Volume 36, n. 2-3



Dermatite atopica

Parte 1: Generalità e Dimensioni socio-economiche

Microbioma e malattie allergiche

**La diagnosi allergologica
con i test cellulari**

Micofiti e Allergia

**IgG4 e disordini
immunomediati**

**La Rinomica:
la sua applicazione può contribuire
alla caratterizzazione
differenziale dei vari sottotipi di rinite**

SHORT REPORT

IgE totali: sono sempre inutili?

NOTIZIARIO ALLERGOLOGICO

Anno 37, 2018 - Volume 36, n. 2-3

DIRETTORE RESPONSABILE
Gianni Mistrello

PROGETTO GRAFICO E IMPAGINAZIONE
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:
*Il deserto dell'Arizona
ricoperto di neve*



Ricordate il paesaggio incantato dell'Algeria (vedi la cover del numero precedente del Notiziario) dove lo scorso anno un manto di neve aveva imbiancato le dune sabbiose del deserto del Sahara? Quest'anno è successo un altro evento straordinario. Questa volta a inizio anno, a Tucson (Arizona, Stati Uniti), in una zona comunemente associata a condizioni desertiche, una coltre di neve ha trasformato un tipico paesaggio da film western in uno spettacolo insolito. In particolare la foto immortalava lo scenario del Saguaro National Park, una delle più grandi riserve di cactus, con il bianco splendente in contrasto con il verde dei cactus. E' molto probabile che questo spettacolo non durerà molto ma la maggior carica di acqua contribuirà sicuramente a ravvivare il colore dei loro fiori che sbocceranno in primavera, solo di notte. Nel frattempo, per una strana inversione meteorologica, alcune parti dell'Alaska si sono risvegliate con condizioni relativamente miti per l'area, che ha sciolto in parte la neve abbondantemente caduta nelle settimane precedenti.

G. M.



SOMMARIO

Notiziario Allergologico, Anno 37 - 2018 - Volume 36, n. 2-3

EDITORIALE

50

Giovanni Mistrello



AGGIORNAMENTI

- Novità nella Dermatite atopica. Parte 1: Generalità e Dimensioni socio-economiche** 51
Elena Galli
- Microbioma e malattie allergiche. Un possibile nuovo target terapeutico?** 60
Lorenzo Emmi
- La diagnosi allergologica con i test cellulari: prospettive e criticità** 68
Salvatore Chirumbolo
- Micofiti e Allergia: un update** 80
Erminia Ridolo, Irene Martignago
- Il ruolo contraddittorio delle IgG4 nei disordini immunomediati** 89
Anna Perino, Valentina Foschi
- La Rinomica: la sua applicazione può contribuire alla caratterizzazione differenziale dei vari sottotipi di rinite.** 101
Girolamo Pelaia



SHORT REPORT

- IgE totali: sono sempre inutili?** 107
Giuseppe Pingitore



RECENSIONI

Gianni Mistrello

- Immunoterapia con LAIS Acari negli anziani.** 111
Kim JH, Lee HJ, Park HS et al.
- Allergia alla birra: attenzione agli allergeni nascosti** 113
Brussino L. et al.
- Il Lisozima: un nuovo allergene del latte di asina**
Martini M., Swiontek K. Antonicelli L. et al.
- Nail art e dermatite da contatto** 117
Gatica-Ortega ME et al.
- L'esofagite eosinofila è equivalente all'asma da pollini?** 119
Armentia A et al.



EDITORIALE

a cura di
Gianni Mistrello

Per ragioni che non ricordo più, forse per facilitare la stesura dell'editoriale, una sorta di ordine mentale, si è sempre cercato di impostare la rivista facendo in modo di includere, nello stesso numero, articoli che avessero tra loro un filo conduttore. Recentemente mi è capitato di leggere un libro in cui l'autore ha riportato alcuni esempi per i quali se da un gruppo di esperti in un determinato campo aggiungi un altro esperto, i passi in avanti sono minimi, mentre se al gruppo omogeneo si aggiunge qualcuno che non ha quasi nulla a che fare con quell'argomento specifico, la variabile impazzita consente quel cambiamento di punto di vista che può spesso portare a veri salti in avanti.

Allora mi sono chiesto: perché non cambiare e pubblicare nello stesso numero articoli che non necessariamente abbiano qualcosa in comune? Questa scelta va inquadrata come esempio di disordine? Mentre mi chiedevo questo ho dato uno sguardo alla mia scrivania e mi sono stupito della impostazione che finora mi sono imposto di dare alla rivista (ammesso che la stessa si possa inquadrare come esempio di ordine). Al confronto la scrivania che vedete rappresentata nella foto è quella di un dilettante del disordine! In questo senso mi fanno molto comodo le celebri parole di Albert Einstein: se una scrivania in disordine è segno di una mente disordinata, di cosa sarà segno allora una scrivania vuota? Certo poi esiste un'ampia gamma di gradazioni di disordine. Invece l'ordine è uno solo: ogni cosa al suo posto e un posto per ogni cosa. E' indubbio che l'ordine è pratico, utile ma trovare qualcuno che sostiene che il disordine è simpatico, creativo, stimolante, accresce la memoria visiva e le proprie attitudini investigative (senza le quali non riusciresti mai a trovare quella tal cosa) è tutta musica per le mie orecchie! In questo senso è abbastanza evidente il mio conflitto di interesse sul tema.

Veniamo quindi agli articoli scelti per questo numero. Iniziamo con il contributo sulla dermatite atopica. La dermatite



atopica, altrimenti conosciuta come eczema, è una patologia infiammatoria cronico-recidivante della cute la cui patogenesi non è ancora del tutto conosciuta. Alterazioni della barriera cutanea, disregolazione del sistema immunitario, fattori ambientali sono alla base di questa patologia che colpisce i soggetti in età pediatrica. In questa prima puntata sull'argomento la Prof.ssa Galli concentra l'attenzione sugli aspetti generali della patologia e sulla diagnosi della stessa, sottolineando come essa stia sempre più rappresentando un problema di salute pubblica anche se il costo sociale ed economico sia ancora sottostimato. Nella seconda puntata che verrà pubblicata nel prossimo numero, l'attenzione si concentrerà in particolare sulle opzioni terapeutiche che però non sembrano ancora del tutto risolutive della patologia.

La diagnostica clinica in allergologia si basa sulla raccolta della storia clinica del paziente supportata da appropriati test in vivo, come i test cutanei (prick) e in vitro, come il dosaggio quantitativo delle IgE specifiche ovvero il test di provocazione. Tuttavia l'identificazione dell'allergene scatenante la risposta allergica non è sempre facile da individuare. Per migliorare l'iter diagnostico negli ultimi anni



sono stati sviluppati diversi test funzionali su cellule; tra questi quello che si è rivelato più promettente è il test di attivazione dei basofili (BAT). Esso rappresenta una sorta di simulazione in vitro dei test di scatenamento in vivo, e nella versione più recente si basa sulla determinazione dei marker di attivazione (per es. CD 63 e CD203c) mediante analisi in citofluorimetria a flusso, piuttosto che sulla quantificazione del rilascio dei mediatori come si faceva in passato. Ne disserta, con straordinaria dovizia di particolari anche tecnici, il Dr. Chirumbolo il quale in questa mini rassegna mette in evidenza sia i vantaggi e le potenzialità (per es. nel follow up dei pazienti sottoposti a immunoterapia specifica) come le criticità del test.

La scoperta dell'esistenza del microbioma (l'insieme dei geni che compongono le popolazioni microbiche del nostro organismo) grazie alla applicazione in microbiologia delle tecniche di sequenziamento dei geni che compongono il DNA e quanto questo complesso ecosistema sia in grado di interagire con i vari sistemi biologici (dal sistema immunitario a quello endocrino, nervoso...) è relativamente recente. Ancora più recente è la dimostrazione di come fattori quali l'alimentazione, lo stile di vita, il tipo di parto e di allattamento, l'abuso di farmaci, in particolare, gli antibiotici possono influenzare la sua composizione e conseguentemente favorire o meno l'instaurarsi di condizioni predisponenti a numerose malattie tra cui l'asma e l'allergia. Il professor Emmi nel suo articolo sull'argomento sottolinea l'importanza del ruolo del microbioma o meglio dei vari microbiomi visto che essi si differenziano a seconda delle sedi del nostro corpo in cui sono presenti. Inoltre la dimostrazione che questo complesso ecosistema è in grado epigeneticamente di interagire e modulare il genoma del nostro corpo, può aprire la strada ad una nuova interpretazione di molte patologie ovvero costituire esso stesso un possibile target terapeutico.

I micofiti o muffe sono microrganismi appartenenti al regno vegetale che possono ritrovarsi in tutti gli ambienti che ci circondano sia indoor che outdoor. Essi sono essenziali per il riciclaggio dei minerali e per la decomposizione dei composti organici e spesso

sono commensali innocui per l'organismo umano. Possono però diventare patogeni ed essere causa di patologie anche gravi. In questo articolo di aggiornamento la Professoressa Ridolo e la Dottoressa Martignago hanno concentrato la loro attenzione sui micofiti più comunemente responsabili di fenomeni di ipersensibilità, sui sintomi clinici che possono provocare e quali fattori possono aumentare il rischio; ovviamente non poteva mancare un richiamo agli strumenti diagnostici oggi disponibili per identificare i soggetti allergici e alle opzioni terapeutiche da mettere in atto per la cura degli stessi.

Il numero prosegue con un articolo molto impegnativo delle Dottoresse Perino e Foschi sul ruolo contraddittorio svolto dalle IgG4. Mentre in alcune situazioni (vedi malattie allergiche) si sostiene che il ruolo delle IgG4 sia di tipo protettivo, rappresentando per molti il marker immunologico più correlabile, se aumentato, al beneficio clinico indotto dalla immunoterapia specifica, in altre situazioni, (vedi alcune malattie autoimmuni), sottolineate dalle autrici dell'articolo, tale ruolo è al contrario patogenetico mentre in altre rimane ancora non del tutto definito. In particolare nella malattia IgG4 correlata le IgG4 potrebbero costituire una sorta di "fuoco amico", e contribuire al peggioramento dei sintomi.

Concludiamo questo numero con il contributo del Prof. Pelaia sulle rinomica. Il fluido nasale può costituire un campione molto utile per approfondire le differenze biopatogenetiche esistenti tra le varie forme di rinite allergica e non allergica. In particolare l'applicazione di tecnologie quali la n MALDI-TOF MS ("matrix-assisted laser-desorption ionization" – "mass spectrometry"), nella analisi di tali campioni sembra permettere, sulla base di specifici pattern peptidici, una caratterizzazione dell'eterogeneità fenotipica ed endotipica della rinite allergica e non allergica. Non si può escludere che questo miglioramento delle conoscenze possa poi costituire la base per lo sviluppo di nuove opzioni terapeutiche.

Il numero include anche una serie di recensioni curiose che possono essere occasione di meditazione..



Novità nella Dermatite atopica.

Parte 1: Generalità e Dimensioni socio-economiche

Elena Galli

MD, PhD, UOS ImmunoAllergologia
dell'età evolutiva
Ospedale San Pietro-Fatebenefratelli
Roma

Not Allergol 2018; vol. 36: n. 2-3 : 52-59

DEFINIZIONE

La dermatite atopica, altrimenti conosciuta come eczema, è un disordine particolarmente “affascinante”. Re-

centemente, Silverberg ha suggerito come l'aggettivo “eterogeneo” sia quello che più si adatta a definire questa sindrome: tutti i suoi aspetti, a partire dal nome, patogenesi, epi-

demiologia fino ai fenotipi clinici e possibili approcci terapeutici, presentano infatti, come vedremo, un'indubbia eterogeneità (3).

La DA è definita un disordine poligenico complesso caratterizzato da fenotipi clinici differenti basati sull'interazione tra suscettibilità genetica ed epigenetica, fattori ambientali, alterazioni della barriera cutanea e del microbioma e disregolazione del sistema immune, sia innato sia adattivo (2, 4-5).

La barriera cutanea, il sistema immune ed il microbioma sono interconnessi sin dalla nascita e la loro costante “comunicazione” è necessaria per caratterizzare insorgenza, progressione e mantenimento della malattia stessa. Una migliore conoscenza in questo campo sarà fondamentale per ampliare le effettive possibilità terapeutiche della dermatite attualmente priva di una terapia risolutiva (2, 4-5) (Tabella 1).

La complessa patogenesi della DA e le terapie attuali e future saranno trattate in dettaglio nella seconda parte di questa review che si pubblicherà nel prossimo numero.

RIASSUNTO

Parole chiave e acronimi

- Dermatite atopica • Eczema • SCORing Atopic Dermatitis (SCORAD)
- Eczema Area and Severity Index (EASI)

La dermatite atopica (DA) è disordine poligenetico complesso ossia una patologia infiammatoria cronico-recidivante della cute, caratterizzata da complesse interazioni tra disregolazioni di barriera e del sistema immune, sia innato sia adattivo, alterato microbioma e forte suscettibilità epigenetica all'ambiente. A causa della complessità patogenetica, esistono numerose e differenti espressioni cliniche della dermatite atopica che rendono la sua terapia particolarmente difficile, specie nei casi medio-gravi, caratterizzati da lesioni cutanee estese, spesso infette e prurito devastante, causa di stress emozionali e di disturbi del sonno. La DA è la malattia cutanea più comune in pediatria, in un continuo trend di crescita, pur colpendo già circa il 20 % della popolazione infantile. Nell'85% dei casi si manifesta nel primo anno e nel 90% dei casi inizia entro i 5 anni di vita, ma frequenti segnalazioni indicano un possibile esordio a tutte le età. Le malattie allergiche costituiscono oggi uno dei maggiori problemi di Salute Pubblica non solo nei cosiddetti Paesi industrializzati bensì in tutto il mondo, con un onere sociale ed economico individuale e collettivo notevole (1). In questo ambito, le dimensioni socio-economiche della dermatite atopica (DA) si inseriscono al primo posto, nonostante il reale impatto della malattia non sia ancora largamente riconosciuto, né dalla Società né da gran parte dei medici (2).



Tabella 1

Dermatite atopica 2018: Highlights

- Disordine poligenico complesso
- Infiammazione cronica recidivante
- Patogenesi correlata ad alterazioni di:

Barriera cutanea
Immunità innata ed adattiva
Microbioma cutaneo
- Suscettibilità epigenetica
- Numerosi fenotipi immunologici e clinici
- Prevalenza elevata ed eterogenea
- Terapia risolutiva non esistente
- Impatto negativo sulla qualità di vita
- Alto costo economico sociale

**STORIA
NATURALE**

La DA è considerata da sempre una malattia tipica dell'età pediatrica (si manifesta nel 45% dei casi entro i primi 6 mesi di vita, nel 60% entro i primi due anni ed in circa l'85% entro i 5, (6) ma recentemente, specie nei casi con severità moderata-severa (7), è descritto un decorso cronico che persiste fino ad età adulta(8). Segnalazioni suggeriscono inoltre, la comparsa in età adulta o nella terza età rendendo difficile definire con precisione il decorso naturale di questa malattia. Roduit (9) identifica tre fenotipi clinici differenti in questo ambito: "precoce transitorio", quando la sintomatologia compare nei primi mesi e scompare entro i primi anni di vita, "precoce persistente" con comparsa precoce e scomparsa entro l'adolescenza ed infine il fenotipo a

"comparsa tardiva". Il fenotipo "precoce persistente" sembra essere correlato ad un maggior rischio di sviluppare ulteriori malattie allergiche, quali allergia alimentare, rinite ed asma (Tabella 2).

In realtà, è stato descritto un ampio ed eterogeneo spettro di fenotipi clinici, nel tentativo principalmente di predire la storia naturale fenotipo specifica, ma nessuno è caratterizzato da biomarkers, come invece sarebbe necessario nell'ottica di una futura terapia personalizzata, e sono pochi lavori che correlano le differenti manifestazioni cliniche ai differenti fattori ambientali (10).

**ASPETTI
EPIDEMIOLOGICI**

La DA è la più frequente malattia infiammatoria cutanea cronica in età pediatrica. In Italia, secondo gli ultimi dati

epidemiologici nazionali a disposizione (11) la sua prevalenza è intorno al 16.5% ma nel mondo la prevalenza è caratterizzata da significative variazioni (11-15). Una review sistematica dei lavori epidemiologici dal 1990 al 2010 (15), riporta un aumento del 2.6-5 % in Svezia, del 5.1-10% in Messico, Australia ed alcune zone dell'Africa e superiore al 10% in Gran Bretania, Nigeria e Sud-Africa. Questi dati sottolineano l'attuale eterogeneità della diffusione della malattia sia in ambienti industrializzati sia in ambienti rurali.

Negli Stati Uniti, i dati del National Survey of Children Health riportano una significativa variazione di prevalenza (dal 8.7 % al 18.1%) persino tra Stati e Distretti (14, con una maggiore prevalenza tra gli americani neri, una significativa correlazione tra alta prevalenza e piccoli gruppi familiari, vita in ambienti urbani e metropolitani ed alto livello di educazione familiare (16).

**CARATTERISTICHE
CLINICHE**

La dermatite è sempre caratterizzata da prurito intenso e da infiammazione ad andamento cronico recidivante della cute.

La sensazione di prurito è mediata da segnali complessi che, a partenza dalla cute attraverso le vie gangliari dorsali, arrivano fino al midollo spinale e al cervello, coordinati da numerose molecole neurologicamente attive in modo differente, tra cui la sostanza P (17). Nella pratica, possiamo dire che il prurito sia scatenato da un aumento della temperatura cutanea



Tabella 2

Dermatite atopica : Possibili Fenotipi Clinici

- ▶ **Età di insorgenza**
 - Insorgenza molto precoce con rapida remissione
 - Insorgenza molto precoce senza remissione
 - Insorgenza precoce
 - Insorgenza durante l'infanzia
 - Insorgenza durante l'adolescenza
 - Insorgenza in età adulta
 - Insorgenza nella terza età
- ▶ **SCORAD lieve, medio, grave**
- ▶ **Associazione ad elevate IgE**
- ▶ **Associazione a malattie allergiche**
 - Asma bronchiale
 - Rinite
 - Allergia alimentare
- ▶ **Associazione ad infezioni persistenti**
 - virali, batteriche, fungine

che si verifica facilmente durante il movimento, il sonno, le emozioni e vari altri stimoli, anche solo irritativi. Il prurito, di difficile controllo clinico, porta a grattamento, spesso inconscio, con disturbi del sonno e peggioramento delle lesioni. La cute si presenta secca e iperreattiva, con lesioni eritematose generalmente distribuite in sedi tipiche a seconda dell'età. Nella fase acuta le lesioni sono più essudate mentre nella fase cronica si mostrano maggiormente lichenificate e desquamate (18) (Figure 1 e 2).

La dermatite si associa spesso ad infezioni cutanee secondarie, batteriche, virali e fungine che, in alcuni casi, possono essere ricorrenti o generalizzare (19). Le infezioni batteriche, prevalentemente stafilococciche, sono molto frequenti

nelle zone escoriate e conferiscono un aspetto essudante alle lesioni. La disbiosi caratteristica del microbioma della dermatite, con il ruolo principale giocato dallo *Stafilococco aureo* (20), riveste un ruolo patogenetico sempre più importante e se ne tratterà nella seconda parte della review.

Le infezioni virali principali sono da Herpes simplex, con la possibilità di disseminazione virale o eruzione varicelliforme di Kaposi o eczema erpetico, che si manifesta con lesioni vescicolose e pustole che possono estendersi a vaste aree. Nei bambini più piccoli e negli adolescenti si segnala anche una maggior suscettibilità ad infezioni da virus del mollusco contagioso (21).

Tra le infezioni micotiche, soprattutto ne-

gli adolescenti, è ben nota la cosiddetta dermatite del collo e della testa, legata alla *Malassezia species* che potrebbe contribuire alla genesi / mantenimento della DA stessa attraverso l'immunità cellulo-mediata e la produzione di IgE specifiche (22).

DIAGNOSI

La diagnosi è esclusivamente legata alle caratteristiche cliniche poiché non esistono ad oggi, specifici marker di laboratorio e/o istologici. Sin dai primi anni 80, dopo la pubblicazione dei primi criteri diagnostici di Hanifin (23), sono stati proposti numerosi strumenti per valutare la severità della dermatite (24-26). Le lesioni cliniche infatti, sono eterogenee e si presentano a fasi alterne, con periodi di quiescenza e fasi di recrudescenza, associate ad infezioni. È importante ai fini terapeutici valutarne la gravità, che viene classificata in lieve, moderata o severa.

Lo strumento finora più utilizzato è lo *SCORing Atopic Dermatitis tool* (SCORAD), che per la valutazione prende in considerazione parametri soggettivi e parametri oggettivi. I primi sono due: il prurito e la perdita di sonno. I criteri oggettivi valutano invece l'estensione e l'intensità delle lesioni (24) (Tabella 3).

L'Eczema Area and Severity Index (EASI), di introduzione più recente, invece non considera il prurito (25). Quando la dermatite presenta un punteggio SCORAD > 50 oppure uno score EASI > 16-20 è considerata di grado severo.



Figura 1



Figura 2

Il *Patient-Oriented Scoring Atopic Dermatitis index* (PO-SCORAD) è una variante più recente che considera anche, in modo dinamico, il paziente (26).

MARCIA ATOPICA

La dermatite non è solo infiammazione della cute. La cosiddetta “marcia atopica” infatti, propone un set sequenziale di malattie allergiche, a partenza appunto dalla dermatite, con progressione verso l’allergia alimentare per culminare nella rinite allergica e nell’asma bronchiale.

Il concetto di marcia atopica negli anni è stato via via ridefinito e corroborato da studi cross-sectional e longitudinali (27, 28) ma in realtà è ancora molto contro-

verso e certamente la sua progressione, complessa e multifattoriale e si verifica solo in alcuni fenotipi. Gli ultimi dati suggeriscono che nella marcia atopica la genetica giochi un ruolo più importante dei fattori ambientali e che il legame tra dermatite, rinite ed asma sia indipendente dai possibili fattori ambientali condivisi dai pazienti nei primi mesi di vita (29).

COMORBILITÀ

Numerosi recenti studi, sebbene discordanti e non certo conclusivi segnalano come la DA sia spesso associata a malattie non allergiche, con un significativo incremento di rischio verso fattori cardiovascolari, tumori, malattie autoimmuni,

fumo e disordini psichiatrici (30-32).

In età pediatrica, diversi lavori mostrano una consistente associazione con disordini di iperattività /deficit dell’attenzione (ADHD), sebbene i meccanismi ed i tempi di sequenza rimangano poco chiari (33). E’ interessante sottolineare come Brunner si spinga a suggerire come la dermatite possa considerarsi un vero e proprio disordine sistemico (34).

DIMENSIONI SOCIALI E IMPATTO ECONOMICO

La Dermatite atopica presenta un enorme impatto economico a livello di Società e di Salute Pubblica, con costi che in generale superano quelli della psoriasi e dell’asma bronchiale



Tabella 3

Indice SCORAD: Valutazione clinica

- Valutazione obiettiva della severità della DA
- Riduzione delle variazioni inter-individuali

sono considerati due parametri:

CRITERI OBIETTIVI e CRITERI SOGGETTIVI

CRITERI OBIETTIVI

- Estensione
- Intensità delle lesioni (0-3)
secchezza, eritema, edema,
papule, secrezione,
escoriazioni, lichenificazione

CRITERI SOGGETTIVI

- Prurito
- Perdita del sonno

CALCOLO

[Estensione/5] + [Intensità x 3,5] + Sintomi soggettivi

e sono simili a quelli riportati per il diabete.

Il più ampio studio economico americano, che pur prendeva in considerazione solo alcuni costi diretti ed indiretti, stimava il costo nazionale della DA, già nel 2004, intorno a 4.228 miliardi di dollari, equivalenti a 5.297 miliardi nel 2015 (35, 36).

Si sottolinea come lo studio non considerasse la maggioranza dei costi indiretti ed alcuni costi diretti e che risalga a più di 10 anni fa, quando la DA aveva una prevalenza molto più bassa.

Studi più recenti dimostrano come un'ulteriore costo di circa 12 milioni di dollari annui sia da attribuire all'o-

spedalizzazione ed identifica una spesa personale mensile per paziente di circa 274 dollari (37, 38).

Il costo reale della dermatite è però ancora indubbiamente sottostimato sia per la difficoltà di una effettiva e completa valutazione dei costi diretti (ad esempio, terapie per lo *Skin care*, indumenti specifici, bonifica ambientale, visite mediche, accertamenti di laboratorio etc.) ed indiretti (assenze lavorative e scolastiche, mezzi di trasporto, collaborazioni domestiche etc.) della malattia stessa e delle comorbidità associate sia perché gli effetti psicologici non possono essere esattamente monetizzati.

Inoltre, il peso economico della DA è

stato valutato in relativamente pochi studi non comparabili fra di loro a causa delle differenti metodologie utilizzate, dei setting di pazienti valutati e del tipo di assistenza pubblica e/o assicurazioni esistenti nelle varie Nazioni (35, 38).

Ad oggi, in Italia, la dermatite non rientra neppure nell'elenco delle malattie croniche ed invalidanti aventi diritto all'esenzione alla partecipazione al costo (ultimo aggiornamento 20 marzo 2013), ed è esclusivamente prevista l'esenzione per alcuni corticosteroidi per uso topico (nota AIFA 88) ed un ciclo di 12 bagni termali annui!

QUALITÀ DI VITA

I disturbi del sonno sono riportati nel 60% dei pazienti (4, 7, 28) e contribuiscono a determinare, insieme al fastidio del prurito e alle lesioni cutanee, un impatto negativo sulla qualità di vita, causando disordini di attenzione e/o iperattività, mancato rendimento scolastico e/o ansia e depressione (2, 31, 33, 34, 39).

Va sottolineato inoltre come nella fascia d'età compresa tra la prima infanzia e l'adolescenza, il ruolo giocato dall'aspetto fisico costituisca un elemento centrale nel determinare sicurezza e autostima. La pelle è il nostro "biglietto da visita" sociale che parla di noi a prescindere dalle nostre intenzioni e abilità, con un linguaggio specifico che varia da cultura a cultura. Lo stato della nostra pelle influenza la nostra socievolezza e la fiducia che riponiamo in noi, facilitan-

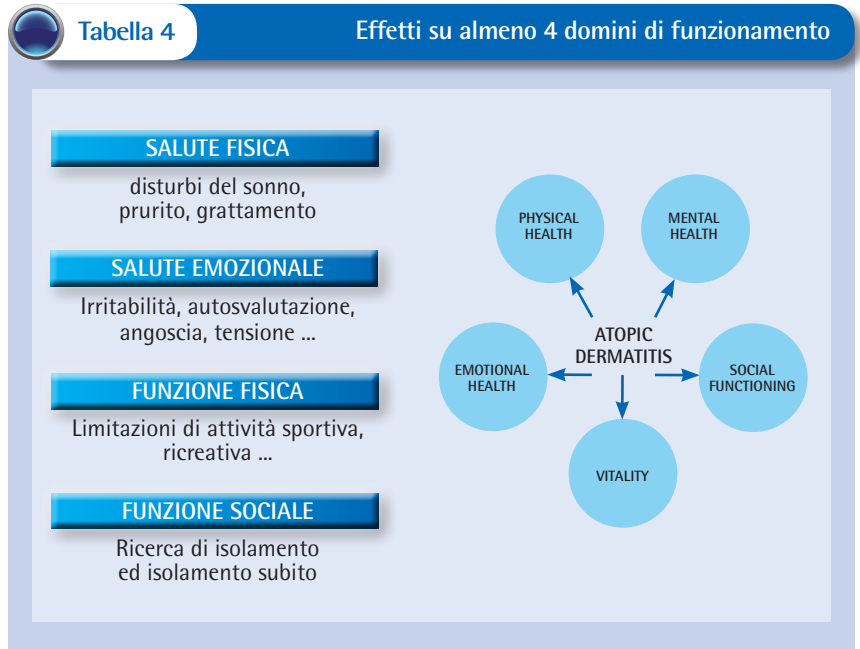


do o ostacolando, nelle diverse età, il completamento delle tappe dello sviluppo che conducono alla formazione adeguata dell'individuo adulto (40). E' molto frequente riscontrare nei pazienti affetti da dermatite la difficoltà di doversi confrontare con forme di pregiudizio sociale, basate sul timore di contagiosità delle lesioni (inesistente!) o sulla discriminazione per fattori estetici.

Tra l'altro, poichè come abbiamo visto, l'esordio della DA avviene nella maggioranza dei casi in età pediatrica, può creare una perturbazione sulla vita familiare, a tutti i livelli. In un simile scenario non è difficile comprendere infatti come alcune famiglie possono trovarsi ad attraversare fasi anche impegnative e complesse del proprio ciclo di vita, fasi che ostacolano a loro volta una risposta efficace alla malattia sia sul piano organizzativo sia emotivo sia affettivo.

Dunque la dermatite presenta ripercussioni su almeno 4 domini essenziali di funzionalità: salute fisica ed emozionale, funzionalità fisica e sociale (Tabella 4).

Ricordiamo che non solo non esiste ad oggi una terapia risolutiva della DA, ma anche che una sua caratteristica fondamentale sia quella di essere protratta nel tempo, potendo scomparire per lunghi periodi per poi riapparire, con grande sconforto della persona colpita e/o dei suoi familiari. Nel 2010 il WHO *Global Burden of Disease Survey*, in considerazione di tutto ciò, ha inserito la Dermatite atopica al primo posto tra tutte le



malattie cutanee in rispetto sia alla sua disabilità sia al numero di anni vissuti dal paziente in presenza di disabilità (41) sottolineando chiaramente come questo disordine rap-

presenti un problema di Salute Pubblica di notevole impatto, sebbene in realtà il suo costo sociale effettivo ed economico sia ancora molto sottostimato.



Bibliografia

1. Global Allergy Forum and Davos Declaration 2011. Davos Declaration :Allergy as a global problem. *Allergy* 2012 ; (2) 67: 141-143.
2. Weidinger S., Novak N. Atopic dermatitis. *Lancet* 2016; 387: 1109-22.
3. Silverberg JJ, Silverberg N.B. Atopic dermatitis: a heterogeneous disorder *Dermatol. Clin* 2017;35:
4. Malik K, Heitmiller KD, Czarnowicki T. An update on the pathophysiology of Atopic Dermatitis. *Dermatol.Clin.* 2017; 35: 317-326.
5. Patrick M, Brunner D YM, Leung M et al. Immunologic, microbial, and epithelial interactions in atopic Dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2018;120: 34-41.
6. Meglio M, Maiello N, Galli E. Atopic Dermatitis. *ERS Handbook: Paediatric Respiratory Medicine* 2012.
7. Abuabara K, Yu AM, Okhovat JP, Allen IE, et al. The prevalence of atopic dermatitis



Bibliografia

- beyond childhood: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Allergy* 2018; 73: 696-704.
8. Barbarot S, Auziere S, Gadkari A, et al. Epidemiology of atopic dermatitis in adults: results from an international survey. *Allergy* 2018; 73: 10.
9. Roduit C, Frei R, Depner M, et al. Phenotypes of atopic dermatitis depending on the timing of onset and progression in childhood. *JAMA Pediatr.* 2017; 171: 655-662.
10. Bieber T, D'Erme AM, Akdis CA, et al. Clinical phenotypes and endophenotypes of atopic dermatitis: Where are we, and where should we go? *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(4S):S58-S64.
11. Cantarutti A, Donà D, Visentin F, et al. Epidemiology of Frequently Occurring Skin Diseases in Italian Children from 2006 to 2012: A Retrospective, Population-Based Study. *Pediatr Dermatol.* 2015; 32: 668-78.
12. Odhiambo JA, Williams HC, Clayton TO, et al. Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC phase three. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124(6):1251-8.
13. Flohr C, Mann J. New insights into the epidemiology of childhood atopic dermatitis. *Allergy* 2014; 69: 3-16.
14. Silverberg JI. Public Health Burden and Epidemiology of Atopic Dermatitis *Dermatol Clin* 2017; 35: 283-289.
15. Deckers IA, McLean S, Linssen S, et al. Investigating international time trends in the incidence and prevalence of atopic eczema 1990-2010: a systematic review of epidemiological studies. *PloS one* 2012;7(7).
16. Yong AM, Tay Y. Atopic dermatitis Racial and Ethnic differences *Dermatol. Clin.*2017; 35: 395-402.
17. Heimal J, Spergel JM. New pathways for itching in patients with atopic dermatitis? *J.Allergy Clin.Immunol.* 2017;140: 393-4.
18. Galli E, Neri I, Ricci G, et al. -Consensus Conference on Clinical Management of pediatric Atopic Dermatitis. *Ital J Pediatr.* 2016; 42: 26.
19. Sun D, Ong PY. Infectious complications in atopic dermatitis. *Immunol.Allergy Clin. N Am.,* 2017 ; 37,75-93.
20. Baviera G , Maiello N, Galli E. Microbiota, atopia e *Staphylococcus aureo* nella dermatite atopica: chi è nato prima, l'uovo o la gallina? *RIAIP* 2017, 3:12-18.
21. Chen X, Anstey AV , Bugert JJ. Molluscum contagiosus virus infection. *Lancet Infect Dis* 2013; 13:877-888.
22. Schmid-Grendelmeier P , Scheynius A, Cramer R. The role of *Malassezia sympodialis* in atopic eczema. *Chem. Immunol. Allergy* 2006; 91: 98-109.
23. Hanifin J, Rajka G. Diagnostic features of atopic eczema. *Acta Derm Venereol* 1980;92:44-7.
24. No authors listed]. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology.* 1993; 186(1): 23-31.
25. Hanifin JM, Thurston M, Omoto M et al. The eczema area and severity index (EASI): assessment of reliability in atopic dermatitis. *EASI Evaluator Group. Exp Dermatol.* 2001;10(1):11-8.
26. Coutanceau C, Stalder JF. Analysis of correlations between patient-oriented SCORAD (PO-SCORAD) and other assessment scores of atopic dermatitis severity and quality of life. *Dermatology* 2014; 229: 248-55.
27. Alduraywish SA, Lodge CJ, Campbell B, et al. -The march from early life food sensitization to allergic disease: a systematic review and meta-analyses of birth cohort studies. *Allergy.* 2016;71:77-89.
28. Tsakok T, Marrs T, Mohsin M, et al.-Does atopic dermatitis cause food allergy? A systematic review. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(4):1071-1078.
29. Khan SJ, Dharmage SC, Matheson MC et al.. Is the atopic march related to confounding by genetics and early-life environment? A systematic review of sibship and twin data. *Allergy* 2018; 73(1):17-28.
30. Cipriani F, Ricci G, Leoni MC et al.-Autoimmunity in atopic dermatitis: Biomarker or simply epiphenomenon? *Journal of Dermatology* 2014; 41: 569-576.
31. Deckert S, Kopkow C and Schimtt J. Non allergic comorbidities of atopic eczema: an overview of systematic reviews *Allergy* 2014;69: 37-45.
32. Brunner PM, Suárez-Fariñas M, He H et al.-The atopic dermatitis blood signature is characterized by increases in inflammatory and cardiovascular risk proteins. *Sci Rep.* 2017, 18;7(1):8707.
33. Johansson EK, Ballardini N, Kull I et al.- Association between preschool eczema and medication for attention-deficit/hyperactivity disorder in school age. *Pediatr Allergy Immunol* 2017; 28:44-50.
34. Brunner P, Silverberg PM, Guttman-Yas-



Bibliografia

- sky E et al.-Increasing comorbidities suggest that atopic dermatitis is a systemic Disorder. *J.Invest.Dermatol* 2017 137,18-25.
35. Bickers DR, Lim HW, Margolis D. et al. The burden of the skin diseases:2004 a joint project of the American Academy of Dermatology Association and the Society for Investigation Dermatology. *J.Am.Acad.Dermatol.* 2006;55:490-500.
36. Drucker AM, Wang AR, Qing Li W et al.-The Burden of Atopic Dermatitis: Summary of a Report for the National Eczema Association. *J. Invest Dermatol* 2017, 137 (1):26-30.
37. Narla S, Hsu DY, Thyssen JP et al.-Inpatient financial burden of atopic dermatitis in the United States. *J Invest Dermatol* 2017,137(7): 1461-1467.
38. J.I. Silverberg JI. Public health burden and epidemiology of atopic dermatitis *Dermatol. Clin.* 2017 :35 , 283-289.
39. Tuckman A. The Potential Psychological Impact of Skin Conditions. *Dermatol Ther (Heidelb).* 2017; 7: 53-57.
40. Barone M, Galli E. Dermatite atopica ad esordio in età evolutiva e intervento psicoterapeutico complesso. *Riap* 2014 ; 2: 41-46.
41. Murray CJ, Vos T , Lozano R et al.-Disability-adjusted life years for 291 diseases and injuries in 21 regions 1990-2010. A systematic analysis for the Global Burden of Disease study 2010. *Lancet* 2012;380:2197-223.

