

Eleonora Savi, Marcello Montagni, Silvia Peveri

## Nuova diagnostica allergologica in vitro e sua applicazione nelle allergopatie professionali

Unità operativa Dipartimentale di Allergologia Ospedale G. Da Saliceto Ausl Piacenza

**RIASSUNTO.** La diagnostica molecolare è un nuovo approccio diagnostico che – consente di individuare la sensibilizzazione verso una singola molecola all'interno della fonte allergenica e avere importanti informazioni sulla rilevanza clinica: la sensibilizzazione a molecole come l'alfa amilasi del grano, o le lipocaline degli animali o la molecola Alt a 1 della alternaria a Hev b6 del lattice correla con un elevato rischio di sviluppare asma bronchiale – ha una maggior sensibilità nella ricerca delle IgE specifiche rispetto alla fonte in toto.

**Parole chiave:** diagnosi molecolare, IgE.

**ABSTRACT.** NEW IN VITRO ALLERGOLOGICAL DIAGNOSTIC TOOL AND ITS APPLICATION IN PROFESSIONAL DISEASE. *Molecular diagnostic is a new therapeutic approach that – allows to evaluate sensitization towards a single molecule in a allergenic source and to obtain relevant information on clinical features: sensitization towards molecules as alfa amylase of wheat or lipocalins of pets, Alt a 1 of alternaria spores and Hev b 6 of latex correlates with the risk to develop asthma – has a greater sensitivity in the serum IgE identification than the whole source.*

**Key words:** molecular diagnosis, IgE.

La diagnostica molecolare è uno strumento a disposizione dell'allergologo che consente di individuare la sensibilizzazione verso una singola molecola all'interno della fonte allergenica con maggior sensibilità talvolta rispetto alla ricerca sulla fonte in toto. Consente di valutare, nell'ambito dell'allergia ad alimenti il risk assessment in base alle caratteristiche di stabilità al calore e agli enzimi digestivi della molecola sensibilizzante e quindi avere informazioni su rischio di indurre reazioni anafilattiche severe in caso di ingestione o inalazione; nelle allergie respiratorie individua la sensibilizzazione verso molecole "genuine" specifiche di quella fonte e verso "pan allergeni" condivisi da più fonti indirizzando quindi anche la scelta dell'immunoterapia (1). Può inoltre identificare, le IgE verso la molecola sensibilizzante che provoca la reazione allergica respiratoria professionale: Albumina sierica, Molecole della farina del grano glutine, gliadina, LTP del grano, del riso e del mais, inibitore Alfa amilasi, inoltre il Lisozima, le molecole dell'aspergillo Asp f 1, 3, 6, marcatori di patologie gravi quali l'Aspergilloso broncopolmonare e l'asma severa da aspergillo e Alt a 1 marcatore di asma da alternaria.

Gli allergeni sono delle proteine o delle glicoproteine il loro peso molecolare (PM) varia tra i 4 kDa ad oltre 150 kDa.

**Acari della polvere:** sono gli allergeni principali della polvere di casa, dei magazzini, delle derrate alimentari. Il *Dermatophagoides farinae* (DF) e il *Dermatophagoides pteronyssinus* (DP). Il DF è la principale causa di sensibilizzazione e di reazioni allergiche indoor sia in Italia che nel resto d'Europa, mentre nelle aree tropicali e subtropicali le maggiori fonti di allergene sono il DP la *Blomia tropicalis* un acaro delle derrate. Le più importanti molecole allergeniche del DF e del DP sono rispettivamente Der f 1 e Der f 2 e Der p 1 Der p 2 e Der p 23 (peritrofina) sono le prime molecole che inducono la sensibilizzazione agli acari. È stato dimostrato che oltre il 90% dei sieri di soggetti sensibilizzati ad acari ha IgE per Der p 1 and Der p 2 e Der p 23 o per Der f 1 e Der f 2 (2, 3).

