

Criteri orientativi per un corretto uso della diagnostica allergologica *in vitro**

Coordinatore Carlo Staffa per conto del Gruppo di Studio SIBioC n. 11 – “Allergologia di Laboratorio: IgE specifiche”

INTRODUZIONE

L'allergologia è una disciplina che interessa trasversalmente diverse branche mediche, coinvolgendo numerosi organi e apparati ed esprimendosi pertanto con quadri clinici significativamente diversi l'uno dall'altro.

Tali manifestazioni, ancorchè tra loro differenti, sono tutte riconducibili all'effetto della liberazione di sostanze flogogene da parte dei mastociti, dovuta ad un'eccitazione recettoriale secondaria al contatto tra allergeni e reagine specifiche.

La diagnosi di affezione allergica è di appannaggio clinico ed è basata sul rilevamento di dati obiettivi e sulla storia clinica del paziente; l'approfondimento, il perfezionamento ed il completamento diagnostico possono avvalersi del risultato di esami da praticare *in vivo* e *in vitro* all'interessato.

In particolare il ricorso alla diagnostica *in vitro* deve essere secondario ad una approfondita indagine clinica e, tutte le volte in cui è possibile, secondaria anche all'esecuzione dei tests diagnostici *in vivo*; deve essere “mirata” e circoscritta ad un numero ben definito di allergeni.

Il valore diagnostico dei tests *in vitro* è pertanto limitato a confermare un sospetto diagnostico o a chiarire manifestazioni cliniche complesse, soprattutto in rapporto con reazioni crociate, ma non deve in alcun caso surrogare l'indagine clinica, poichè i tests *in vitro*, limitati ad evidenziare la presenza in circolo di reagine, non sono di per sè stessi dimostrazione di uno stato di malattia, essendo noti casi con IgE specifiche presenti in circolo anche a tasso elevato, nonostante l'assenza di qualsiasi patologia allergica concomitante; è da tenere presente infine che essi, come ogni altra indagine di laboratorio, sono soggetti ad una discreta variabilità analitica, che entro certi limiti potrebbe ridurne l'attendibilità.

LA QUALITÀ ANALITICA

L'ottimizzazione qualitativa di un test *in vitro* consiste nel raggiungimento del migliore rapporto possibile tra *precisione* e *accuratezza*⁽¹⁾. In allergometria di laboratorio molto è stato fatto in questi ultimi anni per migliorare i metodi di determinazione delle IgE totali e specifiche, con risultati di discreta soddisfazione per quanto riguarda la precisione analitica. Più difficile è la valutazione dell'accuratezza che, dovendo tendere al *valore vero*, si scontra, per quanto riguarda le IgE specifiche, con la carenza di standards di riferimento, disponibili solo per pochi allergeni presso il National Institute of Biological Standards and Control (NIBSC) di Londra.

*Questo è un documento preliminare approvato dal CD SIBioC in data 12 febbraio 2001 che viene pubblicato per essere portato alla conoscenza di tutti i soci in attesa di commenti ed osservazioni. Tutti i suggerimenti vanno inviati entro 6 mesi dalla data di pubblicazione a: Dott.ssa Maria Stella Graziani, Laboratorio di Chimica Clinica, Azienda Ospedaliera Borgo Trento, P.zza Stefani, 1 - 37126 Verona - e-mail: mariastella.graziani@mail.azosp.vr.it

Per quanto riguarda le IgE totali invece è disponibile una preparazione liofila, definita 2nd International Reference Preparation (IRP), cod. 75/502 il cui contenuto di immunoglobulina E è pari a 2,4 ng per KU/l.

Tale standard, utilizzato primitivamente dalla ditta Pharmacia di Uppsala anche per la calibrazione del dosaggio delle IgE specifiche, è stato successivamente adottato con questo intendimento dalla maggior parte delle ditte produttrici, per cui ha il merito di aver consentito un significativo allineamento tra i vari metodi di determinazione. Cionondimeno esso desta qualche perplessità per l'imperfetta identità immunochimica che secondo diversi Studiosi esiste tra le IgE totali che sono utilizzate come calibratore e le IgE specifiche che rappresentano il campione da calibrare. Diversificandosi infatti le costanti di dissociazione del sistema [IgE totali/anti-IgE] da quello [IgE specifiche/allergene relativo], può prodursi un difetto di commutabilità di risposta, in rapporto con le differenze notevoli che sono state osservate a livello di legame per i singoli allergeni.

Queste considerazioni suggerirebbero l'opportunità di allestire una curva di calibrazione per ogni allergene⁽²⁾, se tale soluzione non fosse improponibile per i problemi tecnico-esecutivi che comporterebbe; l'idea comunque è stata parzialmente adottata dalla ricerca industriale, che ha reso disponibile un sistema di dosaggio delle IgE specifiche, con una curva di calibrazione standardizzata in peso/volume per ciascun gruppo omogeneo di allergeni*, con soddisfacenti performances⁽³⁾.

La variabilità analitica derivante dall'utilizzo di sistemi tra loro non correlati e la mancanza di standard di riferimento ha evidenziato la necessità di istituire anche per l'allergometria *in vitro*, come per gli altri analiti, programmi di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ)^(4,5), che sono stati inizialmente allestiti e distribuiti da alcune Ditte del Settore (Quality CAP-Pharmacia, Galileo-Bio Allergy, Quality Control-Pasteur Diagnostici, Kallestad), poi da Enti pubblici (Programma di VEQ di Allergologia della Regione Emilia-Romagna, nato nel 1994 ed attualmente esteso a oltre 100 Laboratori di Analisi, distribuiti su tutto il territorio nazionale).⁽⁶⁾ La valutazione dei risultati ottenuti in questi programmi ha consentito di accertare un significativo miglioramento nel tempo delle performances dei laboratori partecipanti e dei vari sistemi da questi utilizzati, fino a raggiungere attualmente per molti di essi coefficienti di variazione accettabili e paragonabili a quelli che si ottengono per gli altri analiti⁽⁷⁾.