Lofarma **IN THE WORLD**

Headquarters
ITALY

Affiliates

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



Microbioma e malattie allergiche. Un possibile nuovo target terapeutico?

Lorenzo Emmi

Specialista in Allergologia e Immunologia Clinica ed in Endocrinologia e Malattie del ricambio.

Professore a contratto presso il Dipartimento di Chirurgia e Medicina Traslazionale, AOU Careggi. Già Direttore del Centro di Riferimento Malattie Autoimmuni Sistemiche, AOU Careggi, Firenze.

Not Allergol 2018; vol. 36: n. 2-3 : 60-67

DEFINIZIONE DI MICROBIOTA/MICROBIOMA

Il microbiota rappresenta l'insieme di tutti i batteri, virus e funghi che popolano il nostro organismo, mentre il microbioma comprende anche i geni delle suddette popolazioni microbiche (Figura 1).

E' ormai ben noto che esistono differenti microbiomi a seconda delle sedi del nostro corpo, ma il più importante è certamente quello che popola l'apparato gastroenterico (Figura 2).

Quest'ultimo è costituito da trilioni di microbi (circa 10^{14}), ha un peso stimato di circa 1500 mg ed è pertanto possibile a tutti gli effetti considerarlo un nuovo organo che si è venuto ad aggiungere a quelli noti dall'anatomia classica. Il fatto che il numero di microrganismi che popolano il sistema gastrointestinale sia 10 volte superiore al numero di cellule che compongono il nostro organismo e che il numero dei loro geni sia 100 volte superiore a quello dei geni che costituisce il nostro genoma da un'idea delle dimensioni del problema ed ha portato all'utilizzo di termini come superorga-

nismo (l'insieme di essere umano e di microbioma) e di ologenoma (l'insieme del nostro genoma e di quello del microbiota). Va anche ricordato che l'esplosione del concetto di microbioma deriva, come sempre, da un salto qualitativo di

alcune tecnologie. Infatti solo una parte non rilevante di batteri intestinali è individuabile mediante le classiche tecniche microbiologiche di coltura in vitro; più recentemente, mediante metodiche di biologia molecolare, che consistono nella

RIASSUNTO

Parole chiave e acronimi

- microbioma • acidi grassi a catena corta • sistema immunitario • epigenetica
- atopia • asma bronchiale • dieta • COPD Chronic Obstructive Pulmonary Disease)

La scoperta del ruolo del microbioma rappresenta una vera rivoluzione nel campo della biologia e della fisiopatologia. In particolare il passaggio dal concetto di flora batterica a quello di un complessissimo ecosistema che si relaziona con i vari sistemi biologici dell'organismo, quali il sistema immunitario, quello endocrino, nervoso centrale e neurovegetativo, rappresenta un transizione epocale. Il concetto che la qualità dell'alimentazione può modificare la composizione del microbiota e modulare epigeneticamente il nostro genoma ha aperto la strada ad una nuova interpretazione di molte patologie. La possibilità di modulazione del microbioma del feto da parte della madre, mediante il suo stile di vita e del tipo di parto e di allattamento, facilita la comprensione dell'instaurarsi di condizioni predisponenti a numerose malattie tra cui l'atopia. Infine il microbioma sta diventando un nuovo target terapeutico, sia direttamente, come già avviene nell'infezione da Clostridium difficile resistente alla terapia antibiotica, sia attraverso la modulazione mediante pro e prebiotici. Molto intrigante infine l'osservazione che il microbioma può modulare l'attività di alcuni farmaci. Ciò è stato dimostrato in maniera chiara nel campo dell'oncologia, ma potrebbe essere vero anche per alcuni farmaci biologici utilizzati nelle malattie allergiche.



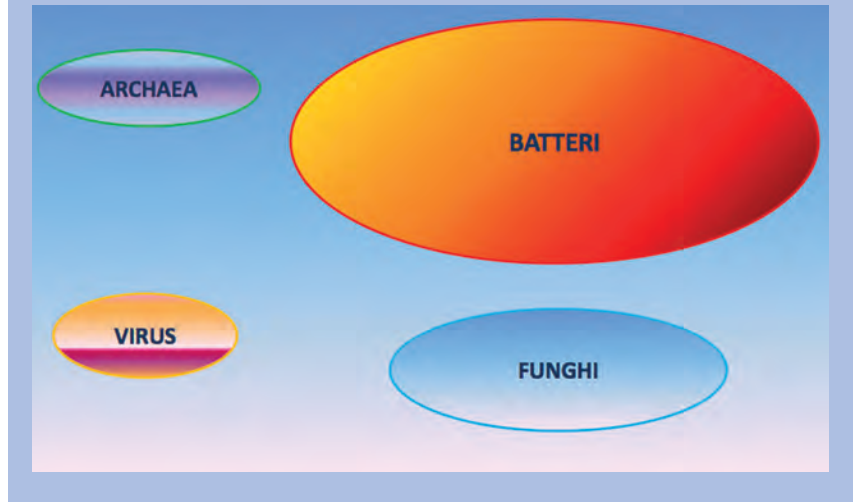
cosiddetta amplificazione genica- *polymerase chain reaction* (PCR) della regione 16srRNA che comprende un'insieme di regioni conservate e regioni ipervariabili capaci di individuare nuove popolazioni batteriche e di metagenomica, tecnica che consente di valutare l'informazione genetica del microbiota. Ciò a consentito di profilare il microbioma in termini sia quantitativi che qualitativi.

Molto importante il concetto di variabilità del microbioma in termini di numerosità e qualità a seconda della porzione anatomica del tratto gastroenterico considerato. Infatti lo stomaco, che un tempo veniva ritenuto sostanzialmente asettico a causa della sua intensa acidità, in realtà contiene numerosi batteri. Tuttavia, a livello intestinale con il graduale passaggio dal tratto più prossimale a quello più distale si assiste ad un notevole aumento della numerosità e ad una modificazione della composizione del microbioma (Figura 3).

La presenza di questa enorme quantità di batteri a livello intestinale differisce completamente dal vecchio ed ormai superato concetto di "flora intestinale". Infatti oggi sappiamo che il microbioma agisce in maniera dinamica e biunivoca a livello locale mediante vari meccanismi: a) protezione e trofismo della mucosa intestinale; b) produzione di vitamine essenziali per la vita (es Vitamina B12 e Vitamina K); c) interazione e controllo dei batteri patogeni; d) modulazione reciproca del sistema immunitario, educazione dello stesso e sviluppo di meccanismi responsabili della tolleranza immunologica a livello intestinale; e) interazione con il sistema nervoso ente-

Figura 1.

Composizione del microbiota gastrointestinale



rico; f) interazione con il sistema endocrino locale; g) rapporto reciproco tra nutrienti e microbioma. Infine il microbioma è anche responsabile di funzioni sistemiche mediante: a) interazioni con il sistema neurovegetativo autonomo; b) rapporti con il sistema nervoso centrale; c) interazione con il sistema neuroendocrino; d) modulazione del nostro genoma mediante meccanismi di tipo epigenetico.

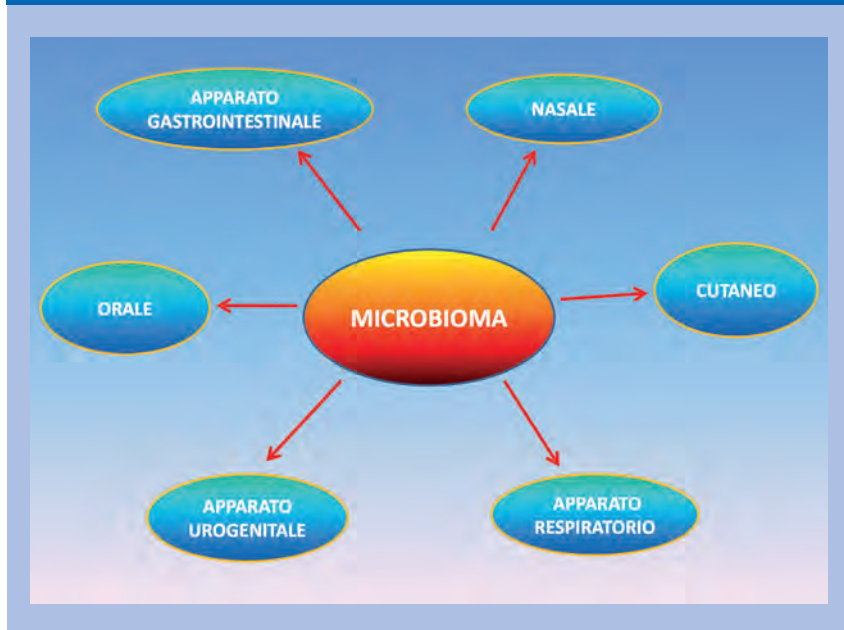
I meccanismi mediante i quali il microbioma interagisce con i suddetti sistemi biologici sono numerosi, tuttavia il più importante è correlato alla produzione dei cosiddetti "metaboliti derivati dal microbiota". Tra questi assumono una particolare importanza i cosiddetti acidi grassi a catena corta "*short chain fatty acids*"- SCFAs- tra cui l'acido acetico, l'acido propionico e l'acido butirrico. I metaboliti dei batteri costituenti il mi-

crobioma hanno numerose funzioni tra cui: a) attività anti-infiammatoria; b) attività antiossidante; c) regolazione della funzione di barriera, in altre parole modificazioni del microbioma possono rendere la mucosa intestinale più o meno permeabile con conseguenze facilmente immaginabili; d) produzione di vitamine, ma anche di energia, sotto forma di ATP, necessaria alle cellule per sopravvivere e funzionare; e) la già ricordata modulazione del sistema immunitario. Doveroso infine ricordare che l'acido butirrico è un potente inibitore di NF-kB mediatore finale di numerose vie della flogosi e di produzione di citochine, ma anche un'inibitore dell'enzima istone deacetilasi.

Un dato straordinariamente rilevante è costituito dalla cosiddetta "variabilità del microbioma". E' infatti noto che il microbioma varia da soggetto a soggetto (varia-



Figura 2. Distribuzione del microbioma



bilità interindividuale), ma anche, in base a numerosi fattori, nel singolo soggetto (variabilità intraindividuale), sebbene sia stata dimostrata la presenza di un “core” stabile durante l’arco della vita.

Recentemente è stato chiarito che, a differenza di quanto ritenuto in passato, anche l’intestino fetale non è completamente sterile e che in maniera sorprendente i microbi presenti già alla nascita provengono in buona parte dal cavo orale della madre. Inoltre lo stile di vita della madre ha un ruolo rilevante. I fattori più importanti sono: a) la genetica; b) l’età gestazionale; c) la presenza di malattie e/o di infezioni materne; d) il tipo e il carico di stress, nonché la modalità di risposta ad esso; e) l’ambiente in cui ha vissuto la madre durante la gestazione;

f) l’eventuale uso di antibiotici, il loro dosaggio e la durata del trattamento; g) l’eventuale ospedalizzazione, la sua durata e frequenza; h) il tipo di parto, se per via vaginale o mediante taglio cesareo ed infine; i) il tipo di allattamento, se al seno o allattamento artificiale. Tutti questi fattori determinano la costituzione di un determinato microbioma iniziale, la cui piena maturità si raggiunge intorno al secondo\quarto anno di vita. E’ in questo intervallo di tempo che il microbioma è particolarmente sensibile a variazioni che generalmente assumono un carattere più stabile. Ad esempio un uso intensivo di antibiotici in questo particolare e delicato momento può indurre modificazioni del microbioma non facilmente modificabili anche suc-

cessivamente. D’altro canto è ormai chiaro che il microbioma si modifica con l’età ed in particolare con la senescenza tende ad essere meno rappresentato sia in termini quantitativi che qualitativi. E’ importante ricordare che la riduzione della variabilità è il primo fenomeno che si verifica costantemente anche in tutte le patologie nelle quali il microbioma è coinvolto. Un ulteriore fattore che contribuisce alla variabilità è rappresentato dalla localizzazione geografica che, come è facile immaginare, agisce mediante molti dei fattori precedentemente discussi, oltreché tramite un elemento straordinariamente importante rappresentato dalle profonde variazioni della dieta nelle varie aree geografiche.

Di particolare importanza il rapporto tra microbiota e sistema immunitario e la possibile modulazione epigenetica da parte del microbioma stesso.

Relativamente al primo punto, il quesito fondamentale è come mai e con quali meccanismi il sistema immunitario tollera il microbiota. In realtà il sistema immunitario è prevalentemente tollerogenico, infatti sviluppa tolleranza verso: a) i propri costituenti (self); b) gli alimenti (molecole estranee che ogni giorno raggiungono in quantità straordinarie il nostro apparato digerente); c) la gravidanza che come è noto rappresenta un vero e proprio emiallotrapianto (metà del corredo cromosomico\antigenico è di origine paterna) ed infine; d) il microbiota. I motivi della tolleranza verso quest’ultimo sono rappresentati dalla co-evoluzione, ovvero i due sistemi si sono modellati uno sull’altro durante le fasi precoci della loro formazione, dallo sviluppo di un



rapporto simbiotico, ovvero un rapporto di mutuo scambio e di mutua utilità tra apparato gastrointestinale e batteri colonizzanti, ma soprattutto dal particolare tipo di risposta immunitaria che si sviluppa a livello intestinale, caratterizzata dalla produzione di IgA secretorie, di citochine immunomodulanti quali TGF-beta e IL-10, dalla presenza di una particolare popolazione di macrofagi più tollerogenici, ma soprattutto dall'espansione di cellule T regolatorie che tendono a controllare le risposte immunitarie infiammatorie. Particolarmente intrigante è anche il problema che concerne le reciproche interazioni tra microbiota e sistema immunitario. In estrema sintesi possiamo affermare che una buona parte dello sviluppo, della educazione e del mantenimento del sistema immunitario è modellata su questa enorme quantità di microrganismi che esso incontra a livello intestinale. D'altro canto il sistema immunitario garantisce l'omeostasi, la formazione ed il mantenimento della funzione del microbioma.

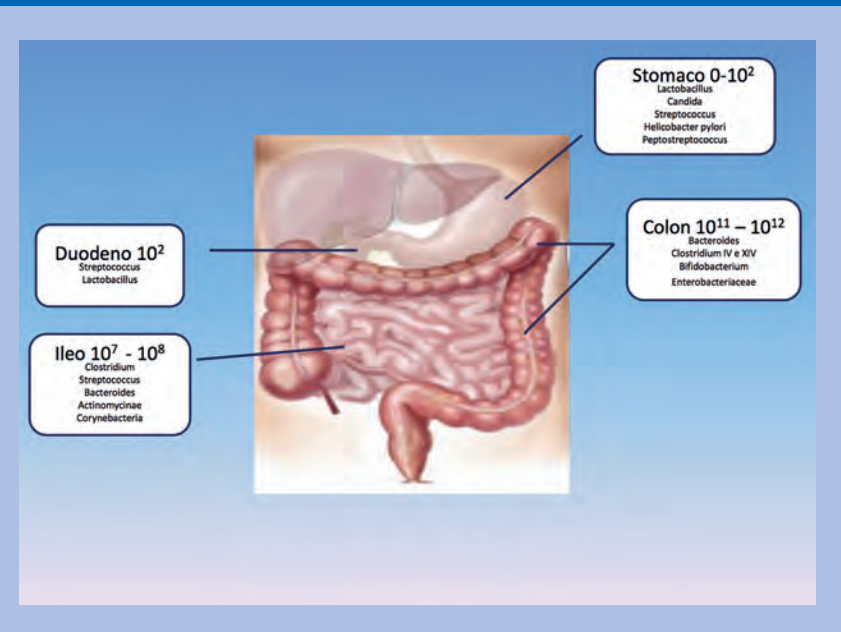
Per quanto concerne il secondo punto, è da precisare che l'epigenetica consiste nella modificazione della funzione/attività di un gene, senza alterazione della sua struttura ad opera di numerosissimi fattori quali patogeni, farmaci, sostanze chimiche, raggi ultravioletti, stress, variazioni del microbioma ed alimentazione. In altri termini ciascuno di noi è certamente caratterizzato dal nostro specifico genoma; tuttavia, l'ambiente e lo stile di vita in senso lato, possono, con meccanismi molecolari complessi, "accendere" o "spegnere" molti dei nostri geni modificando il risultato finale.

Tale osservazione ha un'importanza incredibile, in quanto per la prima volta è possibile spiegare in termini scientifici il rapporto tra ambiente, stile di vita, farmaci, alimentazione, stress ed eventuale predisposizione allo sviluppo di malattie, ma anche alla più o meno precoce senescenza e alla conservazione di una più o meno prolungata salute mentale intesa come capacità mnestiche, di concentrazione, di astrazione, capacità creativa, capacità di adattamento, di mantenimento di interessi e progettualità. Un'altra importante osservazione è rappresentata dal fatto che modificazioni epigenetiche possono verificarsi anche durante il periodo gestazionale e che possono essere trasmesse, almeno in par-

te, mediante un meccanismo noto come trasmissione transgenerazionale ovvero da una generazione all'altra.

I meccanismi mediante i quali si verificano le modificazioni epigenetiche del nostro genoma sono essenzialmente rappresentati da: a) metilazione del DNA; b) acetilazione/deacetilazione degli istoni; c) modulazione genomica da parte dei cosiddetti microRNA. In sintesi la metilazione normalmente corrisponde al silenziamento dei geni, mentre la demetilazione corrisponde alla attivazione del gene. L'opposto per l'acetilazione/deacetilazione. I microRNA (attualmente ne sono noti oltre 2000) sono invece tratti di RNA non codificante che modulano in senso "up and down" i trascritti (RNA messenger).

Figura 3. Differente distribuzione e frequenza delle popolazioni microbiche nell'apparato gastrointestinale





MICROBIOTA E DIETA

I rapporti tra microbiota e dieta sono molto complessi, tuttavia è possibile affermare che la composizione del microbiota è influenzata dal tipo di alimentazione. Infatti studi ormai classici condotti su bambini del Burkina Faso e su una popolazione ristretta, gli Hadza, che vivono in Tanzania, seguendo un tipo di vita del tutto assimilabile a quello dei cacciatori\raccoglitori (tipo di popolazione quasi scomparsa con l'avvento nel neolitico dell'agricoltura e dell'allevamento di bestiame), hanno dimostrato in maniera inequivocabile che il tipo di alimentazione seleziona la prevalenza di alcune popolazioni batteriche conferendo un profilo differente al microbiota. In termini generali è possibile affermare che una alimentazione ricca in grassi e proteine animali induce una prevalenza di *Firmicutes*, mentre una dieta ricca in carboidrati complessi determina un aumento del genere *Bacteroides-Prevotella* (*Bacteroidetes*). Tali osservazioni sono importanti in quanto sappiamo che, ad esempio, diete ricche in fibre aumentano la produzione dei già citati SCFAs che, come ricordato, hanno numerose funzioni "positive". Infatti ad esempio, la maggiore produzione di butirrato aumenta la quota di cellule T regolatorie a livello enterico. Tuttavia la relazione tra microbiota e alimentazione passa essenzialmente attraverso il meccanismo complesso illustrato dalla nutrigenomica e conseguentemente dalle modificazioni epigenetiche indotte dagli alimenti. Ciò consente di guardare ai nutrienti come molecole attive in grado di attivare e/o

spegnerne la trascrizione di alcuni geni. Un esempio classico è rappresentato dagli omega-3 che hanno dimostrato di poter ridurre l'espressione genica di alcune citochine infiammatorie come TNF-alfa e IL-6.

CENNI DI FISIOPATOLOGIA DELL' ATOPIA

Sappiamo da tempo che la patogenesi delle malattie allergiche è essenzialmente dovuta ad una polarizzazione delle cellule T naive in senso Th2. Questo è reso possibile dalla presenza di IL-4 al momento della presentazione dell'allergene. Una volta che le cellule T si sono polarizzate in senso Th2, queste sono capaci di produrre grandi quantità di IL-4 che induce lo *switch* isotipico con conseguente produzione di IgE da parte delle cellule B. Inoltre IL-4 e IL-13 favoriscono l'attivazione di macrofagi M2 che producono fattori favorevoli alla fibrosi sub-epiteliale a livello della mucosa bronchiale. Le stesse citochine favoriscono anche la produzione di muco. IL-5 è a sua volta responsabile del reclutamento, della attivazione e della maggiore sopravvivenza degli eosinofili, cellule effettrici del danno. Infine IL-4 e IL-9 attivano i mastociti che hanno nel contempo legato l'allergene attraverso le IgE fissate sulle loro membrane mediante gli Fc epsilon R. Abbastanza recentemente è stato stabilito il ruolo di un'altra popolazione cellulare le "*innate lymphoid cells*" (ILCs). Queste sono cellule simili ai linfociti T ma prive del TCR. In particolare le ILC2 rappresentano il link tra le risposte innate e quelle adattive. Infatti

quando un allergene entra in contatto con le cellule epiteliali, queste producono IL-25, IL-33 e *Thymic Stromal Lymphoietin* (TSLP), che attivano le ILC2 che a loro volta attraverso IL-4 e IL-13 stimolano i linfociti Th2 a produrre la miscela di citochine sopra menzionate capaci di avviare e mantenere la risposta allergica.

Da molto tempo è noto che lo stile di vita occidentale ed in particolare dei paesi altamente industrializzati, caratterizzato da un'igiene molto accurata, dalla presenza di famiglie costituite da piccoli nuclei, da una vita vissuta all'interno di case riscaldate e poco areate e da un'alimentazione costituita da cibi e acqua sterili, facilita una risposta tipo Th2; al contrario una vita rurale, caratterizzata da famiglie numerose, dal contatto con animali, da un'igiene meno accurata e da una alimentazione più contaminata orientano le risposte in senso Th1/Th17. Più recentemente tale ipotesi è stata resa più articolata dalla comparsa sulla scena di altri due attori fondamentali: il microbioma e l'epigenetica. Infatti il microbioma "ereditato" dalla madre, il tipo di parto ed il tipo di allattamento, possono già in una fase precocissima della vita orientare il microbioma del bambino e quindi il sistema immunitario in senso Th2. Potremmo addirittura speculare che tutta l'ipotesi igienica passi attraverso il microbiota e l'epigenetica. Infatti tutti i fattori elencati, ma anche l'uso di antibiotici ed in particolare la dieta possono modificare il microbiota ed indurre uno stato di disbiosi che, con meccanismi anche di tipo epigenetico, faciliterebbe lo sviluppo dello stato ato-



pico. In termini generali sappiamo che ad esempio un microbiota ricco in Clostridi quattro e quattordici induce una forte produzione di butirrato che, attraverso la sua attività di inibitore della istone deacetilasi, induce la generazione del fattore di trascrizione Foxp3 che rappresenta il marcatore delle cellule Treg, al contrario l'eccesso di batteri segmentati filamentosi induce risposte di tipo Th17.

MICROBIOTA ED ASMA

Come è noto la tolleranza immunologica è grandemente influenzata dal rapporto tra microbioma e sistema immunitario. Infatti animali *germ-free* presentano un difetto dello sviluppo della tolleranza mucosale e hanno un maggior rischio di sviluppare malattie allergiche. Inoltre *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* ed alcuni ceppi di *Clostridium* incrementano, almeno nei modelli murini, lo sviluppo di cellule Treg. I Clostridi sono anche in grado di stimolare le ILC3 a produrre IL-22, molecola cruciale per il mantenimento dell'integrità della mucosa intestinale. Bifidobatteri e Lactobacilli favoriscono la produzione di vitamina A, triptofano ed eme ossigenasi-1 che promuovono l'induzione di cellule Treg. Il polisaccaride A del *Bacteroides fragilis* è in grado in modelli murini di indurre la produzione di IL-10 da parte di cellule T CD4 interagendo con cellule plasmocitoidi dendritiche. E' importante ricordare che l'asma bronchiale (AB) sarebbe influenzata sia dal microbioma intestinale che da quello respiratorio. Recentemente è stato possibile individuare tre *cluster* nell'ambito dei fenotipi

AB e COPD. Il *cluster 1* prevalentemente rappresentato da pazienti affetti da COPD con evidenza di infiammazione neutrofila, elevati livelli di mediatori pro-infiammatori, esacerbazioni associate ad infezioni batteriche e prevalenza di *Proteobacteria* a livello microbico; Il *cluster 2*, caratterizzato da evidenza di infiammazione eosinofila, coinvolgimento di citichine Th2-correlate ed alta concentrazione di *Bacteroidetes* a livello intestinale; Il *cluster 3* è caratterizzato da una infiammazione Th1 correlata e da una prevalenza di *Actinobacteria* e *Firmicutes* come componenti del microbiota.

MICROBIOTA INTESTINALE ED ASMA

E' stato dimostrato che in pazienti asmatici è presente un aumentato numero di batteri in grado di produrre istamina rispetto a volontari sani. Inoltre bambini nati mediante parto cesareo presentano un microbiota prevalentemente costituito da *Stafilococcus species*, *Propionibacteriaceae*, *Corinobacteriaceae* e *Firmicutes* con scarsità di *Actinobacteriaceae* e *Bacteroidetes*. Al contrario bambini nati da parto naturale hanno un'intensa colonizzazione di Clostridi che producono

Figura 4.

Modello patogenetico "circolare" delle malattie complesse

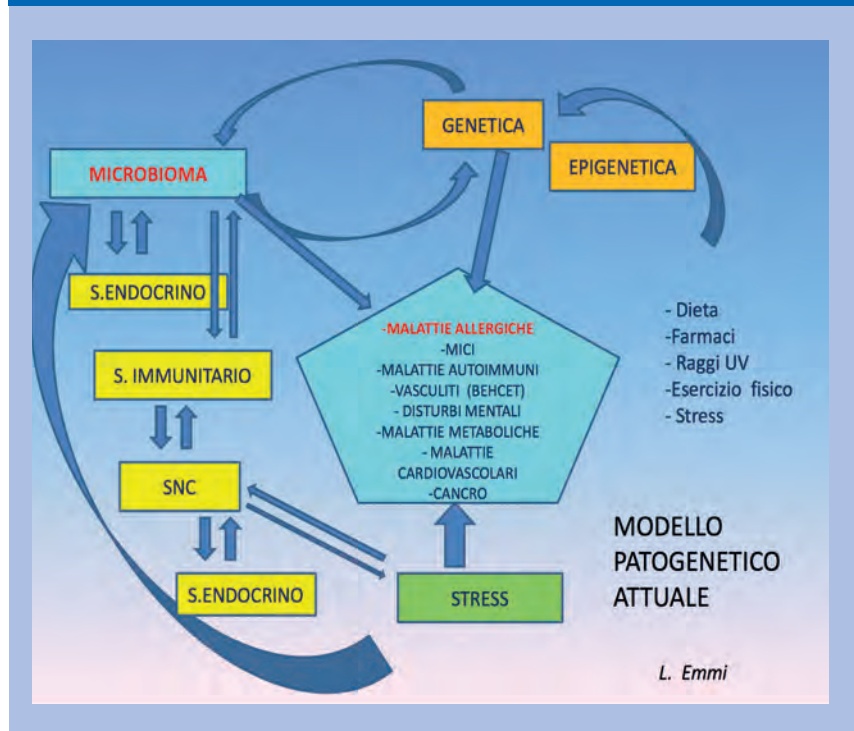
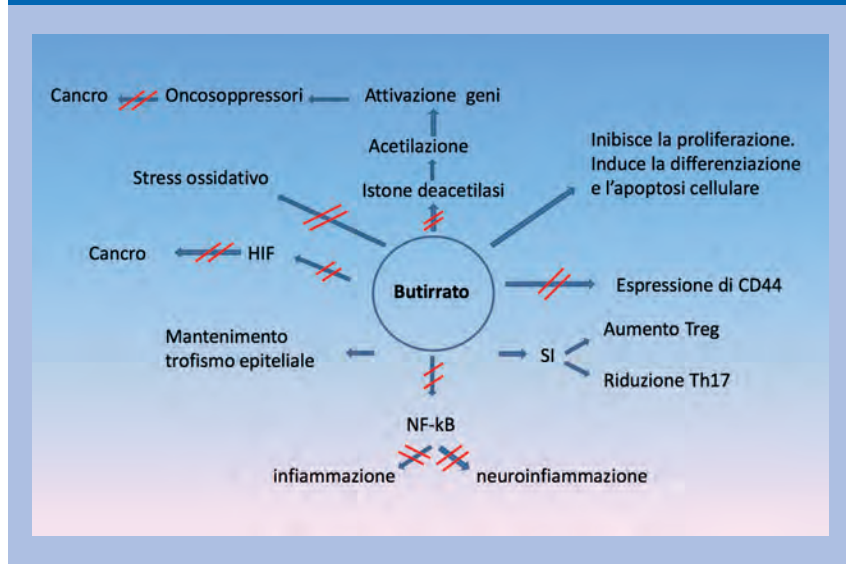




Figura 5. Ruolo del Butirrato nelle malattie complesse



grandi quantità di SCFAs, dotati come è noto di effetti anti-infiammatori. Diversi lavori hanno dimostrato che una disbiosi in fase molto precoce può orientare il sistema immunitario in senso Th2 e facilitare lo sviluppo dell'AB. D'altro canto è ormai abbastanza chiaro il ruolo del microbiota ed in particolare di alcune disbiosi in numerose altre patologie quali il diabete mellito di tipo due, l'obesità, la sindrome metabolica, le malattie infiammatorie croniche dell'intestino, il cancro, le malattie cardiovascolari ed alcune malattie neuropsichiatriche. In estrema sintesi il legame tra disbiosi e patologia è mediato dall'attivazione di processi flogistici sia locali che sistemici. Va precisato che con il termine disbiosi si intende una modificazione transitoria o persistente della normale composizione del microbiota, mentre si defini-

sce eubiosi la normalità di tale sistema. Purtroppo ancora non siamo in grado di definire il concetto di normalità del microbiota, tuttavia possiamo immaginare che sia eubiotico il microbiota di un soggetto giovane non affetto da malattie e che conduce uno stile di vita salutare: esercizio fisico, corretta alimentazione, stress moderato, etc. Dobbiamo anche precisare che ormai conosciamo la rappresentazione quantitativa e qualitativa delle principali popolazioni batteriche costituenti in media il microbiota di una determinata popolazione.

MICROBIOTA RESPIRATORIO ED ASMA

E' doveroso ricordare che il microbiota respiratorio è in realtà fortemente influenzato dal microbiota orale, nasale e

dal microbiota intestinale. Quest'ultimo interagisce con quello respiratorio sia, mediante meccanismi di microaspirazione dal tratto gastroesofageo, sia attraverso modalità più complesse che prevedono una interrelazione sostenuta da molecole di origine batterica, da mediatori infiammatori microbiota-correlati ed infine da segnali neuro ormonali di provenienza intestinale. Inoltre, mentre le prime vie aeree, fortemente influenzate dai fattori sopra menzionati, sono colonizzate da un consistente e diversificato profilo microbico, le vie aeree inferiori sono caratterizzate da una popolazione microbica meno rilevante e più omogenea. Alcuni studi hanno dimostrato una differenza nel "burden" e nella variabilità del microbiota nei pazienti asmatici rispetto ad una popolazione di controllo. Infatti, è stata dimostrata, nelle basse vie aeree di pazienti asmatici, una particolare espansione di *Proteobacteria* rispetto a quanto riscontrato nei soggetti sani. Alcuni membri di suddetto phylum sono inoltre correlati ad una maggiore iperresponsività bronchiale. E' stato anche osservato che pazienti asmatici steroidoresistenti esprimono una particolare espansione di *Haemophilus parainfluenza*, membro dei *Proteobacteria*. E' stato dimostrato che tale specie induce nei macrofagi coltivati in vitro l'attivazione di MAPK, di IL-8 e inibisce la risposta dei corticosteroidi.

CONCLUSIONI PATOGENETICHE

Si può pertanto ipotizzare che le malattie allergiche, al pari delle malattie autoimmuni, di alcune patologie metaboliche e



forse del cancro, debbano essere viste in maniera più complessa, in un modello circolare e non lineare e che nel dialogo tra i vari fattori patogenetici debba entrare a buon diritto il microbioma e l'epigenetica (Figura 4).

POSSIBILITÀ TERAPEUTICHE

Le possibilità terapeutiche più recenti sono rappresentate da:

- a.** Omalizumab (Xolair), farmaco biologico utilizzato in realtà da alcuni anni nel trattamento dell'AB allergico grave non controllato nonostante la terapia con steroidi topici ad alto dosaggio, il cui meccanismo d'azione non è ancora del tutto noto. Omalizumab è un anticorpo monoclonale umanizzato che si lega al recettore per l'Fc delle IgE presente sui mastociti e sui basofili, impedendo così l'attivazione di tali cellule. Omalizumab potrebbe anche agire mediante una modulazione dei mastociti mucosali attivati soprattutto attraverso i TLR da peptidi batterici prodotti da uno stato di disbiosi.
- b.** Mepolizumab (Nucala) anticorpo monoclonale anti IL-5, utilizzato insieme alla terapia tradizionale nell' AB eosinofilo refrattario severo. Anche gli eosinofili potrebbero essere attivati in condizioni di disbiosi.
- c.** Pro e Prebiotici. Molti studi hanno dimostrato che uno o più ceppi di lactobacilli e/o bifidobacteria possono avere un ruolo nella prevenzione dell'atopia. I meccanismi con cui i probiotici potrebbero essere efficaci sono rappresentati dalla modificazione del *milieu* citochinico locale. In condizione di disbiosi si

viene a creare uno stato di infiammazione cronica a basso grado che potrebbe essere in parte revertita dall'uso dei probiotici. E' stato infatti dimostrato che alcuni ceppi batterici possono favorire la produzione di IL-10, TGF-beta, nonché la produzione di IgA. Tuttavia è ragionevole ritenere che l'uso dei probiotici potrebbe essere particolarmente efficace nella madre durante la gestazione e nelle prime fasi della vita neonatale, successivamente quando i *network* pro-infiammatori si sono stabilizzati, la loro efficacia potrebbe essere meno evidente. I prebiotici rappresentano in realtà la maniera più fisiologica di "combattere" la disbiosi. E' stato infatti osservato da tempo che l'assunzione di cibi ricchi in fibre e' un potente induttore della produzione di SCFAs ed in particolare di butirrato. Tali piccole molecole attraverso alcuni meccanismi, in parte descritti precedentemente, determinano una

"downregulation" dei processi infiammatori locali (Figura 5).

d. Trapianto fecale "*Faecal Microbiota Transplantation*" (FMT). In letteratura sono presenti numerosi dati sia in modelli animali che nell'uomo che suggeriscono che alterazioni della composizione del microbiota abbiano un ruolo importante nello sviluppo dell'AB. Al momento l'uso del FMT nell'asma è tuttavia limitato, ma potrebbe rappresentare in futuro una valida alternativa terapeutica nell' AB severo refrattario alle terapie farmacologiche.

