

Cross reattività tra polline di graminacee e pomodoro in pazienti con o senza sindrome orale allergica

Franco Borghesan MD, Ingrid Holmquist BSC*, Elisabetta Favero MD, Fulvia Chieco Bianchi MD, Lucia Billeri MD, Andrea Leonardi MD, Anita Kober PhD* e Mario Plebani MD

Department of Laboratory Medicine, University-Hospital, Padova-Italy, *Pharmacia Diagnostic Uppsala-Svezia

ABSTRACT

Can we distinguish between co-sensitization and cross-reactivity? A study on grass pollen and tomato hypersensitivity

Background: Aim of this study was to determine whether it is possible to identify a common antigenic determinants in patients with cross-reactivity between grass pollen and tomato. **Method:** We selected forty-six sensitized subjects that had consecutively referred to our allergy outpatients' clinic. Three groups of patients allergic to grass pollen were identified and then subdivided according to the presence of IgE to tomato with or without oral allergy syndrome (OAS). Radio Allergo Sorbent Test with Pharmacia-CAP techniques inhibition (RAST-CAP) was used to assess cross-reactivity and Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) immunoblotting was performed to detect specific antigenic determinants. **Results:** In immunoblot, the 21 patients of group 1 showed IgE against a 30-36 kD protein of g6. The same protein was shared by the patients of group 2 (who were sensitive to tomato but did not show any symptoms after ingestion of tomato), and of group 3 (who were sensitive to tomato and had OAS after ingesting tomato). The immunoblotting analysis of the tomato protein revealed that the patients from group 3 had a significantly higher prevalence of IgE against a 14-15 kD protein than groups 1 and 2. **Conclusions:** we have identified some allergenic proteins that define not only cross-reactivity but also co-sensitization in patients with sensitivity to grass pollen and with oral allergy syndrome to tomato.

RIASSUNTO

Scopo dello studio è stato quello di valutare se sia possibile identificare un determinante antigenico che identifichi co-sensibilizzazione nei pazienti con cross-reattività tra polline di graminacee (in questo caso è stato utilizzato il phleum "g6") e pomodoro. Sono stati identificati 3 gruppi di pazienti allergici alle graminacee suddivisi a seconda della presenza o meno di IgE nei confronti del pomodoro con o senza sindrome orale allergica. Per valutare la cross-reattività è stata utilizzata la tecnica della RAST CAP inibizione e per ricercare la presenza di determinanti antigenici specifici è stato utilizzato l' SDS-PAGE immunoblotting. Risultati: i 21 pazienti del gruppo 1 hanno mostrato di possedere all'immunoblot IgE nei confronti di una proteina di circa 30-36 kD del g6. Questa proteina era condivisa anche dai pazienti del gruppo 2 (sensibili al pomodoro ma senza sintomi) e del gruppo 3 (sensibili al pomodoro e con SOA). Analizzando all'immunoblotting la proteina del pomodoro i pazienti del gruppo 3 presentano IgE nei confronti di una proteina di circa 14-15 kD in misura significativamente maggiore rispetto ai pazienti del gruppo 1 e 2. Abbiamo identificato alcune proteine allergeniche che definiscono la co-sensibilizzazione e non solo la cross-reattività nei pazienti con sensibilità al polline di graminacee e con sindrome orale allergica nei confronti del pomodoro.

INTRODUZIONE

Il problema delle cross-reattività è di cruciale importanza nella diagnostica in vitro delle allergopatie.

Il dosaggio delle IgE specifiche nei confronti degli allergeni di origine vegetale soffre di problemi di specificità per la presenza di determinanti in comune tra polline e alimento.

La cross reattività è stata spiegata dalla combinazione di diverse ipotesi: la presenza di lecitine negli alimenti vegetali che determinano un legame aspecifico con le IgE, la presenza di IgE dirette contro i carboidrati cross-reattivi delle glicoproteine, la presenza di allergeni in comune tra pollini e vegetali (1). Si distinguono dal punto di vista

clinico pazienti che presentano IgE specifiche con significato di cross-reattività e pazienti le cui IgE significano reale sensibilizzazione ovvero co-sensibilità.(2).

Non è possibile delineare con facilità un valore soglia che sia dotato di maggior specificità e che sia in grado di distinguere tra cross-reattività e co-sensibilizzazione (3).