In particolare, dai risultati ottenuti negli ultimi due anni del programma di V.E.Q. della Regione Emilia-Romagna⁽⁸⁾, risulta che il CV percentuale medio, per gli allergeni presi in esame e per i metodi più utilizzati (sei) e quindi con un maggior contributo di risposte, si avvicina al 20% (21,067%) e che tale valore si riduce ulteriormente attestandosi intorno al 17% se consideriamo solo i due sistemi che hanno fornito le migliori performances⁽⁹⁾.

LA DIAGNOSTICA *in vitro*

La diagnostica *in vitro* delle allergopatie si articola in un discreto ventaglio di analisi, nell'ambito delle quali vanno distinti *test aspecifici o di presunzione, test specifici o di conferma e test di 2° livello o di approfondimento*. I primi comprendono esami tesi ad accreditare il sospetto di allergia in atto e hanno le prerogative di essere *eseguibili presso tutti i laboratori di analisi, di essere a basso costo, di vantare una buona affidabilità e di poter essere eseguibili in tempi brevi*.

I secondi, che di norma dovrebbero essere fatti solo se i primi sono suggestivi di affezione allergica in atto, sono normalmente *eseguibili presso molti laboratori, hanno un costo medio-alto, hanno una discreta affidabilità e possono essere evasi nell'arco di qualche giorno*.

I terzi, che vanno richiesti solo per casi particolari, per dirimere situazioni cliniche complesse e per modificare un'impostazione terapeutica risultata inefficace, sono *eseguibili solo presso laboratori specializzati, sono a costo elevato e possono essere evasi anche in tempi lunghi. La loro interpretazione, caso per caso, è di tipo specialistico*.

Il ricorso all'esecuzione dei test *in vitro* deve essere motivata dall'impossibilità di

*ENEA system - Bioallergy; ADVIA Centaur Allergy - Bayer

concludere l'iter diagnostico con la sola indagine clinica o solo con il sussidio dei test *in vivo*, dato che l'allergometria *in vitro* non è sempre indispensabile e comporta sempre un elevato costo sociale.

In questo tipo di approccio diagnostico esistono inoltre limiti connessi con la *fase pre-analitica*, quali *richieste mal impostate, poco chiare e soprattutto eccessivamente estese*, con la *fase analitica*, dove non possono essere esclusi *difetti di esecuzione*, specialmente per i laboratori in cui la diagnostica allergologica sia non vocazionale o sia comunque infrequente, e con la *fase post-analitica*, relativamente a possibili *difficoltà interpretative del referto e conseguenti difetti d'impostazione della terapia*.

Test aspecifici

L'incremento dei granulociti eosinofili nel sangue periferico è notoriamente un parametro cui viene attribuita importanza in caso di sospetta allergia. Si tratta di un test rapido, di facile esecuzione, dotato di elevata accuratezza, precisione e sensibilità ma di bassa specificità, essendo influenzabile da diverse situazioni pato-fisiologiche non obbligatoriamente connesse con un'allergia.

Molto più interessante, anche se più impegnativa è *la ricerca ed il conteggio degli eosinofili nel secreto nasale, negli scrapings congiuntivali e nel liquido di lavaggio bronco-alveolare (BAL)*.

Il dosaggio delle IgE totali è un'indagine entrata da diversi anni nel repertorio normale di tutti i laboratori di analisi, è dotata di accuratezza, precisione e sensibilità accettabili ma di bassa specificità, potendo incrementarsi per eventi non connessi con le allergie. Per questo motivo e per il suo costo abbastanza significativo il test è da tempo oggetto di discussione circa la sua utilità, anche perchè in passato se ne è abusato, attribuendogli erroneamente valore di screening. E' comunque inconfutabile il fatto che la grande parte dei pazienti allergopatici ha un patrimonio di IgE totali incrementato e che pertanto questo parametro può conservare una sua indicazione, pur con il limite connesso al suo significato presuntivo.

Quanto a suoi "limiti di normalità", compresi per l'adulto secondo la letteratura mondiale, entro le 150 U.I. per ml nell'adulto, essi probabilmente dovrebbero essere riveduti, in rapporto con il miglioramento tecnologico che è stato con il tempo apportato alla sensibilità del dosaggio sia delle IgE totali che a quello delle specifiche. Indagini condotte in tal senso presso il nostro laboratorio nel decennio 1985-95 su 8.000 casi di pazienti adulti positivi per vari allergeni, evidenziarono come un'alta percentuale dei casi aveva un patrimonio di t-IgE inferiore al 150 U.I. (38%), che tra questi il 60% presentava un tasso inferiore a 100 U.I. e che addirittura in 218 casi clinicamente e sierologicamente positivi le IgE totali non arrivavano a 20 U.I. (2,7% del totale dei campioni positivi).

Per tali motivi potrebbe essere considerato "normale" nell'adulto un patrimonio di IgE totali di 50 U.I./ml, oscillante fino a 100 unità per i soggetti iper-reativi, mentre per valori superiori alle 100 U.I./ml occorrerebbe giustificare l'incremento, ricercandone le cause.

Il dosaggio della Proteina Cationica degli Eosinofili (ECP) nel siero ed in altri liquidi biologici rappresenta un test dotato di buona specificità (specie nella sindrome asmatica), la cui determinazione non trova ancora ampio utilizzo nella pratica corrente benchè essa non presenti particolari problemi esecutivi, sia dotata di buona precisione e sensibilità (a patto che si rispettino le norme preanalitiche raccomandate dalle Ditte produttrici), sia automatizzabile, e trovi notevole utilità come marker nella verifica dell'efficacia terapeutica.