Tuttavia, in considerazione anche del rapporto tra stile di vita occidentale e incremento della condizione di atopia, è verosimile che l'approccio migliore sia dato da una radicale modificazione dello stile di vita e soprattutto della dieta che sostanzialmente dovrebbe essere equilibrata e contenere un buon apporto di alimenti ricchi in fibre.



Bibliografia

1. Cresci GA and Bawden E.-Gut Microbiome: What We Do and Don't Know. -*Nutr Clin Pract.* 2015; 30(6):734-46.
2. Hartz LE, Bradshaw W, Brandon DH.-Potential NICU Environmental Influences on the Neonate's Microbiome: A Systematic Review.- *Adv Neonatal Care* 2015;15(5):324-35.
3. Huang YJ,Boushey HA.-The microbiome in asthma. -*J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(1):25-30.
4. Bhattarai Y.-Microbiota-gut-brain axis: Interaction of gut microbes and their metabolites with host epithelial barriers.-*Neurogastroenterol Motil.* 2018;30(6):e13366.
5. Ipci K, Altintoprak N, Muluk NB et al.-The possible mechanisms of the human microbiome in allergic diseases.-*Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2017; 274(2):617-626.
6. Lanaspas M, Bassat Q, Medeiros MM et al.-Respiratory microbiota and lower respiratory tract disease.-*Expert Rev Anti Infect Ther.* 2017;15(7):703-711.
7. Panzer AR, Lynch SV.-Influence and effect of the human microbiome in allergy and asthma.- *Curr Opin Rheumatol.* 2015; 27(4):373-80.



La diagnosi allergologica con i test cellulari: prospettive e criticità

Salvatore Chirumbolo

Direttore e Segretario Scientifico
del CONEM-Council for Nutritional
and Environmental Medicine-Mo i Rana,
Norway
Dipartimento di Neuroscienze,
Biomedicina e Movimento
Università di Verona

Not Allergol 2018; vol. 36: n. 2-3 : 68-79

INTRODUZIONE

La diagnosi allergologica in laboratorio rappresenta uno dei principali compiti che la ricerca sperimentale sulle allergie e le reazioni di ipersensibilità sta affrontando in questi ultimi anni, particolarmente nel campo dell'allergia agli alimenti e dell'ipersensibilità ai farmaci (1-4). Per diagnosticare una patologia allergica il laboratorio si serve di una batteria ancora piuttosto scarsa di test, solitamente incentrati sulla ricerca delle IgE circolanti e sui test cutanei, mentre l'uso dei cosiddetti "test cellulari", in particolare del *basophil activation test* o "test di attivazione dei basofili" (BAT), è ancora poco diffuso. Le cosiddette reazioni di ipersensibilità, di cui la più comune allergia è solo un esempio, rappresentano una tipologia di risposte piuttosto complesse del nostro sistema immunitario che, se da un lato possono essere in parte tracciabili dalla produzione e tipologia di anticorpi coinvolti nelle reazioni immunologiche, dall'altra necessitano del coinvolgimento di diverse popolazioni ematologiche e

di subset linfocitari specifici, nonché di una vasta panoplia di mediatori e segnalatori cellulari, in particolare citochine e chemochine, per essere identificate con correttezza. Per questa ragione, e anche allo scopo di ampliare la batteria di esami disponibili per la diagnosi allergologica, sono stati sviluppati negli ultimi anni i test cellulari, di cui il BAT è quello più conosciuto.

IL BASOFILO COME CELLULA TEST NELLE ALLERGIE

Alcune cellule, coinvolte nelle risposte immunologiche che conducono alle manifestazioni allergiche, circolano nel sangue periferico e possono essere raccolte con un semplice prelievo di sangue, che per un BAT è in genere in sodio eparina. Tra queste cellule, quelle più note in

RIASSUNTO

Parole chiave e acronimi

• Allergia • Basofili • Test di attivazione dei basofili (BAT) • Citofluorimetria

Il test di attivazione del basofilo (basophil activation test) è un esame in vitro eseguito sul sangue intero eparinato del paziente presunto allergico cimentando i basofili con l'allergene direttamente nel campione di sangue e poi analizzando l'attivazione cellulare investigando i basofili attraverso la loro cattura elettronica in citometria a flusso. Le prestazioni di tale test cellulare, che rimane ad oggi l'unico test in vitro capace di saggiare la risposta allergica in modo diretto, sono in continua evoluzione e molto ancora rimane da affrontare per consentire al test di fornire valutazioni affidabili e nette circa l'allergia ai farmaci, agli inalanti, agli alimenti, al follow up immunoterapeutico. Il test è senza dubbio più performante, in termini di prestazioni analitiche, della ricerca delle IgE nel siero.

In questa mini rassegna si descriverà il test al solo scopo di farlo conoscere ai medici e allergologi facendo luce sui suoi vantaggi e sulle possibili criticità.



IL TEST DI ATTIVAZIONE DEL BASOFILO PREMESSE TECNICHE

La citometria a flusso

La citometria a flusso o cito-fluorimetria a flusso è un metodo ingegnoso che permette di “catturare” le cellule che attraversano un capillare di diametro estremamente piccolo (focalizzazione idrodinamica) rilevando la fluorescenza emessa da un composto chimico, chiamato fluoròforo o fluorocromo, che risulta attaccato ad un anticorpo monoclonale che, a sua volta, riconosce e si attacca ad un antigene CD specifico della cellula. Ovviamente, per mancanza di spazio, daremo qui una spiegazione semplicistica, per gli approfondimenti si rimanda il lettore ai testi di letteratura. Gli anticorpi monoclonali, a cui è associato un fluorocromo o due fluorocromi in tandem, riconoscono e si attaccano alle migliaia di specifici marcatori CD del basofilo, per esempio quelli espressi in membrana, e quindi preparano (o si dice in gergo “colorano”) le cellule in modo che quando esse attraversano dal capillare una per una un fascio laser, i rivelatori dello strumento registrano la fluorescenza emessa dai fluorocromi attaccati alle cellule, fluorescenza che è diversa a seconda dei fluorocromi stessi, in dipendenza della stessa sorgente laser e consentono di identificare le diverse tipologie di cellule (dunque “separandole” elettronicamente) in base alle diverse fluorescenze emesse dai rispettivi fluorocromi. Il citofluorimetro, tuttavia separa inizialmente le cellule del sangue,

campo allergologico sono i basofili, che ammontano in verità alla frazione più esigua dei globuli bianchi valutati da una semplice formula leucocitaria (5-8). I basofili sono leucociti la cui origine ematopoietica è stata a lungo dibattuta (9). Sebbene condividano diversi aspetti cellulari, molecolari e funzionali con i mastociti tissutali (10), sembra piuttosto che i basofili siano più imparentati con gli eosinofili che con i mastociti (9), anche se recenti ricerche hanno svelato che basofili e mastociti possono condividere un precursore comune, da cui si differenziano per una diversa regolazione da parte del fattore di trascrizione C/EBP- α che se espresso o up-regolato porta al basofilo, se inibito porta al mastocita. Nella lineage STAT5pos, GATA2pos e C/EBP- α pos è l'espressione di MITF che porta al mastocita. Quindi, se il precursore esprime il C/EPB- α il commitment è verso il basofilo, se esprime il MITF è verso il mastocita. L'espressione del C/EPB- α reprime quella del MITF e viceversa, per cui se si formano basofili dal precursore non si possono formare mastociti e viceversa (11).

Lo studio della funzione dei basofili umani si è notevolmente arricchito negli ultimi anni, soprattutto grazie ai progressi dell'immunologia sperimentale e all'introduzione della citometria a flusso, che ha permesso a molti ricercatori e medici l'investigazione approfondita dei meccanismi bio-cellulari e molecolari dei basofili durante le risposte allergiche (12). Fino a non molto tempo fa, si pensava che i basofili fossero esclusive cellule circolanti che, successivamente a sensibilizzazione primaria con un aller-

gene specifico, sviluppassero un processo cosiddetto di “rilasciabilità”, in seguito al *cross linking* dell'allergene con le IgE specifiche legate ai recettori delle IgE, gli Fc ϵ RI o “recettori ad alta affinità”. Oggi sappiamo che i basofili hanno un ruolo molto importante non solo nell'immunità innata ma anche in quella cosiddetta acquisita. I basofili, in seguito al legame dell'allergene (che è un antigene o un complesso di antigeni) con le IgE poste sui recettori ad alta affinità Fc ϵ RI, rilasciano mediatori solubili, come leucotrieni, amine vasoattive, proteasi, citochine e chemochine. Tra questi il mediatore più noto è senza dubbio l'istamina (13,14). Alcuni test cellulari (test di rilasciabilità) valutano infatti il rilascio d'istamina come marcatore allergologico, spesso con diversi metodi, come il metodo delle fibre di vetro (15). Di solito associato al rilascio d'istamina, i basofili, in seguito all'attivazione cellulare, esprimono sulla loro membrana esterna alcuni “marcatori” molecolari, identificati nella classificazione immunologica CD, di cui il più noto è il CD63 (15-17) (Tabella 1). Alcuni di questi marcatori, come il CD203c, sono specifici dei basofili, altri sono spesso condivisi da altre cellule e/o leucociti (18-20). I diversi marcatori CD per il basofilo usati per il BAT non sono molti, anche se la ricerca in tal senso sta facendo i suoi progressi (21-31).

La diversa espressione di alcuni di questi marcatori di membrana successivamente ad attivazione cellulare può essere “seguita” attraverso una citometria a flusso multiparametrica, approccio oggi usato per l'esecuzione di un BAT in laboratorio (Tabella 1).



Tabella 1

Principali marcatori di superficie del basofilo e protocolli

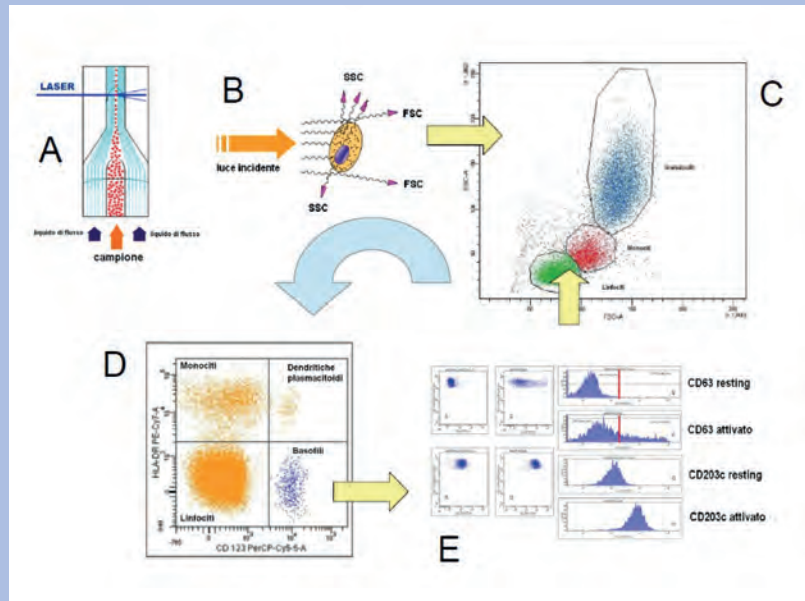
MARKER	DESCRIZIONE	ESPRESSIONE	BIBLIOGRAFIA
CD63	Teraspanina LAMP-3	Non costitutivo. Aumenta con attivazione	21-23
CD203c	Marcatore specifico ENPP-2	Costitutivo. Aumenta con attivazione	23, 28
CD123	Recettore per l'inteleuchina 3	Costitutivo-inducibile. Non aumenta con attivazione	23, 25, 26-28
CD107a	LAMP-1 Attività citotossica	Inducibile, Aumenta con attivazione	20
CD164	Sialomucina	Costitutivo. Aumenta con attivazione	20, 24
CD45	Tirosin fosfatasi di membrana	I basofili sono dimly per il CD45. Non aumenta con attivazione	26, 28
CD193 (CCR3) CRTH2	Recettore eotaxina Recettore PGD2 prostaglandina D2	Costitutivo. Diminuisce con attivazione Costitutivo. Non aumenta con attivazione	27, 29 30
FcεRI/IgE	Recettore per le IgE ad alta affinità	Costitutivo. Aumenta con l'attivazione	31
PROTOCOLLO DEL BAT (in grassetto la fenotipizzazione)		ESPRESSIONE	
SSC/Anti-IgE/CD63		Solitamente il protocollo è anti-IgE-PE e anti-CD63-FITC. Commerciale (Glycotope Biotechnology GmbH Heidelberg, Germany).	
SSC/CCR3/CD63		Protocollo fatto dal fenotipico CCR3-PE e dal marker di attivazione CD63-FITC. Commerciale (Bühlmann FlowCast®)	
SSC/CCR3/CD63/CD203c		Protocollo fatto dal fenotipico CCR3-PE e dal marker di attivazione CD63-FITC, CD203c PE-DY647. Commerciale (Bühlmann FlowCast2®)	
SSC/CD203c/CD63		Protocollo con CD203c-PE per la separazione ed un CD63-FITC per l'attivazione. Commerciale (BasoFlow® Exbio)	
SSC/CD123/HLADR/CD63/CD203c		I basofili esprimono in modo elevato il CD123 (bright) e non esprimono l'HLADR. Versione non commerciale	
CD45/CD123/HLA-DR/CD63/CD203c		I basofili esprimono in modo debole il CD45 (sono CD45dim) Versione non commerciale	
SSC/DRTH2(DP2)/CD63		Protocollo proposto ma quasi mai usato in letteratura	



attraverso un fascio di luce, che consentirà di misurare, in uscita, la diffrazione luminosa del fascio lineare su un corpo in sospensione, diffrazione che sarà diversa a seconda delle dimensioni della particella (ad esempio una cellula) (forward scatter o FSC) e anche la riflessione da una luce incidente a 90°, riflessione che sarà diversa a seconda della complessità interna cellulare (side scatter, SSC). In questo modo, dato che le cellule del sangue sono diverse contemporaneamente per dimensioni (FSC) e per granulosità e forma del nucleo (SSC), esse vengono separate come dati elettronici elaborati in forma di punti (eventi o dot) in un grafico (dot plot), che separa i diversi punti in “aree” o nuvole più o meno dense di eventi (Figura 1).

Dunque, al citofluorimetro, lo strumento che usa la citofluorimetria a flusso, un campione di sangue è inizialmente “separato” nelle sue principali componenti della formula leucocitaria attraverso un grafico FSC/SSC. Questo dot plot o grafico è chiamato in gergo “morfologico”. Prima di essere letto al citofluorimetro, il sangue intero o un suo campione o frazione viene “colorato” (staining) con gli anticorpi monoclonali provvisti di fluorocromo. La fluorescenza di tali fluorocromi viene letta da un ulteriore sistema rispetto al FSC/SSC che consente di distinguere popolazioni cellulari più fini e subset o sottopopolazioni linfocitarie non immediatamente evidenti al FSC/SSC, utilizzando diversi laser e distinguendole a seconda dei marcatori investigati (Figura 1).

Figura 1. Schema semplificato di percorso di analisi di un BAT al citofluorimetro

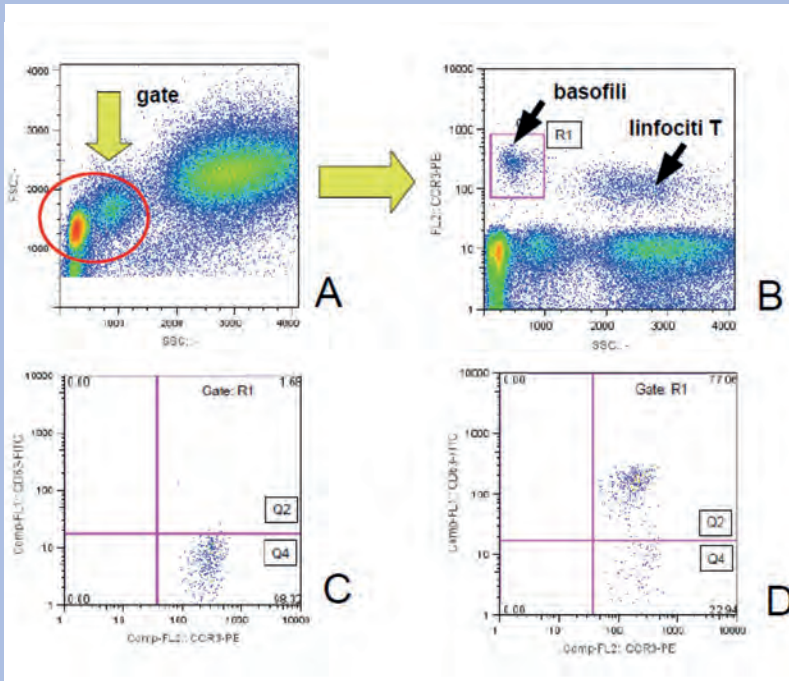


A) focalizzazione idrodinamica: il campione passa da un capillare e viene incrociato da un raggio laser; B) un fascio di luce incontra le cellule in linea retta (FSC) o angolata (SSC) e viene letto dal software del citofluorimetro come una serie di punti (dots) che si distribuiscono secondo dimensioni (FSC, ascissa) e granulosità (SSC, ordinata), creando un dot plot morfologico (C). All'inizio il grafico è nero, i colori fittizi si aggiungono dal computer in automatico creando i diversi gate (aree chiuse circolari). La freccia gialla in basso riporta l'area in cui presumibilmente si collocano i basofili. Il gate fatto in quest'area presso i linfociti viene fatto leggere dal software per l'espressione di alcuni marcatori fenotipici del basofilo (ad esempio CD123 e HLA-DR). Si separano 4 popolazioni cellulari, monociti, dendritiche plasmacitoidi, linfociti e basofili (CD123bright/HLADR negativi) (D). La nuvola dei basofili viene letta per l'espressione dei marcatori di attivazione CD63 e CD203c, in condizioni di non attivazione (resting) e di attivazione (E). Nei basofili attivati il CD63 si esprime anche oltre la soglia (linea rossa), il CD203c aumenta la fluorescenza (si sposta a destra nell'istogramma di fluorescenza). Tratto da Chirumbolo S, Vella A, Ortolani R et al. Differential response of human basophil activation markers: a multi-parameter flow cytometry approach. Clin Mol Allergy. 2008 Oct 16;6:12 Immagini non copyrighted poiché soggette ad embargo.



Figura 2.

Esempio di BAT



Esempio di BAT che utilizza il protocollo commerciale CCR3/CD63 per gentile concessione (tratto da Ugucioni et al., J Clin Invest 1997, modif). A) Sul morfologico l'operatore segna un'area (gate, cerchio rosso) nella part bassa (low) dell'SSC (ascissa), zona linfociti. B) Questo gate lo si legge per l'espressione del CCR3, contro SSC. Si identifica una nuvola di dot, più o meno distinta dai linfociti (che esprimono anche il CCR3) e si include in un ulteriore gate (quadrato rosso): C) Il gate è letto per l'espressione del CD63. Nei basofili non attivati il CD63 è poco espresso (Q4) ed è dentro la linea fucsia che fa da cut off. D) Nei basofili attivati il CD63 è upregolato (aumenta) e si vede una nuvola sopra la linea fucsia (Q2).

Marcatori cellulari

Come si fa ad “identificare” una certa tipologia cellulare in mezzo alla popolazione mista del sangue intero, usando i diversi fluorocromi attaccati ai diversi

monoclonali?

Innanzitutto, è necessario sapere, dalla letteratura scientifica, quali “marcatori” sono espressi dai basofili in quanto tali, anche se non attivati in corso di aller-

gia o non specificatamente collegati ad una risposta allergica. Questi marcatori si definiscono “fenotipici”. Sono molto importanti, perché permettono di “catturare”, identificandone la presenza con dei segnali elettronici (dot o eventi), le cellule che vogliamo cercare nel sangue. Gli allergologi esperti che usano il BAT, devono prima realizzare un “protocollo di fenotipizzazione”, cioè un’associazione di diversi marcatori in grado di “staccare” i basofili dalla massa delle altre cellule, come una nuvola più o meno netta di dot o eventi (puntini), che, essendo strettamente collegati a certi precisi fluorocromi, identificano solo ed esclusivamente certe precise cellule, senza necessariamente separarle fisicamente dal sangue (Figura 1D).

In letteratura sono stati descritti ed applicati diversi protocolli di fenotipizzazione, riassunti in Tabella 1. La maggior parte degli studiosi “stacca”, attraverso una procedura tutta informatica, un’area nel dot plot morfologico, dove si presume possano essere localizzati i dot che identificano i basofili, creando quindi un gate nel morfologico (un’area chiusa, come quando si vuole sottolineare con il pennarello cerchiando una parola, vedi Figura 1C e Figura 2A). L’area di questo gate viene “letta” per l’espressione di alcuni marcatori di fenotipizzazione, come ad esempio il CD123, il CD203c, il CD193 (o CCR3), eccetera. Alcuni autori usano quindi ben precisi protocolli di fenotipizzazione, riassunti in Tabella 1.

Ua volta “catturate” le cellule nel gate (che appaiono come dot o eventi) e identificate grazie ai monoclonali specifici



del protocollo di fenotipizzazione, come studiarle? Orbene, attraverso lo studio di altri marcatori, chiamati “marcatori di attivazione”, sempre espressi dai basofili ma stavolta in modo diverso rispetto ai basofili attivati. Tali marcatori, almeno i più noti, sono il CD63, il CD203c, il CD164, il CD193 o CCR3 (21-30). Durante l'attivazione questi marcatori aumentano di numero sulla membrana biologica dei basofili, tranne il CCR3, il recettore dell'eotaxina, che diminuisce (27). Il marcatore più usato è il CD63. Esso sembra essere fortemente collegato al fenomeno del rilascio e dunque è un buon marcatore per “spiare” quando il basofilo attivato ha rilasciato i suoi granuli e i mediatori vasoattivi (17,28). L'espressione del CD63 nella popolazione dei basofili non è omogenea, dato che dipende da fenomeni complessi di regolazione cellulare e dal diverso grado di rilascio e quindi quando si studiano in citofluorimetria con il BAT i basofili che hanno aumentato la quota di CD63 in superficie, l'operatore calcola una percentuale di attivazione, cioè una percentuale di CD63 sovraespresso (up-regulated), a partire da uno “zero” (soglia) arbitrario che è la CD63% dei basofili non attivati (che tuttavia non è quasi mai zero %) (31,32). Ma che cosa intendiamo per attivazione?

Test di attivazione

Il test di attivazione del basofilo è un esame in vitro, che quindi può essere facilmente eseguito in un laboratorio attrezzato da personale tecnico e specializzato. Il test si basa sull'esame citofluorimetrico di basofili attivati o

challenged da definiti allergeni purificati direttamente in campioni eparinati (sodio eparina) di sangue intero venoso periferico di soggetti atopici o che hanno manifestato una sindrome allergica. Il procedimento è semplice e routinario e in alcuni casi il BAT è venduto perfino come pratico kit commerciale. Di solito un buon kit ha due controlli positivi. Un controllo, fatto da un anti-IgE policlonale, serve a verificare se i basofili sono reattivi alla risposta IgE-mediata ed un altro controllo, costituito da un peptide formilato batterico, serve a verificare se i basofili si attivano comunque, anche da uno stimolo non IgE-mediato. Il kit è provvisto anche di una miscela di anticorpi monoclonali coniugati con un fluorocromo, ad esempio l'isotiocianato di fluoresceina (FITC) o la ficoeritrina (PE). I diversi kit commerciali usano anche protocolli diversi di BAT (Tabella 1). Senza volerne necessariamente descriverne uno in particolare faremo un esempio.

Immaginiamo di usare un protocollo commerciale CCR3/CD63. Questo significa che un campione del sangue intero eparinato viene trattato con una miscela contenente due anticorpi monoclonali, uno contro la molecola CD193 o CCR3, espressa costitutivamente dal basofilo ed uno contro la molecola CD63, la cui espressione in membrana aumenta con l'attivazione cellulare. Gli anticorpi monoclonali sarebbero invisibili al sistema se non fossero coniugati ognuno con uno specifico fluorocromo. Immaginiamo quindi che all'anticorpo anti-CD193 sia attaccata una molecola fluorescente di fico-

eritrina (PE) e all'anticorpo anti-CD63 una molecola di FITC (fluoresceina). L'anticorpo anti-CD193-PE si attacca a tutte le molecole CD193 presenti nel sangue, e dunque quelle cellule che lo esprimono saranno identificate come puntini (dot) nel canale di lettura della fluorescenza emessa dal PE. Il software dello strumento consente anche di fare un istogramma delle diverse intensità di fluorescenza corrispondenti al canale, una misura che ci dà un'idea di come la fluorescenza (e quindi il marcatore cellulare) siano distribuiti nella popolazione di cellule positive a quel marcatore.

La figura 2 sintetizza questa serie di passaggi con una adeguata illustrazione gentilmente concessa per lo scopo. Una volta identificati i basofili come cellule SSClow/CCR3pos, essi sono letti per l'espressione del CD63 e quindi del % del CD63, misura che ci indica se e quanto i basofili sono stati attivati nella risposta allergica.

Il CD63 è un marcatore di attivazione molto diffuso nei BAT, che viene valutato come percentuale di CD63 espresso rispetto ad una soglia, posta come livello base, che dovrebbe indicare il livello di CD63 espresso dai basofili “a riposo”, cioè non attivati. Questa soglia si chiama cut off e varia a seconda del tipo di protocollo di fenotipizzazione usato e della biologia dei basofili (32-34).

In breve, se il protocollo permette di separare, in gergo si dice “staccare”, i basofili come nuvola ben distinta dagli altri eventi nel dot plot, la valutazione dei marcatori di attivazione è più precisa.



APPLICAZIONE DEL BAT NELLA DIAGNOSI ALLERGOLOGICA PROSPETTIVE E CRITICITÀ

Premessa

L'auspicata diffusione del BAT dopo il suo, pur timido ingresso nell'allergologia diagnostica verso la fine degli anni '90, sta avendo qualche rivincita solo in questi ultimi anni, anche se resta ancora molta strada da fare. Un primo problema è che il test necessita di uno strumento tanto sofisticato quanto versatile, il citofluorimetro, spesso rintracciabile più in un laboratorio d'immunologia che in un laboratorio di analisi ematocitochimiche e che necessita di training, manutenzione, controlli e monitoraggio come qualsiasi altra grande strumentazione diagnostica, con i suoi relativi costi. Anche i monoclonali coniugati con i fluorocromi sembrano molto meno vantaggiosi di una ricerca di IgE specifiche o di un test cutaneo. Il problema più oneroso è tuttavia rappresentato dall'estrema variabilità individuale delle risposte allergiche e anche dalla loro complessità, che spesso rischia di rendere poco affidabili anche test ormai comuni come la ricerca delle IgE totali e specifiche e lo skin prick test (SPT). Ci sono delle ragioni di carattere biologico e ragioni di carattere tecnico e metodologico.

I basofili non sono semplici effettori della risposta allergica. Proprio il fatto che siano presenti in così basso numero nel sangue circolante, depone a favore dell'ipotesi che i basofili assumano un ruolo più fine, ovvero "regolatorio" più che

effettore, nella risposta allergica (5,8). Quello che si sa è che i basofili sono i principali produttori di interleuchina 4 (IL-4) tra le cellule dell'immunità innata e svolgono un ruolo di "cellule guida" dei linfociti T, addirittura entrando nei linfonodi e producendo l'ormone dei linfociti T chiamato linfopoietina stromale timica (TSLP) (8,12,35). Inoltre, la risposta dei basofili ai diversi allergeni, particolarmente se misurata attraverso il CD63, è molto eterogenea. Esistono infatti soggetti cosiddetti "non responder" e "non releaser" per l'attività degranulatrice e di rilasciabilità del basofilo, che in associazione con fenomeni di anergia cellulare, rendono più complicato il quadro di valutazione dell'attivazione in un BAT (8, 33,36).

Un test di attivazione positivo indica, con un'ottima approssimazione, che il soggetto è allergico all'antigene di challenging, l'antigene con cui i basofili sono cimentati nel campione di sangue intero eparinato, ergo il soggetto è stato in passato sensibilizzato con quell'antigene e ne risulta allergico. Con il BAT è possibile valutare l'attività cellulare relativa alla risposta allergica per la stragande maggioranza degli allergeni conosciuti di cui il soggetto possa aver acquisito relativa sensibilizzazione, veleno d'ape e altri insetti, allergeni inalatori, alimentari, tossicologici, farmacologici, eccetera, praticamente in modo diretto, con un semplice prelievo di sangue. Inoltre, il BAT rappresenta lo strumento di elezione per la valutazione dell'immunoterapia allergologica orale o cutanea o per gli effetti avversi dei vaccini (37,38).

Criteri tecnici di ottimizzazione di un BAT

Ad oggi i marcatori di attivazione più usati in un BAT sono il CD63 ed il CD203c (Figura 1E). Quando il basofilo si attiva, a causa di stimoli non IgE-mediati (cioè che attivano la cellula da vie diverse rispetto a quelle associate al recettore ad alta affinità) o IgE-mediati, aumenta l'espressione del CD63 e del CD203c sulla membrana cellulare del basofilo. Il grado in cui si esprime il CD63 è diverso a seconda della disponibilità di granuli che il basofilo esocita per rilasciare istamina (33,34), mentre il CD203c ha un aumento piuttosto omogeneo in tutta la popolazione dei basofili analizzata. Sebbene i due marcatori siano a volte entrambi usati nello stesso BAT, il CD203c è più dipendente dalla pre-stimolazione (priming) del basofilo con interleuchina 3 (IL-3), necessaria per preparare il basofilo a rispondere ad una infiammazione allergica. Questo spiega perché alcuni BAT contengono anche IL-3 per favorire la risposta dei controlli positivi nel kit.

Quello che è estremamente importante in un BAT è la purezza con cui sono elettronicamente "catturati" i basofili in un gate. Siccome si tratta di segnali indiretti (dot o eventi), bisogna essere certi che tutti i puntini inclusi in un gate rappresentino basofili nel modo più puro possibile. Questo è attuabile ma solo a condizione che si utilizzi un protocollo di fenotipizzazione ottimale.

L'uso del CD203c come marcatore fenotipico è stato più volte discusso.

Poiché il CD203c è il marcatore specifico dei basofili, cioè nel sangue circolante,



Tabella 2

Esempi di uso del BAT in allergologia

ALLERGIA ALLERGENI	PROTOCOLLO	PERFORMANCE ANALITICA		BIBLIOGRAFIA
		SENSIBILITA'	SPECIFICITA'	
ALIMENTI				
1 Alfa-galattosio	1 Anti-IgE/CD63 (FlowCAST®)	83%	78%	Mehlich J et al., J Allergy Clin Immunol. 2018 Aug 17. pii: S0091-6749(18)31143-6.
2 Sesamo	2 SSC ^{low} /CD123 ^{pos} /HLADR ^{neg} CD63/CD203c	86%	85%	Appel MY et al., Clin Exp Allergy. 2018 Aug;48(8):1025-1034.
3 Nocciolina	3 SSC ^{low} /CD203 ^{spos} CD63 (BasoFlowEx® Exbo) CD45 ^{dim} /CD123 ^{bright} /HLADR ^{neg} /CD63/CD203c	86% 79%	99% 100%	Rentzos G et al., Clin Transl Allergy. 2015 Jun 11;5:22 Chirumbolo S et al. Clin Exp Allergy. 2018 Aug;48(8):1068-1070 Chirumbolo S et al., Adv Respir Med. 2017;85(4):193-201.
INALANTI				
4 Dermatopagoides	4 Anti-IgE/CD63 (FlowCAST®)	76%	78%	Kim SH et al., Asia Pac Allergy. 2018 Jan 24;8(1):e6.
5 Polline, graminacee	5 Anti-IgE/CD63 (Basotest Glycotope GmbH) CD45 ^{dim} /CD123 ^{bright} /HLADR ^{neg} /D63/CD203c	90% 98%	73% 100%	Ogulur I et al., Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2017 Jun;97:197-201 Chirumbolo S et al., Clin Exp Allergy. 2018 Aug;48(8):1068-1070
IMENOTTERI	6 Anti-IgE/CD63 (FlowCAST®) SSC ^{low} /CD123 ^{pos} /HLADR ^{neg} CD63/CD203c	56% 95%	95% 100%	Vachová M et al., Allergy Asthma Proc. 2016 May;37(3):248-55
FARMACI				
7 Amoxicillina/ Clavulanico	7 Anti-IgE/CD63 (FlowCAST®)	55% 29-50%	89% 85-100%	Salas M et al., Allergy. J Allergy Clin Immunol Pract. 2018 May - Jun; 6(3):1010-1018.e2. Decuyper II et al., Drugs R D. 2017 Jun;17(2):265-278.
8 Rocuronum	8 SSC ^{low} /CD123 ^{pos} /HLADR ^{neg} CD63	80%	96%	Leysen J et al. Allergy. 2011 Aug;66(8):1014-9.
VACCINI	9 Anti-IgE/CD63 (Basotest Glycotope GmbH)	85%	77%	Herreros B et al., J Immunol Methods. 2018 Mar;454:86-88



per quanto se ne sa, è espresso solo dai basofili, alcuni autori usano il CD203c come marcatore di fenotipizzazione (e non di attivazione). E' stato dimostrato che l'uso del CD203c come marcatore fenotipico crea dei bias o criticità. Poiché il CD203c modifica la sua espressione sulla membrana plasmatica dei basofili dopo l'attivazione, la nuvola di dot al

citofluorimetro si "sposta" verso valori più alti di intensità di fluorescenza media (MFI), lasciando fuori dal gate fenotipico una certa quota (anche >50%) di basofili inizialmente staccati dal gate stesso. La valutazione del CD63, che a questo punto resterebbe l'unico marcatore di attivazione presente nel BAT, è falsata (biased) dal fatto che la soglia vie-

ne stabilita sul primo gate (100% basofili) e l'attivazione su un gate "spostato" (es. 50% basofili), a causa del fatto che il marcatore fenotipico CD203c è un marcatore di attivazione (26). Inoltre, il CD203c, come marcatore di attivazione, è utile nello screening delle reazioni non IgE mediate.

Un altro marcatore di attivazione, usato

Tabella 3

Reenti esempi di uso del BAT in immunoterapia

IMMUNOTERAPIA	PROTOCOLLO	BIBLIOGRAFIA
OFC (Oral Food Challenge) 1 Rassegna	1 Anti-IgE/CD63 (FlowCAST®)	De Amici M et al., <i>Minerva Pediatr.</i> 2018 Oct 4. doi: 10.23736/S0026-4946.18.05144-7.
	2 Not indicated	Knight V Is the Allergen-Specific Basophil Activation Test (BAT) Predictive of Oral Food Challenge (OFC) Outcomes? <i>J All Clin Immunol</i> 2015; 135(2): Suppl AB250
	3 Peanut	Santos AF et al., <i>J Allergy Clin Immunol.</i> 2015 Jan;135(1):179-86
SIT (Subcutaneous Immunotherapy) 4,5 Dermatopagoides (dust mite)	4 SSCLow/CCR3pos/CD63	Czarnobilska EM et al <i>Postepy Dermatol Kim SH et al., Asia Pac Allergy.</i> 2018 Jan 24;8(1):e6.
	5 SSCLow/CCR3pos/CD63	
6 Imenotteri	6 Anti-IgE/CD63 (FlowCAST®)	Bidad K et al., <i>Cytometry B Clin Cytom.</i> 2014 May;86(3):183-90. Chirumbolo S. <i>Cytometry B Clin Cytom.</i> 2015 Jan;88(1):3-4.



erroneamente come marcatore fenotipico, è il CCR3 o CD193. Sebbene in Figura 2 sia stata data prova di un ottimo distacco dei basofili CCR3pos dal sangue intero (Figura 2B), il CCR3 è espresso anche dai linfociti CD3pos, che quindi possono contaminare il gate dei basofili e falsare la valutazione del CD63 (27). Inoltre, anche il CCR3 cambia con l'attivazione (diminuisce l'espressione), falsando la valutazione del CD63 (5) (Figura 2).