Scopo del nostro lavoro è stato di quello di valutare attraverso una metodica di immunoblot e con la CAP RAST inibizione se esistano dei determinanti allergenici in grado di identificare il paziente con co-sensibilizzazione

MATERIALI E METODI

Sono stati raccolti i sieri di 46 pazienti, presentatisi consecutivamente presso il nostro ambulatorio di allergo-

logia da marzo a settembre 2001 per sindrome allergica respiratoria.

Dopo un'accurata storia clinica i pazienti sono stati sottoposti a prick test con allergeni Lofarma (Milano) e a dosaggio IgE specifiche con la metodica CAP-Pharmacia. In tutti i pazienti riscontrati positivi alle graminacee veniva eseguito un prick test con allergene del pomodoro (Lofarma). Veniva quindi eseguito un test di provocazione in aperto con pomodoro: circa 15 grammi di pomodoro crudo venivano fatti ingerire ai pazienti, raccomandando di tenere il pomodoro in bocca per almeno 10-15 secondi. Dopo aver ottenuto un consenso informato veniva prelevato il siero per l'esecuzione dell'immunoblot e della CAP-inibizione.

Il siero veniva immagazzinato a -20 gradi in attesa di venire utilizzato per le successive analisi.

Sono stati selezionati 3 gruppi di pazienti.

Il primo gruppo (21 pazienti, 13 femmine-8 maschi, età compresa tra 16-52 media 31,4) pazienti con pollinosi sensibili alle graminacee con test cutaneo positivo per phleum e IgE positive senza sintomi riferibili a sindrome orale allergica e con IgE per pomodoro assenti.

Il secondo gruppo (15 pazienti, 9 femmine-6 maschi, età compresa tra 9-48 media 26,9) pazienti sensibili alle graminacee, con IgE positive per pomodoro ma senza sintomi riferibili all'ingestione del pomodoro.

Un terzo gruppo (10 pazienti, 5 femmine 5 maschi, età compresa tra 12-48 media 30,5) comprendente pazienti sensibili alle graminacee, con IgE positive per pomodoro e sindrome orale allergica conseguente all' ingestione di pomodoro.

La reattività dei sieri dei pazienti è stata valutata dopo aver sottoposto gli allergeni (phleum e pomodoro) a elettroforesi su gel SDS a gradiente 7,5% - 20% tamponato secondo la metodica di Neville (4) e successivo immunoblotting effettuato secondo Towbin (5).

RISULTATI

Il test cutaneo è risultato positivo per le graminacee in tutti i pazienti. Era negativo, invece, per il pomodoro in tutti quelli del primo gruppo, positivo nel secondo e terzo gruppo.

Il test di scatenamento in aperto con pomodoro è risultato positivo in 6 dei 10 pazienti che riferivano sintomi all'ingestione di pomodoro.

44 dei 46 pazienti studiati presentavano all'immunoblot IgE nei confronti delle proteine di 30-36 kD del g6.

I pazienti del gruppo 2 e 3 presentavano IgE nei confronti di un profilo di proteine molto più ampio. In tabella 1 sono riportati i risultati.

Le figure 1,2,3 e 4 illustrano i risultati dell' immunoblot. Si è osservata una netta differenza tra pazienti affetti da pollinosi senza cross-reattività e gli altri.

In tabella 2 sono invece riportati i risultati riguardanti la CAP-RAST inibizione. Questa è stata eseguita preincubando il siero di alcuni pazienti allergici alle graminacee (g6) con l'allergene pomodoro (f25) e preincubando a sua volta con l'allergene g6 il siero di alcuni pazienti allergici

all'f25. L'incubazione con l'allergene f25 non inibisce significativamente tranne in un caso (siero n° 35) il CAP nei confronti del g6. Il g6 invece evidenzia una quasi completa capacità "inibente" nei confronti del f25.

DISCUSSIONE

Il problema della specificità in allergologia di laboratorio è molto importante quando ci si trova ad analizzare sieri di pazienti con pollinosi per il problema delle cross reattività.