Test specifici

La ricerca ed il dosaggio delle IgE allergene-specifiche è l'indagine più nota ed usata. La prima versione del test, denominato *Radio-Allergo-Sorbent-Test*, ha finito per connotare con il medesimo acronimo (*RAST*) nella terminologia corrente tutti i tests succedanei, anche se molti dei criteri tecnici su cui esso si basava, dall'uso del dischetto di carta come

supporto solido a quello dello Jodio¹²⁵ come tracciante radio-isotopico, sono attualmente entrati in fase di obsolescenza e vengono ancora ben poco utilizzati.

Il principio su cui esso si basava è invece tuttora valido e consiste nel mettere in evidenza le IgE specifiche presenti in una soluzione, "adescandole" con i vari allergeni esposti in fase solida o liquida e coniugati direttamente o indirettamente ad un sistema rivelatore; la conclusione del test consiste nel dosaggio delle IgE legatesi specificamente con quel preciso allergene.

La lettura dei risultati fu ripartita fin dall'inizio in quattro raggruppamenti o classi, oltre la "zero", e ad essi venne assegnato un valore espresso in numeri ordinativi (prima, seconda, terza e quarta classe) o alternativamente in 1, 2, 3 o 4 segni +, a somiglianza con la lettura delle positività dei test *in vivo*.

E' sempre sembrata infatti di grande utilità la confrontabilità tra i test *in vitro* e quelli *in vivo* ed in tal senso la suddivisione in classi analoghe dei risultati ha sempre funzionato da interfaccia fra i due tipi di approccio diagnostico.

La validità dell'attribuzione di un valore numerico, espresso in Unità Internazionali per ml, alle rilevazioni di IgE specifiche, che darebbe loro il significato di una determinazione quantitativa, è controversa, trattandosi in realtà per taluni AA. di dosaggi semi-quantitativi, poichè essa fa riferimento alla curva di calibrazione delle IgE totali, con le già espresse perplessità circa le cinetiche di reazione delle IgE intese come anticorpo (nel siero del paziente) o come antigene (nel sistema di riferimento), non obbligatoriamente identiche. Per altro la FDA americana ha recentemente conosciuto al sistema CAP di Pharmacia, che usa questo principio, la caratteristica di essere l'unico in grado di determinare quantitativamente le IgE.

Per ciò che attiene all'utilizzo di allergeni in fase solida o liquida, vale la pena di evidenziare quanto i miglioramenti tecnologici apportati ai rispettivi sistemi di determinazione abbiano avvicinato le relative performances, come è dimostrato dai risultati dei programmi di VEQ⁽⁷⁾.

Ed altrettanto dicasi per i sistemi di lettura, siano essi isotopici, fotometrici, fluorimetrici o luminometrici.

Al di là della qualità degli estratti allergenici (E.A.), che sono sempre uno dei principali punti di forza o di debolezza di ogni apparato diagnostico⁽¹⁰⁾, va valutato con grande attenzione l'impianto strumentale, la sua affidabilità, la sua velocità operativa, la sua compattezza ed il livello della sua informatizzazione.

A questo proposito va segnalato che l'approccio strumentale viene svolto con sedute analitiche, nell'ambito delle quali il siero di ogni paziente può essere studiato in maniera personalizzata, prevedendo per esso solo gli allergeni ritenuti necessari, oppure esso può essere analizzato con l'impiego di *pannelli allergenici* più o meno estesi. L'utilizzo di questi ultimi presenta lo svantaggio della rigidità, disponendo per ogni caso da studiare dello stesso numero e della stessa tipologia di allergeni, ed il vantaggio del ridotto impatto operativo per il tecnico e del costo, che nel complesso può risultare vantaggioso, se la richiesta prevede la valutazione di diversi allergeni.

Tra i *pannelli allergenici* una nota particolare meritano quelli da utilizzare come *screening*, composti da miscele bilanciate (*IgE screening multitest*) di sostanze eterogenee normalmente coinvolte in sensibilizzazioni allergiche da inalanti (sia stagionali che perenni), statisticamente scelte in modo che la loro negatività possa escludere, con ampio margine di credibilità, la positività di un'indagine estesa ai più comuni allergeni inalanti. Va osservato peraltro che questo tipo di approccio diagnostico non viene di fatto inserito in programmi di valutazione della qualità, per cui non esistono garanzie di uniformità di performances nella criticità di discriminazione fra positivi e negativi⁽¹¹⁾.

Anche a livello di raggruppamenti omogenei di allergeni esistono dei *mix test* composti da non oltre cinque componenti in qualche modo tra loro collegati (famiglie, omologie molecolari), in grado di fornire informazioni qualitative multiple con un unico test; tenuto conto dei limiti di controllo della qualità già espressi per gli *IgE screening multitest*, il vantaggio del loro impiego è economicamente legato con la loro negatività.

Anche se quando si parla di *anticorpi ad attività reaginica* si fa riferimento alle IgE, è stata ipotizzata da vari AA. l'esistenza di un'attività di tipo reaginico anche a livello di una particolare sottoclasse di IgG, le cosiddette *Short Term Sensitizing IgG* (o *IgG-STs*), in

grado di contrarre un legame di breve durata (poche ore) con gli specifici recettori dei mastociti e dei basofili, con lo sviluppo di un'attività simil-reaginic. Premesso che nelle pneumo-allergie l'ipotesi della loro esistenza (o comunque di un loro coinvolgimento) è ormai definitivamente tramontata, essa è comunque molto controversa anche nelle altre affezioni allergiche, sia perchè il reperimento in circolo di IgG allergene-specifiche (specialmente per proteine alimentari) può avvenire anche in soggetti sani, sia perchè possono semplicemente essere IgG anti-IgE e simulare una reazione allergica con formazione di immunocomplessi allergene-specifici.