Il metodo più semplice, ancora usato, in verità, è quello di "marcare" i basofili con un anticorpo anti-IgE e valutare l'attivazione con un CD63. Questo approccio, ormai superato, risente del bias legato al ciclo biologico-molecolare del recettore ad alta affinità FcεRI, che modifica l'espressione durante la risposta allergica e dal fatto che altre cellule, catturate come contaminanti nel gate morfologico dei basofili esprimono un recettore Fcε, ovvero un recettore FcεRII a bassa affinità (5, 32).

Il metodo "migliore" è quello di fenotipizzare i basofili con un marcatore completamente inespresso, sia in fase di non attivazione (resting) che di attivazione, associato, nel protocollo di fenotipizzazione, con un marcatore costitutivo espresso sia in fase resting che in attivazione, che non cambia la sua espressione in fase di attivazione (25-28).

Questo protocollo, sviluppato nei nostri laboratori, usa il marcatore CD123, espresso in modo elevato (bright) anche dai basofili a riposo (resting) e l'HLA-DR, un marcatore degli antigeni di istocompatibilità di classe II, che i basofili non esprimono (28) (Figura 1D).

Il CD123 è dunque un marcatore che, a differenza del CD203c, non "sposta" il gate dei basofili fatto sul CD123pos, anche se alcuni autori avrebbero espresso un parere opposto a cui è stata anche data recente reply (25,26). L'ottimizzazione di questi ultimi anni del BAT suggerirebbe, inoltre, di non usare più il morfologico come criterio di fenotipizzazione e quindi di non includere più nel protocollo di fenotipizzazione un segnale SSClow per catturare i basofili (ad esempio un SSClow/CD123pos). Il suggerimento (25,26) è di staccare inizialmente i basofili come cellule CD45dim, considerando che il CD45 è un marcatore espresso da tutti i leucociti circolanti (si chiama infatti Pan-Leu) e la sua diversa espressione nei diversi leucociti consente di ottenere un nuovo dot plot chiamato immunologico. Dunque, il protocollo di elezione è un fenotipico CD45dim/CD123bright/HLADRneg (26), che finora è il BAT più performante proposto in letteratura (25).

Uso del BAT e prestazioni analitiche

La Tabella 2 riporta alcuni eloquenti esempi sull'uso del BAT nella diagnosi allergologica. La Tabella 3 riassume alcune importanti evidenze del BAT usato in immunoterapia (41). Quest'ultimo campo è in continua evoluzione e il BAT resta l'unico test in grado di dare informazioni precise sull'immunoterapia orale o cutanea (41). Le prestazioni analitiche dei BAT sono oggetto di interessante discussione scientifica e pertanto i valori indicati in Tabella 2 e riportati e/o ricalcolati su dati della letteratura citata, sono solo indicativi. Sensibilità e speci-

ficità dei BAT ovviamente sono legati alla dose di allergene e alla sua immunospecificità, al pannello (protocollo) usato per catturare i basofili nel gate, alla soglia stabilita per il CD63%, alle diverse condizioni sperimentali. Il cut off del CD63 è un punto critico della valutazione di performance di un BAT. Da un punto di vista semplicemente pre-analitico, la "quantità" di marcatori CD63 presenti sul basofilo all'inizio del test dovrebbe essere la più bassa possibile, in genere si accetta una soglia pari al 3-5% di CD63% in basofili resting, tenendo presente che la valutazione del CD63% è fortemente condizionata dalla prestazione del protocollo di fenotipizzazione (21,33,34). Sebbene la sensibilità sia piuttosto buona per quasi tutti i BAT e in particolare per quelli che usano criteri più selettivi dell'anti-IgE, la specificità è alta per i protocolli più selettivi, come il protocollo CD45dim/CD123bright/HLADRneg (25,26). Il trattamento pre-analitico è un passaggio molto importante, l'eritrosi deve essere eseguita in modo corretto e i basofili trattati in ghiaccio entro 4 ore dal prelievo e processati a +4°C durante lo staining (28).

La convenienza di un BAT si riferisce all'impatto che il test diagnostico cellulare, in genere più precoce rispetto alle IgE sieriche o più specifico rispetto ad un SPT, ha sui pazienti e sul loro decorso medicoclinico. In condizioni di presunta reazione anafilattica o anafilattoide, nelle patologie allergiche croniche, come orticaria cronica o asma e nell'immunotolleranza, il BAT ha caratteristiche molto più performanti ed affidabili di altri test. I kit presenti in commercio usano solo alcuni



dei pannelli di fenotipizzazione usati in un BAT, cioè IgE/CD63, CCR3/CD63, CCR3/CD63/CD203c, CD203c/CD63, etc., mentre il pannello più performante che usa il CD123 e l'HLA-DR (ottimizzato con il CD45), viene preparato in laboratorio con i monoclonali singoli (26,39). Per molti aspetti, i test fatti "in casa" sono più versatili e convenienti di quelli in kit routinari (40) (Tabella 2 e 3).

CONCLUSIONI

L'uso del BAT in allergologia sta diventando sempre più un *must* nel laboratorio diagnostico, principalmente per la sua versatilità e affidabilità nel rintracciare la risposta allergica cellulare. Il BAT è un test cellulare più semplice di qualche recente proposta fatta usando i mastociti, perché queste cellule sono estremamente eterogenee rispetto ai basofili, mentre questi ultimi sono meno eterogenei e più facili da manovrare, dato che basta un semplice prelievo di sangue periferico. Particolari aree della ricerca medica, come le allergie pediatriche, le patologie croniche, l'immunoterapia con anticorpi umanizzati o con allergeni specifici, sono ambiti in cui risultano molto meno affidabili i classici test serologici o cutanei, che di solito sono surrogati con altri test, spesso time consuming e che non sempre confermano il quadro clinico [41]. L'allergologia è una scienza relativamente moderna ma il BAT potrebbe dare una mano a dipanare molti aspetti critici delle risposte allergiche nell'ambito dei complessi meccanismi dell'immunologia.



Bibliografia

1. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *J Allergy Clin Immunol.* 2018; 141(1):41-58
2. Vardakas KZ, Kalimeris GD, Triarides NA et al.-An update on adverse drug reactions related to β -lactam antibiotics. *Expert Opin Drug Saf.* 2018;17(5):499-508.
3. Santos AF, Shreffler WG. Road map for the clinical application of the basophil activation test in food allergy. *Clin Exp Allergy.* 2017; 47(9):1115-1124
4. Doña I, Torres MJ, Montañez MI et al.-In Vitro Diagnostic Testing for Antibiotic Allergy. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2017; 9(4):288-298.
5. Chirumbolo S. State-of-the-art review about basophil research in immunology and allergy: is the time right to treat these cells with the respect they deserve? *Blood Transfus.* 2012; 10(2):148-64.
6. Ebo DG, Hagedorens MM, Bridts CH et al.-In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clin Exp Allergy.* 2004; 34(3):332-9
7. Gibbs BF. Basophils as Key Regulators of Allergic Inflammation and Th2-type Immunity. *World Allergy Organ J.* 2008; 1(7):123-8
8. Chirumbolo S, Björklund G, Sboarina A et al.-The role of basophils as innate immune regulatory cells in allergy and immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother.* 2018; 3;14(4):815-831.
9. Arinobu Y, Iwasaki H, Akashi K. Origin of basophils and mast cells. *Allergol Int.* 2009; 58(1):21-8
10. Varricchi G, Raap U, Rivellesse F et al.-Human mast cells and basophils-How are they similar how are they different? *Immunol Rev.* 2018; 282(1):8-34.
11. Sasaki H, Kurotaki D, Tamura T. Regulation of basophil and mast cell development by transcription factors. *Allergol Int.* 2016; 65(2):127-134
12. Kubo M. Mast cells and basophils in allergic inflammation. *Curr Opin Immunol.* 2018 ; 28;54:74-79.
13. Borriello F, Iannone R, Marone G. Histamine Release from Mast Cells and Basophils. *Handb Exp Pharmacol.* 2017;241:121-139
14. de Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM et al.-Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008;146(3):177-89
15. Platzer MH, Grattan CE, Poulsen LK et al.-Validation of basophil histamine release against the autologous serum skin test and outcome of serum-induced basophil histamine release studies in a large population of chronic urticaria patients. *Allergy.* 2005; 60(9):1152-6.
16. Engel P, Boumsell L, Balderas R et al.-CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *J Immunol.* 2015; 195(10):4555-63
17. Szegedi A, Irinyi B, Gál M et al.-Significant correlation between the CD63 assay and the histamine release assay in chronic urticaria. *Br J Dermatol.* 2006; 155(1):67-75.
18. Heneberg P, Riegerová K, Ilová A et al.-Updates on the surface antigens of basophils: CD16 on basophils of patients with respiratory or insect venom allergy and the rejection



Bibliografia

- of CD203c and CD63 externalization decoupling by bisindolylmaleimides. *Clin Exp Allergy*. 2018, 4, in press.
19. Bühring HJ, Strebler A, Valent P. The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004;133(4):317-29.
20. Han X, Jorgensen JL, Brahmandam A et al.-Schlette E, Huh YO, Shi Y, Awagu S, Chen W. Immunophenotypic study of basophils by multiparameter flow cytometry. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(5):813-9
21. Chirumbolo S. Monitoring of CD63% in basophil activation test and suggested new parameters for allergy diagnosis. *Inflamm Res*. 2012; 61(2):171-6.
22. Hoffmann HJ, Knol EF, Ferrer M et al.-Pros and Cons of Clinical Basophil Testing (BAT). *Curr Allergy Asthma Rep*. 2016; 16(8):56
23. MacGlashan DW Jr. Basophil activation testing. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(4):777-87
24. Chirumbolo S. CD164 and other recently discovered activation markers as promising tools for allergy diagnosis: what's new? *Clin Exp Med*. 2011; 11(4):255-7.
25. Chirumbolo S, Björklund G, Vella A. On the reliability of the CD123-endowed basophil activation test (BAT) and its application in food allergy. *Clin Exp Allergy*. 2018; 48(8):1068-1070
26. Chirumbolo S, Björklund G, Vella A. Using a CD45dim/CD123bright/HLA-DRneg phenotyping protocol to gate basophils in FC for airway allergy. CD123 does not decrease. *Adv Respir Med*. 2017;85(4):193-201.
27. Chirumbolo S, Ortolani R, Vella A. CCR3 as a single selection marker compared to CD123/HLADR to isolate basophils in flow cytometry: some comments. *Cytometry A*. 2011 ;79(2):102-6.
28. Chirumbolo S, Vella A, Ortolani R et al.-Differential response of human basophil activation markers: a multi-parameter flow cytometry approach. *Clin Mol Allergy*. 2008; 16:6:12
29. Hausmann OV, Gentinetta T, Fux M et al.-Robust expression of CCR3 as a single basophil selection marker in flow cytometry. *Allergy*. 2011; 66(1):85-91
30. Monneret G. Is this time for CRTH2/DP2 in a flow cytometric basophil activation test? *Clin Exp Allergy*. 2008 Jul;38(7):1239-40
31. De Week AL, Sanz ML, Gamboa PM et al.-Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. II. Technical issues. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2008;18(3):143-55.
32. Chirumbolo S. Major pitfalls in BAT performance may be caused by gating protocols and CD63% cut off evaluation. *Cytometry A*. 2014; 85(5):382-5
33. Chirumbolo S. Basophil activation test in allergy: time for an update? *IntArch Allergy Immunol*. 2012; 158(2):99-114
34. Chirumbolo S. Monitoring of CD63% in basophil activation test and suggested new parameters for allergy diagnosis. *Inflamm Res*. 2012; 61(2):171-6
35. Yamanishi Y, Karasuyama H. Basophil-derived IL-4 plays versatile roles in immunity. *Semin Immunopathol*. 2016; 38(5):615-22
36. MacGlashan D Jr. Expression of CD203c and CD63 in human basophils: relationship to differential regulation of piecemeal and anaphylactic degranulation processes. *Clin Exp Allergy*. 2010; 40(9):1365-77.
37. Chirumbolo S. Basophil activation test to optimize the diagnosis of adverse effects following immunization to vaccines. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2013 Jul 9;12(3):196-202.
38. Chirumbolo S. Use of basophil activation test in the investigation of adverse effects to vaccines. *Hum Vaccin*. 2011; 7(8):878-80.
39. McGowan EC, Saini S. Update on the performance and application of basophil activation tests. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2013; 13(1):101-9
40. De Amici M, Barocci F, Caimmi S et al.-Clinical use of Basophil Activation Test (BAT) in drug, food and hymenoptera venom allergies. *Minerva Pediatr*. 2018,4.
41. Chirumbolo S. Immunotherapy in allergy and cellular tests: state of art. *Hum Vaccin Immunother*. 2014; 10(6):1595-610

Lofarma
è social

seguici su:





Micofiti e Allergia: un update

Erminia Ridolo,
Dipartimento di Medicina e Chirurgia,
Università di Parma.

Irene Martignago
UOS Allergologia ed Immunologia Clinica,
ULSS n.1 Dolomiti, Feltre (BI)

Not Allergol 2018; vol. 36: n. 2-3 : 80-88

INTRODUZIONE

I micofiti, o Funghi, sono ubiquitari nei luoghi in cui l'uomo vive, sia intensi come mondo esterno che come ambienti interni, domestici e non. Sono organismi eucarioti, da unicellulari a complessi, a cui appartengono anche i lieviti e le muffe. Hanno un ruolo importante in tutti gli ecosistemi, facilitando la decomposizione del materiale organico, rendendola nuovamente bio-disponibile. Così facendo, ricavano l'energia per il proprio sostentamento. Infatti, attraverso la produzione di enzimi digestivi che secernono nell'ambiente esterno, assorbono successivamente i nutrienti. Questi costituiscono una complessa miscela di prodotti organici, fra cui alcuni proteici, che sono in grado di indurre la produzione di IgE umane, e successivamente di legarle causando i sintomi clinici della reazione allergica; mentre altri derivati presentano un'azione irritante, che può contribuire all'infiammazione in caso allergia, sia causata da micofiti che da altri allergeni (1).

Per le loro caratteristiche biologiche i micofiti rappresentano un regno a sé stante, suddiviso in 8 phyla, comprendente più di 100.000 specie conosciute, benché la diversità sia stata stimata in più di 3 milioni di specie. Dal punto di vista allergologico sono tre i phyla interessati: *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Zygomycota*. La maggior parte dei mico-

fiti che causano allergia appartiene agli *Ascomycota*. Tale classificazione risulta importante in quanto è stata individuata una stretta correlazione fra la tassonomia e la produzione di IgE: ogni phyla presenta un'elevata cross-reattività IgE-mediata fra le proprie specie, ma non quelle degli altri gruppi. In base a questa identificazione, inoltre, è possibile divi-

RIASSUNTO

Parole chiave e acronimi

• Micofiti • Allergia • Asma bronchiale • Rinite allergica • Immunoterapia specifica

I micofiti sono organismi ubiquitari negli ambienti popolati dall'uomo, sia interni che esterni, e sono in grado di indurre una reazione allergica nei pazienti sensibilizzati. Le specie di micofiti conosciute sono più di 100.000, ma Alternaria, Cladosporium e Penicillium sono quelle più frequentemente coinvolte in caso di allergia respiratoria. I sintomi di asma bronchiale sono più frequenti nei pazienti con sensibilizzazione a micofiti. In particolare, si possono associare a crisi di asma fatali o potenzialmente fatali. La diagnosi di allergia viene effettuata con le classiche metodiche in vivo o in vitro, tramite l'utilizzo di estratti diagnostici standardizzati la cui preparazione può risultare difficoltosa data l'intrinseca variabilità naturale e l'attività proteolitica dei micofiti stessi. Il trattamento dell'allergia per micofiti comprende la classica terapia sintomatica e le misure di evitamento ambientale, dove possibile. Inoltre, è disponibile l'immunoterapia allergene specifica per micofiti, sia in modalità di somministrazione sublinguale che sottocutanea.



dere gli *Ascomycota* in due diversi sottogruppi: il primo comprende le classi *Sordariomycetes*, *Leotiomycetes*, *Euromycetes* e alcuni della classe *Dothideomycetidae*; il secondo il genere *Pleosporomycetidae* della classe *Dothideomycetidae* (Tabella 1) (1, 2).

Le componenti dei micofiti che hanno attività allergenica sono rappresentate da diversi tipi di proteina: enolasi, heat shock protein, ciclofilline, proteasi, disulfido-isomerasi, proteine perossisimali di membrana, proteine dell'acido ribosomale e alcool deidrogenasi. L'attività immunoinfiammatoria, invece, è mediata da metaboliti come i β -glucani e il loro recettore dectina-1, in grado di attivare i macrofagi, stimolandoli alla produzione e alla liberazione di numerosi mediatori proinfiammatori. Altre molecole, come alcuni metaboliti prodotti unicamente dai micofiti, sono utilizzate per il calcolo del carico micotico in un ambiente. L'ergosterolo, per esempio, presente nell'aria correla con la concentrazione di micofiti nella polvere di casa (1, 3).

I micofiti possono essere virtualmente identificati in qualsiasi ambiente, sia interno che esterno. Alcuni studi hanno evidenziato che la concentrazione media all'aria aperta in un clima temperato come il nostro italiano, varia fra le 50 spore/metro³ in inverno e le 50.000/m³ in estate. Infatti, il clima caldo-umido favorisce la proliferazione di questi organismi, per cui i picchi di spore all'esterno sono presenti nei mesi centrali e tardivi dell'estate, in particolare nei momenti di maggior umidità ambientale, come le ore pomeridiane. In questo contesto ri-

Tabella 1 Classificazione semplificata del Regno dei Funghi

PHYLA	CLASSE	ORDINE	SPECIE
Zygomycota	Zygomycetes	Mucorales	Mucor
Ascomycota	Saccharomycetes Dothideomycetes	Sordariomycetes Capnodiales Pleosporales	<i>Candida</i> , <i>Saccharomyces</i> <i>Cladosporium</i> <i>Alternaria</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Epicoccum</i>
	Eurotiomycetes	Eurotiales Onygenales	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> <i>Trichophyton</i>
	Saccharomycetales Leotiomycetes	Hypocreales Helotiales	<i>Fusarium</i> , <i>Trichoderma</i> <i>Botrytis</i>
Basidiomycota	Microbotryomycetes Ustilaginomycetes	Sporidiobolales Ustilaginales	<i>Rhodotorula</i> <i>Ustilago</i>

Nella tabella sono riportati i micofiti più importanti dal punto di vista allergologico.

entrano le epidemie di asma bronchiale associate a temporali, in cui aumenta il numero di spore nell'ambiente, soprattutto di alcune specie, come *Alternaria* e *Cladosporium*. Questi ultimi rappresentano i più comuni generi di micofiti degli ambienti esterni (1).

Negli ambienti indoor la carica è in genere inferiore ed è specchio della concentrazione esterna, a meno che non vi siano fonti di proliferazione interne specifiche. Per esempio, in caso di livelli esterni di 1500 spore/m³, all'interno la carica è di circa 1000-1200 spore/m³. I più comuni micofiti indoor sono *Penicillium*, *Aspergillus*, *Ascospores*, *Alternaria*, *Periconia*, *Basidiospores*, *Stachybotrys* e *Wallemia*. Gli ambienti domestici con concentrazioni di spore più elevate sono

rappresentati da lavanderie, bagni, cantine e camere da letto (2, 3).

L'esposizione ai miceti può causare allergia di tipo respiratorio (asma bronchiale, rinite, congiuntivite allergiche), ma anche altre manifestazioni cliniche (Tabella 2): infezioni, micotossicosi, reazioni da ipersensibilità non IgE mediate (2).

ALLERGIA AI MICOFITI

Introduzione

L'esatta prevalenza dell'allergia ai micofiti non è nota, ma viene stimata fra il 3% e il 10% della popolazione generale. I diversi studi presenti in letteratura concordano sul fatto che vi è una distribuzione età-dipendente, con una mag-



giore incidenza nell'età infantile, per poi scendere nell'età adulta (4, 5).

È interessante, inoltre, sottolineare come l'allergia ai micofiti non è quasi mai una monosensibilizzazione, in altre parole i pazienti si presentano contemporaneamente allergici ad altri aeroallergeni. Un altro significativo aspetto è stato evidenziato da uno studio italiano, condotto su quasi 7000 bambini, che ha sottolineato il ruolo dei fattori genetici nello sviluppo di questa allergia, dimostrando come circa l'83% di questa popolazione pediatrica aveva una familiarità per allergia ai micofiti (6).

Clinicamente i pazienti con allergia ai micofiti possono presentare:

- Asma bronchiale allergica
- Oculorinite allergica, anche se è più

rara e alcuni studi mettono in dubbio che i miceti possano causare solo questa sintomatologia senza asma bronchiale associato.

Come per qualsiasi paziente allergico e non, il sospetto di allergia ai micofiti deve partire dalla raccolta dettagliata dell'anamnesi.

I pazienti con sensibilizzazione ai micofiti presentano sintomi respiratori (rinite, congiuntivite, asma bronchiale) dopo esposizione ad ambienti con elevata carica allergenica: all'esterno nei mesi di metà-fine estate; negli ambienti umidi, come cantine o vecchi edifici; dopo i temporali; o durante lavori di giardinaggio (7).

I soggetti allergici ai micofiti presentano un aumentato rischio di presentare asma bronchiale. Uno studio statuni-

tense che si è occupato di misurare la concentrazione degli allergeni indoor ha dimostrato che gli allergeni più comunemente presenti ad elevate cariche nelle case erano quelli derivati da cane, gatto e *Alternaria*. I bambini con un'esposizione maggiore presentavano, infatti, un aumentato rischio di sviluppare asma bronchiale (8).

Inoltre, in seguito ad un temporale, soggetti allergici ad un solo micofita presentano un rischio di presentare un attacco di asma non trascurabile (Odd Ratio – OD 9,31), ma che aumenta in modo esponenziale se sensibilizzati a due (OD 64) (9). Sono necessarie delle caratteristiche preesistenti contemporaneamente perché si sviluppi un'epidemia di asma severo associata ad un temporale:



Tabella 2

Manifestazioni cliniche non allergiche correlate all'esposizione fungina

PATOLOGIA	MECCANISMO	ESEMPI
Infezioni	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Infezioni cutanee da dermatofiti ➤ Infezioni opportunistiche 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Micosi cutanee da <i>Trichophyton</i> ➤ Candidosi orofaringea nei pazienti immunocompromessi
Ingestione di micotossine	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Effetto tossico da ingestione di cibo contaminato 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ingestione di aflatossina contaminante cereali
Micetoma	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Proliferazione di miceti all'interno di cavità anatomiche 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Aspergilloma polmonare o sinusale
Reazioni da ipersensibilità non IgE mediate	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Reazione di ipersensibilità di tipo III o IV ➤ Ipersensibilità di tipo T Helper 2 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Polmone del contadino ➤ Aspergillosi broncopulmonare allergica



Figura 1

Alternaria

micofiti hanno attività sia antigenica che immunomodulatoria, come già sottolineato nel paragrafo precedente.

Diagnosi

Dopo aver posto il sospetto diagnostico di allergia a micofiti, questo può essere confermato mediante un test di primo livello in vivo, gli skin prick test, utilizzando estratti commerciali standardizzati. Questi ultimi sono disponibili sul mercato per le principali specie di micofiti in grado di determinare allergia nei soggetti esposti: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*. La preparazione di estratti diagnostici standardizzati per micofiti è una sfida per l'industria. Infatti, alcune delle componenti allergeniche più importanti sono rappresentate da enzimi ad attività proteasica che possono compromettere la stabilità dell'estratto, alterando la struttura di altri allergeni. Tale problema può essere superato aggiungendo un'adeguata percentuale di glicerolo al preparato. Inoltre, i miceti sono organismi con un'intrinseca variabilità naturale, dovuta alla loro incredibile capacità di adattamento ambientale. Tuttavia, le componenti allergeniche maggiori sembrano mantenere una stabilità molecolare intra-specie [7].

In uno studio tedesco, che ha approfondito l'epidemiologia dell'allergia ai micofiti prendendo in considerazione più di 3000 pazienti, solo il 20% di questi presentava una monosensibilizzazione ai miceti, o, in altre parole, la positività ai prick test per un singolo allergene di questo tipo. La positività più comune era per *Alternaria* (66%), seguita da *Cladosporium* (13,1%) e *Aspergillus* (12,6%). La

- Pazienti con asma allergico da sensibilizzazione a micofiti
- Aumento significativo della carica allergenica in un breve arco di tempo
- Temporali con correnti freddi durante la stagione allergenica
- Numerosi pazienti asmatici con allergia ai micofiti all'esterno durante il temporale.

È fondamentale sottolineare anche come l'allergia ai micofiti sia strettamente correlata al rischio di sviluppare attacchi d'asma potenzialmente fatali.

Questi decessi sono più frequenti in giovani adulti durante il picco stagionale di carica allergenica micofitica, come successo in Veneto negli ultimi anni (1).

I micofiti sono causa di asma severa tanto che è stato coniato il termine SAFS

(*Severe Asthma associated with Fungal Sensitization*, Asma severo associato a sensibilizzazione a micofiti). La sensibilizzazione ad *Alternaria* è la più frequente in caso di SAFS, meno comunemente sono responsabili *Cladosporium* e *Penicillium*. Si deve ricordare comunque che l'asma severo correlato ad esposizione fungina può essere secondario non solo a meccanismo allergico IgE-mediato, ma anche a:

- colonizzazione fungina delle vie aeree, per esempio nell'aspergillosi broncopulmonare allergica;
- colonizzazione fungina di distretti corporei diversi dalle vie aeree (10).

Questa varietà di manifestazioni è dovuta al fatto che i prodotti metabolici dei

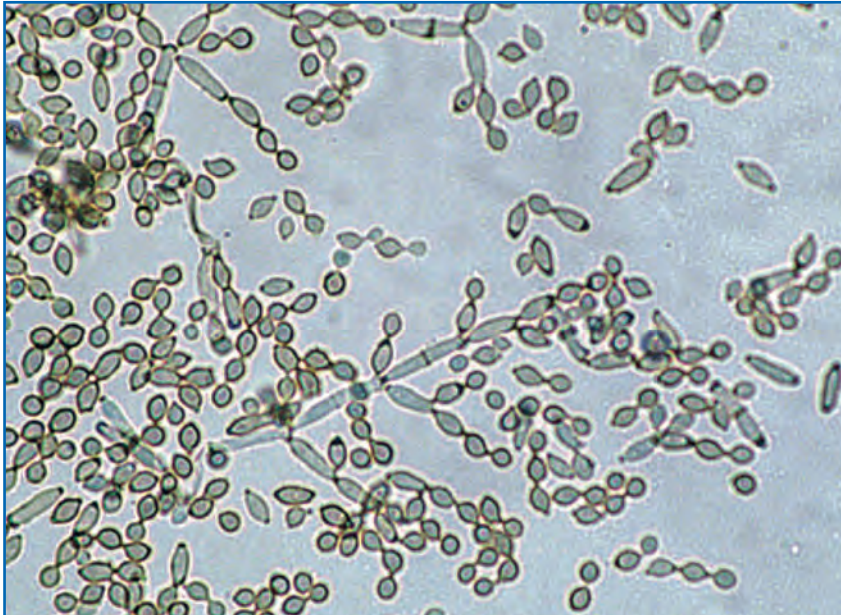


Figura 2

Cladosporium

quelli maggiori, elencati nella tabella 3. Si intende per allergene maggiore quello che presenta una prevalenza maggiore del 50% nei pazienti sensibilizzati alla fonte allergenica. La tecnica CRD può risultare utile per identificare un profilo di gravità delle manifestazioni cliniche dell'allergia del paziente. Per esempio, gli allergeni Asp f 1 e f 3 di *Aspergillus* sono correlati al rischio di sviluppare asma severo. Inoltre, la CRD, identificando il profilo esatto di sensibilizzazione del paziente, permette una più corretta prescrizione dell'immunoterapia allergene-specifica (8).

Di seguito una breve descrizione delle principali specie e dei loro allergeni maggiori (8, 12):

Alternaria alternata (figura 1)

L'*Alternaria* è un allergene sia indoor

maggior parte dei pazienti presentava, quindi, più di una positività. Tale fatto potrebbe essere secondario alla elevata cross-reattività fra specie fungine diverse, come spiegato precedentemente (11). Il test *in vitro* per la diagnosi di sensibilizzazione ai micofiti è rappresentato dal dosaggio IgE specifiche per micofiti. La sensibilità di questo test è minore dei prick test nei pazienti monosensibilizzati, mentre arriva al 100% nei pazienti polisensibilizzati (11).

Sono disponibili in commercio anche metodiche per la diagnostica molecolare (CRD: *Component Resolved Diagnosis*), test di terzo livello, che permette l'identificazione delle singole componenti allergeniche fungine. Come per altri importanti allergeni, infatti, anche per i micofiti sono stati individuati

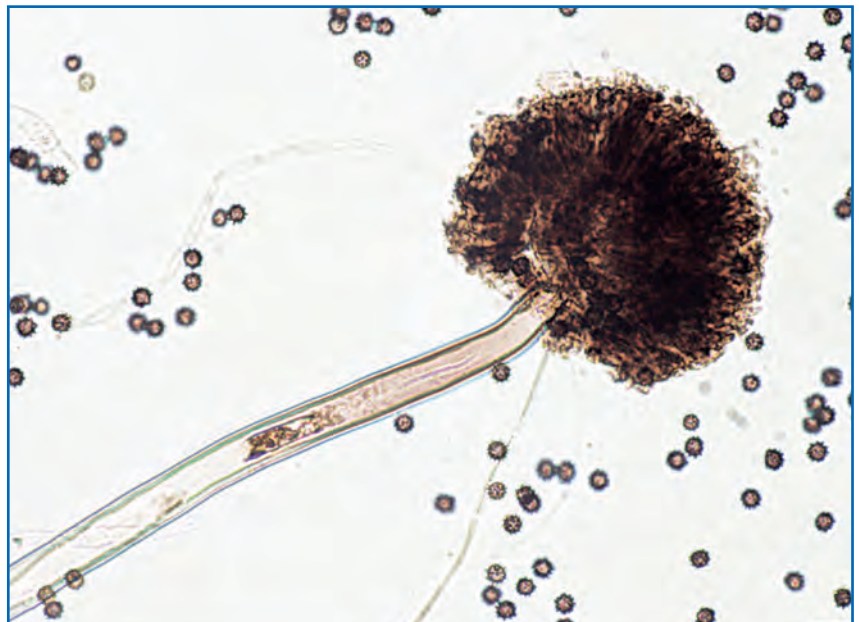


Figura 3

Aspergillus



cha outdoor, che predilige i climi molto umidi, e rappresenta una delle più frequenti sensibilizzazioni. Fra le sue specie la *A.alternata* è la più importante. La componente Alt a1 rappresenta l'allergene maggiore, con una sieroprevalenza fino al 90% nei pazienti allergici ad *Alternaria*. Altri importanti allergeni sono Alt a 2 e Alt a 5, riconosciuti nel 25-40% dei soggetti.

Cladosporium herbarum (figura 2)
Anche questo micofita è comune sia negli ambienti interni che esterni, ma si sviluppa preferibilmente in climi più caldi rispetto ad *Alternaria*. Gli allergeni maggiori sono rappresentato da Cla h 8 e Cla h 6, riconosciuti rispettivamente dal 55-60% e dal 50% dei pazienti sensibilizzati a *Cladosporium*.

Aspergillus fumigatus (figura 3)
È un micofita termoresistente presente a tutte le latitudini. È il principale agente eziologico dell'aspergillosi broncopolmonare allergica, ma è responsabile anche di sintomi allergici respiratori, in particolare asma. L'allergene maggiore è Asp f 1, riconosciuto dall'85% dei pazienti sensibilizzati a questa specie.

Penicillium (figura 4)
Questi micofiti sono presenti prevalentemente negli ambienti interni. Sono due i più diffusi: *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium citrinum*. Pen ch 13 e Pen ch 18 rappresentano gli allergeni maggiori, riconosciuti rispettivamente dall'88% e dall'82% dei pazienti allergici a *Penicillium*.

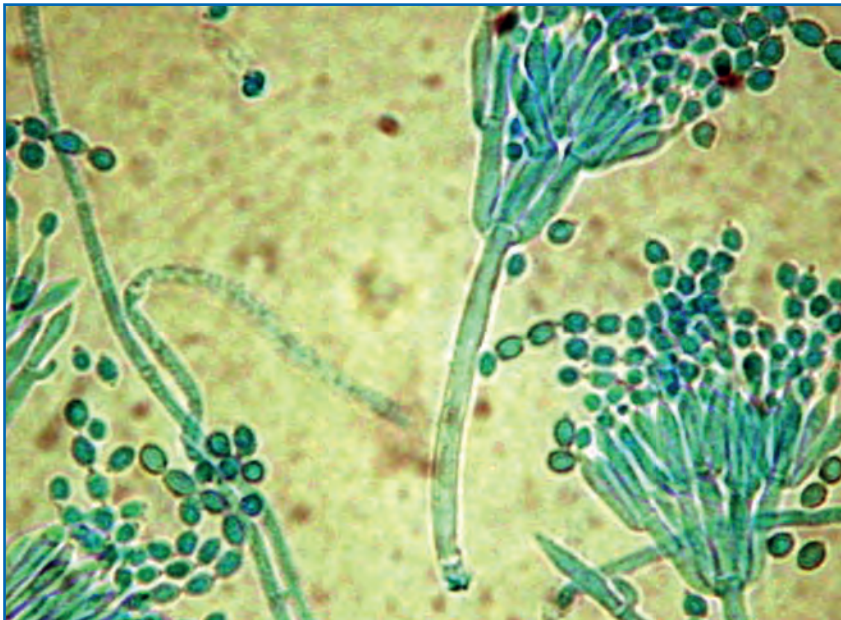


Figura 4

Penicillium

Tabella 3
Gli allergeni finora identificati delle principali specie di micofiti

GENERE	ALLERGENI IDENTIFICATI
Alternaria	Alt a 1 Alt a 2 Alt a 3 Alt a 4 Alt a 5 Alt a 6 Alt a 7 Alt a 8 Alt a 10 Alt a 13
Cladosporium	Cla h 3 Cla h 6 Cla h 7 Cla h 8 Cla h 9 Cla h 10 Cla h 12
Aspergillus	Asp f 1 Asp f 3 Asp f 5 Asp f 6 Asp f 11 Asp f 12 Asp f 18 Asp f 22 Asp f 28
Penicillium	Pen c 2 Pen c 3 Pen c 13 Pen c 18 Pen c 19 Pen c 22 Pen c 24 Pen c 30



Terapia

Come per qualsiasi allergia respiratoria dovuta ad aeroallergeni presenti nell'ambiente esterno, ma anche all'interno degli edifici, il trattamento si basa su farmacoterapia, evitamento (o prevenzione secondaria) e immunoterapia allergene-specifica. In questo articolo non tratteremo la terapia farmacologica dell'allergia respiratoria.