**Derivati animali:** roditori, conigli, ma anche gatti, cani, maiali e pecore, vengono utilizzati in tutto il mondo nei laboratori a fini scientifici e l'allergia ai derivati di questi è frequente nei paesi in cui la ricerca medica e veterinaria è sviluppata. I soggetti sensibilizzati al gatto reagiscono spesso anche a contatto con il cane e con altri

animali come cavallo, roditori, maiale: questo è dovuto alla sensibilizzazione verso componenti allergeniche comuni alle varie specie come le sieralbumine, le kallikreine e le lipocaline (4). Gli allergeni animali vengono veicolati da particelle di varie dimensioni (da 0.4 a 20 µm di diametro medio) che possono rimanere sospese per aria anche per lunghi periodi (5). Gli allergeni sono presenti negli epiteli, nella saliva, nel siero e nelle urine, che sono considerate la fonte principale di allergeni nel ratto e nel topo. I due allergeni urinari più rilevanti, appartenenti alla famiglia delle lipocaline, sono stati ben caratterizzati e sono l'allergene maggiore del ratto (Rat n 1) e del topo (Mus m 1), che condividono il 64% della struttura aminoacidica. Vengono secreti principalmente con le urine, ma anche dalle ghiandole salivari, mammarie e da altre ghiandole esocrine (6). Anche i tre allergeni maggiori della cavia (Cav p 1, Cav p 2 e Cav p 3) e del coniglio (Ory c 1 e Ory c 2) appartengono alla famiglia delle lipocaline. Il cane maschio produce un allergene peculiare secreto dalla prostata, Can f5.

**Micofiti:** Circa 80 specie di muffe sono responsabili di sintomi respiratori allergici. Le principali sono: *Alternaria A. Aspergillus F. Cladosporium H. Alternaria Alternata* dal punto di vista allergologico è uno dei più importanti micofiti outdoor. Si sviluppa sulla vegetazione, sul terreno, sul tronco degli alberi, sui cibi vegetali. Nelle regioni a clima temperato le sue spore si trovano nell'aria da maggio a novembre con un picco in tarda estate-autunno. La dispersione delle spore ha picchi nei giorni assolati e nelle ore pomeridiane. L'alternaria può provocare sintomi respiratori nei lavoratori deputati alla raccolta e processazione dei cereali. Alt a 1 è la molecola che correla con l'insorgenza di asma nei sensibilizzati. Durante la germinazione delle spore aumenta il rilascio dell'allergene maggiore Alt a 1, un allergene secreto che arriva facilmente agli alveoli polmonari a differenza degli altri allergeni che restano nella spora e difficilmente arrivano agli alveoli (7). *Cladosporium herbarum* si trova su foglie secche appassite o tronchi di alberi, è un saprofito del terriccio e si trova sia indoor che outdoor. A differenza dell'alternaria che si sviluppa in climi temperati umidi il *Cladosporium* si sviluppa anche in zone più fredde. Questa muffa può crescere su formaggi conservati in plastica sottovuoto e provocare sintomi di allergia professionale. *Aspergillus fumigatus* una spora che tollera ampie escursioni termiche ed è un importante patogeno per l'uomo. È un fungo opportunista patogeno, le spore sono ubiquitarie e provocano patologie allergiche respiratorie e infezioni delle alte e basse vie aeree (8). Raramente l'inhalazione delle spore provoca patologia se il paziente non è immunodepresso. Le spore di Aspergillo si producono nelle case e nei composti vegetali, su fogliame, tronchi, terriccio, escrementi di volatili, tabacco. La sensibilizzazione verso Asp f 1, Asp f 3, Asp f 4 correla con l'insorgenza di asma bronchiale.

**Il lattice:** il contenuto allergenico del prodotto lavorato può variare notevolmente con una variabilità fino 3000 volte documentata nei guanti in lattice di diversi produttori. Inoltre, gli additivi utilizzati nel processo di produzione, quali mercaptobenzotiale, carbamati e tiurami

posso comportarsi da apteni e dar luogo ad sensibilizzazione da contatto. La gomma di lattice contiene oltre 200 proteine, e tra queste tredici sono state identificate come allergeni clinicamente significativi, caratterizzati a livello molecolare e sono nominati da Hev (hevein) b 1 a Hev b 13. Le proteine Hev b 1 e Hev b 3 sono associate con l'allergia al lattice nei soggetti con spina bifida esposti precocemente a cateteri contenenti lattice, mentre la proteina nativa Hev b 2, il ricombinante Hev b 5, la nativa o ricombinante Hev b 6, la nativa Hev b 1, 3 e probabilmente la nativa Hev b 4, sono stati indicati come gli allergeni maggiori negli adulti sensibilizzati al lattice (9). Di conseguenza, una combinazione di allergeni ricombinanti del lattice possono essere utilizzati per determinare il profilo di sensibilizzazione nei differenti gruppi di pazienti con allergia al lattice. I pazienti monosensibilizzati alla profilina Hev b 8, non sembrano a rischio di reazione a seguito dell'esposizione ai manufatti in lattice, verosimilmente perché si tratta di un antigene clinicamente irrilevante o perché non è più presente nei manufatti in lattice (10).