La loro presunta responsabilità nell'ambito delle intolleranze alimentari giustifica comunque la loro ricerca negli umori circolanti (eseguibile con tecnica IgG-RAST) purchè limitata ad una casistica ristretta e selezionata.

Alle IgG viene attribuito universalmente anche *effetto bloccante (IgG₄)*, per cui l'immunoterapia specifica sarebbe responsabile del loro incremento a vaccinazione avvenuta. In effetti questo meccanismo, invocato soprattutto per l'immunoterapia nei confronti del veleno di insetti, è discutibile per l'incostanza con cui esso è dimostrabile, ivi compresi anche casi clinicamente accertati di avvenuta desensibilizzazione.

Indagini di II° livello

Vengono definiti "di II° livello" alcuni accertamenti a carattere non routinario, di esecuzione complessa e ad elevato impegno professionale sia in fase di esecuzione sia soprattutto in fase d'interpretazione.

Il loro impiego è limitato agli approfondimenti diagnostici necessari talora per chiarire casi di discrepanza fra clinica e laboratorio, soprattutto nell'ambito di possibili fenomeni cross-reattivi, ovvero per documentare meglio casi controversi o ancora per studi finalizzati (centri di ricerca).

Vanno collocati in questo paragrafo *gli studi di caratterizzazione epitopica degli allergeni (Immunoblot) e la ricerca di allergeni crocianti (RAST-inibizione, caratterizzazione con anticorpi monoclonali, ecc.); i tests di rilascio dei mediatori chimici della flogosi allergica*, che oltre alla succitata ECP e agli altri mediatori degli eosinofili, come l'EPX e l'U-EPX, riguardano l'istamina e metil-istamina, la mielo-perossidasi granulocitaria (MPO) e soprattutto la Triptasi, che, nella sua peculiarità di *marker mastocitario*, è un interessante indice di degranulazione di queste cellule, tenuto conto tra l'altro del fatto che i suoi livelli plasmatici si mantengono per alcune ore dopo il suo rilascio, con conseguente vantaggio per il rilevamento dei suoi livelli sierici.

Il *test di degranulazione dei Basofili*, che da un punto di vista teorico si proponeva come un metodo interessante per lo studio delle modificazioni cellulari conseguenti al contatto con un allergene, in pratica ha incontrato grosse difficoltà di utilizzo, connesse con l'indaginosità del test e la sua interpretazione troppo soggettiva. Esso peraltro ha aperto la strada ad un nuovo tipo di approccio diagnostico, basato sulle reazioni cellulari allergene-specifiche ed impostato o sullo studio citofluorimetrico delle modificazioni delle cellule (numero, dimensione e citodensità) o sulla liberazione di mediatori chimici della flogosi allergica. Un particolare cenno merita a questo proposito il *test di rilascio dei sulfido-leucotrieni (CAST-ELISA)*, ideato per lo studio delle "allergie non IgE-mediate" e delle "reazioni pseudo-allergiche" (PAR) e basato su un'incubazione del concentrato leucocitario del paziente con varie diluizioni delle sostanze clinicamente responsabili del quadro clinico. L'aggiunta di IL-3 favorisce il rilascio di LTC₄, LTD₄ e LTE₄ se l'allergene in questione è in grado di stimolare i flogociti (basofili ed eosinofili) presenti nel campione di sangue. La delicatezza dell'esame e la necessità di farne una sufficiente pratica prima di utilizzarlo al meglio, ne limitano a tutt'oggi l'impiego, anche sono state dimostrate buone performances del test, specialmente nei casi difficilmente esplorabili con altri sistemi (es.: intolleranza all'aspirina)⁽¹²⁾.

Il dosaggio delle varie molecole attive dell'immunoflogosi (citochine, molecole di adesione) è riservato per ora a finalità di ricerca pura, mentre notevole interesse, anche per la sua semplicità esecutiva, riveste tuttora *la ricerca delle precipitine* nella diagnostica delle alveoliti estrinseche (Farmer's lung), test qualitativo eseguibile con la tecnica della diffusione bi-direzionale in agar, secondo Ouchterlony.

PROTOCOLLI DIAGNOSTICI *in vitro***DIAGNOSI DELLE ALLERGOPATIE DA INALANTI**

L'inquadramento clinico delle affezioni allergiche da inalanti consente un orientamento circa il probabile agente in causa, definendo alcuni punti fermi anamnestici, quali:

- Rilevanze familiari e personali
- Precedenti accertamenti sanitari fatti e terapie eseguite
- Caratteristiche sintomatologiche
- Stagionalità
- Ambiente di vita e di lavoro
- Evoluzione clinica: esordio, durata ed eventuali andamenti ciclici
- Correlazioni con ambienti, eventi ed attività definiti

Inalanti perenni

In presenza di una clinica perenne, con sintomatologia a carico dell'apparato nasolacrimale, oculo-congiuntivale e respiratorio, è opportuno informarsi circa lo stato di vetustà dell'abitazione, le caratteristiche degli arredi, le condizioni di ventilazione e ricambio d'aria e la presenza nell'ambito domestico di animali ovvero la loro frequentazione per lavoro, per hobby o altro.

Acari

Gli *Acari* più noti sono i *Dermatofagoidi*, detti anche "Acari maggiori" o "Acari della polvere" o "house dust mites" per distinguerli da quelli delle "derrate alimentari", definiti anche "Acari minori" o "storage mites".

I *Dermatofagoidi* più interessanti dal punto di vista allergologico appartengono al genere *Dermatophagoides* e sono principalmente rappresentati dal *D. Pteronyssinus* e dal *D. Farinae*, legati tra loro da omologie antigeniche del 78% per gli epitopi del gruppo I (*Der p1* e *Der f1*), dell'88% per quelli del gruppo II (*Der p2* e *Der f2*) e del 75% per quelli del gruppo III (*Der p3* e *Der f3*)⁽¹³⁾.