Prevenzione secondaria

Evitamento dell'allergene

È possibile ridurre l'esposizione ambientale ai micofiti nei pazienti con allergia

conclamata?

Come facilmente intuibile, la concentrazione di spore nell'aria correla in maniera diretta con la possibilità di presentare sintomi di rinite, congiuntivite e/o asma bronchiale. Uno studio, per esempio, ha evidenziato un aumento di vendita di farmaci inalatori per asma nelle giornate in cui si era registrata un'aumentata concentrazione di spore outdoor di *Alternaria* (13). Un'altra analisi canadese su 15000 ambienti domestici diversi ha dimostrato la prevalenza di sintomi respiratori nei bambini che abitavano in case con elevate concentrazione indoor

di micofiti o di umidità (14).

La migliore strategia per ridurre la presenza di muffa in casa consiste nell'eliminare tutti i fattori che favoriscono l'umidità, condizione necessaria per mantenere e favorire la crescita e la proliferazione dei micofiti. Quindi intervenire con bonifiche e riparazione di sistemi di condizionamento dell'aria e riscaldamento, di infiltrazioni d'acqua su muri e tetti, rappresenta il primo e fondamentale passo. Oltre agli interventi di ristrutturazione, molti studi riconoscono il ruolo dell'ipoclorito di sodio, più comunemente detta candeggina, nell'era-

Tabella 4

Studi controllati riguardo ITS per micofiti

STUDIO	ALLERGENE	N° PAZIENTI	MODALITÀ DI SOMMINISTRAZIONE	DURATA DELLO STUDIO
Goldstein <i>et al.</i> ¹⁷ (1981)	Non specificato	13 pazienti 0 controlli	Sottocute	12 settimane
Metzger <i>et al.</i> ¹⁸ (1983)	<i>Alternaria</i>	10 pazienti 0 controlli	Sottocute	3 mesi
Dreborg <i>et al.</i> ¹⁹ (1986)	<i>Cladosporium</i>	16 pazienti 14 controlli	Sottocute	10 mesi
Malling <i>et al.</i> ²⁰ (1986)	<i>Cladosporium</i>	22 pazienti 11 controlli	Sottocute	5 – 7 mesi
Horst <i>et al.</i> ²¹ (1990)	<i>Alternaria</i>	13 pazienti 11 controlli	Sottocute	1 anno
Kuna P <i>et al.</i> ²² (2011)	<i>Alternaria</i>	30 pazienti 20 controlli	Sottocute	3 anni
Melzer <i>et al.</i> ²³ (2015)	Non specificato	10 pazienti 0 controlli	Sublinguale	3 anni



dicare colonie di micofiti negli ambienti domestici. Alcuni studi interventistici hanno dimostrato che la riduzione dell'umidità negli edifici diminuiscono nell'adulto i sintomi asmatici e/o rinocongiuntiviti e il consumo di farmaci "antiallergici". Per quanto riguarda i bambini, la messa in atto di interventi di bonifica degli ambienti domestici si è dimostrata efficace, all'analisi dei dati dopo 6 mesi, nella riduzione dei giorni con sintomi respiratori, del numero minore di accessi al pronto soccorso e di successivi ricoveri (1).

Alcuni studi hanno preso anche in considerazione il ruolo della prevenzione primaria, che risponde alla domanda "E' possibile prevenire lo sviluppo di allergia nei confronti dei micofiti?".

L'esposizione a muffe sembra essere il fattore principale per lo sviluppo e il manifestarsi di allergia. Gli studi che hanno messo in relazione questi due fattori (esposizione e successiva allergia) sono di tipo osservazionale e, di conseguenza, tutti i fattori che potrebbero essere importanti nello sviluppo di allergia potrebbero non essere stati presi in considerazione. Più certa, invece, sembra la correlazione fra il grado di umidità indoor, la carica fungina ambientale e il rischio di sviluppare asma bronchiale (1).

Una revisione sistematica della letteratura ha dimostrato che vi è una relazione statisticamente significativa fra un aumentato rischio di sviluppare asma in bambini provenienti da famiglie con storia di atopia ed esposizione a micofiti, muffa visibile e odore di muffa in casa (15).

Nessuno studio finora ha dimostrato, tuttavia, che la ridotta esposizione a micofiti in bambini a rischio di sviluppare atopia rappresenti un fattore protettivo.

Immunoterapia specifica per micofiti

L'immunoterapia allergene specifica (ITS) è l'unica terapia in grado di modificare la storia naturale della malattia allergica e consiste nella somministrazione di dosi crescenti e controllate di allergene in un periodo di tempo e con scadenze temporale stabiliti. L'ITS può essere somministrata per via sottocutanea o sublinguale e la sua efficacia e sicurezza sono ormai ben riconosciute. Per quanto riguarda l'ITS per micofiti si presentano le stesse problematiche espone per la preparazione degli estratti diagnostici per gli skin prick test e per la loro standardizzazione. Secondariamente, gli studi standardizzati contro

placebo su ITS per micofiti sono pochi, datati e riguardano esclusivamente *Alternaria* e *Cladosporium* e nella maggior parte dei casi la modalità sottocutanea. Inoltre, sono stati eseguiti su campioni di ridotte dimensioni (tabella 4). Per questo motivo è importante scegliere prodotti per l'ITS di provata efficacia (16).

L'immunoterapia specifica può essere prescritta a tutti i pazienti con diagnosticata rinite, oculorinite o asma da sensibilizzazione a miceti. Va identificato quindi quale micofita è responsabile della sintomatologia clinica fra *Alternaria* e *Cladosporium*, e considerato il grado di controllo dell'asma. Infatti, la presenza di asma non controllato rappresenta una controindicazione alla prescrizione di ITS. Diversi studi recenti hanno dimostrato l'efficacia di questo approccio terapeutico anche nella sinusite allergica micotica.



Bibliografia

1. Portnoy JM, Jara D. Mold allergy revisited. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2015; 114: 83-89.
2. Baxi SN, Portnoy JM, Larenas-Linnemann D, et al. -Exposure and Health Effects of Fungi on Humans. *J Allergy Clin Immunol Pract.* -2016; 4(3): 396-404.
3. Kennedy JL, Heymann PW, Platts-Mills TAE. The Role of Allergy in Severe Asthma. *Clin Exp Allergy*.2012; 42(5): 659-669.
4. Jaakkola MS, Quansah R, Hugg TT, et al.- Association of indoor dampness and molds with rhinitis risk: A systematic review and meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132(5):1099-1110.
5. Sharpe RA, Bearman N, Thornton C, et al.- Indoor fungal diversity and asthma: A meta-analysis and systemic review of risk factors. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135: 110-22.
6. Cantani A, Businco E, Maglio A. *Alternaria* allergy: a three years controlled study in children treated with immunotherapy. *Allergol Et Immunopathol*, 1988; 16(1):1-4.
7. Twaroch TE, Curin M, Valenta R. *Mold Allergens in Respiratory Allergy: From Structure to Therapy.* *Allergy Asthma Immunol Res.* 2015;



Bibliografia

7(3):205-220.

8. Pomés A, Chapman MD, Wünschman S. Indoor Allergens and Allergic Respiratory Disease. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2016; 16(6): 43.
9. Pulimood TB, Corden JM, Bryden C, et al.- Epidemic asthma and the role of the fungal mold *Alternaria alternata*. *J Allergy Clin. Immunol.* 2007; 120: 610-617.
10. Lombardi C, Savi E, Ridolo E, et al.-Is allergic sensitization relevant in severe asthma? Which allergens may be culprit? *World Allergy Organization Journal*(2017; 10:2.
11. Mari A, Schneider P, Wally V, et al.- Sensitization to fungi: epidemiology, comparative skin tests, and IgE reactivity of fungal extracts. *Clin Exp Allergy.* 2003; 33:1429-1438.
12. Kustrzeba-Wójcicka I, Siwak E, Terlecki G, et al. -*Alternaria alternata* and Its Allergens: a Comprehensive Review. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2014; 47:354-365.
13. Delfino RJ, Zeiger RS, Seltzer JM, et al. -The effect of outdoor fungal spore concentrations on daily asthma severity. *Environ Health Project.* 1997; 105:622-625.
14. Dales RE, Zwanenburg H, Burnett R, et al -Respiratory health effects of hoe dampness and mold among Canadian children. *Am J Epidemiol.* 1991; 134:196-203.
15. Pekkanen J, Hyvarinen-Shaughnessy U, Korppi M, et al.-Moisture damage and childhood asthma: a population-based incident case-control study. *Eur Respir J.* 2007; 29:509-515.
16. Coop CA. Immunotherapy for mold allergy. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2014; 47:289-298.
17. Goldstein GL.-Chai H. Efficacy of rush immunotherapy in decreasing bronchial sensitivity to inhaled antigens in perennial childhood asthma. *Ann Allergy* 1981; 47:333-337 36.
18. Metzger WJ, Donnelly A, Richardson HB. Modification of late asthmatic responses during immunotherapy for *Alternaria*-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 71:119 37.
19. Dreborg S, Agrell B, Foucard T et al. - A double-blind, multicenter immunotherapy trial in children, using a purified and standardized *Cladosporium herbarum* preparation. *Allergy* 1986; 41:131-140.
20. Malling HJ, Dreborg S, Weeke B. Diagnosis and immunotherapy of mold allergy. *Clinical efficacy and side effects of immunotherapy with Cladosporium h.. Allergy* 1986; 41:507-519.
21. Horst M, Hejjaoui A, Horst V et al.-Double-blind, placebo-controlled rush immunotherapy with a standardized *Alternaria* extract. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85:460-472 39.
22. Kuna P, Kaczmarek J, Kupczyk M. Efficacy and safety of immunotherapy for allergies to *Alternaria alternata* in children. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:502-8.
23. Melzer JM, Driskill BR, Clenney TL. Sublingual Immunotherapy for Allergic Fungal Sinusitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2015; 124(10):782-7.



FOLLOW ME

Vi trasferite e volete continuare a ricevere il Notiziario Allergologico? Comunicateci il vostro nuovo indirizzo.



per telefono

02 581981



per fax

02 8322 512



per e-mail

redazione@lofarma.it commer@lofarma.it



per posta

v.le Cassala 40, 20143 Milano



Il ruolo contraddittorio delle IgG4 nei disordini immunomediati

Anna Perino,
Specialista in Allergologia
e Immunologia Clinica
Torino

Valentina Foschi
Specialista in Reumatologia
ASL CN1 Medicina Interna
Osp., Montis Regalis
Mondovi (CN)

Not Allergol 2018; vol. 36: n. 2-3 : 89-100

INTRODUZIONE

Le immunoglobuline umane sono suddivise in quattro classi, ognuna con le proprie caratteristiche e funzioni biologiche, come determinato dalle differenti catene pesanti. Le sottoclassi IgG differiscono nella loro affinità recettoriale e nella loro abilità ad attivare il complemento. Le IgG1 e le IgG3 attivano fortemente il complemento mentre le IgG2 possono attivarlo solo in presenza di alte concentrazioni di antigeni. Le IgG4 sono le meno rappresentate a livello ematico e possiedono caratteristiche strutturali tali per cui non attivano il complemento attivamente attraverso la via classica. Inoltre le IgG4 possono legarsi solo debolmente e meno efficacemente al recettore ad alta affinità per le Immunoglobuline G (FcγRI) rispetto alle IgG1 e IgG3 mentre possiedono una affinità decisamente più alta per il recettore per le immunoglobuline G di tipo inibitorio (FcγRIIB). Le IgG4 sono molecole dinamiche che possono diventare bi-specifiche attraverso il co-

RIASSUNTO

Parole chiave

- IgG4 • Fab-arm exchange • allergia • tolleranza • autoimmunità
- esofagite eosinofila • malattia IgG4 correlata

Acronimi

- FAE • Fab-Arm Exchange • EoE • Esofagite eosinofila
- IgG4-RD malattia IgG4 correlata

I livelli di immunoglobuline IgG4 sieriche di soggetti sani costituiscono solo circa il 4% delle immunoglobuline IgG totali. Le IgG4 non legano il complemento (C1) ma inibiscono l'immunoprecipitazione e l'attivazione del C1, mediato generalmente dalle IgG. Sono considerate immunoglobuline "strane" con caratteristiche immunobiologiche particolari, in grado di produrre effetti completamente differenti.

Possiedono infatti una attività anti-infiammatoria e tollerogena come nella esposizione allergica cronica e nell'immunoterapia antiallergica ma possono anche essere direttamente patogene come riscontrato in alcuni disordini autoimmuni (es. pemfigo, miastenia grave). Inoltre rappresentano il marker biologico più evidente della malattia IgG4 correlata (condizione fibro-infiammatoria ad eziologia sconosciuta), anche se il loro reale ruolo nella malattia non è stato ancora definito. Si sta inoltre ipotizzando un loro coinvolgimento in entità patologiche che nei casi più gravi (per es. esofagite eosinofila) possono evolvere verso la fibrosi.

In questo articolo si analizzano le caratteristiche immunobiologiche delle IgG4 ed i loro effetti positivi e negativi nelle varie situazioni cliniche in cui possono essere coinvolte dall'allergia all'autoimmunità, con particolare interesse verso l'esofagite eosinofila e la malattia IgG4 correlata. Inoltre si è cercato di individuare un meccanismo comune che potrebbe essere alla base dello sviluppo della fibrosi che sembra rappresentare il punto terminale dell'evoluzione di differenti entità patologiche.



Figura 1.

Fab-Arm Exchange



Con il Fab-arm exchange mezza molecola di IgG4 si ricombina random con un'altra mezza molecola di anticorpo che può esprimere una specificità diversa. In questo modo si formano anticorpi bispecifici che possono essere monovalenti e quindi non in grado di legare a ponte un antigene.

siddetto *Fab Arm Exchange* (FAB), pur restando funzionalmente monovalenti e quindi incapaci di legare gli antigeni (1). Mentre l'immunizzazione vaccinica stimola preferenzialmente una risposta di tipo IgG1 e IgG2, l'immunoterapia anti-allergica specifica (ITS) è spesso associata alla produzione di IgG4. Un aumento delle IgG4, considerata di tipo protettivo, sembra correlarsi con il successo della ITS stessa, anche se la grande variabilità dei livelli di questa classe immunoglobulinica non permette di usarla routinariamente come marker. L'importanza di un aumento delle IgG4 specifiche si è dimostrata particolarmente rilevante nel prevenire sia le reazioni allergiche in apicoltori esposti cronicamente all'allergene che il rischio di reazioni gravi nei soggetti sottoposti a ITS (2).

L'interesse verso le IgG4 finora limitato al campo allergologico, si è rinnovato con l'identificazione di una nuova entità patologica e cioè la malattia IgG4 correlata (IgG4-RD). Questa malattia è una condizione fibroinfiammatoria ad eziologia sconosciuta che può colpire

fondamentalmente ogni organo. I più colpiti sono le ghiandole salivari maggiori, i tessuti orbitari e periorbitari, il retroperitoneo, il pancreas, i linfonodi. La principale caratteristica clinica è la formazione di tumefazioni, mentre istologicamente è caratterizzata da un infiltrato infiammatorio ricco di plasmacellule che producono IgG4 (IgG4+), fibrosi storiforme e flebite obliterante, che si riscontrano in modo simile in tutti gli organi colpiti. Il riscontro di livelli anche molto elevati di IgG4 nel siero dei pazienti affetti è molto frequente, ma non costante. La patogenesi della malattia è complessa e non completamente conosciuta: nonostante sia plausibile che le IgG4 giochino un ruolo importante nel determinare il danno tissutale, sembra improbabile che rappresentino l'elemento alla base della patogenesi. Le IgG4 inoltre non sono specifiche della malattia in quanto altre situazioni patologiche, incluse alcune patologie autoimmuni, sono associate ad un aumento dei loro livelli ematici.

Il ruolo delle IgG4 nelle malattie autoimmuni può essere direttamente

patogenetico come nel pemfigo, nella miastenia grave, nella glomerulonefrite membranosa e nelle polineuropatie o può essere meno definito come nel Lupus Eritematoso Sistemico o nell'Artrite Reumatoide (3).

Recentemente è stata posta l'attenzione su un eventuale coinvolgimento delle IgG4 nella patogenesi dell'Esofagite Eosinofila (EoE) come eventuale marker di evoluzione fibrosante (4). In questo articolo sono state analizzate le caratteristiche funzionali delle IgG4 e sono stati presi in rassegna i loro effetti positivi e negativi nelle varie situazioni cliniche in cui possono essere coinvolte. L'aspetto interessante che ne è emerso è che lo stesso anticorpo e la stessa popolazione cellulare possono esprimere effetti diversi a seconda che si rilevi la loro presenza in soggetti sani, allergici o affetti da patologia autoimmune. Recentemente si è ipotizzato che le IgG4 possano costituire l'elemento comune responsabile dello sviluppo della fibrosi che sembra rappresentare l'epilogo evolutivo delle varie entità patologiche.



IgG4 CARATTERISTICHE IMMUNOBIOLOGICHE

Gli anticorpi IgG4 sono peculiari sia nella struttura che nella funzione. Essi costituiscono la sottoclasse di anticorpi IgG meno abbondante visto che i loro livelli serici sono intorno al 4% nei soggetti sani. La loro concentrazione può però oscillare in un range amplissimo, compreso tra 0,01 e 1,4 mg/ml; a livello di singolo individuo tale concentrazione tende però a rimanere stabile nel tempo. Nonostante esista oltre il 95% di omologia tra i domini della regione costante delle IgG4 e quelli degli altri isotipi di IgG, le differenze di sequenza aminoacidica nel secondo dominio della regione costante riducono la capacità delle IgG4 di legare sia il C1q (e conseguentemente di attivare la via classica del complemento), sia i recettori FcγRI (e conseguentemente di attivare i fagociti e innescare meccanismi di citotossicità anticorpo-dipendente (5)).

Una caratteristica molto peculiare delle IgG4 è la reazione di scambio di metà anticorpo, detta anche *Fab-arm exchange* (FAE). Le IgG4 formano facilmente legami disolfuro nella loro regione cerniera, ma questi legami sono instabili (6). La differenza di un singolo aminoacido nella regione cerniera (una serina al posto della prolina come rilevato a livello delle IgG1), sembra stabilizzare la suddetta regione, sfavorendo la formazione dei ponti disolfuro. Nel caso delle IgG4, studi in vitro hanno dimostrato che circa il 50% presenta forze

non covalenti a tenere unite le sue catene pesanti. In vivo, questa percentuale può variare in base a fattori locali, come ad esempio il pH. Come risultato di questa instabilità, questi anticorpi possono andare incontro al FAE dove metà di una molecola di IgG4, costituita da una catena pesante e da una leggera legate covalentemente, può associarsi con un'altra metà, avente anche specificità diversa (Figura 1).

Possono così formarsi anticorpi potenzialmente bi-specifici che, però, sono funzionalmente monovalenti. Questi anticorpi non sono in grado di formare immunocomplessi, proprio perché non possono formare cross-link con gli antigeni (7). Sembra che lo scambio avvenga spontaneamente a livello sierico poiché in soggetti allergici è stata riscontrata la presenza di anticorpi bi-specifici per due differenti allergeni. In questo caso gli anticorpi IgG4 così

formati sono in grado di legarsi a due differenti allergeni (ad esempio gatto e betulla) (8). Lo scambio può avvenire anche tra anticorpi monoclonali umanizzati di isotipo IgG4 (per esempio il natalizumab, anticorpo monoclonale utilizzato a scopo terapeutico nella sclerosi multipla). In questo caso l'anticorpo umanizzato può scambiare in vivo una emi-molecola con le IgG4 endogene con conseguente perdita di efficacia. Proprio per evitare questo si usano ora anticorpi con una particolare mutazione che, stabilizzando la molecola anticorpale, minimizza il rischio di FAE (1).

In vitro lo scambio indotto avviene rapidamente in meno di un'ora favorito dal pH acido mentre in vivo richiede ore o giorni. Si calcola che fino al 99% delle IgG4 sieriche siano bi-specifiche con una emivita di circa 21 giorni.

Un'altra peculiarità delle IgG4 è rap-

Figura 2.

Peculiarità delle IgG (da ref. 10)

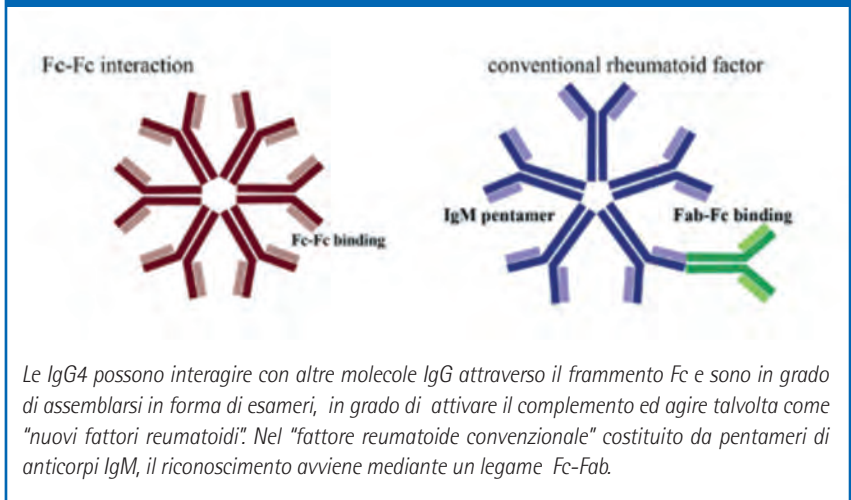
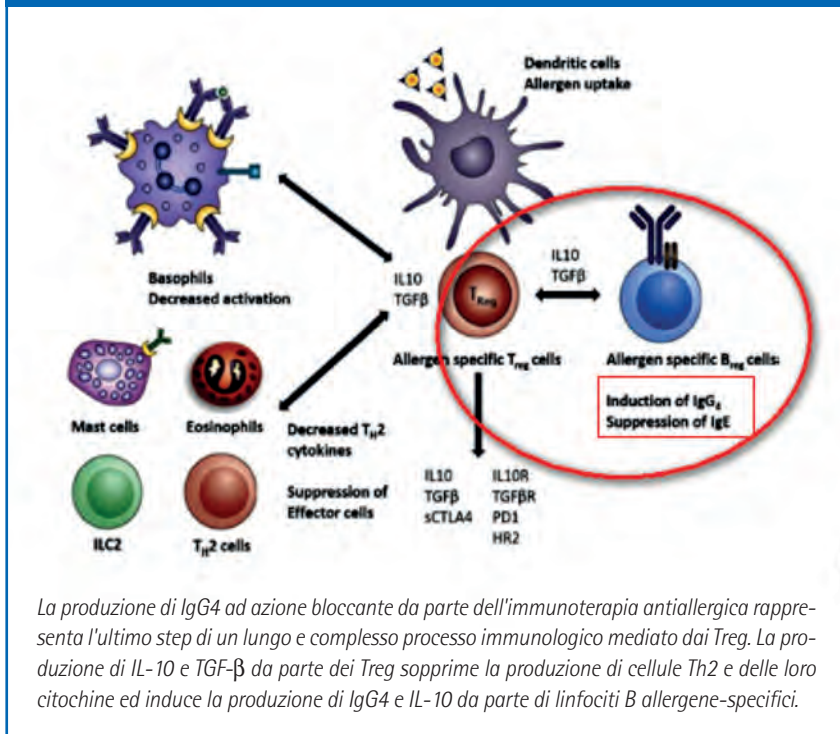




Figura 3. Meccanismi cellulari coinvolti nell'immunoterapia antiallergica



presentata dalla loro capacità di formare degli esameri assumendo, mediante un legame Fc-Fc, caratteristiche strutturali simili al fattore reumatoide convenzionale come originariamente osservato nell'artrite reumatoide (Figura 2) (9).

Quando le IgG4 si strutturano come esameri, questi acquistano anche la capacità di attivare il C1 con conseguente ipo-complementomia come osservato nella pancreatite autoimmune ed in alcune forme di nefrite tubulo interstiziale (10).

Le IgG4, secondo quello che viene definito “modello temporale”, sono probabilmente prodotte alla fine della

risposta immune, nel caso in cui l'antigene persista e non sia stato eliminato prima (11).

Gli stretti legami che intercorrono tra le IgG4 e le IgE sono ormai chiariti: le risposte IgG4 sono spesso associate con l'allergia IgE mediata per quanto siano risposte distinte. Sia le IgE che le IgG4 sono indotte dalle citochine Th2 IL-4 e/o IL-13 per quanto le IgE siano le prime a comparire (12). E' anche comune il riscontro di IgG4 in assenza di IgE, un processo questo definito “risposta Th2 modificata”. Una importante componente regolatoria nella risposta Th2 modificata è rappresenta

dalla interleuchina IL-10 che promuove lo switch verso le IgG4 e inibisce la produzione di IgE (Figura 3).

La stretta correlazione tra IgE e IgG4 è anche stata riscontrata nella IgG4-RD: in uno studio prospettico, un elevato livello di IgE è stato riscontrato nel 57% dei pazienti al momento della diagnosi con una correlazione positiva tra IgE, IgG4 e ipereosinofilia (13,14). Secondo alcuni autori livelli elevati di IgE, ipereosinofilia ed elevato livello di IgG4 policlonali verso antigeni multipli, rappresentano un campanello d'allarme che dovrebbe indirizzare verso la diagnosi di IgG4-RD. Si suppone quindi che elevati livelli di IgG4 riflettano una regolazione immunologica aberrante della risposta IgG4 complessiva anche se non si può escludere un nesso causale della malattia diretta verso antigeni specifici (15).

IgG4 E ALLERGIA

Le IgG4 sono prodotte tipicamente nella risposta agli allergeni sia alimentari che ambientali ma prima di ottenere titoli significativi di IgG4, è necessaria un'esposizione prolungata. La risoluzione delle allergie infantili è accompagnata da una variazione nel profilo anticorpale anti-allergeni. In particolare, anche a seguito di una ITS, viene stimolata, spesso in concomitanza con una riduzione delle IgE, la produzione di IgG4 specifiche.

In questi contesti, le IgG4 svolgono un ruolo protettivo bloccando e seque-



strandando gli allergeni e prevenendo così il contatto con le IgE fissate al recettore specifico sulla superficie dei mastociti. Nel trattamento delle allergopatie con ITS, unica terapia causale in grado di modificare la storia naturale della malattia, il livello di IgG4 può correlarsi con il miglioramento dei sintomi ma non è mai stato dimostrato come biomarker di valore assoluto a causa dell'elevata variabilità nella popolazione allergica (16).

Il ruolo potenzialmente protettivo delle IgG4 nell'acquisizione della tolleranza agli allergeni alimentari, particolarmente alle proteine del latte vaccino (CM), è stato discusso a lungo. Un aumento di IgG4 è stato riscontrato nei pazienti trattati con immunoterapia orale specifica (OIT) come in quelli che sviluppano naturalmente la tolleranza al latte vaccino, anche se i risultati dei diversi studi sono spesso contraddittori. In un recente studio, è stato confermato che bambini di oltre 5 anni con allergia persistente al latte vaccino presentano IgE e IgG4 che si legano a componenti del latte vaccino con maggiore intensità e diversità rispetto a bambini con allergia transitoria (17). La produzione, spontanea o indotta da ITS, di IgG4 specifiche con funzione protettiva e l'induzione della tolleranza verso gli allergeni è il risultato di una complessa interazione di vari tipi di cellule (Figura 3).

Tra queste, un ruolo importante è rappresentato dalle cellule T regolatorie (Treg) e B (Breg) non solo nei soggetti sani ma come risultato di una risposta indotta dalla ITS (18).

In conclusione, le IgG4 sono sempre state considerate immunoglobuline "amiche" dei pazienti allergici per le loro caratteristiche anti-infiammatorie riassunte come segue:

- Possono andare incontro a FAE dando origine ad anticorpi funzionalmente monovalenti
- Non fissano il C1 se non quando in forma di esameri
- Agiscono come anticorpi bloccanti competendo con le IgE nel legare gli allergeni.
- Possono sopprimere l'attivazione di mastociti e basofili attraverso il recettore di tipo inibitorio FcγRIIb.

Sulla base dei recenti riscontri, gli allergologi e non solo, dovrebbero prendere in considerazione anche i potenziali effetti patogenetici delle IgG4, rilevati in altre situazioni spesso associate a stati atopici e/o che simulano sintomi allergici.

IgG4 ESOFAGITE EOSINOFILA

L'esofagite eosinofila (EoE) è una malattia infiammatoria cronica dell'esofago ad eziologia almeno parzialmente atopica che colpisce sia gli adulti che la popolazione pediatrica, associata ad infiltrazione eosinofila dell'epitelio esofageo (19). La malattia spesso coesiste con altri disordini atopici quali rinite allergica, asma, allergie alimentari. I sintomi includono difficoltà alla crescita, vomito, dolore toracico e addominale, disfagia e ristagno di cibo che procedono in questo ordine dall'infanzia all'età adulta fino alla fibrosi. La

storia naturale è sconosciuta.

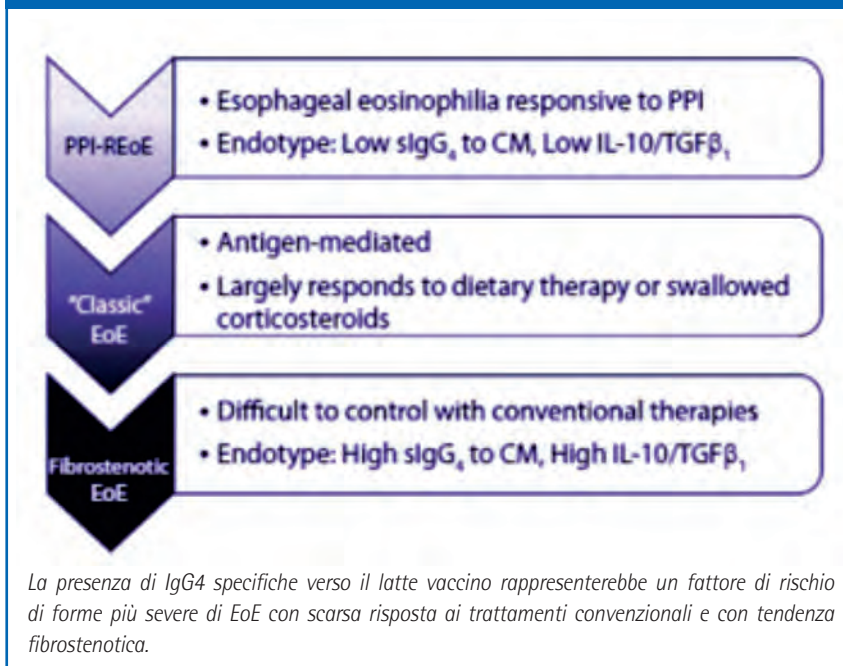
L'eziologia della EoE coinvolge un complesso rapporto tra genetica, sistema immunitario e ambientali (20). Una vasta proporzione di pazienti affetti da EoE pur presentando una sensibilizzazione ad alimenti non trova beneficio nell'attuazione di diete di eliminazione basate sulla positività ai prick test e/o dosaggio delle IgE specifiche. Ad ulteriore conferma della scarsa rilevanza delle IgE in questa patologia, l'opzione terapeutica basata sull'impiego dell'anticorpo monoclonale anti-IgE umane (omalizumab) risulta inefficace (21).

La dieta di eliminazione (basata non tanto sull'esito dei prick ma sull'anamnesi e verso cibi correlati all'esofagite) e la somministrazione di steroidi rimangono il trattamento standard della patologia. I casi più lievi sembrano rispondere agli inibitori della pompa protonica dimostratisi sicuri ed efficaci anche nell'età pediatrica, mentre una percentuale fino al 40-50% dei pazienti, qualsiasi sia l'età, sono refrattari a questo trattamento (22). Circa il 10% dei pazienti affetti presenta riduzione del calibro esofageo difficile da trattare ed al momento della diagnosi fino al 67% dei pazienti adulti ed il 16% dell'età pediatrica presentano una patologia fibrostenotica; quando si è instaurata la fibrosi la sola riduzione della componente infiammatoria può non essere efficace nel migliorare la sintomatologia clinica.

Altri riscontri osservati nella popolazione pediatrica, forniscono una più profonda comprensione del significato potenziale e sulla regolazione delle



Figura 4. Possibili endotipi di EoE in base ai livelli di IgG4 specifiche per le proteine del latte vaccino (da ref. 25)



IgG4. Un recente studio pediatrico sottolinea che la presenza di IgG4 è una caratteristica rilevante della malattia, è strettamente correlata al livello degli eosinofili a livello esofageo, all'immunità di tipo Th2 e ad una serie di citochine originate dai T linfociti e verosimilmente prodotte a livello locale tra cui le interleuchine IL-4, IL-13 e IL-10 come osservato dal profilo dei trascrittomi * (23, 24).

* Il trascrittoma è l'insieme di tutti gli mRNA che sono trascritti dai geni di un organismo per la sintesi di una certa proteina in un determinato momento.

Gli stretti rapporti tra IL-4, IL-13 e periostina (una proteina rilasciata dalla matrice cellulare delle vie aeree epiteliali stimulate da IL-13, e considerata un marker delle forme più severe di asma) potrebbero anche spiegare in parte l'evoluzione fibrosante della malattia. Recentemente alcuni autori (25) hanno proposto che una stratificazione dei pazienti affetti da EoE basandosi sui livelli di IgG4 verso il latte vaccino potrebbe essere utile a fornire un riscontro sulla risposta immune a livello esofageo ed eventualmente sul decorso della malattia o sulla risposta al trattamento (25). Si ipotizza quindi un modello di endotipizzazione (Figura 4) in base alla

presenza di IgG4 specifiche per le proteine del latte, avendo ad un estremo i pazienti responsivi a gli inibitori della pompa protonica e all'altro, i pazienti non responsivi ai trattamenti e con un impronta fibrotica ed un fenotipo più simile alla malattia autoimmune correlata alle IgG4.

IgG4 COME AUTOANTICORPI

La prima malattia autoimmune descritta come disordine mediato dalle IgG4 è stato il pemfigo negli anni '80 (target antigenico desmogleina I). Da allora un ruolo patogenetico delle IgG4 è stato riscontrato almeno in tredici malattie autoimmuni, inclusa la miastenia grave, il pemfigo foliaceo ed altre e di alcune sono stati anche dimostrati gli autoantigeni target. Secondo i criteri di Witebsky un ruolo sicuramente patogenetico delle IgG4 è stato dimostrato in alcune malattie e confermato mediante esperimenti di transfer passivo come riassunto nella Tabella 1.

In reumatologia, alcuni dati fanno ipotizzare un ruolo potenziale delle IgG4 anche in altre malattie quali il Lupus e l'Artrite reumatoide. In questi casi le IgG4 potrebbero rappresentare un iniziale tentativo di diminuire la risposta infiammatoria della malattia anche se non si può escludere un loro coinvolgimento patogeno.

A differenza delle malattie autoimmuni quali tiroiditi o sclerosi sistemica causate dalle altre classi di IgG (IgG1



e IgG3), il meccanismo d'azione delle IgG4 come autoanticorpi consiste nel bloccare le interazioni proteina-proteina o nell'attivare o disattivare enzimi o recettori mediante un legame allosterico ovvero competitivo (27).

IgG4-RD

La "IgG4-RD" è stata descritta per la prima volta nel 2001 a carico del

pancreas ("pancreatite autoimmune di tipo I"), e solo dopo, riconosciuta in svariati organi e apparati. Anche condizioni patologiche classicamente ritenute entità a sè stanti (per esempio la malattia di Mikulicz e la fibrosi retroperitoneale idiopatica) sono state progressivamente catalogate come manifestazioni della "IgG4-RD". Ad oggi, i meccanismi patogenetici alla base della "IgG4-RD" rimangono ampiamente da definire e, quindi non si hanno per

ora *bio-markers* utili per la diagnosi e il *follow-up* (28).