Il nostro lavoro ha utilizzato sieri di pazienti con una delle cross reattività più frequenti in allergologia. Percentuali che vanno dal 23% al 76% dei pazienti allergici al polline presenta IgE nei confronti di allergeni cross-reattivi (6). Di questi solo una parte presenta prurito, vescicolazione buccale, orticaria, o sintomi gastro-intestinali con l'ingestione di pomodoro. Il test di scatenamento in aperto è risultato positivo solo in 6 dei 10 pazienti che riferivano sintomi all'ingestione di pomodoro. Questo a ribadire come la storia clinica possa essere non sempre dirimente (7) e come il challenge test sia indispensabile per una corretta diagnosi.

Va ricordato comunque che in alcuni pazienti si assiste ad una risoluzione spontanea dei sintomi, e come alcuni disturbi evocati dall'ingestione degli alimenti cross reattivi siano maggiormente evidenti nella stagione pollinica.

Nel nostro caso il test è stato eseguito al di fuori del periodo di pollinosi.

Negli anni il nostro impegno è sempre stato quello di fornire al clinico un test di laboratorio con una capacità discriminante sempre maggiore. Dapprima abbiamo dimostrato come il test in vitro effettuato con le cosiddette metodiche di seconda generazione abbia un'efficienza clinica paragonabile al test in vivo (8). Poi, dimostrato che tutte le metodiche di seconda generazione hanno una buona affidabilità (9), abbiamo cercato di offrire, attraverso l'analisi delle curve ROC, un test che desse la miglior capacità discriminante (10).

Questo non è facilmente proponibile per i pazienti pollinosi con reattività nei confronti di allergeni alimentari di origine vegetale a causa dei problemi di cross reattività (11).

Con la definizione di un pattern proteico specifico dei pazienti con co-sensibilizzazione sarà possibile fornire attraverso la tecnica degli allergeni ricombinanti, l'allergene che offra la massima specificità diagnostica. Sarà possibile dosare IgE specifiche nei confronti di proteine che significano paziente affetto da pollinosi o che significano allergia alimentare o entrambe.

Nel nostro lavoro sono state studiate tre popolazioni tipiche: una popolazione di pazienti con sintomi allergici respiratori durante il periodo di fioritura delle graminacee con IgE specifiche nei confronti dell'allergene "g6" e senza IgE specifiche dirette verso allergeni alimentari (gruppo 1); un gruppo di pazienti con sintomi analoghi al gruppo 1, senza sintomatologia all'ingestione di pomodoro ma con IgE specifiche dirette contro l'allergene del pomodoro (gruppo 2) e infine un gruppo di pazienti sintomatici all'inhalazione del polline di "g6" e all'ingestione di pomodoro con IgE positive per entrambi gli allergeni (gruppo 3).

Tabella 1
risultati dell'immunoblot

	SERAUniCAP kU/l		IMMUNOBLOTTING							
	g6	f25	g6	~ 53	30-36	~ 14	70-90	40-50	20-30	~15 kD
				kD	kD	kD	kD	kD	kD	
			g6	g6	g6	f25	f25	f25	f25	
1	21,5	<0,35	+	+++						
2	17,1	<0,35	+	+++	+					
3	1,13	<0,35		+						
4	2,15	0,35		+						
5	43,1	0,35	+	+						
6	18,6	0,35	+	+++	+					
7	1,03	0,35		+						
8	73,6	0,35	+	+++						
9	8,78	0,35	+	+++						
10	0,516	0,35								
11	1,29	0,35								
12	11,5	0,35	+	+++						
13	16,4	0,35	+	+++						
14	5,78	0,35		+++						
15	2,79	0,35		+						
16	3,17	0,35		+	+					
17	24,8	0,35		+++						
18	>100	0,35		+++						
19	39,5	0,35		+++						
20	21,1	0,35		+++	+					
21	5,13	0,35		+++						
22	>100	2,23	+	+++				+		
23	>100	27,5	+++	+++	+	+	+++			+
24	>100	7,81		+++		+	+	+++		
25	33,7	2,15	+	+++		+	+			
26	17,2	0,665	+	+++	+	+	+			
27	0,998	0,37	+	+		+				
28	0,849	1,48		+				+		
29	4,24	0,615	+	+++	+					
30	55,1	1,32	+	+++	+					
31	3,86	1,99	+++	+++		+	+++	+		
32	6,80	3,83		+++						
33	16,2	1,38	+	+++	+					+
34	11,5	0,831	+	+++						
35	1,51	1,36	+++	+++		+++	+++	+		
36	18,3	0,691	+++	+++	+		+			
37	53,3	2,26	+	+++	+					+
38	20,9	1,44	+	+++			+			+
39	8,88	1,09	+	+++	+					
40	17,2	1,02	+	+++	+					
41	>100	13,9	+++	+++	+	+	+++			+
42	>100	10,6	+++	+++	+		+			+
43	59,3	1,36	+	+			+			
44	>100	7,72	+++	+	+	+	+++			
45	0,919	0,901		+						
46	5,65	1,28	+	+	+					+