Anche gli *Acari* minori, appartenenti ad altre famiglie quali le *Acaridae* (*Tirophagus Putrescentiae* e *Acarus Siro*) e le *Glycyphagidae* (*Glycyphagus Domesticus* ed il *Lepidoglyphus Destructor*), presentano fenomeni di cross-reattività tra loro e nei confronti degli *Acari* maggiori, possedendo strutture antigeniche imparentate con il *Der p1*⁽¹⁴⁾.

In mancanza di ulteriori precisazioni quindi, il processo diagnostico può essere così impostato:

RICHIESTA	ALLERGENI TESTATI
Acari (o Acari maggiori o Acari della polvere o Dermatofagoidi)	<i>Dermatophagoides Pteronyssinus</i> <i>Dermatophagoides Farinae</i>
Acari minori (o Acari delle derrate)	<i>Acarus Siro</i> , <i>Tirophagus putrescentiae</i> , <i>Glycyphagus Domesticus</i> , <i>Lepidoglyphus</i> <i>Destructor</i> ed <i>Euroglyphus Maynei</i>

Muffe

Normalmente i pazienti allergici a qualche *Muffa* presentano sensibilizzazioni crociate con numerose speci di funghi, essendo stati a tutt'oggi identificati diversi allergeni crocianti, tra i generi *Alternaria* e *Cladosporium*, e tra *Aspergilli* e *Penicilli*.

Schema di processo diagnostico consigliato:

RICHIESTA	ALLERGENI TESTATI
Muffe o Micofiti	<i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Alternaria tenuis</i> (o <i>alternata</i>)

Derivati da animali

La sensibilizzazione contemporanea a *derivati epiteliali del gatto, del cane* è di frequente osservazione. A tale proposito è stata evidenziata una reattività crociata tra il Fel d1, determinante allergenico maggiore del gatto, ed il Can d1, determinante allergenico maggiore del cane.

Poichè la frequentazione di altri animali viene in genere segnalata all'atto dell'anamnesi, di fronte ad una richiesta generica di "RAST per derivati epiteliali" conviene limitare l'indagine al gatto e al cane, riservandoci di ampliarne il ventaglio in caso di indicazione più precisa:

RICHIESTA	ALLERGENI TESTATI
Epiteli o forfore o derivati animali	<i>Epitelio di gatto, forfora di cane</i>

Inalanti stagionali

La scelta dei pollini da valutare deve essere condizionata dai dati aerobiologici locali, dall'incidenza statistica di specifiche pollinosi oltre che dalle informazioni raccolte dal paziente circa la stagionalità della sintomatologia e le eventuali correlazioni ambientali ritenute interessanti.

Graminacee

L'allergia alle *Graminacee* rappresenta un esempio tipico, noto da molto tempo, di sensibilizzazione multipla su base cross-reattiva. Questo peraltro, come fa notare Lars Yman⁽¹⁵⁾ consente, dal punto di vista pratico, di allestire un pannello "minimale" sulla base di studi immunologici e di osservazioni cliniche, che consenta di "coprire" la casistica ordinaria di sensibilizzazione al polline di graminacee. In effetti sono stati identificati numerosi raggruppamenti allergenici delle graminacee (*gruppi 1, 2/3, 4, 5, profilina*) che sono presenti nella maggior parte delle differenti speci di questa famiglia^(16,17).

Il pannello "minimale" va quindi allestito con almeno una *Panicoidea* e, tra le *Poideae*, almeno una *Phragmitiforme* ed una o due *Festuciformi* (quest'ultima è la famiglia comprendente il maggior numero di specie allergeniche):

RICHIESTA	ALLERGENI TESTATI
Graminacee	<i>g2) Cynodon Dactylon</i> , <i>g6) Phleum Pratense</i> , <i>g7) Phragmites Communis</i> e <i>g13) Holcus Lanatus</i>

Alberi

Per quanto riguarda il polline degli *Alberi*, è verosimile che intervengano rapporti di tipo cross-reattivo tra le speci imparentate, che sono maggiormente rappresentate come tipologia arborea nell'area geografica d'interesse. Pertanto, dato che l'incidenza statistica di cross-reazioni tra pollini di alberi risente delle caratteristiche del territorio da cui essa è stata desunta, la scelta dei pollini da testare varia entro certi limiti da zona a zona⁽¹⁸⁾.

Ciò premesso, i pollini arborei più frequentemente coinvolti in fenomeni di sensibilizzazione allergica nelle statistiche nazionali appartengono alle *Betulaceae/Corylaceae*, *Oleaceae* e - rilievo abbastanza recente - alle *Cupressaceae*. Lo schema consigliato è pertanto il seguente:

RICHIESTA	ALLERGENI TESTATI
Alberi	t3) <i>Betula Verrucosa</i> , t4) <i>Corylus Avellana</i> , t9) <i>Olea Europea</i> e t23) <i>Cupressus Sempervirens</i>

Erbe varie

Le manifestazioni di allergia crociata non sono altrettanto importanti per questo ampio raggruppamento quanto per le Graminacee. Cionondimeno fenomeni di cross-reattività sono stati descritti nell'ambito di alcune famiglie di *Compositae* ed in particolare tra i componenti del genere *Ambrosia* (tribù delle *Helianteeae*) e tra i componenti del genere *Artemisia* della tribù delle *Anthemideae*^(19,20,21,22).