La IgG4-RD è una patologia fibroinfiammatoria sistemica, caratterizzata dalla comparsa di lesioni tumor-like a carico di vari organi, da un infiltrato linfo-plasmocitario ricco in plasmacellule che producono IgG4 fibrosi, flebite obliterante e, spesso da elevate concentrazioni sieriche di IgG4. La presentazione clinica varia a seconda dei diversi organi coinvolti (pancreas, ghiandole



Tabella 1

Malattie autoimmuni IgG4 mediate di classe I (da ref. 27)

DISEASE	ANTIGEN	EPITOPE	OTHER ANTIBODIES	ANTIBODY BINDING TO AFFECTED ORGAN	PATHOGENIC MECHANISM OF IgG4
CLASS I DISEASES					
MUSK-MG	MuSK	Ig-like domain 1,2 CARD domain	10% IgG1, 2	Neuromuscular junction	Yes. Block of MuSK-Lrp4 and reduced AChR clustering, block of MuSK-ColQ interaction
CIDP	CNTN1	Ig-like domains (protein core, glycosylation independent)	IgG2, 3	Paranodal axoglial junctions of motoneurons	Yes. Block of contactin/Caspr and NF155 interaction, paranode dismantling
emphigus foliaceus	Dsg1	N-terminal EC1 and EC2 omain, others	IgG1, 2, 3, IgA	Keratinocytes mostly in superficial layers of the skin	Yes. Block of cell adhesion, cell sheet dissociation in cultured human keratinocytes, and human skin explants. Pathogenicity was reduced after depletion of IgG4
Pemphigus vulgaris	Dsg3			Keratinocytes mostly in basal/parabasal layers of the skin	
Thrombotic thrombocytopenic purpura	ADAMTS13	5 small solvent - exposed loops in the spacer domain, others	IgG1, 2, 3, IgM, IgA	IgG in blood circulation (ADAMTS13 is a secreted protease)	Yes. Cloned IgG4 blocked ADAMTS13 protease activity which leads to von Willebran Factor (vWF) accumulation and microthrombosis

CIDP: polineuropatia cronica demielinizzante. MuSK-MG: miastenia grave da anticorpi anti Muskel Specific Kinase.



lacrimali e salivari, reni, retroperitoneo, etc.) e a seconda dell'ordine temporale, sincrono o metacrono, con cui essi vengono interessati (Tabella 2).

La diagnosi risulta in genere complessa, in quanto richiede un elevato indice di sospetto da parte del clinico e un approccio multidisciplinare. Infatti la IgG4-RD può presentarsi paucisintomatica rispetto all'effettivo coinvolgimento sistemico oppure essa può mimare, a dispetto della sintomatologia sfumata, patologie più gravi, inducendo un atteggiamento terapeutico aggressivo. La biopsia nel corso delle indagini diagnostiche, è determinante per una diagnosi corretta (29).

La patogenesi della IgG4-RD rimane poco chiara. La presenza di una risposta immunologica di tipo Th2,

l'attivazione delle cellule regolatrici T, l'aumentata produzione di IL-10, IL-4 e TNF- β , sono state confermate da diversi studi (8). Complessivamente sono stati evidenziati elementi che rimandano ai meccanismi dell'autoimmunità, dell'allergia e dell'immunità innata. Il reale ruolo delle IgG4 risulta tuttavia ancora sconosciuto: il dubbio se contribuiscono alla patogenesi delle lesioni o se si comportino da semplici spettatori rimane. Ulteriori studi sono pertanto necessari per chiarire il reale meccanismo patogenetico della IgG4-RD e, soprattutto, per individuare il ruolo delle IgG4. Non è poi da escludere l'influenza di possibili trigger ambientali visto che una percentuale rilevante di pazienti affetti da questa malattia è costituita da operai esposti in maniera

prolungata a solventi, derivati petroliferi o gas industriali (30).

Tra le cellule immuni coinvolte nella patogenesi sembra predominante una popolazione di linfociti T di tipo citotossico, che presentano sulla loro superficie granzime A, perforina e una proteina appartenente alla famiglia delle SLAM (*Signaling Lymphocyte Activation Molecule*), chiamata SLAMF7 (CD4+SLAMF7+CTL). Attualmente si pensa che queste cellule attivate da linfociti B e plasmablasti, rivestano un ruolo essenziale nel determinare il danno tessutale e determinare la fibrosi. La dimostrazione del rapido declino della concentrazione di IgG4 e della scomparsa del marcatore di superficie CD20 a livello dei plasmablasti e delle plasmacellule, in seguito al trattamento con Rituximab (anticorpo monoclonale diretto contro il CD20 espresso dai linfociti B) confermerebbe l'ipotesi patogenetica. Il trattamento con Rituximab interferisce anche con l'attività dei linfociti citotossici SLAMF7 a riprova che gli stessi sarebbero indotti da linfociti B e da plasmablasti (31).

Una strategia di trattamento non è ancora chiaramente stabilita ma il farmaco di prima linea di trattamento rimane la terapia glucosteroidica che determina nella maggioranza dei casi una completa remissione seguita però in genere da ricadute successive. L'impiego in aggiunta di farmaci immunosoppressivi (azatioprina, metotrexate, ciclosporina...) consentirebbe di ridurre il dosaggio degli steroidi. Nelle forme resistenti, la migliore alternativa è rappresentata dal Rituximab (32).



Tabella 2

Organi coinvolti nella malattia IgG4 correlata (da rif. 29)

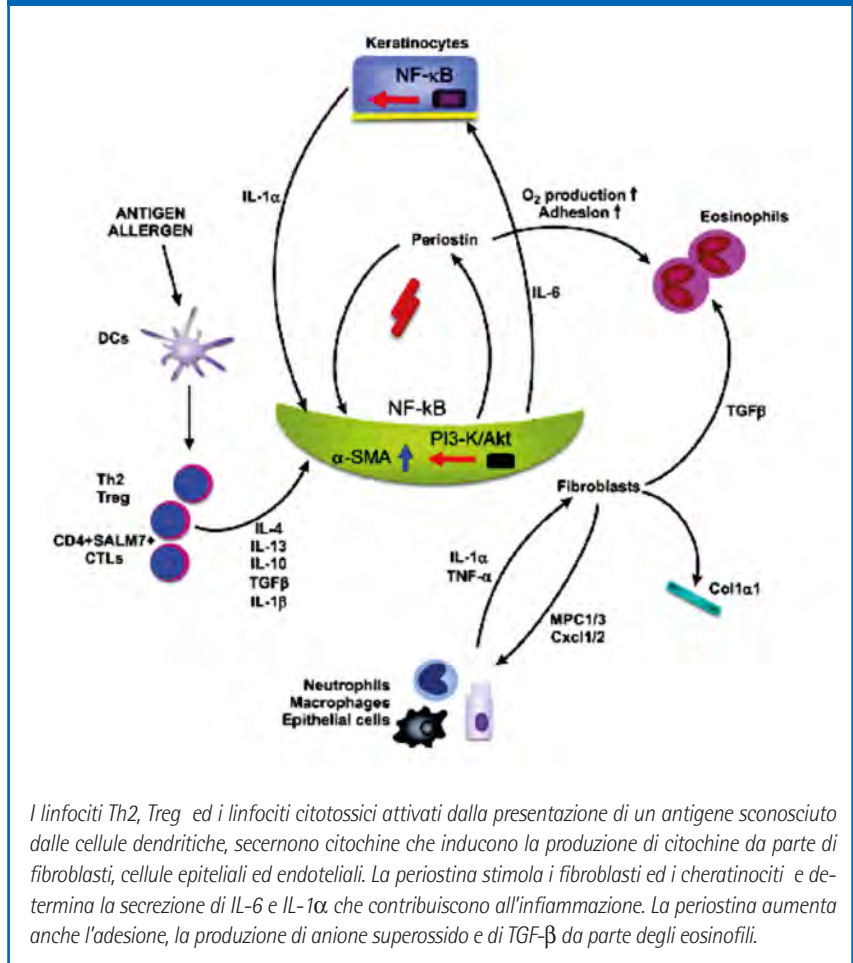
ORGANO	
Pancreas	Pancreatite autoimmune tipo 1
Ghiandole salivari	Scialoadenite, Tumore di Kuttner
Ghiandole lacrimali	Dacrioadenite, pseudo tumori
Rene	Nefrite tubulo interstiziale, nefropatia membranosa, pielite
Retroperitoneo	Fibrosi retro peritoneale
Linfonodi	Linfadenopatia
Polmone	Alveolite interstiziale
Vie biliari	Colangite sclerosante, colecistite
Fegato	Epatopatia, pseudo tumori
Sistema endocrino	Ipfisite, tiroidite di Riedel
Sistema nervoso centrale	Pachimeningite
Altri	Prostatite, mastite, mediastinite



IgG4 E SVILUPPO DI FIBROSI

La fibrosi, come si è visto, rappresenta la caratteristica principale della IgG4-RD, per cui si è cercato di individuare i meccanismi immunopatologici che potrebbero anche essere alla base di altre malattie con evoluzione fibrosante. Sono state quindi studiate potenziali vie coinvolte in vari organi: vari studi hanno suggerito che le interleuchine IL-4 e IL-13 prodotte per lo più dai Th2, e le citochine IL-10 e TGFβ prodotte dai Treg, possano essere coinvolte nel commitment del linfociti B verso la produzione di plasmacellule secernenti IgG4 come nella deposizione di matrice extracellulare da parte dei fibroblasti attivati (33). Recentemente è stato dimostrato che le cellule maggiormente rappresentate che formano gli infiltrati nei tessuti colpiti sono i linfociti citotossici SLAM7+ che producono citochine profibrotiche come TGF-β, IL 1 β e IFNγ. Anche altre cellule potrebbero essere coinvolte nello sviluppo di fibrosi storiforme; plasmacellule IgG4+ producenti IL-6, macrofagi ovvero eosinofili attivati dalle suddette interleuchine che a loro volta possono secernere fattori profibrotici. Questa cascata di eventi potrebbe infine culminare con l'attivazione dei fibroblasti con conseguente deposizione di matrice extracellulare (34,35). L'osservazione che i plasmablasti nella IgG4-RD hanno un repertorio immunoglobulinico oligoclonale supporta l'ipotesi che questo disordine sia indotto da autoantigeni ma il trigger antigenico è ancora sconosciuto. Uno di questi au-

Figura 5. Periostina e dialogo con il sistema immune nella fibrosi (da ref. 38 mod)



I linfociti Th2, Treg ed i linfociti citotossici attivati dalla presentazione di un antigene sconosciuto dalle cellule dendritiche, secernono citochine che inducono la produzione di citochine da parte di fibroblasti, cellule epiteliali ed endoteliali. La periostina stimola i fibroblasti ed i cheratinociti e determina la secrezione di IL-6 e IL-1α, che contribuiscono all'infiammazione. La periostina aumenta anche l'adesione, la produzione di anione superossido e di TGF-β da parte degli eosinofili.

toantigeni potrebbe essere rappresentata dalla Galectina-3 (Gal-3). Il possibile ruolo di Gal-3 come autoantigene è stato dimostrato in svariati processi fibrotici come la sclerosi sistemica e nelle malattie interstiziali polmonari. Un altro link potenziale tra il processo fibrotico della sclerosi sistemica e della IgG4-RD

potrebbe essere rappresentato dal ligando della chemochina CC18 (CCL18), secreto dai macrofagi stimolati da IL-4 e IL-13. Per quanto riguarda la IgG4-RD, sono stati osservati livelli più elevati di anticorpi anti Gal-3 nella pancreatite autoimmune come anche nelle ghiandole salivari, nei polmoni e nei linfonodi



di di soggetti affetti dalla malattia (36). Nel panorama della fibrosi della IgG4-RD potrebbe essere coinvolta anche la periostina, proteina matricellulare prodotta dai fibroblasti dopo stimoli profibrotici (Figura 5). Elevati livelli di periostina sono stati dimostrati in pazienti con fibrosi polmonare rapidamente progressiva e più recentemente sovrappresa anche nelle ghiandole salivari di pazienti con IgG4-RD anche in presenza di livelli ematici sovrapponibili ai controlli sani (37, 38). Di conseguenza la periostina potrebbe rappresentare sia un potenziale biomarker a scopo diagnostico che un target per lo sviluppo di nuove opzioni terapeutiche.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

L'importanza delle IgG4 è stata originariamente evidenziata nelle malattie allergiche in cui esse sembrano esercitare, se indotte da ITS, un ruolo protettivo riducendo l'infiammazione allergica e favorendo l'induzione di fenomeni di tolleranza nei confronti di allergeni specifici. Il loro ruolo nell'ambito di altre malattie non è ancora sufficientemente chiarito. In particolare se in alcune malattie autoimmuni il loro ruolo patogenetico sembra dimostrato sulla base della individuazione dell'antigene target grazie ad esperimenti di trasferimento passivo in modelli animali sperimentali, nel caso della IgG4-RD non è ancora chiaro se essi rappresentino un tentativo inefficace di "contrastare" la malattia primitiva scatenata da antigeni ancora

sconosciuti (con conseguente rischio di favorire fenomeni fibrotici) o al contrario siano essi stessi un elemento scatenante la malattia. Sembra comunque che una stretta correlazione tra linfociti B, livelli di IgG4 e fibrosi sia alla base della malattia visto che la somministrazione di Rituximab è particolarmente efficace nei casi di soggetti con IgG4-RD refrattari, steroideo-resistenti e/o recidivanti. Dopo la terapia che depleta i linfociti B, si osserva infatti una rapida riduzione delle IgG4 sieriche insieme con la diminuzione dei plasmablasti e delle plasmacellule e riduzione dell'attivazione dei fibroblasti.

L'analisi dei meccanismi patogenetici coinvolti nella IgG4-RD ha condotto da un lato all'identificazione di alcune caratteristiche comuni con i disordini allergici in cui la risposta Th2 caratterizzata da IL 4 e IL 13 è predominante e, dall'altro, ha messo in evidenza alcune differenze con le altre malattie autoimmuni in cui gli autoanticorpi patogeni appartengono per lo più alle sottoclassi IgG1 e IgG3 e in cui la risposta cellulare immune è diretta essenzialmente dai linfociti Th1 e Th17. Un altro aspetto peculiare della malattia riguarda il ruolo delle cellule Treg: a differenza dei disordini caratterizzati da una risposta aberrante del sistema immune verso gli autoantigeni dove i Treg e la loro funzione soppressive è normalmente ridotta, nella IgG4-RD questa funzione sembra aumentata e il rilascio da parte loro di fattori quali TGF- β e IL-10, potrebbe contribuire allo sviluppo della fibrosi.

Per quanto riguarda lo sviluppo della fibrosi, questa rappresenta il risultato

finale di svariate e differenti condizioni infiammatorie croniche di eziologia allergica ed autoimmune: anche se i processi immunologici che sono alla base della stessa non sono ancora completamente conosciuti, in alcuni di questi disordini sembrano coinvolte le stesse molecole (periostina, Gal-3, CCL18, TGF- β) suggerendo una via comune e aprendo nuovi orizzonti sul loro uso come biomarker ovvero potenziali bersagli terapeutici.

Sulla base delle attuali conoscenze l'identificazione dei pazienti affetti da IgG4-RD è piuttosto complessa visto che negli stessi possono riscontrarsi connotati clinici in qualche modo sovrapponibili a quelli osservabili nelle malattie allergiche ovvero autoimmuni. Data quindi la peculiarità della malattia momento è auspicabile che l'iter diagnostico preveda un approccio multidisciplinare al fine di individuare l'opzione terapeutica ottimale per il trattamento dei pazienti. che ne sono affetti.

In conclusione, le IgG4 rappresentano una classe di anticorpi con caratteristiche uniche e peculiari, potendo svolgere un ruolo protettivo ovvero patogenetico ovvero costituire un marker di risposte immuni aberranti indotte da una stimolazione cronica di autoantigeni non sempre individuabili. La scoperta del ruolo multiforme che questi anticorpi possono esprimere in diverse situazioni implica un cambio di prospettiva da parte degli allergo/immunologi che devono prendere atto del loro potenziale "lato oscuro" visto che in certe situazioni essi potrebbero agire come una sorta di "fuoco amico".



Bibliografia

1. Lighaam LC, Rispens T. *The Immunobiology of Immunoglobulin G4*. *Semin Liver Dis*. 2016; 36 (3):200-215
2. Kappen JH, Durham SR, Veen HI, et al.- *Applications and mechanisms of immunotherapy in allergic rhinitis and asthma*. *Thor Adv Respir Dis*. 2017; 11(1):73-86
3. Vasaitis L. *IgG4-related disease: A relatively new concept for clinicians*. *Eur J Intern Med*. 2016; 27:1-9
4. Wright BL, Spergel JM. *Eosinophilic Esophagitis*. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2018; 6(5):1799-1801
5. Aalberse RC, Stapel SO, Schuurman J, et al.- *Immunoglobulin G4: an odd antibody*. *Clin Exp Allergy*. 2009; 39(4):469-477
6. van der Neut Kofschoten M, Schuurman J, Losen et al.- *Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange*. *Science* 2007; 317(5844):1554-1557
7. Nirula A, Glaser SM, Kalled SL, et al.- *What is IgG4? A review of the biology of a unique immunoglobulin subtype*. *Curr Opin Rheumatol*. 2011; 23(1):119-124
8. Chliva C, Aggelides X, Makris M, et al.- *Comparable profiles of serum histamine and IgG4 levels in allergic beekeepers*. *Allergy*. 2015; 70(4):457-460
- 9.-Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. *IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions*. *Front Immunol*. 2014; 5:520
10. Liu M, Hao M. *Unique properties of IgG4 antibody and its clinical application in autoimmune pancreatitis*. *Scard J Gastroenterol*. 2018; 2: 1-11.
12. Aalberse RC, Platts-Mills TA, Rispens T. *The developmental history of IgE and IgG4 antibodies in relation to atopy, eosinophilic esophagitis, and the modified TH2 response*. *Curr Allergy Asthma Rep* 2016; 16: 45-55
13. Culver EL, Sadler R, Bateman AC, et al.- *Increases in IgE, Eosinophils, and Mast Cells Can be Used in Diagnosis and to Predict Relapse of IgG4-Related Disease*. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2017;15(9):1444-1452.e6
14. Saeki T, Kobayashi D, Ito T, et al.- *Comparison of clinical and laboratory features of patients with and without allergic conditions in IgG4-related disease: A single-center experience in Japan*. *Mod Rheumatol* 2018; 28(5):845-848
15. Culver EL, Vermeulen E, Makuch M, et al.- *Increased IgG4 responses to multiple food and animal antigens indicate a polyclonal expansion and differentiation of pre-existing B cells in IgG4-related disease*. *Ann Rheum Dis*. 2015; 74(5):944-947
16. Shamji MH, Durham SR. *Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers*. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 140(6):1485-1498
17. Caubet JC, Lin J, Ahrens B, Gimenez G, Bardina L, Niggemann B, Sampson HA, Beyer K. *Natural tolerance development in cow's milk allergic children: IgE and IgG4 epitope binding*. *Allergy*. 2017; 72(11):1677-1685
18. Scott-Taylor TH, Axinia SC, Amin S, et al.- *Immunoglobulin G; structure and functional implications of different subclass modifications in initiation and resolution of allergy*. *Immun Inflamm Dis* 2018; 6(1):13-33
19. Philpott H, Kweh B, Thien F. *Eosinophilic esophagitis: current understanding and evolving concepts*. *Asia Pac Allergy*. 2017; 7(1):3-9
20. Rochman M, Azouz NP, Rothenberg ME. *Epithelial origin of eosinophilic esophagitis*. *J Allergy Clin Immunol* 2018; 142(1):10-23
21. Clayton F, Peterson K. *Eosinophilic Esophagitis: Pathophysiology and Definition*. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2018; 28(1):1-14
22. Ellison S, Philpott H. *A New Paradigm in the Treatment of Eosinophilic Esophagitis: Proton Pump Inhibitors Are Safe, Aim for "Deep Remission"*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2018; 67(2):146-147
23. Clayton F, Peterson K. *Eosinophilic Esophagitis: Pathophysiology and Definition*. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2018; 28(1):1-14
24. Rosenberg CE, Mingler MK, Caldwell JM, et al.- *Esophageal IgG4 levels correlate with histopathologic and transcriptomic features in eosinophilic esophagitis*. *Allergy* 2018; 73(9):1892-1901
25. Ferguson AE, Fulkerson PC. *Eosinophilic esophagitis: Time to classify into endotypes?* *J Allergy Clin Immunol* 2018; 142(1):71-72
26. Huijbers MG, Plomp JJ, van der Maarel SM, et al.- *IgG4-mediated autoimmune diseases: a niche of antibody-mediated disorders*. *Ann N Y Acad Sci*. 2018; 1413(1):92-103
27. Konecny I. *A New Classification System for igG4 Autoantibodies*. *Frontiers in Immunology* 2018;9:1-22
28. Kamisawa T, Funata N, Hayashi Y, et al.- *A new clinicopathological entity of IgG4-related autoimmune disease*. *J Gastroenterol* 2003; 38:982-984
29. Galeano D, Zanoli L, Scarfia VR, et al.- *Malattia renale IgG-4 correlata: cosa il nefrologo deve sapere*. *G Ital Nefrol* 2016; 33 (1)
30. de Buy Wenniger LJ, Culver LE, Beuers U. *Exposure to occupational antigens might*



Bibliografia

predispose to IgG4-related disease, *Hepatology* 2014; 60(4):1453-1554

31. Della Torre E, Feeney E, Deshpande V, et al.-B-cell depletion attenuates serological biomarkers of fibrosis and myfibroblast activation in IgG4-related disease. *Ann Rheum Dis.* 2015; 74(12):2236-2243

32. Quattrocchio G, Barreca A, Demarchi A, et al.-IgG4-related kidney disease: the effects of a Rituximab-based immunosuppressive therapy. *Oncotarget* 2018; 9(30):21337-21347

33. Okazaki K, Yanagawa M, Mitsuyama T,

et al. Recent advances in the concept and pathogenesis of IgG4-related disease in the hepato-bilio-pancreatic

34. Mattoo H, Mahajan VS, Maehara T, et al. Clonal expansion of CD4 cytotoxic T lymphocytes in patients with IgG-related disease. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 138(3):825-838

35. Lv X, Gao F, Liu Q, Zhang S, et al.-Clinical and pathological characteristics of IgG4-related interstitial lung disease. *Exp Ther Med.* 2018;15(2):1465-1473

36. Perugino CA, AlSalem SB, Mattoo H, et al.-Identification of galectin-3 as an autoantigen in patients with IgG4-related disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2018 S0091-6749(18)30768-1

37. Puxeddu I, Capocchi R, Pratesi F, et al.- Mediators of angiogenesis and fibrosis in IgG4-related disease. *Clin Exp Med* 2018; 18:245-249

38. Izuhara K, Nunomura S, Nanri Y, et al.- Periostin in inflammation and allergy. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(23):4293-4303

BUON 2019

Auguri ai Lettori e agli Autori

Con la speranza che ci seguano
con lo stesso interesse anche il prossimo anno.

Gianni Mistrello





La Rinomica: la sua applicazione può contribuire alla caratterizzazione differenziale dei vari sottotipi di rinite.

Girolamo Pelaia,
Cattedra,
Scuola di Specializzazione
e Unità Operativa
Complessa Malattie
dell'Apparato Respiratorio
Università degli Studi
Magna Graecia
di Catanzaro

Not Allergol 2018; vol. 36: n. 2-3 : 101-106

La rinite è una delle principali comorbidità dell'asma bronchiale, con cui spesso condivide peculiari pattern flogistici, nell'ambito di un inquadramento patogenetico unitario delle malattie infiammatorie croniche delle vie aeree superiori ed inferiori. In particolare, le forme allergiche ("allergic rhinitis": AR) e non allergiche ("non-allergic rhinitis": NAR) di rinite rappresentano un importante fattore di rischio per lo sviluppo di asma (1). La AR è una patologia atopica, scatenata dall'esposizione agli allergeni e sostenuta da una flogosi IgE-mediata della mucosa nasale (2). La NAR è invece caratterizzata da una eterogenea eziologia e comprende vari fenotipi infiammatori, quali la NAR eosinofila (NARES), la NAR mastocitaria (NARMA), la NAR eosinofilo-mastocitaria (NARESMA) e la NAR neutrofila (NARNE) (3).

Dal punto di vista diagnostico, non è semplice distinguere questi differenti sottogruppi di patologia rinitica, in quanto non sono disponibili specifici ed affidabili biomarcatori in grado di identificare precisamente ciascun sottotipo

RIASSUNTO

Parole chiave
• Rinite • Fluido nasale • Peptidomica • Rinomica

Il fluido nasale, prelevabile mediante tecniche non invasive, può costituire un campione molto utile per approfondire le differenze biopatogenetiche esistenti tra le varie forme di rinite allergica e non allergica. A tal riguardo, nel presente studio sono state utilizzate particelle mesoporose di silice per recuperare selettivamente la componente peptidica del fluido nasale, che è stata quindi analizzata tramite la tecnologia MALDI-TOF MS ("matrix-assisted laser-desorption ionization" - "mass spectrometry"), la quale ha consentito di identificare differenti profili peptidici in riferimento ai soggetti sani di controllo ed ai pazienti affetti da rinite allergica o non allergica. Pertanto, questo particolare tipo di piattaforma sperimentale peptidomica ("rinomica") permette di individuare specifici pattern di espressione peptidica nel fluido nasale, potenzialmente molto rilevanti per la caratterizzazione dell'eterogeneità fenotipica ed endotipica della rinite allergica e non allergica.

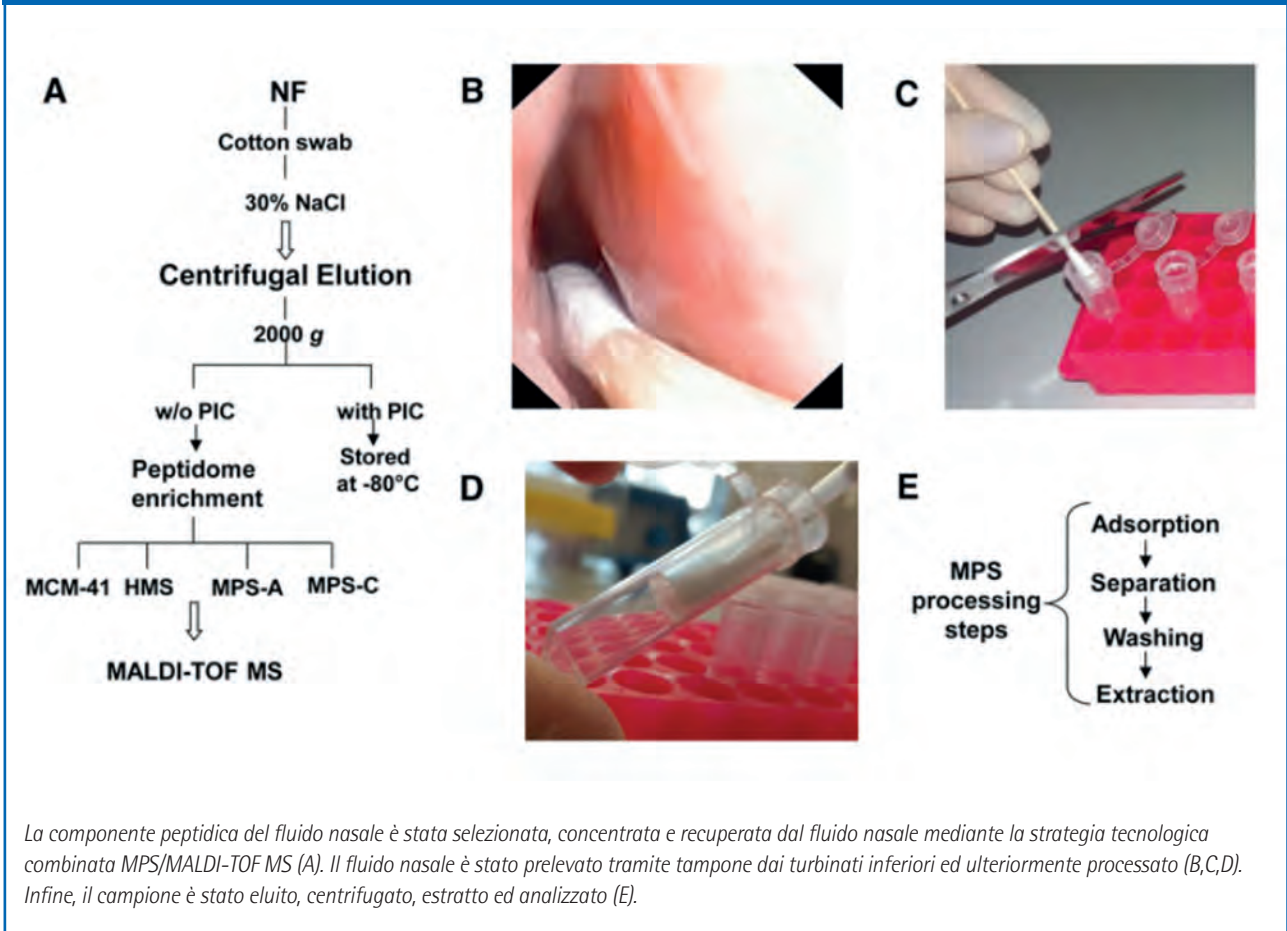
(4). Pertanto, particolarmente utile è la citologia nasale, che è in grado di individuare i vari profili flogistici cellulari (3), ma non può fornire sufficienti informazioni riguardanti i meccanismi molecolari implicati nella patogenesi delle varie forme di rinite. In tale contesto possono quindi essere molto utili, nell'ambito della ricerca traslazionale e delle future prospettive diagnostiche e terapeutiche,

gli studi di proteomica basati sull'analisi della mucosa nasale, finalizzati alla stratificazione fenotipica ed endotipica della rinite allergica e non allergica (5-7). Tuttavia, le indagini proteomiche finora effettuate in ambito rinologico hanno trascurato la caratterizzazione dei profili peptidici espressi nel fluido nasale. Ciò ha rappresentato un'evidente limitazione, in quanto nella biopatogenesi



Figura 1.

Piattaforma sperimentale dell'analisi "rinomica"



delle malattie infiammatorie croniche delle vie aeree i peptidi comprendono molecole che svolgono un ruolo fondamentale, quali citochine, chemochine ed altri mediatori (8). Pertanto, particolarmente vantaggiosa è la possibilità di attuare studi peptidomici in grado di concentrare ed analizzare la componente a basso peso molecolare del contenuto proteico dei campioni biologici. Sulla

scia di tali ricerche precedentemente effettuate dal nostro gruppo (9-14), abbiamo quindi pensato di estendere l'applicazione di queste metodiche anche allo studio del fluido nasale dei pazienti rinotici, con l'intenzione di individuare eventuali pattern molecolari rilevanti per l'approfondimento della comprensione dei meccanismi patogenetici responsabili dei diversi fenotipi di rinite

allergica e non allergica (15). In particolare, abbiamo studiato 8 pazienti affetti da AR, 7 pazienti con NAR e 7 soggetti normali (15). Tutti gli individui arruolati nel nostro studio sono stati sottoposti ad una accurata indagine anamnestica, integrata da prove allergologiche cutanee eseguite mediante prick test, dosaggio delle IgE sieriche totali e specifiche, rinoscopia e spirometria as-



sociata a prove farmacodinamiche comprendenti test di reversibilità dell'ostruzione bronchiale con broncodilatatore o broncostimolazione con metacolina. I soggetti sani di controllo non hanno riferito sintomi allergici e/o nasali, caratterizzandosi anche per la negatività dei test allergologici cutanei e per la normalità degli esami rinoscopici, spirometrici e delle prove di provocazione bronchiale.

L'esame citologico è stato eseguito mediante raschiatura nasale utilizzando un "Rhino-Probe" 17 18, in accordo con il metodo descritto da Gelardi e coll. (16). Pertanto, i campioni sono stati prelevati dalla porzione media dei turbinati inferiori, strisciati su vetrino e colorati con la tecnica May-Grunwald Giemsa. I vetrini sono stati quindi esaminati al microscopio ottico, equipaggiato con una macchina fotografica digitale. Le conte cellulari sono state effettuate su 50 campi microscopici ad un ingrandimento di 1000 x. In base ai profili cellulari, le varie forme di rinite non allergica sono state differenziate in NARES (eosinofili >20% delle cellule totali), NARMA (mastociti >10% delle cellule totali) e NARNE (neutrofili > 50% delle cellule totali).

Per quanto riguarda l'analisi peptidomica, abbiamo caratterizzato i profili peptidici espressi nel fluido nasale di pazienti asmatici con concomitante rinite, confrontandoli con quelli dei soggetti normali di controllo. Nei campioni biologici ottenuti tramite tampone nasale, la componente peptidica è stata selettivamente recuperata ed analizzata utilizzando la tecnologia dell'assorbimento su particelle mesoporose di silice

(MPS: "mesoporous silica"), in combinazione con la spettrometria di massa (MS: "mass spectrometry") associata alla metodologia MALDI-TOF, basata sulla "matrix-assisted laser-desorption ioniza-

tion" (MALDI) accoppiata ad analizzatori "time of flight" (TOF) (15) (Fig. 1). I preliminari risultati ottenuti evidenziano la presenza di almeno quattro picchi peptidici, caratterizzati da diversi

Figura 2. Analisi peptidomica nasale (lato sinistro) e caratterizzazione citologica nasale (lato destro) effettuate nei soggetti sani e nei vari sottogruppi di pazienti rinitici.