Nell'analisi immunoblot con la proteina del "g6", 44 pazienti su 46 hanno dimostrato di avere IgE rivolte verso un pattern ben definito di proteine che vanno da un peso compreso tra 30 e 36 kD. Questo è il determinante allergenico maggiore (Phl p 1 e Phl p 5).

Il secondo e il terzo gruppo di pazienti presenta IgE nei confronti di una serie di proteine molto più estese rispetto ai semplici pollinosici con peso molecolare compreso tra 14 e 53 kD.

Quando l'analisi immunoblot viene condotta con l'allergene del pomodoro "f25" nel primo gruppo le IgE sono praticamente assenti, nel secondo gruppo sono rivolte principalmente verso un epitopo di peso molecolare compreso tra 40 e 50 kD. Questo è il determinante maggiore del pomodoro probabilmente corrispondente alla patatina (12).

Nel terzo gruppo, ci aspettavamo che ci fossero IgE nei confronti di un'altro gruppo di proteine e in effetti valutando l'immunoblot eseguito con l'allergene del pomodoro, 5 pazienti su 10 (50%) hanno dimostrato di possedere IgE rivolte verso un epitopo di circa 14-15 kD dell'allergene del pomodoro, rispetto ai pazienti del gruppo 2 che presentano IgE nei confronti di questo epitopo in 2 su 15 (13,3%). Se valutiamo la presenza di IgE verso l'analogo epitopo di circa 14-15 kD nell'immunoblot eseguito con g6, ne rileviamo la presenza in 7 pazienti su 10 nel gruppo 3 (70% dei pazienti) e in 6 pazienti su 15 nel gruppo 2 (40% dei pazienti) La proteina con queste caratteristiche dovrebbe appartenere al gruppo delle profiline.

Nei pazienti con anticorpi contro la proteina di 14-15 kD il challenge con pomodoro era positivo in 3.

Altri lavori(13) hanno dimostrato che le proteine allergeniche del gruppo 11 del lolium perenne di peso molecolare di 16-18 kD hanno la stessa sequenza dell'allergene del pomodoro, evidenziando una cross-reattività e non una co-sensibilizzazione. Questo lavoro mette in luce per la prima volta quali possano essere gli epitopi allergenici coinvolti nella sindrome orale allergica al pomodoro nei pazienti allergici alle graminacee.

Il futuro della diagnostica in vitro delle allergopatie sta proprio nella identificazione di epitopi che forniscano una specificità sempre maggiore al test e questo futuro con l'utilizzo degli epitopi allergenici ricombinanti è cominciato (14). La maggior specificità e sensibilità permetterà di evitare indagini come il test in doppio cieco verso placebo che impegna molto in termini di tempo il medico, il paziente e familiari(15).