Va osservato inoltre che, benchè la sensibilizzazione al polline di *Artemisia* si accompagni statisticamente spesso a quella di *Ambrosia*, non sono state messe in evidenza similitudini antigeniche tra gli allergeni maggiori delle due speci. Infine non va dimenticato che anche per il polline delle erbacee come per gli altri pollini, la *profilina* può fungere da allergene crociante. Il pannello consigliato deve comprendere almeno una *Heliantea*, una *Antemidea* a cui va aggiunta una *Urticacea*; esso potrebbe pertanto essere il seguente:

RICHIESTA	ALLERGENI TESTATI
Erbe varie o Erbe infestanti o Compositae	w1) <i>Ambrosia elatior</i> (o altra), w5) <i>Artemisia absintium</i> o w6) <i>A. vulgaris</i> e w19) <i>Parietaria officinalis</i> o w21) <i>P. judaica</i>

DIAGNOSI DELLE ALLERGOPATIE DA ALIMENTI

L'approccio diagnostico di laboratorio alla sospetta allergia da *Alimenti* è sicuramente molto difficile, per problemi connessi con le diverse fasi dell'iter diagnostico di Laboratorio, dalla *pre-analitica*, caratterizzata dalla troppo frequente richiesta onnicomprensiva di "RAST per alimenti", all'*analitica* propriamente detta, che si articola sull'uso di estratti allergenici ottenuti da alimenti interi e crudi quando invece la sensibilizzazione avviene spesso nei confronti di prodotti intermedi della digestione, modificati dalla cottura e dai trattamenti di conservazione. Va tenuto conto poi del fatto che il mondo degli alimenti rappresenta certamente il repertorio più ricco per il fenomeno delle cross-reattività. Tutto ciò obbliga il medico di laboratorio (troppo spesso nell'impossibilità di valutare clinicamente il paziente) a compiere scelte che si rifanno a *criteri statistici*, *all'età dell'interessato* e *ai coinvolgimenti cross-reattivi*.

Quando non sia possibile pertanto commisurare la scelta degli allergeni alimentari alle problematiche cliniche, occorre dotarsi di pannelli standard, quali ad esempio quelli di seguito riportati:

ALIMENTI STANDARD*		
1) Albume	6) Arachidi	11) Cipolla
2) Latte vaccino	7) Soia	12) Sedano
3) Merluzzo	8) Fagioli	13) Gambero
4) Grano	9) Pomodoro	14) Granchio
5) Piselli	10) Lievito	

*La scelta è stata fatta con criterio statistico

ALIMENTI PEDIATRICI

1) Albume	7) Carota	13) Caseina
2) Latte vaccino	8) Mela	14) Glutine
3) Merluzzo	9) α -lattalbumina	15) Pollo
4) Riso	10) β -lattoglobulina	16) Banana
5) Grano	11) Tuorlo	
6) Soia	12) Nocciole	

LATTICINI

1) Formaggio ferm.	3) β -lattoglobulina	5) Formaggio dolce
2) α -lattalbumina	4) Caseina	6) Latte vaccino

SINDROME ORALE ALLERGICA

1) Mela	6) Albicocca	11) Sedano
2) Ciliegia	7) Noce	12) Pomodoro
3) Banana	8) Finocchio	13) Melone
4) Nocciola	9) Carota	14) Pesca

ALIMENTI S.O.A. AGGIUNTIVI (su richiesta)

C.R. vs Betulacee:	<i>Pera, Fragola, Lampona; Prugna, Albicocca; Mandorla; Prezzemolo; Arachide.</i>
C.R. vs Composite:	<i>derivati del Girasole, Camomilla; Anguria; Prezzemolo; Castagna; Arachide.</i>
C.R. vs Graminacee:	<i>Arachide; Prugna, Albicocca; Anguria; Frumento; Limone</i>
C.R. vs Urticacee:	<i>Gelso; Basilico; Pistacchio; Pisello</i>

Quando si sospetti un'allergia alimentare e la ricerca delle IgE risulti negativa (*allergia non IgE-mediata*), scartati i test di citotossicità o simili per mancanza di documentazione scientifica che ne attesti la validità, si può effettuare la determinazione delle *IgG specifiche*, che, anche se non da tutti accettata, rappresenta un criterio di indagine riproducibile ed automatizzabile, per il quale esistono testimonianze di validità^(23,24), anche se la specificità delle IgG è bassa, essendo talora presenti in affezioni croniche dell'intestino non su base allergica o addirittura anche nel sano.

Nel caso di *intolleranze ad alimenti ed additivi alimentari*, molto frequenti e a patogenesi non immunologica, per giungere ad una diagnosi di certezza è necessario ricorrere a tests di provocazione *in vivo* (*challenge tests*) in doppio cieco con placebo, utilizzando capsule disponibili in commercio, contenenti vari dosaggi di differenti alimenti secchi o liofilizzati.

La ricerca degli *anticorpi anti-Gliadina di classe A e G (AGA-test)* rappresenta un'indagine di notevole sensibilità e specificità (specie le IgA) nei casi di morbo celiaco, oltre ad essere un esame di facile esecuzione e non traumatizzante che, associato alla ricerca degli *anticorpi anti-Endomisio (AEA)* può entro certi limiti sostituire la biopsia digiunale. La determinazione delle *trans-glutaminasi* per la diagnosi di Morbo Celiaco, con funzione sostitutiva nei confronti dei tests attualmente in uso (specie l'AEA), è d'introduzione abbastanza recente e necessita di una congrua fase di valutazione per poter essere accreditata a pieno titolo.

DIAGNOSI DELLE ALLERGOPATIE DA VELENO D'INSETTI

Tra gli *Imenotteri pungitori* grande interesse allergologico hanno sempre riscosso gli

Apidi e tra questi l'*Apis mellifera*, per i risvolti di ordine pratico che essa riveste nei confronti degli apicoltori.