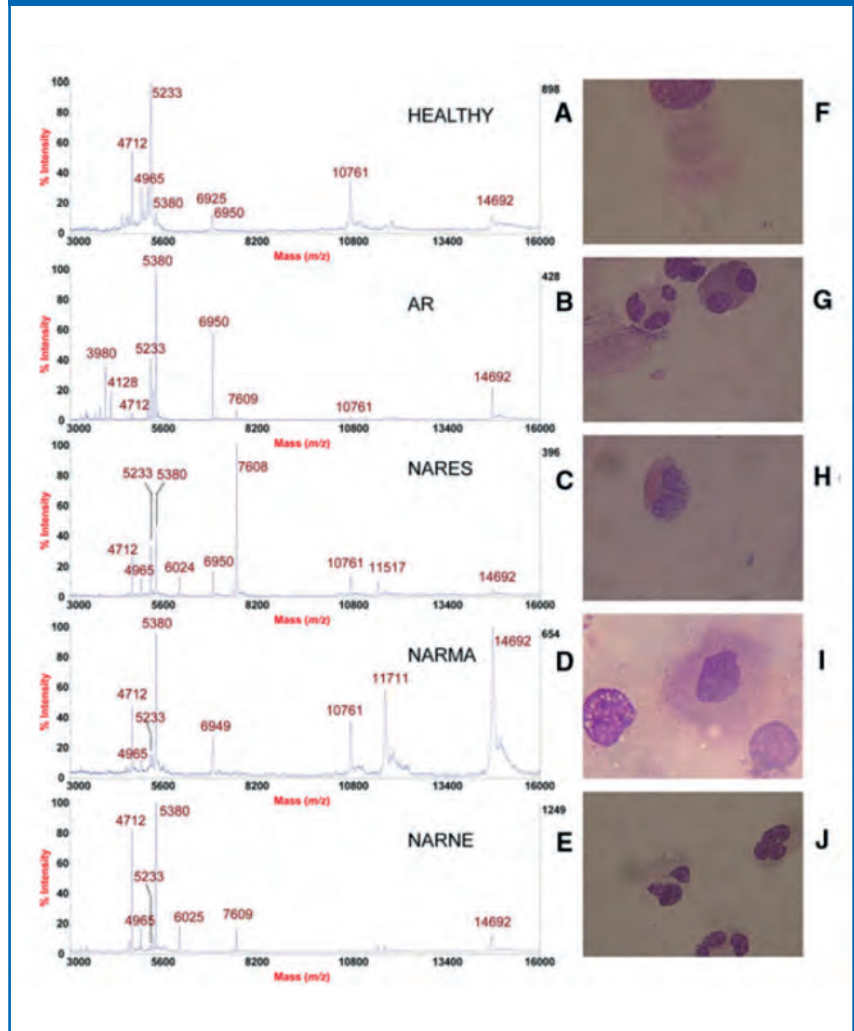
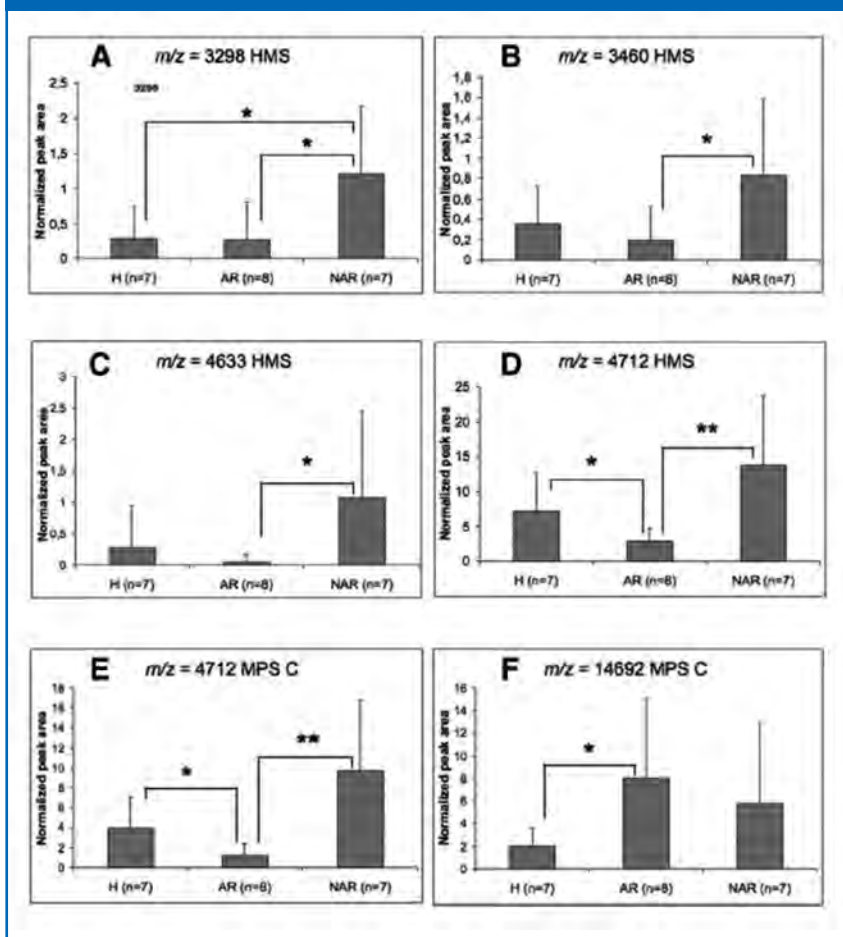




Figura 3. Quantificazione comparativa dei picchi peptidici nasali relativi ai soggetti sani ed ai vari sottogruppi di pazienti riniti



profili di espressione che consentono di differenziare i soggetti sani dai pazienti riniti e, nell'ambito di questi ultimi, gli individui con rinite allergica rispetto a quelli con rinite non allergica. In particolare, le sequenze aminoacidiche di alcune delle molecole peptidiche differenzialmente espresse nei suddetti tre gruppi di per-

sone sono riconducibili al lisozima ed a frammenti della proteina staterina (15) (Figure 2 e 3). Tali frammenti sono risultati presenti in quantità significativamente superiori nel gruppo NAR rispetto al gruppo AR.

Originariamente identificata nelle secrezioni della parotide e delle ghiandole sot-

tomandibolari e sottolinguali, la staterina è una proteina espressa nelle ghiandole sottomuose. Essa svolge un importante ruolo fisiologico nel cavo orale, in quanto lubrifica lo smalto dentario e partecipa al mantenimento dell'omeostasi minerale (17). La staterina è espressa anche nelle secrezioni nasali, ed unitamente ad altre proteine quali la fosfolipasi A2 e le defensine probabilmente contribuisce a realizzare una efficace protezione anti-microbica (18). Tuttavia, precedentemente non è mai stata studiata l'espressione differenziale dei vari frammenti peptidici di staterina in rapporto alla quantità totale della proteina intera. E' comunque interessante menzionare che frammenti di staterina sono stati rinvenuti nella saliva, dove verosimilmente hanno una funzione pre-secretoria, in quanto sono stati direttamente identificati nei dotti ghiandolari della parotide e delle ghiandole sottomandibolari e sottolinguali (19).

Nel nostro studio abbiamo individuato la presenza di staterina intera nel fluido nasale, ma senza rilevare differenze quantitative tra pazienti affetti da AR o NAR. Infatti, le variazioni statisticamente significative tra questi soggetti hanno riguardato esclusivamente il rilievo di maggiori quantità dei quattro suddetti frammenti di staterina nel gruppo NAR rispetto al gruppo AR. Pertanto, noi ipotizziamo che questi derivati proteolitici della staterina possano svolgere un ruolo potenzialmente rilevante nella biopatogenesi delle riniti. Tale speculazione, che ovviamente necessita di ulteriori conferme sperimentali, sembra comunque essere suffragata dalla dimostrazione che un frammento sinte-



tico di staterina garantisce una efficace funzione protettiva ad ampio spettro nei confronti degli agenti patogeni orali, mentre sarebbe irrilevante l'attività antimicrobica della proteina intera (15). Inoltre, i livelli di espressione di lisozima sono risultati significativamente più elevati nel gruppo AR rispetto al gruppo normale di controllo. Lisozima è il più abbondante polipeptide antimicrobico presente nel fluido di rivestimento delle vie aeree. Si deposita nelle cellule sierose, dalle quali viene secreto nelle ghiandole sottomucose. E' anche rilasciato da eosinofili e neutrofilii presenti nelle secrezioni in caso di flogosi delle vie aeree (20). In particolare, indagini di microscopia elettronica eseguite a livello dei tessuti dei turbinati inferiori hanno individuato la presenza di lisozima nelle cellule sierose delle ghiandole della mucosa nasale, ed anche nelle "goblet cells" dell'epitelio nasale (21). Il lisozima idrolizza i legami glicosidici del peptidoglicano della parete cellulare batterica, esplicando così una efficacissima protezione nei confronti di molti comuni batteri gram-positivi delle vie aeree superiori (22). Oltre che dalla sua intrinseca attività enzimatica, l'azione anti-batterica del lisozima dipende anche dalle sue proprietà cationiche (23). Analogamente ai nostri risultati, anche Yuta e coll. hanno documentato, rispetto ai soggetti normali, un incremento dell'espressione del lisozima nel fluido nasale dei pazienti con AR (24). Ciò è stato confermato anche da Tomazic e coll., che al di fuori della stagione pollinica hanno evidenziato una non significativa tendenza all'aumento della con-

centrazione di lisozima nel gruppo AR, valutato comparativamente nei confronti del raggruppamento di controllo (25). D'altra parte, è estremamente interessante che i nostri dati, relativi al lisozima, siano stati ottenuti in assenza di processi rinitici in atto. Pertanto, è molto improbabile che la sintesi di lisozima sia aumentata in risposta ad infezioni batteriche. Infatti, è ben noto che la produzione di lisozima riflette l'attività ghiandolare sierosa (26,27). Si può quindi speculare che i pazienti allergici siano caratterizzati da uno stato di ipertrofia o iperattivazione delle ghiandole sottomucose nasali, sebbene tale ipotesi ovviamente necessita di ulteriori conferme sperimentali.

Naturalmente siamo consapevoli dei limiti del nostro studio, principalmente derivanti dall'esiguità del numero degli individui valutati. Tuttavia, il nostro principale obiettivo è stato quello di dimostrare che la piattaforma tecnologica combinata MPS/MALDI-TOF MS può consentire una rapida rilevazione dei profili peptidici nasali. Intendiamo comunque ampliare la numerosità dei soggetti studiati, in modo tale che il riconoscimento dei pattern di espressione dei peptidi analizzati possa essere

perfezionato, ottimizzato e validato, con la finalità di differenziare appropriatamente i vari sottotipi di rinite. In questo contesto, le secrezioni nasali provenienti dai turbinati rendono il campionamento mediante tampone notevolmente specifico per quanto riguarda la ricerca di biomarcatori peptidici delle varianti allergiche e non allergiche di rinite.

In conclusione, con riferimento alle malattie flogistiche croniche allergiche e non allergiche delle vie aeree superiori, questi risultati suggeriscono che è concretamente possibile, impiegando una metodica estremamente semplice e non invasiva, quale l'esecuzione di un tampone nasale, individuare molecole peptidiche eventualmente utilizzabili come biomarcatori di specifici fenotipi/endotipi. In realtà, l'identificazione e la corretta articolazione delle diverse componenti di tali pannelli molecolari potrebbero significativamente contribuire a migliorare le conoscenze sulla biopatogenesi delle malattie rino-bronchiali atopiche e non atopiche. Inoltre, la piattaforma sperimentale "rinomica" potrebbe rivelarsi molto interessante anche ai fini della caratterizzazione di bersagli peptidici dotati di potenziale utilità terapeutica.



Bibliografia

1. Passalacqua G, Ciprandi G, Pasquali M, et al.-An update on the asthma-rhinitis link. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4:177-183.
2. Bousquet J, Schunemann HJ, Samolinski B, et al.-Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA): achievements in 10 years and future needs. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130:1049-1062.
3. Gelardi M, Luigi Marseglia G, Licari A, et al.-Nasal cytology in children: recent advances. *Ital J Pediatr* 2012; 38:51-58.



Bibliografia

4. Diamant Z, Boot JD, Mantzouranis E, et al.-Biomarkers in asthma and allergic rhinitis. *Pulm Pharmacol Ther* 2010; 23:468-481.
5. Simoes T, Charro N, Blonder J, et al.-Molecular profiling of the human nasal epithelium: a proteomics approach. *J Proteomics* 2011; 75:56-69.
6. Gelardi M, Siciliano RA, Papa F, et al.-Proteomic analysis of human nasal mucosa: different expression profiles in rhinopathologic studies. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2014; 46:164-171.
7. Tomazic PV, Birner-Gruenberger R, Leitner A, et al.-Apolipoproteins have a potential role in nasal mucus of allergic rhinitis patients: a proteomic study. *Laryngoscope* 125:91-96, 2015.
8. Cramer R.-The potential of proteomics and peptidomics for allergy and asthma research. *Allergy* 2005; 60:1227-1237.
9. Terracciano R, Gaspari M, Testa F, et al.-Selective binding and enrichment for low-molecular weight biomarker molecules in human plasma after exposure to nanoporous silica particles. *Proteomics* 2006; 11:3243-3250.
10. Terracciano R, Pasqua L, Casadonte F, et al.-Derivatized mesoporous silica beads for MALDI-TOF MS profiling of human plasma and urine. *Bioconjug Chem* 2009; 20:913-923.
11. Terracciano R, Casadonte F, Pasqua L, et al.-Enhancing plasma peptide MALDI-TOF-MS profiling by mesoporous silica assisted crystallization. *Talanta* 2010; 80:1532-1538.
12. Terracciano R, Preianò M, Palladino GP, et al.-Peptidome profiling of induced sputum by mesoporous silica beads and MALDI-TOF MS for non-invasive biomarker discovery of chronic inflammatory lung diseases. *Proteomics* 2011; 11:3402-3414.
13. Preianò M, Pasqua L, Gallelli L, et al.-Simultaneous extraction and rapid visualization of peptidomic and lipidomic body fluids fingerprints using mesoporous aluminosilicate and MALDI-TOF MS. *Proteomics* 2012; 12:3286-3294.
14. Savino R, Terracciano R.-Mesopore-assisted profiling strategies in clinical proteomics for drug/target discovery. *Drug Discov Today* 2012; 17:143-152.
15. Lombardo N, Preianò M, Maggisano G, et al.-A rapid differential display analysis of nasal swab fingerprints to distinguish allergic from non-allergic rhinitis subjects by mesoporous silica particles and MALDI-TOF mass spectrometry. *Proteomics* 2017; 17,6:1600215.
16. Gelardi M, Iannuzzi L, Tafuri S, et al.-Allergic and non allergic rhinitis: relationship with nasal polyposis, asthma and family history. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2014; 34:36-41.
17. Helmerhorst EJ, Traboulsi G, Salih E, et al.-Mass spectrometric identification of key proteolytic cleavage sites in statherin affecting mineral homeostasis and bacterial binding domains. *J Proteome Res* 2010; 9:5413-5421.
18. Cole AM, Dewan P, Ganz T.-Innate antimicrobial activity of nasal secretions. *Infect Immun* 1999; 67:3267-3275.
19. Inzitari R, Cabras T, Rossetti DV, et al.-Detection in human saliva of different statherin and P-B fragments and derivatives. *Proteomics* 2006; 6:6370-6379.
20. Cole AM, Liao HI, Stuchlik O, et al.-Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid. *J Immunol* 2002; 169:6985-6991.
21. Machino M, Morioka H, Tachibana M, et al.-Studies of the substructures of the lysozyme-rich secretory granule of the serous cell in the human nasal gland. *Arch Histol Jpn* 1984; 47:549-551.
22. Tieu DD, Kern RC, Schleimer RP.-Alterations in epithelial barrier function and host defense responses in chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124:37-42.
23. Ibrahim HR, Matsuzaki T, Aoki T.-Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *FEBS Lett* 2001; 506:27-32.
24. Yuta A, Ali M, Sabol M, et al.-Mucoglycoprotein hypersecretion in allergic rhinitis and cystic fibrosis. *Am J Physiol* 1997; 273:1203-1207.
25. Tomazic PV, Birner-Gruenberger R, Leitner A, et al.-Seasonal proteome changes of nasal mucus reflect perennial inflammatory response and reduced defence mechanisms and plasticity in allergic rhinitis. *J Proteomics* 2016; 133:153-160.
26. Proud D, Riker DK, Togias A.-Reproducibility of nasal allergen challenge in evaluating the efficacy of intranasal corticosteroid treatment. *Clin Exp Allergy* 2010; 40:738-744.
27. Raphael GD, Jeney EV, Baraniuc JN, et al.-Pathophysiology of rhinitis. Lactoferrin and lysozyme in nasal secretions. *J Clin Invest* 1989; 84:1528-1535.



IgE totali: sono sempre inutili?

Giuseppe Pingitore

Allergologo e pediatra
Roma

Not Allergol 2018; vol. 36: n. 2-3 : 107-110

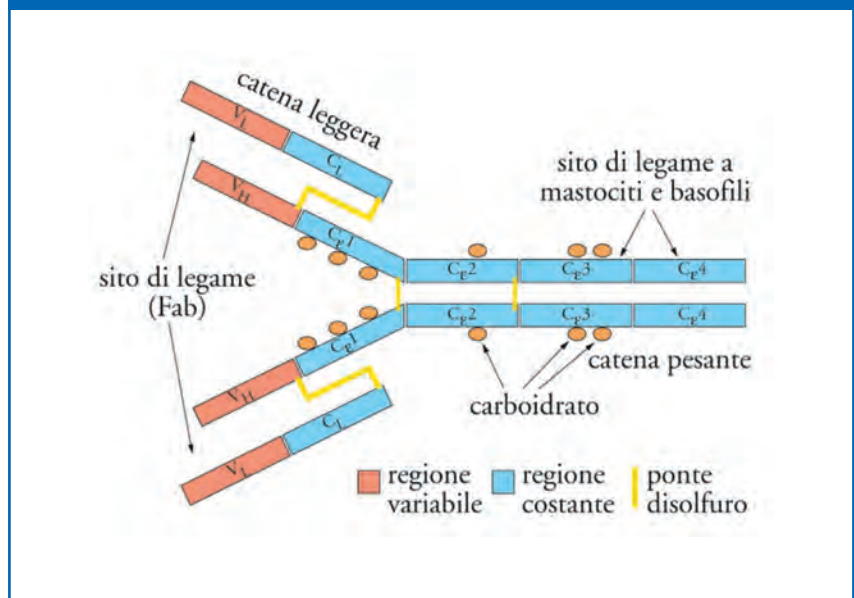
La storia delle IgE inizia in Germania, nel 1921, quando Otto Prausnitz e Heinz Küstner descrivono un curioso fenomeno: l'iniezione sottocutanea di siero di un donatore allergico seguita dalla iniezione dello specifico antigene determina la comparsa di un pomfo e di eritema nella sede di inoculo. E' la chiara dimostrazione dell'esistenza nel siero degli allergici di un fattore in grado di riconoscere l'antigene e di reagire verso di esso, cioè di una "reagina". Una brillante intuizione seguita da decenni di buio. Infatti, solo 45 anni dopo Teruko e Kimishige Ishizaka, due immunologi giapponesi, moglie e marito, descrivono una nuova classe di immunoglobuline IgE (Figura 1) e danno inizio alla moderna allergologia (1).

VALORI NORMALI DI IgE

I valori normali delle IgE dipendono dall'età. Nella tabella 1 vengono indicati i valori normali orientativi nelle diverse età. Nei soggetti non allergici i valori di IgE sono normalmente bassi ed esiste una significativa differenza del livello di IgE tra bambini ato-

Figura 1.

Struttura degli anticorpi IgE



pici e non atopici (2). Una ricerca italiana condotta su 6370 soggetti allergici (3), oltre a confermare che il livello delle IgE totali varia in funzione dell'età, ha evidenziato differenti patterns di distribuzione tra i due sessi e una tendenza all'aumento con l'avanzare dell'età. Al contrario le IgE allergene spe-

cifiche diminuiscono man mano che l'età avanza.

Esistono, poi, varie patologie non allergiche e alcune abitudini di vita che si possono accompagnare ad un aumento delle IgE totali, come mostrato nella tabella 2. L'esistenza di una relazione tra i livelli di IgE totali e la pre-



Tabella 1

Valori normali delle IgE nelle diverse età

Nel 1° anno di vita	Fino a 20 UI/ml
Fra 2 e 5 anni	Fino a 80 UI/ml
Fra 6 e 13 anni	Fino a 100 UI/ml
Fra 14 e 20 anni	Fino a 120 UI/ml
Fra 21 e 40 anni	Fino a 260 UI/ml
Fra 41 e 60 anni	Fino a 250 UI/ml
Oltre i 60 anni	Fino a 240 UI/ml

Burgio, *Pediatria Essenziale*, UTET Torino (1961)

valenza o il rischio di comparsa di patologie allergiche, in particolare asma e wheezing, è emersa chiaramente da alcuni importanti studi di coorte (4, 5). Tuttavia, nella gestione del singolo paziente, la misurazione dei valori di IgE totali è di modesta utilità, come confermato dai documenti di consenso delle principali società scientifiche (6).

QUANDO LE IgE POSSONO ESSERE UTILI

Missed allergens

La diagnosi di allergia a inalanti si basa su storia clinica, esame obiettivo e risultato dei test cutanei. Alcuni soggetti, tuttavia, pur avendo una storia clinica molto suggestiva di allergia, risultano negativi ai test allergici. Se i soggetti risultati negativi ai test allergologici iniziali hanno alti valori di IgE totali – nello studio pubblicato il cut-off è pari a 116 kU/L (7) – è consigliabile “allargare” il pannello degli allergeni da testare in quanto potrebbe essere in gioco un allergene non testato (missed allergen); l'utilizzo di un pannello allargato consente di fare diagnosi nel 15% dei

casi risultati inizialmente negativi al test.

Aspergilloso broncopolmonare

La presenza di alti valori di IgE sieriche rientra tra i criteri diagnostici maggiori dell'aspergilloso broncopolmonare. Nel corso del trattamento della malattia, una prolungata riduzione del livello sierico delle IgE rappresenta un indice di successo della terapia e un buon indice prognostico (8).

Immunoterapia allergene specifica

(AIT) – Alcuni anni fa, Di Lorenzo e coll., studiando 279 pazienti adulti affetti da rinite allergica e/o asma, monosensibilizzati e in trattamento con AIT, sia sottocutanea che sublinguale, evidenziarono l'esistenza di una significativa correlazione tra il rapporto dei livelli sierici di IgE specifiche e quello delle IgE totali (s-IgE/t-IgE) e la risposta clinica all'AIT, nel senso che valori di s-IgE/t-IgE superiori a 16.2 si accompagnavano ad una miglior risposta clinica al trattamento immunoterapico (9). Tali osservazioni sono state confermate pochi anni dopo da un altro gruppo di ricerca su popolazione pediatrica (10).

Dermatite atopica

(DA) - La misurazione dei livelli di IgE to-

tali nei bambini affetti da DA può fornire utili indicazioni prognostiche sul decorso e sulla risposta al trattamento. Recentemente Kiiski e coll (11) hanno valutato il valore predittivo delle IgE in 169 bambini affetti da DA a vari livelli di gravità e hanno evidenziato che una buona risposta alla terapia si otteneva nell'80% circa dei pazienti con livelli di IgE inferiori a 1000 ku/L, ma soltanto nel 14,3% di quelli che avevano valori di IgE superiori a 10000 kU/L.

Allergia alimentare

(AA) – Le linee guida della EAACI sulla diagnosi e gestione dell'allergia alimentare (12) mettono in guardia (evidenza di grado IV) sull'interpretazione del dosaggio delle IgE specifiche in soggetti con sospetta allergia alimentare e dermatite atopica in quanto, in presenza di valori elevati di IgE totali, potrebbe trattarsi di una sensibilizzazione asintomatica. Un altro aspetto riguarda la possibile influenza dei livelli di IgE totali sui risultati dei challenges, effettuati al fine di giungere ad una diagnosi di AA IgE mediata. Infatti, uno studio condotto in Giappone (13) dimostra come i soggetti con i livelli di IgE totali più elevati, risultino significativamente meno responsivi al challenge effettuato con il bianco dell'uovo bollito e il latte crudo. Ma il tema che maggiormente interessa sia i clinici che i ricercatori è quello della individuazione di test che siano in grado di predire la reazione avversa all'alimento. Alcuni lavori hanno messo in evidenza che fare riferimento al rapporto s-IgE/t-IgE invece che al solo valore di IgE specifiche (s-IgE) garantisce una maggiore accuratezza nel predire l'esito del challenge (14, 15). Lo stesso dicasi per la valutazione dello sviluppo della tolleranza in bambini di età superiore ai 5 anni con allergia IgE



mediata all'uovo: la performance diagnostica del rapporto s-IgE/t-IgE per ovalbumina è eccellente e, in ogni caso, superiore al dosaggio delle singole IgE specifiche per bianco d'uovo o per ovalbumina o per ovomucoide (16). Il motivo di questo fenomeno non è noto ma si ipotizza che valori più elevati di IgE totali possano contribuire ad innalzare il livello di IgE specifiche clinicamente non rilevanti. Prendendo spunto da tutte queste evidenze, alcuni ricercatori irlandesi hanno realizzato un software online (il Cork-Southampton food challenge outcome calculator) che, partendo da 6 parametri in input (SPT, sIgE, tIgE meno sIgE, sintomi, sesso ed età), è in grado di predire l'esito del challenge per latte e derivati, uovo e arachidi; il software è stato validato su popolazioni pediatriche irlandesi e canadesi e, in base a quanto dicono gli autori, avrebbe un'accuratezza diagnostica del 96% (17).

Allergia al veleno di imenotteri

Occorre sottolineare alcuni aspetti peculiari. Il primo riguarda l'affidabilità del dosaggio

delle IgE specifiche. L'analisi di 51 sieri di pazienti deceduti a causa di una reazione allergica fatale dovuta a puntura di imenottero (18) ha evidenziato valori negativi (<0.22 ng/mL) di IgE contro il veleno nel 10% dei casi e valori molto bassi, compresi tra 0.35 ng/mL e 1.1 ng/mL, nel 47% dei soggetti. Un altro aspetto riguarda l'influenza dei livelli di IgE totali sulla frequenza delle sensibilizzazioni asintomatiche (19). Il grafico mostra le frequenze delle sensibilizzazioni asintomatiche in accordo ai livelli di IgE totali (Figura 2).

Il terzo aspetto concerne l'influenza dei livelli di IgE totali sulla gravità delle reazioni da punture di imenotteri. Analogamente a quanto accade con le sensibilizzazioni asintomatiche, la gravità delle manifestazioni cliniche è inversamente proporzionale al livello di IgE totali (20). Pertanto, il dosaggio di t-IgE può essere utile per interpretare correttamente il significato delle s-IgE, sia nel caso di livelli molto bassi che molto alti di s-IgE, in quanto si possono associare a positività multiple clinicamente non significative.

Tabella 2

Patologie allergiche e non che si accompagnano ad un aumento delle IgE

Malattie parassitarie

Infezioni

Aspergillosi bronco-polmonare
Candidosi sistemica
Mononucleosi
CMV
Infezioni respiratorie virali
HIV
Pertosse

Immunodeficienze

S. di Wiskott-Aldrich
S. da iper IGE
S. di di George
S. di Nezelof
Deficit di IGA

Patologie varie

S. nefrosica
Epatite
Fibrosi cistica
Malattia di Kawasaki
Poliarterite nodosa
S. di Guillain Barré
Artrite reumatoide
Pemfigoide bolloso
Eritema nodoso streptococcico

Abitudini

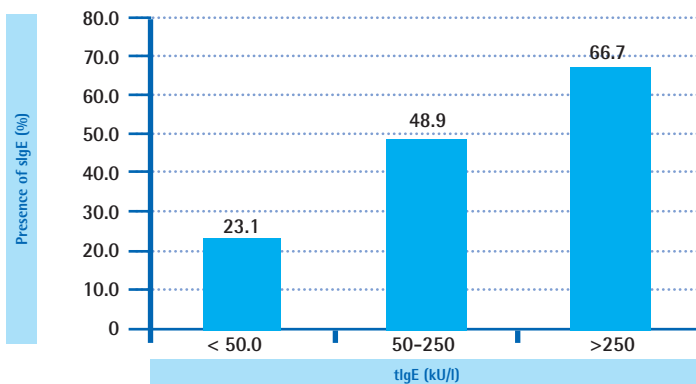
Fumo di sigaretta
Alcolismo

Malattie neoplastiche

Morbo di Hodgkin
Mieloma da IgE
Carcinoma bronchiale

Figura 2.

Livelli di IgE totali e frequenza di sensibilizzazioni asintomatiche





Allergia a antibiotici beta-lattamici

Nel sospetto di una reazione allergica da antibiotici beta-lattamici oggi abbiamo la possibilità di misurare le IgE specifiche verso alcune molecole: penicilline G e V, ampicillina, amoxicillina e cefacloro. La misurazione viene effettuata mediante CAP System, di cui esistono due versioni, una precedente (old test) e una più recente (new test).

Il nuovo test ha evidenziato una maggiore sensibilità 85% vs. 44%) rispetto al vecchio test e una più bassa specificità (54% vs. 80%) ma la performance diagnostica, espressa in "diagnostic odd ratio" (DOR), è bassa (DOR 6.78 vs. 3.16, $P = 0.333$) per entrambi i test. All'analisi delle curve di sensibilità e specificità a differenti livelli di IgE totali, per entrambi i CAP test, si è notato

che le IgE totali influenzano il DOR di tutti e due i test, ottenendosi risultati migliori per valori al di sotto di 200 kU/L per il nuovo test e di 500 kU/L per il vecchio (21). Pertanto, alla luce di queste osservazioni, appare obbligatorio conoscere i valori di t-IgE ed usare la combinazione di entrambi i test in vitro nell'approccio diagnostico alla allergia da beta-lattamici.



Bibliografia

1. Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook MM. Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with gamma-E-globulin antibody. *J Immunol.* 1966; 97(6):840-53.
2. Lindberg RE et al. Levels of IgE in serum from normal children and allergic children as measured by an enzyme immunoassay. *J Allergy Clin Immunol* 1986;78(4 Pt 1):614-8
3. De Amici M, Ciprandi G. The Age Impact on Serum Total and Allergen-Specific IgE. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2013; 5(3):170-174
4. Sears MR et al.-Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *N Engl J Med* 1991;325(15):1067-71
5. Martinez FD, et al. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med* 1995;332:133
6. Bernstein IL, Li JT, Bernstein DI, et al.-Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008;100 (Suppl 3):S1-148
7. Hatcher JL, Cohen SD, Mims JW. Total serum immunoglobulin E as a marker for missed antigens on in vitro allergy screening. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2013; 3(10):782-7.
8. Greenberger PA, Bush RK, Demain JG, et al.-Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2014; 2(3):300-5.
9. Di Lorenzo G, Mansueto P, Pacor ML, et al.-Evaluation of serum s-IgE/total IgE ratio in predicting clinical response to allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 123(5):1103-10.
10. Karakoc GB, Yilmaz M, Altınta DU, et al. Can Serum-Specific IgE/Total IgE Ratio Predict Clinical Response to Allergen-Specific Immunotherapy in Children Monosensitized to House Dust Mite? *J Allergy (Cairo).* 2012;2012:694094
11. Kiiski V, Karlsson O, Remitz A, Reitamo S. High serum total IgE predicts poor long-term outcome in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 2015; 95(8):943-7.
12. Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, et al.-EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy.* 2014;69(8):1008-25
13. Horimukai K, Hayashi K, Tsumura Y, et al. Total serum IgE level influences oral food challenge tests for IgE-mediated food allergies. *Allergy.* 2015; 70(3):334-7.
14. Gupta RS, Lau CH, Hamilton RG, et al. Predicting outcomes of oral food challenges by using the allergen-specific IgE-total IgE ratio. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2014; 2(3):300-5.
15. Machinena-Spera A, Giner-Muñoz MT, Alvaro-Lozano M, et al.-Can total IgE/specific IgE ratio predict tolerance in cow's milk allergic children? *Pediatr Allergy Immunol.* 2014;25(8):823-6.
16. Vazquez-Ortiz M, Machinena-Spera A, Giner MT, et al.-Ovalbumin-specific IgE/total IgE ratio improves the prediction of tolerance development in egg-allergic children aged ≥ 5 years. *Pediatr Allergy Immunol.* 2015; 26(6):580-3.
1. Audrey Dunn-Galvin and Jonathan Hourihane, Department of Paediatrics, Cork University (Ireland)
18. Hoffman DR. Fatal reactions to hymenoptera stings. *Allergy Asthma Proc.* 2003; 24(2):123-7.
19. Sturm GJ, Schuster C, Kranzelbinder B, et al.-Asymptomatic sensitization to hymenoptera venom is related to total IgE levels. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009;148(3):261-4.
20. Sturm GJ, Heinemann A, Schuster C, et al. Influence of total IgE levels on the severity of sting reactions in Hymenoptera venom allergy. *Allergy.* 2007 Aug;62(8):884-9.
21. Vultaggio A, Matucci A, Virgili G, et al. Influence of total serum IgE levels on the in vitro detection of beta-lactams-specific IgE antibodies. *Clin Exp Allergy.* 2009; 39(6):838-44.



RECENSIONI

Immunoterapia con LAIS Acari negli anziani.

Efficacy and safety of sublingual Immunotherapy in Elderly Rhinitis Patients Sensitized to House DustMite

Kim JH, Lee HJ, Park HS et al.

AAIR 2018; 10 (6). 675-685.

Le malattie croniche nell'anziano sono diventate un problema sociale in tutto il mondo con un incremento progressivo delle spese sanitarie. In particolare le malattie croniche dell'apparato respiratorio rappresentano il terzo carico (causa) di morbilità negli anziani con più di 60 anni di età. Sebbene sia opinione comune che le malattie allergiche tendano a diminuire con l'avanzare dell'età, in realtà le suddette sono del tutto sotto-diagnosticate e sotto-stimate in termini di grado di incidenza. Sintomi quali rinite (AR) ed asma sono frequenti nei soggetti allergici, influenzando negativamente sulla loro quality of life.

Come noto gli acari della polvere domestica sono considerati i più comuni indoor inhalant allergens in grado di indurre in soggetti sensibilizzati AR e asma. In aggiunta la immunoterapia specifica (ITS) rappresenta una opzione terapeutica in grado di alleviare i suddetti sintomi per un effetto di immuno-modulazione e allo stesso tempo di prevenire che in tali soggetti si estenda il loro spettro di sensibilizzazione allergica. Stranamente le Guidelines sulla ITS raramente raccomandano (anzi, spesso sconsigliano) l'ITS nei soggetti allergici anziani, partendo dal presupposto che il loro sistema immunitario sia down-regulated e quindi non in grado di trarre beneficio da questa opzione terapeutica. Il valore di questo studio è quindi principalmente legato alla relativa carenza di studi clinici negli over 60 e al fatto di aver esplorato alcuni effetti immunologici in una fascia di età caratterizzata da processi di immunosenescenza. E', infatti, noto che l'immunoterapia specifica riscontri nella giovane età la miglior finestra di opportunità per beneficiare appieno degli effetti disease-modifying, tuttavia l'allergia respiratoria è divenuta un problema emergente anche negli anziani.



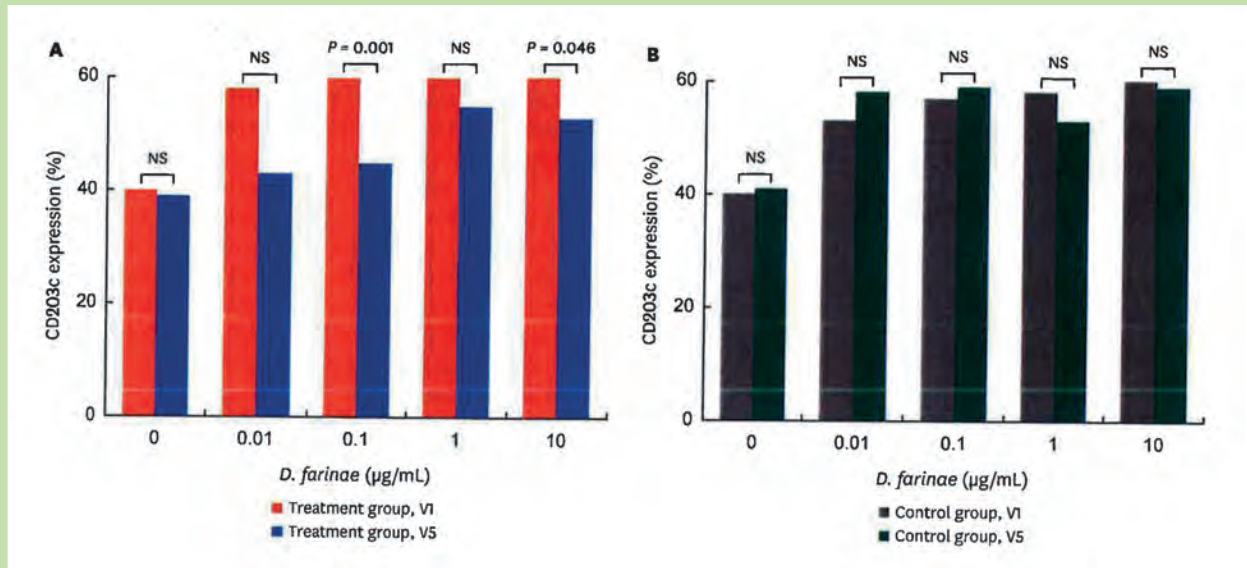
La disponibilità di strumenti terapeutici sicuri e privi di interazione con i numerosi farmaci, che vengono assunti per malattie concomitanti in questa fascia di età, rappresenta quindi una prospettiva interessante. A tale scopo nello studio coreano, condotto secondo le norme della buona pratica clinica, l'immunoterapia sublinguale si è basata sulla somministrazione di estratto modificato di Acari (allergoide, LAIS). Come è noto, questo tipo di prodotto è caratterizzato da una ridotta reattività specifica di legame nei confronti delle IgE, finalizzata al miglioramento del profilo di tollerabilità, quindi dovrebbe risultare vantaggioso anche in una fascia di età suscettibile alle complicanze di eventuali reazioni avverse alla ITS. Aspetto non meno importante dello studio è l'aver indagato e confermato le risposte cliniche in una popolazione di etnia diversa da quella caucasica.