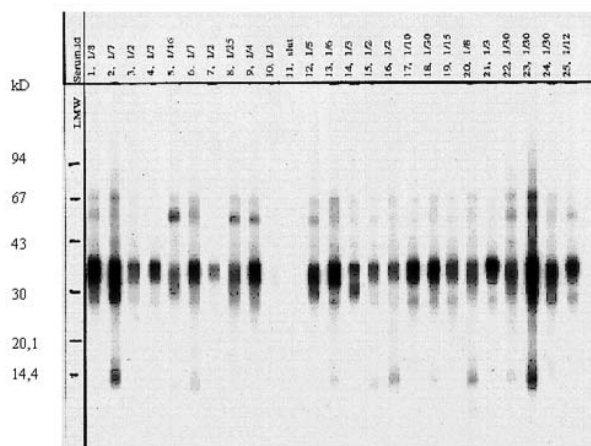


Figura 1
immunoblotting per g6

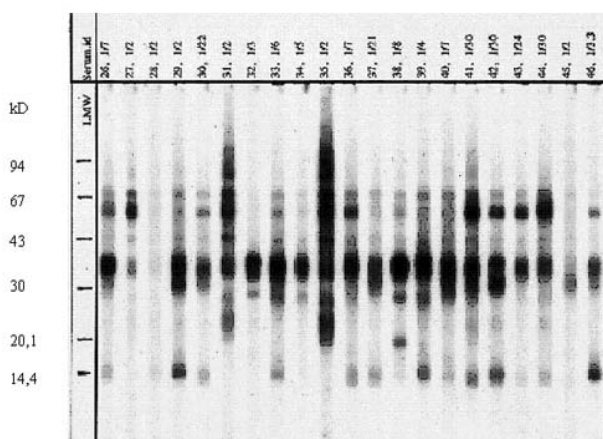


Figure 2
immunoblotting per g6

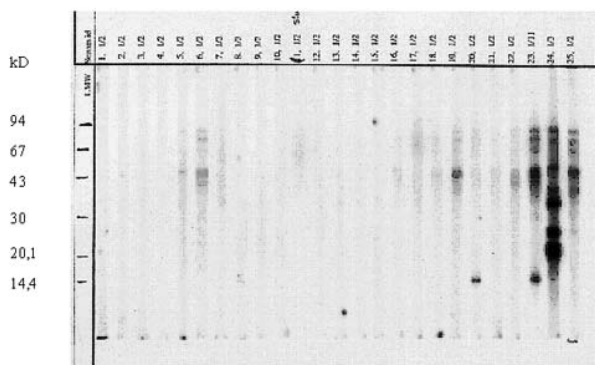


Figure 3
immunoblotting per f25 (pomodoro)

Un altro metodo che viene storicamente utilizzato per valutare la cross reattività è stata la CAP-inibizione (16).

La CAP-inibizione del g6 preincubando i sieri con l'allergene del pomodoro è stata solo parziale e non significativa in tutti i pazienti tranne in un caso (siero n°35).

Nel nostro lavoro la CAP-inibizione dell'allergene f25 eseguita preincubando il siero con allergene del "g6" è risultata completa in quasi tutti i casi a dimostrazione che l'allergene g6 è capace di inibire quasi totalmente l'allergene del pomodoro e che la sensibilizzazione nei confronti del polline precede quella nei confronti delle proteine del pomodoro. Si è ottenuta una inibizione del 100% in 2 (siero n° 23-33) pazienti del gruppo 2 che presentano IgE contro la proteina di circa 15 kD e in 3 pazienti (sieri n°38-41-42) del gruppo 3 che hanno IgE nei confronti della proteina di 15 kD del pomodoro. L'inibizione è solo parziale nel paziente identificato con il siero n°24. In questo paziente non si riscontrano IgE nei confronti della proteina di circa 14-15 kD a conferma di quanto riportato da altri autori (17) che le proteine profillino-simili sono indispensabili nel determinare la totale cross-reattività e di conseguenza la successiva co-sensibilizzazione. L'inibizione non è significativa nel paziente 32 che non presenta IgE verso nessun antigene noto del pomodoro pur avendo un livello significativo di IgE contro il pomodoro (3.83 kU/l).

Sono ben 7 (sieri n° 29,30,32,34,39,40,45) i pazienti con IgE specifiche nei confronti di "f25" che non presentano legami, quando valutati all'immunoblot, verso nessuno degli allergeni noti del pomodoro e sono 2 i pazienti (sieri 10 e 11) del gruppo 1 che non presentano legami nei confronti dell'allergene del g6, evidenziando quanto complesso sia allestire un sistema diagnostico che offra una efficienza clinica del 100%. Questo da una parte può essere dovuto ai problemi tecnici di allestimento delle metodiche di immunoblot e RAST-inibizione ma è dovuto in alcuni casi alla scarsa conoscenza delle fonti allergeniche, o alla frammentazione di epitopi della struttura tridi-