**Allergeni alimentari:** che sono stabili al calore o alla processazione sono responsabili di gravi reazioni allergiche oltre che per ingestione anche per inalazione di polveri o di vapori di cottura, sono quindi anche allergeni professionali: latte, uovo, pesce, grano, crostacei, soia etc.

**Uovo:** l'albumene contiene Ovomucoide (Gal d 1) molto stabile alla cottura è il maggior allergene dell'uovo sebbene ne costituisca solo il 10% delle proteine, è il più pericoloso, resistente alla cottura anche protratta, ovoalbumina (Gal d 2), è l'allergene più presente, si denatura a 60 °C questo lo rende in grado di indurre reazioni allergiche solo se inalato o ingerito crudo, mentre è tollerato se cotto in forno o se mescolato nei cibi con la farina che ha l'effetto di mascherare l'allergene (il cosiddetto "effetto matrice"), transferrina o Conalbumina (Gal d 3) e il Lisozima (Gal d 4) è utilizzato come antimicrobico nella produzione di formaggi ed è anche utilizzato nell'industria farmaceutica: sono segnalati casi di asma professionale. Il tuorlo contiene l'alfa-levitina presente anche nel siero dei volatili; questa sensibilizzazione può indurre sia sintomi conseguenti all'ingestione dell'uovo che sintomi respiratori da inalazione di sieroproteine di uccelli negli allevatori.

**Il latte:** è spesso un allergene nascosto ed entra nella preparazione come contaminante in insaccati, salumi, polpette di carne con un grave rischio di anafilassi per i pazienti sensibilizzati al latte. L'allergene principale è la caseina molto stabile al calore e in grado di indurre anafilassi anche da inalazione.

**Il pesce:** ha un allergene principale la parvalbumina, una proteina resistente alla bollitura, frittura e alla conservazione per essiccazione e congelamento. È presente in quantità diversa nelle varie specie ittiche, può variare in quantità nelle varie porzioni del corpo del pesce (testacoda) ed è presente in varie isoforme non immunologicamente identiche. È descritto essere un allergene professionale in addetti alla pulitura, essiccazione del pesce: la via di sensibilizzazione è in questo caso inalatoria o percutanea. La risposta anticorpale è eterogenea, alcuni pazienti sensibilizzati alla parvalbumina possono tollerare alcune specie di pesce quale il tonno che ha un basso contenuto di par-

valbumina, altri reagiscono a tutte le parvalbumina, altri ancora reagiscono selettivamente verso specie simili come trota e salmone (11). Alcuni pazienti sviluppano reazioni allergiche all'ingestione di pesce pur non essendo sensibilizzati al pesce, ma all'*Anisakis simplex* un nematode che parassita il muscolo dei pesci.

**Crostacei:** la tropomiosina è l'allergene principale dei molluschi, dei crostacei e dei cefalopodi, ed è anche un allergene minore dei dermatofagoidi, delle lumache, dei nematodi come l'*Anisakis* e sono in grado di indurre gravi reazioni anafilattiche in soggetti sensibilizzati sia quando vengono ingeriti cotti o crudi, sia per inalazione di vapori di bollitura: possono quindi indurre asma allergica professionale. Altre molecole allergeniche note dei crostacei sono l'arginina chinasi, la proteina del sarcoplasma, la catena leggera della miosina, tutti resistenti al calore (12).

**Soja:** si può ritrovare come allergene nascosto in budini, salse, prodotti da forno. L'inalazione può indurre malattia professionale: sono stati descritti casi di baker's asma (asma dei panettieri) indotte da lecitina di soia. La maggior parte degli allergici alla soia sono sensibilizzati all'allergene Gly m 4 una PR10 omologo al Bet v 1, l'allergene maggiore della betulla che è il sensibilizzante primario. Durante la fase di stivaggio e trasporto la soia, a causa dell'incremento della temperatura e dello sviluppo di muffe e di microbi, rilascia allergeni aerodispersi come Gly m1 e Gly m2 responsabili di asma allergico da inalazione. Episodi di epidemia di asma si sono registrati a Barcellona durante la permanenza nel porto di una nave carica di soia.