Soggetti coreani di età superiore ai 60 anni affetti da rinocongiuntivite allergica persistente di grado moderato/grave sostenuta da sensibilizzazione ad acari della polvere, alcuni dei quali con asma bronchiale, sono stati arruolati e randomizzati a ricevere il LAIS in compressa oromucosale alla dose di 1,000 AU, due volte la settimana (con ammessi farmaci sintomati-



Figura 1

Sovrapposizione di strutture di Pru



Modificazione della espressione di CD203c nei basofili stimolati con *Dermatophagoides farinae* prima (V1) e dopo il trattamento con LAIS Acari (V5) nel gruppo attivo (A) e nel gruppo di controllo (B). Wilcoxon's signed rank test è stato applicato per la comparazione dei due gruppi. NS: differenza non significativa.

ci al bisogno), a seguito di una fase di induzione di 4 giorni, o in alternativa essere curati secondo le linee guida della terapia farmacologica, ovvero con antistaminici topici ed orali, cortisonici nasali, cortisonici inalatori e broncodilatatori, nel corso di un anno. La sicurezza del trattamento è stata valutata mediante l'esame fisico dei soggetti nel corso delle cinque visite previste e la segnalazione di eventi avversi categorizzati in base a frequenza, durata, intensità e gravità. L'efficacia della cura è stata indagata mediante la raccolta di punteggi relativi a sintomi allergici, qualità della vita (RQLQ) e controllo di asma (ACT) e rinite (RCAT), insieme alla frequenza di utilizzo di farmaci antiallergici e ad una valutazione endoscopica delle mucose nasali. A inizio e fine studio, in tutti i soggetti sono stati raccolti campioni ematici per misurare i livelli di anticorpi specifici IgA, IgE, IgG1, IgG4 verso i dermatofagoidi, oltre alla risposta al test di attivazione dei basofili (BAT).

Dallo studio è emerso che 26 pazienti (età media 67.0 ± 5.8 anni) dopo un anno di trattamento hanno espresso un cospicuo miglioramento statisticamente significativo ($p < 0.001$) della sintomatologia nasale e oculare rispetto alle condizioni di partenza, pur assumendo una minor quantità di farmaci antiallergici rispetto ai 13 pazienti del gruppo di controllo. In termini di punteggio combinato sintomi e farmaci, entrambi i gruppi hanno osservato un miglioramento statisticamente significativo rispetto alle condizioni di partenza, tuttavia il gruppo con immunoterapia ha ottenuto un esito migliore e più robusto dal punto di vista statistico ($p < 0.001$). La valutazione rinoscopica ha documentato un oggettivo miglioramento nei pazienti trattati con immunoterapia ($p < 0.05$), variazione invece non statisticamente significativa nel gruppo di controllo. Nel corso dello studio la qualità della vita dei pazienti è migliorata progressivamente, avvicinandosi alla significatività statistica solo



nel gruppo con immunoterapia ($p=0.053$); i questionari sul controllo della rinite hanno riportato un lieve miglioramento nel gruppo trattato, mentre quelli sul controllo dell'asma non hanno individuato variazioni degne di nota, probabilmente per l'esiguo numero di soggetti asmatici coinvolti.

Dal punto di vista immunologico in entrambi i gruppi non si è assistito a variazioni rispetto al basale nei livelli di IgE ed IgG specifiche, tuttavia i livelli serici di IgA verso i dermatofagoidi sono curiosamente diminuiti in maniera significativa nel gruppo trattato con immunoterapia, suggerendo nuove ipotesi di ricerca in questa direzione. Il test di attivazione dei basofili (BAT) ha evidenziato una diminuzione statisticamente significativa nella espressione del CD203c rispetto al basale solo nel gruppo trattato con allergoide ($p < 0.05$) (Figura 1).

Tale CD203c è un marker di superficie dei basofili e la sua espressione è rapidamente up-regulated dopo il legame dell'allergene al recettore ad alta affinità delle IgE (FcεR1). Questo sembrerebbe suggerire che il beneficio clinico indotto dal LAIS sia legato ad una riduzione della reattività dei basofili agli acari.

Per quanto riguarda gli eventi avversi, nel corso di un anno sono stati riportati esigui episodi di esacerbazione di rinite (13.3% dei pazienti), di congiuntivite (13.3%), di asma (10%), episodi di tosse (10%), di cefalea (3.3%), di prurito cutaneo (10%), di infezione delle alte vie respiratorie (20%), senza differenze in termini di frequenza con il gruppo di controllo. Tutte le reazioni sono state indicate come lievi e a guarigione completa senza complicanze. Non sono stati riportati eventi avversi di tipo locale (irritazione e prurito del cavo orale), né eventi seri riconducibili causalmente al trattamento.

Dai risultati di questo studio emerge che il ricorso all'ITS nei soggetti di età superiore a 60 anni permette un contenimento dell'utilizzo di farmaci sintomatici per il controllo dei disturbi causati dalla rinocongiuntivite persistente legata agli acari della polvere. I farmaci anti-allergici sono efficaci ma non sempre privi di effetti collaterali. Basti pensare agli antistaminici, non di rado responsabili di ritenzione urinaria, secchezza delle fauci, stipsi, aritmie, cefalea, capogiri, sedazione ed affaticamento, nausea; gli steroidi, anche topici, possono essere causare infezioni del tratto respiratorio, epistassi, cefalea, faringite, bruciole nasale e ulcerazioni nasali oltre al rischio di effetti sistemici.

Tutti questi effetti divengono maggiormente invalidanti in fasce di età avanzate, maggiormente suscettibili a poli-patologie, che richiedono relativi trattamenti farmacologici.

In conclusione, mentre sino a pochi anni fa si riteneva che l'immunoterapia specifica fosse controindicata nelle persone anziane, per la ridotta efficienza del sistema immunitario, oggi possiamo affermare che essa verosimilmente mantenga proprietà immunomodulatorie in grado apportare benefici clinicamente riscontrabili, avvantaggiandosi di un profilo di tollerabilità favorevole quando somministrata per via sublinguale. Quest'ultimo aspetto risulta particolarmente accentuato dall'utilizzo di allergoidi a ridotta allergenicità, in grado di veder minimizzati persino i più comuni eventi avversi locali.

E.C.

Allergia alla birra: attenzione agli allergeni nascosti

Beer anaphylaxis due to coriander
as hidden allergen

Brussino L., Rolla G. et al.

BMJ Case Rep. 2018. pii: bcr-2018-225562

Gli autori descrivono un caso di anafilassi molto originale, più precisamente viene descritto il caso di una donna di 29 anni che ha avuto un episodio di anafilassi subito dopo aver bevuto un sorso di birra artigianale. La donna, che soffriva di rinite allergica da pollini di betulla e nocciolo ed era sensibilizzata al polline di Graminacee ma in assenza di allergie alimentari, si è presentata al pronto soccorso con starnuti, rinorrea acquosa, angioedema alla palpebra, difficoltà a respirare e prurito intenso e diffuso. Dopo il trattamento con antistaminici orali (cetirizina 10 mg) e glucocorticoidi (prednisone 25 mg), tutti i sintomi sono scomparsi nel giro di un'ora. Due mesi dopo l'evento, la donna si è recata al dipartimento di allergologia dell'A.O. Ordine Mauriziano (Torino) mostrando ai medici un'immagine della bottiglia che conteneva la birra che sospettava essere la causa della reazione allergica. Nell'elenco degli ingredienti riportati in etichetta vi era-



RECENSIONI

no malto Pilsner e Maris Otter, luppolo Magnum, Amarillo e Centennial, ma nessuna indicazione relativa agli aromi. I medici hanno deciso quindi di contattare direttamente il birrifico artigianale che aveva prodotto la birra per ottenere informazioni più dettagliate sugli ingredienti, scoprendo così che venivano utilizzati anche semi di coriandolo macinati (1 g di semi per litro di birra).

Per la valutazione diagnostica sono stati condotti skin prick test, test di provocazione orale (oral challenge test) e determinazione

delle IgE specifiche per semi di coriandolo e per allergeni di polline di betulla (Bet v 1 e Bet v 2).

Sono stati condotti skin prick test con estratti commerciali di lievito e luppolo e per allergeni inalatori comuni, che sono risultati positivi solo per estratti di polline di betulla, nocciolo e graminacee. Sono stati anche eseguiti prick by prick test con alimenti naturali: malto d'orzo, due tipi di birra e semi di coriandolo frantumati. Sono state osservate reazioni positive solo alla birra aromatizzata al coriandolo (pomfo di 5 mm e eritema di 12 mm di diametro) e ai semi di coriandolo (pomfo di 8 mm e eritema di 20 mm) (Foto 1). Le IgE specifiche erano positive per estratto di semi di coriandolo (2.12 kUA/L) e per Bet v 1 (3.69 kUA/L); negative per Bet v 2.

Il test di provocazione orale è stato condotto con semi di coriandolo frantumati alla dose di 5, 50 e 100 mg. 15 min dopo la dose da 50 mg la paziente ha avuto congestione nasale, rinorrea, e visibile angioedema labiale, orticaria generalizzata e una sensazione di tensione in gola. I sintomi si sono placati dopo somministrazione di epinefrina intramuscolare.

In seguito, alla paziente è stata fornita epinefrina auto-iniettabile, invitandola comunque ad evitare di ingerire coriandolo anche a basse quantità. La donna ha ricominciato a bere birra non aromatizzata dopo l'episodio anafilattico, e alla visita di follow-up a 6 mesi di distanza non ha riportato alcuna reazione allergica.

Questo lavoro pone l'attenzione sui rischi degli allergeni nascosti. La birra è una delle bevande più consumate al mondo, ma i casi di reazioni allergiche sono piuttosto rari, e principalmente sono legati ad allergia a orzo, lievito o luppolo. Il ruolo dell'alcool come possibile co-fattore non è però da escludere. Di recente, è diventato popolare aromatizzare cibi e bevande, inclusa la birra, con aromi naturali, come coriandolo, aneto, finocchio e cumino. Questo ha portato ad un aumento di reazioni allergiche alla birra, come quella descritta in questo articolo. È importante sottolineare che la presenza degli aromi aggiunti non è sempre riportata nelle etichette, e per questo possono essere ritenuti allergeni nascosti. Il coriandolo non rientra tra i 14 allergeni da dichiarare per legge; va però sottolineato che l'allergia al coriandolo è assai rara ed è solitamente legata all'esposizione occupazionale o per ingestione involontaria dovuta all'uso di particolari salse (teriyaki sauce) contenente la spezia. Da sottolineare che i semi di coriandolo

Figura 1 SPT positivo per la birra aromatizzata



SPT positivo per la birra aromatizzata con il coriandolo (B) e per i semi di coriandolo (Cor); + e - si riferiscono al controllo positivo (istamina) e controllo negativo, rispettivamente.



Semi di coriandolo

sono aggiunti in certi tipi di birra belghe e tedesche. Inoltre semi di coriandolo sono aggiunti in alcuni piatti tradizionali come la Yemeni-Israeli spicy sauce usata come accompagnamento dei felafel o il Mexican "Pescado En Cilantro", essenzialmente un piatto di pesce cucinato con salsa di coriandolo. In letteratura alcune osservazioni cliniche sembrano suggerire che l'allergia al polline di Betulla, in particolare a Bet v1 o Bet v2, può essere associata a reazioni anafilattiche al coriandolo. Anche questo caso apparentemente sembra rientrare in questa categoria. Tuttavia, gli autori ritengono improbabile che la reazione della ragazza sia stata scatenata da un allergene del coriandolo omologo all'allergene Bet v 1, poiché questo tipo di proteine è termolabile, quindi molto probabilmente denaturate o durante il processo di pastorizzazione della birra. Altri allergeni termo-resistenti (non però il Bet v2 perché la negatività IgE) possono essere implicati in questi fenomeni. Gli autori hanno poi voluto mettere in evidenza che, sebbene la paziente sia stata curata al pronto soccorso con successo grazie all'impiego di anti-istaminici e glucorticoidi, questo approccio terapeutico non sarebbe l'ideale. Infatti le linee guida raccomandano di usare l'epinefrina ai primi segni di anafilassi come era questo caso. Purtroppo l'epinefrina risulta ancora sotto-usata nei pronto soccorso e questo può poi tradursi in eventi fatali.

G.M.

Il Lisozima: un nuovo allergene del latte di asina

Lysozyme, a new allergen in donkey 's milk

Martini M., Swiontek K. Antonicelli L. et al.
Clin Exp Allergy. 2018;00:1-3.

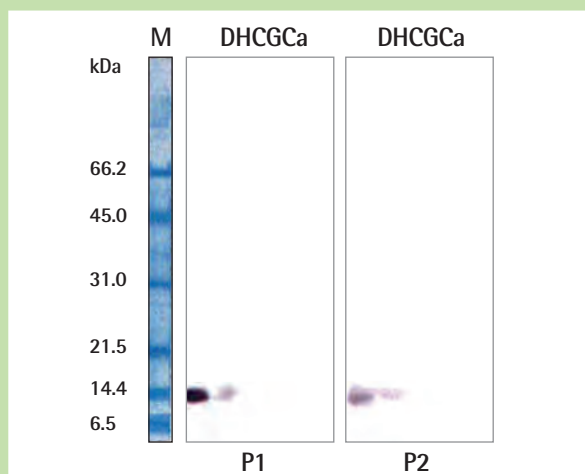
L'uso del latte di asina come pratica di bellezza risale a diversi secoli fa e donne famose come Cleopatra, Poppea e Paolina Bonaparte erano solite immergersi in una vasca piena di latte d'asina nell'intento di migliorare la propria avvenenza. Oggi il latte di asina è utilizzato in campo alimentare ma rientra anche nella composizione di svariati prodotti cosmetici. Seppur il latte di asina in virtù delle sue caratteristiche organolettiche che lo rendono molto simile al latte materno, sia consigliato come alternativa al latte vaccino per lo svezzamento dei poppanti allergici al latte vaccino, qualche caso di anafilassi in seguito all'assunzione di latte di asina è stato riportato in letteratura.



Latte d'asina



Figura 1 Risultati di immunoblotting con i sieri dei pazienti (1 e 2).



Lines: M, standard di peso molecolare; D, latte di asina; H, latte di cavalla; C, latte di mucca; G, latte di capra; Ca, latte di cammella.

In questo articolo, il gruppo di autori tra cui il sottoscritto, descrivono due casi particolari di allergia al latte di asina.

Il primo caso riguarda una ragazza di 9 anni che ha mostrato un episodio di orticaria acuta generalizzata dopo una prima applicazione di una crema contenente latte di asina. La ragazza non aveva mai assunto latte di asina ma usava comunemente una saponetta contenente latte di asina. La sua storia clinica era caratterizzata da episodi di reazioni anafilattiche a noci e arachidi, mentre risultava negativa sia alla forfora di cavallo e asina che al latte ovvero ai formaggi di mucca, capra e pecora. L'esecuzione di un prick by prick risultava invece positivo sia per latte di asina che per la crema contenente il latte di asina.

Il secondo caso si riferisce ad una donna di 33 anni giunta al pronto soccorso con un angioedema delle labbra, palpebre e mani. I sintomi erano apparsi pochi minuti dopo aver "testato" un paio di gocce di latte di asina per verificarne la temperatura prima di farlo assumere al suo bambino. La storia clinica della paziente mise in evidenza la presenza di una rinite moderata persistente verso acari, polline di Poacee oltre

a forfora di gatto e cane; inoltre la stessa riferiva di episodi di dermatite atopica conseguenti all'uso di cosmetici a base di latte di asina. La paziente risultava negativa al latte vaccino mentre il prick by prick era positivo per latte di asina e crema a base di latte di asina.

Per cercare di individuare a quali componenti del latte di asina le pazienti si erano sensibilizzate, sono state effettuate una serie di analisi. In particolare il siero di entrambi i soggetti quando testato in immunoblotting, mostrava una notevole reattività IgE nei confronti di una banda a 14 kDa presente nel latte di asina; tale positività, anche se di minore intensità, si riscontrava anche nei confronti del latte di cavalla mentre i sieri erano del tutto negativi nei confronti del latte di mucca, capra e cammella (Figura 1).

Una analisi della banda mediante spettrometria di massa consentì di identificare che la componente in questione era il lisozima. Successive prove di inibizione dell'immunoblotting con il lisozima purificato da latte di asina o cavalla hanno confermato il dato. La positività al lisozima di asina e cavalla può essere spiegata dalla notevole identità di sequenza delle due proteine. Il fatto poi che il lisozima sia in grado di indurre una reazione allergica anche quando presente in un prodotto cosmetico (risultato di un complesso processo industriale che può anche prevedere l'impiego di certe temperature) è dovuto alla sua termoresistenza. In base alla identità di sequenza (53%), ci si poteva aspettare un fenomeno di cross-reattività tra lisozima di asina e lisozima di mucca; i sieri dei soggetti in esame, come indicato in precedenza, risultavano però negativi sia all'immunoblotting verso il latte vaccino che al prick. In aggiunta i soggetti risultavano negativi anche al lisozima di uovo.

In conclusione gli autori di questo lavoro hanno messo in evidenza per la prima volta il ruolo del lisozima nella allergia al latte di asina in pazienti tolleranti al latte vaccino. Da sottolineare che in entrambi i casi la sensibilizzazione è avvenuta attraverso un pathway percutaneo visto che esse non avevano mai assunto latte di asina in precedenza. L'impiego quindi di cosmetici contenenti proteine di origine alimentare possono costituire un rischio nel successivo sviluppo di reazioni allergiche, soprattutto in soggetti con disfunzioni della loro barriera cutanea.

G.M.



Nail art e dermatite da contatto

Allergic contact dermatitis caused by (meth)acrylates in long-lasting nail polish – are we facing a new epidemic in the beauty industry?

Gatica-Ortega ME et al.

Contact Dermatitis. 2017;77(6):360-366.

La storia dell'amore tra le donne e le loro unghie ha radici molto antiche. In particolare il concetto di manicure ha inizio in India oltre 5000 anni fa, con l'uso dell'henné come una vernice per unghie. In Cina l'uso dello smalto fu introdotto nel 300 a.c. come un modo per indicare ricchezza e status sociale. Anche in Egitto le donne usavano smaltarsi unghie. I metodi degli egiziani erano diversi da quelli in uso in Cina, ma il colore indicava comunque lo stato sociale, con tonalità di rosso profondo riservati per quelli di alto rango. Cleopatra e Nefertiti, grandi regine anche di seduzione, furono grandi fan di henné per la colorazione delle unghie.

La prima utilizzava toni tendenti al cremisi, mentre la seconda prediligeva il rosso rubino. Ma i padri della "nail art" furono gli Inca che dipingevano immagini di aquile sulla punta delle dita. Da tempo si assiste ad un boom delle attività legate alla cura e all'abbellimento delle unghie e le donne non si accontentano più infatti dei semplici smalti per unghie. Mai come oggi le unghie sono considerate una parte del corpo su cui manifestare l'estro artistico (a volte anche un po' ardito) e mai come oggi la nail art, grazie allo sviluppo di nuove tecnologie e materiali, può realizzarsi con una varietà di colori e di forme del tutto impensabili solo pochi anni fa.

L'uso sfrenato e continuativo di questa nuova forma di cosmesi può però comportare qualche rischio della salute. Ne sono un esempio i prodotti utilizzati per la manicure, come messo in evidenza da Gatica-Ortega e colleghi in un lavoro recentemente pubblicato sulla rivista *Contact Dermatitis*. Si tratta di uno studio osservazionale retrospettivo che ha valutato i segni clinici della dermatite allergica da contatto (allergic contact dermatitis, ACD) associata ad acrilati e metacrilati, qui

di seguito indicati come (met)acrilati, presenti nello smalto per unghie a lunga durata (smalto semipermanente). L'ACD coinvolge una risposta allergica cellulo-mediata, e rappresenta una reazione di ipersensibilità ritardata di tipo IV a un antigene specifico a cui il paziente è stato precedentemente esposto. I metacrilati sono composti derivati dell'acido acrilico [o acido 2-propenoico] e dell'acido metacrilico [o acido 2-metilpropenoico], sono monomeri comuni nella plastica polimerica e trovano utilizzo in svariati campi (resine acriliche, collanti, colori acrilici, materiale per rivestimenti, materiali assorbenti...). I metacrilati sono anche presenti nei tre principali prodotti per la manicure acrilica: 1) le unghie in acrilico, consigliato nel caso di ricostruzione dell'unghia, dove si utilizzano un monomero liquido e un polimero in polvere, e si induriscono all'aria; 2) le unghie in gel: sono composte da un materiale acrilico che però necessita di luce UV per favorire la polimerizzazione; e infine, (3) lo smalto semipermanente, oggetto dello studio, che viene applicato come uno smalto tradizionale. Solitamente, si applicano almeno tre strati, il primo (base) e l'ultimo (finitura) trasparenti e quello intermedio colorato. Tutti gli strati contengono metacrilati e, dopo l'applicazione di ogni strato, è richiesta una breve esposizione a una lampada UV o LED per consentire la polimerizzazione.





RECENSIONI

Sebbene esistano diversi studi sul rischio di esposizione ai (met)acrilati con la manicure acrilica in generale, poco è noto sull'impatto specifico dello smalto semipermanente, che per via delle sue caratteristiche, minor tempo (15-30 min, contro 1-2 ore per le altre tecniche), costi ridotti, facilità di applicazione e risultato duraturo, è sempre più popolare tra le donne. Lo studio ha coinvolto un totale di 2353 pazienti (1514 femmine e 839 maschi) sottoposti a patch test tra il 2013 e il 2016 in 4 diversi ospedali spagnoli. Il tempo d'esposizione per il patch test è stato di due giorni e le letture sono state fatte al secondo e quarto giorno dall'applicazione. Per tutti i pazienti sono stati raccolti ed analizzati i dati personali, le caratteristiche cliniche, la localizzazione della dermatite e i risultati del patch test. Inoltre, nel caso di esposizione professionale, sono state anche prese in considerazione le informazioni riguardanti il numero di clienti al giorno, il tempo impiegato per la procedura, il grado di esperienza e formazione delle estetiste. Dopo la diagnosi, ai pazienti è stato suggerito di utilizzare dispositivi di protezione individuale quali maschere, occhiali e soprattutto speciali protezioni per le dita, ottenute da guanti Silver Shield®/4H®, da indossare sotto ai classici guanti in nitrile. Sono poi state condotte interviste telefoniche per verificare la capacità di continuare a lavorare e il rispetto delle misure di prevenzione secondaria. Infine, è stata anche valutata l'esposizione ad altre fonti di metacrilati.



L'ACD da metacrilati è stata diagnosticata in circa il 2% dei pazienti (n=43), tutte donne e con un'età media di 35 anni. La maggior parte delle pazienti (93%, n=40) lavorava come estetista, alcune (n=10) anche come parrucchiera. Di queste, 23 applicavano lo smalto anche sulle proprie mani. 27 estetiste applicavano solo smalto semipermanente, e per loro il tempo medio per lo sviluppo dei sintomi di ACD è stato di circa 10 mesi e mezzo (range 2 settimane – 72 mesi) dalla prima esposizione allo smalto semipermanente. Altre 13 pazienti applicavano anche altri tipi di unghie acriliche, con un tempo di latenza di 9,5 anni (intervallo: 2-30 anni) dalla prima esposizione a metacrilati di qualsiasi tipo (anche unghie acriliche o in gel). Sulla base delle informazioni fornite da 25 estetiste, il numero di clienti variava da 2 clienti al mese a 100 clienti a settimana, ma per la maggior parte era superiore a 10 clienti a settimana. In tutti i pazienti è stato osservato il coinvolgimento delle dita, con eczema più severo solitamente sulla mano dominante. Sono state osservate due fasi cliniche, una prima fase acuta con dermatite vescicolare pruriginosa, e una seconda fase cronica caratterizzata da dermatite con fessurazione dei polpastrelli. Oltre alle dita, nel 45% delle pazienti esposte professionalmente, sono state colpite da dermatite anche palpebre e guance (in 15 casi); avambracci (in 5); dorso delle mani (in 3); cosce (in 3) e l'addome in una paziente. Sono stati riportati anche altri sintomi, tra cui parestesia in circa il 23% delle pazienti totali edema transitorio del viso, delle palpebre e/o delle labbra nel 9,3%; e sintomi del tratto respiratorio superiore nel 14,0% dei casi. Una paziente ha sviluppato un'orticaria acuta generalizzata con lesioni, e si è dovuta recare al pronto soccorso. La maggior parte dei pazienti aveva un certo grado di onicolisi, ma non sono state osservate distrofie severe dell'unghia. Gli agenti sensibilizzanti più frequentemente positivi erano HPMA (2-idrossipropilmetacrilato) che ha indotto reazioni in tutti le pazienti tranne una; HEMA (2-idrossietilmetacrilato) e THFMA (tetraidrofurfuril metacrilato). Questi composti erano anche quelli più frequentemente presenti sull'etichetta degli smalti forniti dalle pazienti. In tutti i casi sono state osservate reazioni multiple, molte delle quali forti (++) o fortissime (+++). 20 delle pazienti hanno anche avuto reazioni positive ad altri allergeni, soprattutto nichel (30,2%) e tiomersale (9,3%). Le interviste telefoniche a 22 pazienti sono



state condotte da 4 a 43 mesi dopo la diagnosi; 16 pazienti hanno continuato a lavorare, la metà usando le protezioni per mani, ma solo 2 la maschera, e nessuna ha usato gli occhiali. In conclusione, questo lavoro pone l'attenzione su un fenomeno in crescita, ossia la sensibilizzazione ai (met)acrilati presenti nei prodotti per la manicure, in particolare negli smalti semipermanenti. Questi sono infatti sempre più diffusi per via della facilità di applicazione, dei tempi e dei costi ridotti, e per la qualità del risultato. Le estetiste rappresentano la popolazione più esposta, ed entrano più facilmente in contatto con il (met)acrilato prima della polimerizzazione, poiché tendono a rimuovere l'eccesso di prodotto con le dita non protette. Inoltre, la formazione è scarsa e non include informazioni rilevanti sulla sicurezza e sui dispositivi di protezione individuale. E' molto probabile che il rischio sia sottostimato, poiché oggi è possibile acquistare facilmente l'occorrente per applicare da sole a casa gli smalti semipermanenti. Ne deriva che molto probabilmente i numeri aumenteranno ulteriormente, e per questo gli autori parlano di "nuova epidemia", sottolineando la necessità di normative che regolino il marketing e l'uso di questi prodotti da parte di personale adeguatamente formato e l'implementazione di misure di prevenzione primarie. **G.M.**

L'esofagite eosinofila è equivalente all'asma da pollini?

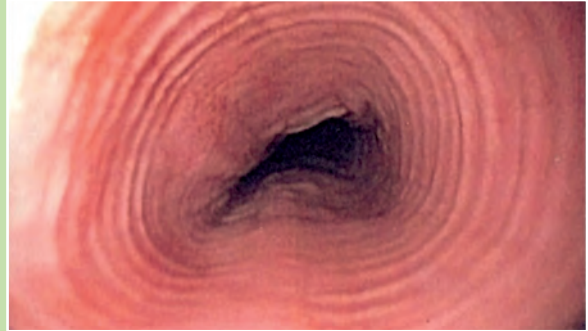
Is eosinophilic esophagitis an equivalent of pollen allergic asthma? Analysis of biopsies and therapy guided by component resolved diagnosis.

Armentia A et al.

Allergol Immunopathol (Madr). 2018 Mar - Apr;46(2):181-189.

L'esofagite eosinofila (EoE), è una malattia infiammatoria cronica immuno-mediata dell'esofago, la cui eziologia non è del tutto chiara ma che presenta un'istologia caratteristica. E' infatti contraddistinta da un'alterazione della mucosa dell'esofago che, dalla biopsia endoscopica, mostra infiltrazione eosinofila. Inoltre, sulla parete esofagea possono essere

Figura 1



L'analisi endoscopica mostra una fragilità mucosale accompagnata da solchi e anelli e da una riduzione notevole del calibro dell'esofago

visibili solchi o anelli multipli (Figura1).

Nell'EoE la risposta infiammatoria è di tipo Th2 e si osserva una disfunzione della barriera mucosa dovuta a cambiamenti molecolari, tra cui una disregolazione della desmogleina 1, proteina essenziale nell'adesione cellulare.

Si stima che la prevalenza sia dello 0,4% in bambini e adulti, principalmente di sesso maschile. I soggetti affetti da EoE solitamente presentano difficoltà di deglutizione (disfagia), occlusione esofagea da bolo alimentare (food impaction) e, a volte, bruciore di stomaco e dolore toracico. Inoltre, i pazienti possono soffrire anche di rinocongiuntivite, dermatite atopica e asma. Una sensibilizzazione ad aeroallergeni è stata identificata nell'87% dei pazienti con EoE e spesso si osservano esacerbazioni stagionali della malattia.

Secondo alcuni autori non esiste una chiara utilità clinica nell'identificazione della sensibilità alimentare negli adulti con EoE, mentre altri studi mostrano invece l'efficacia di diete di eliminazione basate sulla diagnostica allergologica molecolare (*Component Resolved Diagnosis, CRD*).

Gli autori hanno impostato il loro lavoro ipotizzando che le mucose esofagee e bronchiali, data la loro comune origine embrionale, possano rispondere con meccanismi infiammatori simili agli stimoli allergenici. Secondo questa ipotesi il peggioramento stagionale dell'EoE in pazienti con elevati livelli di IgE specifiche potrebbe essere causato dall'ingestione involontaria di granuli di



polline presenti nell'aria. A livello della mucosa esofagea, i pollini potrebbero poi germinare, facilitati da pH e umidità adeguati e dalla barriera mucosa alterata.

Lo studio è stato quindi indirizzato a: 1) ottenere una diagnosi eziologica accurata dell'EoE mediante test allergologici standard e CRD; 2) dimostrare un ruolo patogeno per gli allergeni ambientali nell'EoE (secondo i postulati di Koch-Henle¹), utilizzando anche tecniche d'istologia vegetale; 3) valutare l'efficacia dell'AIT e/o di una dieta specifica di eliminazione disegnatasi sulla base della CRD.

Lo studio, di tipo osservazionale longitudinale, ha coinvolto 129 pazienti con EoE e 3 gruppi di confronto: 50 soggetti sani (senza problemi digestivi o allergici); 50 con asma da polline, inclusi sulla base di skin prick test (SPT) positivo, IgE specifiche per allergeni pollinici e spirometria, e 53 pazienti pediatrici celiaci (CD) confermata da indagini cliniche, sierologiche e biopsia. Quest'ultimo gruppo è stato incluso data la comorbidità osservata tra EoE e celiachia.

I soggetti affetti da EoE sono stati inclusi nello studio sulla base dei seguenti criteri: diagnosi di EoE (basata su sintomi di food impaction e >15 eosinofili/campo su biopsia), seguiti dal loro servizio di gastroenterologia dal 2010, con un trial sull'effetto degli inibitori di pompa protonica (PPI), trattati per almeno nove mesi con terapie convenzionali senza miglioramenti clinici. I pazienti arruolati sono stati sottoposti ad anamnesi clinica, SPT, determinazione di IgE-specifiche mediante ImmunoCAP e CRD, valutazione del grado di disfagia ed endoscopia con biopsia.

I 129 pazienti con EoE sono stati sottoposti a terapia standard (PPI, corticosteroidi orali, associati a six-food diet, una dieta che prevede l'eliminazione dei 6 alimenti che più spesso causano allergie) oppure a dieta di eliminazione specifica e/o ITS (immunoterapia specifica per via sottocutanea o sublinguale) definiti sulla base della CRD.

L'ITS (sublinguale) è stata somministrata anche a pazienti CD con IgE positive a pollini di graminacee e/o allergeni del grano. L'ITS è stata somministrata per tre anni, con controlli clinici e istologici ogni sei mesi. In particolare, le biopsie esofagee sono state eseguite su pazienti EoE, CD e sui controlli che hanno accettato (15 soggetti sani e 14 asmatici).

Sulle biopsie, oltre all'osservazione dei tessuti umani mediante colorazione con blu di toluidina, sono state anche condotte inda-

gini di microscopia a fluorescenza per evidenziare la presenza di tubetti pollinici mediante l'uso di un fluorocromo specifico per il callosio, un polisaccaride di origine vegetale, che viene anche depositato nei tubetti pollinici. Inoltre, pollini e altri elementi vegetali nella mucosa esofagea sono stati esaminati mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) in pazienti e controlli sani. Tutti i pazienti EoE e tutti i controlli hanno completato l'intero protocollo. La CRD ha rilevato un'ipersensibilità ad allergeni in quasi il 90% dei pazienti con EoE. Nello specifico, gli allergeni predominanti erano il gruppo 1 del polline di graminacee (55% contro un 24% nei pazienti CD) e LTP (lipid transfer protein) di pesca (20,9% vs 5,7% nei CD), polline di artemisia (20,2% vs 7,5% nei CD) e nocciola (18,6% vs 7,5% nei CD). Altre sensibilizzazioni sono state rilevate verso 2S albumine di noce (17,8% vs 5,7% nei CD), profilina (11,6% vs 5,7% nei CD) e verso un allergene maggiore di Anisakis, Ani s 1 (12,4% vs 0% nei CD). Le indagini istologiche hanno rilevato la presenza di pollini e/o tubetti pollinici infiltranti in 80 pazienti EoE (65,6%), 55 con CRD positiva agli allergeni del gruppo 1 delle graminacee e 25 ad altre miscele polliniche. Le indagini al SEM hanno mostrato la presenza di numerosi pollini disidratati di Poaceae infiltrati negli spazi intercellulari, nelle biopsie ottenute in primavera/estate.

Dei 129 pazienti EoE, 91 hanno ricevuto AIT (68 di questi in combinazione con dieta di eliminazione) e 19 solo dieta di eliminazione. Il confronto tra i pazienti con EoE sensibilizzati ai pollini che hanno ricevuto o meno l'ITS ha mostrato esiti migliori nei pazienti trattati.

Dopo due anni di ITS e/o dieta eliminazione su CRD, i pazienti EoE hanno mostrato un significativo miglioramento clinico, l'infiltrato eosinofilo si era notevolmente ridotto (da una media di 130 eosinofili/campo a 3/campo) e anche la presenza di callosio era diminuita significativamente nei pazienti trattati con ITS.

I risultati di questo studio mostrano che nei pazienti EoE è stata riscontrata un'elevata incidenza di sensibilizzazione ai pollini ingeriti. La dieta di eliminazione e/o l'ITS definiti in base allo spettro di sensibilizzazione hanno portato ad importanti miglioramenti nei pazienti affetti da EoE.

G.M.

¹ I postulati di Koch-Henle sono dei criteri destinati a stabilire la relazione di causa-effetto che lega un agente patogeno ad una malattia.

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

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