Ciò ha favorito lo studio dei caratteri antigenici del veleno delle Api e, per confronto, di quello degli insetti tassonomicamente imparentati, quali i *Vespidi*, comprendenti Vespe e Calabroni (*Polistes* e *Vespula*). L'imparentamento cross-reattivo tra Apidi e Vespidi è modesto, anche se talora i tests *in vitro* sembrano evidenziare il contrario⁽²⁵⁾.

Molto più importante è invece la somiglianza antigenica all'interno della famiglia dei Vespidi, nella quale sono stati identificati diversi allergeni crocianti; studi comparati tra Vespidi del genere *Polistes* ambientati in Europa (*P. dominulus* e *P. gallicus*) e cinque speci americane (*P. exclamans*, *P. fuscatus*, *P. metricus*, *P. annularis* e *P. apachus*) hanno evidenziato una reattività crociata evidente tra i due gruppi a confronto, anche se essa coesiste con peculiarità antigeniche specie-specifiche di grande interesse per l'uso di estratti diagnostici provenienti da insetti di origine diversa da quella del paziente da esaminare⁽²⁶⁾.

In mancanza di richiesta dettagliata, relativa ad insetti diversi dagli Apidi e dai Vespidi, lo schema da seguire potrebbe essere il seguente:

RICHIESTA	ALLERGENI TESTATI
Veleno di insetti o di imenotteri pungitori	Ape (<i>Apis m.</i>), Giallone (<i>Vespula Spp</i>), Vespa (<i>Polistes Spp</i>), Calabrone (<i>Vespa c.</i>)

DIAGNOSI DELLE ALLERGOPATIE DA FARMACI E DA ALLERGENI PROFESSIONALI

Le sindromi da *ipersensibilità a Farmaci* di tipo IgE-mediato sono chiamate in causa molto più spesso di quanto in realtà meritino, essendo esse limitate a pochi medicinali (Penicillina, Ampicillina, Amoxicillina, Insulina, ACTH e pochi altri); la maggior parte delle reazioni da ipersensibilità ai farmaci sono infatti di tipo citolitico, da immunocomplessi o di tipo citotossico oppure sono di tipo pseudo-allergico (PAR).

In considerazione di tali limitazioni, la ricerca di IgE farmaco-specifiche va eseguita in maniera molto mirata e solo per il medicinale in causa, che va obbligatoriamente indicato; è infatti inaccettabile una richiesta generica di "RAST per farmaci".

Le sensibilizzazioni *professionali* invece sono probabilmente più frequenti di quanto si sia portati a pensare, essendo gli allergeni professionali assai numerosi. E' peraltro impossibile ed ingiustificato eseguire indagini "a tappeto" dal momento che l'indicazione all'esame ha una precisa connotazione derivante dall'ambiente di lavoro e dalle osservazioni fatte dal paziente circa la comparsa di manifestazioni presunte allergiche ogni volta che egli entra in contatto con quella precisa sostanza. Anche in questo caso, come per i farmaci, è dunque opportuna un'indicazione clinica di probabilità circa il prodotto o i prodotti da valutare.

CONSIDERAZIONI FINALI

Il D.M. 96 prevede per lo studio delle IgE specifiche *in vitro* solo la voce "90.68.1 - IgE specifiche allergologiche quantitativo (per pannello, fino a 12 allergeni)".

Esiste dunque un'unica codificazione con la quale può essere configurato nella richiesta un numero di allergeni compreso fra 1 e 12, a fronte di un corrispettivo economico fisso. In realtà con il numero 12 si è voluto fare riferimento al numero di allergeni che viene normalmente richiesto, facendo una media tra le richieste al di sotto (es. "veleno di imenotteri") o al di sopra di tale valore (es.: "IgE specifiche per inalanti stagionali e alimenti S.O.A.").

Pertanto, in caso di un'indagine multiallergenica, il faticoso limite dei 12 allergeni può essere superato a discrezione del medico prescrittore, fermo restando il rimborso che il S.S.N. versa all'Ente e l'importo del ticket che l'utente è tenuto a pagare.

Con questo accorgimento si è voluto affidare l'economicità dell'indagine alla respon-

sabilità del richiedente, vincolandola alla richiesta che deve essere mirata e contenuta, poichè il rimborso previsto (196.400 lire) copre il costo vivo di appena una decina di allergeni.

Come raccomandazione finale si consiglia di:

- Ricorrere all'allergometria *in vitro* solo quando la clinica e gli eventuali test *in vivo* non siano esaustivi per dirimere il dubbio diagnostico;
- In caso di sospetta sensibilizzazione ad allergeni inalanti con sintomatologia atipica o non chiara il ricorso ad un *multitest di screening* è consigliabile per la tempestività della risposta, per l'affidabilità e per l'economicità dell'indagine;
- Nonostante il loro discutibile significato, *il dosaggio delle IgE totali* può essere un sussidio documentale in caso di sospetta allergia, pur con tutti i limiti derivanti dalla loro aspecificità; l'esame è comunque veloce, affidabile e di costo contenuto;
- Affidarsi alla raccolta di un'accurata anamnesi per orientare la scelta degli allergeni da studiare e contenerne così il numero;
- Agevolare il più possibile i rapporti tra clinica e laboratorio al fine di personalizzare al massimo ogni percorso diagnostico nell'interesse finale dell'Utente.