**Grano:** contiene proteine solubili in acqua (le albumine) e altre insolubili come il glutine (13). Il grano contiene un numero elevato di molecole allergeniche alcune implicate soprattutto nella patogenesi di dermatiti professionali in panificatori, altre in grado di dare asma da inalazione (inibitore dell'alfa amilasi) altre ancora di indurre soprattutto allergia alimentare. Il grano, come il polline di graminacee, contiene anche la profilina: nei pazienti sensibilizzati alle graminacee si può avere una positività ai test allergometrici per il grano assolutamente priva di significato clinico. Il maggior allergene alimentare del grano è il glutine composto di glutenine (ad alto e basso peso molecolare) e di gliadina a sua volta composta di varie frazioni alfa, beta gamma, omega (omega 1, 2, 3, 4, 5 a secondo della velocità di diffusione elettroforetica). Il grano contiene anche una LTP che ha una omologia con quella della pesca di circa 50% e può dare anafilassi da ingestione e asma da inalazione. LTP è un allergene considerato il maggior sensibilizzante alimentare nel sud Europa e in Italia: è una proteina di trasporto lipidico stabile alla cottura e ai succhi digestivi. La sensibilizzazione alla LTP di pesca può provocare manifestazioni cliniche all'in-

gestione di diverse rosacee (albicocca, ciliegia), ma sono descritti anche sintomi all'inalazione di LTP nei luoghi di lavoro dove è presente in alta concentrazione: mercati ortofruttili, supermercati etc. LTP è un pan allergene presente ma anche in altri vegetali come grano, mais, orzo.

L'asma professionale da farina di cereali, è tra le più frequenti forme di asma professionale, e la sua prevalenza non sembra essere in calo. Dal 5 al 10% dei lavoratori esposti presentano sintomi compatibili con asma professionale e dal 14 al 20% di rinite. Una relazione tra il livello di esposizione e il tasso di sensibilizzazione specifica è stata chiaramente dimostrata per LTP-Tri a 14 e l'alfa amilasi (14).

## Bibliografia

- 1) Canonica G.W. World Allergy Organization Journal 2013; 6: 17 (3 October 2013).
- 2) Posa D, Perna S, Resch Y. Evolution and predictive value of IgE responses towards a comprehensive panel of house dust mite allergens during the first two decades of life: a longitudinal birth cohort study Allergy 2016; 102: 390-412.
- 3) Benerjee S, Weber M, Blatt K. Conversion of Der p 23, a new major house dust mite allergen, into a hypoallergenic vaccine. J Immunol 2014; 192(10): 4867-75.
- 4) Custovic A, Simpson B, Simpson A. Relationship between mite, cat, and dog allergens in reservoir dust and ambient air. Allergy 1999; 54: 612-6.
- 5) Baring C, Hilger C, de Baly F. Asthme aux animaux de laboratoire. In: Bessot J-L, Pauli G, Vandenplas O. L'asthme professionnel. Paris: Margaux Orange 2012, pp. 163-174.
- 6) Jones M. Laboratory Animal Allergy in the Modern Era. Curr Allergy Asthma Rep 2015; 15: 73. Vandenplas O, Pauli G. Agents étiologiques: considerations generales. In: Bessot J-L, Pauli G, Vandenplas O. L'asthme professionnel. Paris: Margaux Orange 2012, pp. 157-162.
- 7) Vailes L, Sridhara S, Cromwell O. Quantitation of the major fungal allergens, Alt a 1 and Asp f 1, in commercial allergenic products. J Allergy Clin Immunol 2001; 107: 641-6.
- 8) Greenberger PA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. J Allergy Clin Immunol 2002; 10: 685-6.
- 9) Yeang HY. Natural rubber latex allergens: new developments. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2004; 4: 99-104.
- 10) Wisniewski AV, Jones M. Pro/Con debate: Is occupational asthma induced by isocyanates an immunoglobulin E-mediated disease? Clin Exp Allergy 2010; 40: 1155-62.
- 11) Van Do T, Elsayed S, Florvaag E. Allergy to fish parvalbumins: studies on the cross-reactivity of allergens from 9 commonly consumed fish. J Allergy Clin Immunol 2005; 116: 1314-20.
- 12) Leung PSC, Chow WK, Duffey S. IgE reactivity against a cross-reactive allergen in crustacean and mollusca: evidence for tropomyosin as the common allergen J Allergy Clin Immunol 1996; 98: 954-961.
- 13) Savi E, Pala G. Gli Allergeni da "Allergologia e Immunologia Clinica" SIAAIC ed Pacini 2017.
- 14) Palacin A, Varela J, Quirce S, et al. Recombinant lipid transfer protein Tri a 14: a novel heat and proteolytic resistant tool for the diagnosis of baker's asthma. Clin Exp Allergy 2009; 39: 1267-76.