TESTI DI CONSULTAZIONE

Holgate S. T., Church M. K. - *Allergologia* - UTET Ed., Torino, 1995

Errigo E. - *Malattie allergiche* - Lombardo Ed., Roma, 1999

Bach J. F., Lesavre P. - *Immunologia* - Flammarion Med. - Sciences, Ediz. italiana, 1991

Roitt I. - *Immunologia* - Ed. McGraw-Hill Libri Italia Srl - 1996

Kay A. B. - *Allergy and allergic diseases* - Blackwell Science, Oxford, 1997

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. Pini C., Di Felice G. - *Standardizzazione dei metodi analitici per il dosaggio delle IgE specifiche*. - Atti 72° Corso CEFAR "Il Laboratorio in Allergologia" (Bologna, 18-19 Dicembre 1996)
2. Pistocchi E., Mengozzi S., Del Vecchio C. - *Valutazione della qualità per la determinazione delle IgE specifiche. Risultati di un anno di attività del programma Galileo*. - Atti XX Congr. Soc. It. Allergol. Immunol. Clin. (Roma, 19-22 Novembre 1991) OIC Med. Press., Firenze 1991, p. 363
3. Plebani M., Borghesan F., Faggian D., Bernardi D. - *L'utilizzo delle curve ROC nello studio dell'efficienza clinica dell'ENEA System*. - Giorn. It. Allergol. Immunol. Clin., 1995, 5: 249
4. Romano L., Marseglia S., Giovannelli S. - *Controllo di qualità interlaboratori per il dosaggio di IgE specifiche: risultati di un ciclo preliminare*. - Ligand Quart. 1991, 10: 100
5. Tozzoli R. - *La qualità dei test di laboratorio nella diagnostica allergologica*. - Atti Corso CEFAR (La Thuile, 11-17 Febbraio 1996)
6. Staffa C. - *Qualità dei metodi analitici per il dosaggio delle IgE specifiche* - Atti del Corso CEFAR di Allergologia - Bologna 18-19 Dicembre 1996
7. Staffa C. Bolelli G.F., Franceschetti F. et Al. - *Valutazione Esterna di Qualità in allergologia: tre anni di esperienza nella regione Emilia-Romagna* - Bioch. Clin. 1996, 20,13-20
8. Pistocchi E. - *Il problema della qualità nel laboratorio di Allergologia*. - Atti del 95° Corso CEFAR "Il Laboratorio in Allergologia" (Ancona, 1-2 Dicembre 1998) Biomedica, Milano, 1998
9. Staffa C. - *I controlli di qualità su ampia scala hanno ridotto le atipie diagnostiche in allergometria di Laboratorio?* - Atti del 114° Corso CEFAR "Aggiornamenti in Allergologia" (Perugia 30 Novembre-1 Dicembre 2000) Biomedica, Milano, 2000
10. Pini C. Di Felice G. - *La diagnostica, i controlli di qualità, Le norme in allergologia* - Atti del Convegno "Il network delle malattie allergiche: ricadute sanitarie e socio-economiche". (Roma, 17 Aprile 1998) Istituto Superiore di Sanità, Roma, 1998
11. Romano L. - *La standardizzazione degli allergeni: stato dell'arte* - Atti 102° Corso CEFAR "Aggiornamenti in Allergologia" (Napoli, 11-12 Novembre 1999) Biomedica, Milano, 1999
12. Staffa C. - *L'automazione in Allergologia* - Ed. Medical Systems, Genova, 1997, 52-53
13. O'Neill G. M., Baldo B. A. - *Intra-species cross-reactivity of house-dust mite allergens separated by protein blotting and detected by selective elution of mite components and IgE antibodies* - Electroforesis, 1993,14, 923-925 citato da P. Deviller
14. Johansson E., Johansson S. G. O., Van Hage-Hamsten M. - *Allergic Characterization of A: Siro and T. Putrescentiae and their cross-reactivity with L. Destructor and D. Pteronyssinus* -

- Clin Exp. Allergy 1994, 24, 743-751
15. Yman L. - *Botanical relations and immunological cross-reactions in pollen allergy* - Ed. Pharmacia, Uppsala, 1982, 22-23
 16. Fahlbusch B., Muller W. D., Diener C. H. et al. - *Detection of crossreactive determinants in grass pollen extracts using monoclonal antibodies against group IV and group V allergens* - Clin. Exp. Allergy 1993, 23, 51-60
 17. Van Ree R., Driessen M. N. B., Van Leeuwen W. A. et al. - *Variability of crossreactivity of IgE antibodies to group I and V allergens in eight grass pollen species* - J. Allergy Clin. Immunol., 1991, 22, 611-617
 18. Staffa C. - *Considerazioni sul problema delle reazioni crociate in allergologia* - Giorn. It. Allergol. Immunol. Clin. 1999, 9, 228-240
 19. Devillier P. - *Panorama des allergies croisées* - Rev. fr. Allergol., 1998, 38, 20-27
 20. Fernandez C., Martin-Esteban M., Fiandor A. et al. - *Analysis of cross-reactivity between sunflower pollen and other pollens in the composite family* - J. Allergy Clin. Immunol., 1993, 92, 660-667 citato da P. Devillier
 21. Jimenez A., Moreno C., Martinez J. et al. - *Sensitization to sunflower pollen: only a occupational allergy?* - Int. Arch. Allergy Immunol. 1994, 105, 297-307 citato da P. Devillier
 22. Park H. S., Kim M. J., Moon H. B. - *Antigenic relationship between mugwort and ragweed pollens by crossed immunoelectrophoresis* - J. Korean Med. Sci. 1994, 9, 213-217 citato da P. Devillier
 23. Marinkovich V. - *Specific IgG antibodies as markers of adverse reactions to food* - citato da E. Errigo
 24. Wuthrich B. - *Specific IgG antibodies as markers of adverse reactions to food. Contra!* - citato da E. Errigo
 25. Egner W., Ward C., Brown D. L. et al. - *The frequency and significance of specific IgE to both wasp (*Vespula*) and honey-bee (*Apis*) venoms in the same patients* - Clin. Exp. Allergy, 1998, 28, 26-34
 26. Sanchez F., Blanca M., Fernandez J. et al. - *Comparative study between European and American species of *Polistes* using sera from European sensitized subjects* - Clin. Exp. Allergy, 1995, 25, 281-287