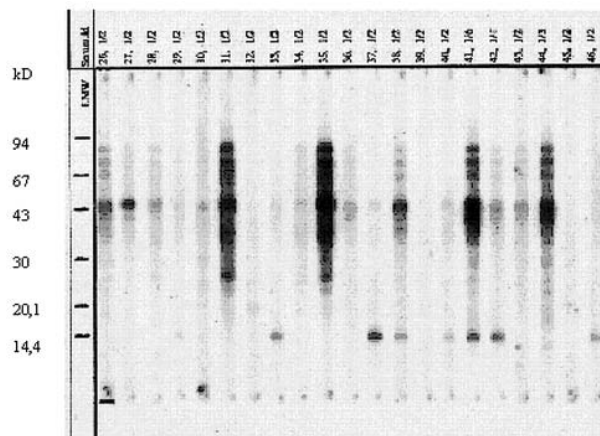


Figure 4
immunoblotting per f25 (pomodoro)

Tabella 2
 risultati della CAP inibizione

GRUPPO SIERO	UniCAP g6 kU/l	UniCAP f25 kU/l	ImmunoCA/ImmunoCA	
			P g6 (f25 allergene inibitore) % di inibizione	P f25 (g6 allergene inibitore) % di inibizione
1	2	17,1	<0,35	25
	5	43,1	<0,32	0
	6	18,6	<0,32	30
	9	8,8	<0,32	4
	12	11,5	<0,32	0
	13	16,4	<0,32	13
	19	39,5	<0,32	7
	20	21,1	<0,32	25
	23	>100	27,5	18
	24	>100	7,8	22
	25	33,7	2,15	11
	31	3,9	1,99	28
	32	6,8	3,8	0
	33	16,2	1,38	28
	35	1,5	1,36	90
	36	18,3	0,69	5
	38	20,9	1,44	9
	39	8,9	1,09	0
	41	>100	13,9	18
	42	>100	10,6	12

mensionale degli allergeni (18). Questa complessità dell'allergene sembra essere allo stato attuale delle conoscenze il limite maggiore della diagnostica in vitro delle allergopatie che attraverso l'utilizzo di allergeni ricombinanti sta intraprendendo la via che porterà ad una migliore efficienza clinica. L'utilizzo di casistiche maggiori con pazienti sempre più selezionati sarà di notevole ausilio per il riconoscimento degli epitopi più significativi e una maggior conoscenza delle fonti allergeniche potrà diminuire i pazienti con IgE verso epitopi sconosciuti.

BIBLIOGRAFIA

1. Caballero T., Martin-Esteban M. Association between pollen hypersensitivity and edible vegetable allergy :a review. *J Investig Allergol Clin immunol* 1998; 8 (1):6-16.
2. Pauli G. Evaluation in the Understanding of Cross-Reactivi-

- ties of Respiratory Allergens: The role of Recombinant t Allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;123:183-195.
3. Bircher AJ, van Melle, Haller E, Curty B, Frei PC. IgE to food allergens are highly prevalent in patients allergic to pollens, with and without symptoms of food allergy. *Clin Exp Allergy* 1993; 24: 367-374
4. Neville DN. Molecular weight determination of protein dodecyl sulphate complexes by electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J Biol Chem* 1971; 246:6328.
5. Towbin H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets:procedure and some applications. *Prot Nat Acad Sci* 1979;9:4350
6. Sicherer SH. Clinical implication of cross-reactive food allergenes. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:881-890.
7. Sampson HA. Food allergy. Part 2. Diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:981-989.
8. Plebani M; Borghesan F. and Faggian D. Clinical efficiency of in vitro and in vivo tests for allergic diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995; 74:23-289.
9. Plebani M, Bernardi D, Basso D, Borghesan F, Faggian D. Measurement of specific immunoglobulin E: intermethod comparison and standardization. *Clin Chem*1998;44:1974-1979.
10. Plebani M, Borghesan F ,Basso D, Faggian D. Receiver-operating characteristics (ROC) curves: a fundamental tool for improving the clinical usefulness of in vitro IgE tests. *Allergy* 1996;51:407-411
11. Vuitton DA. Allergic cross-reaction: General and practical aspects. *Clin Rev Allergy Immunol* 1997;15:367-374.
12. Reche M, Pascual CY ,Vicente J, .Caballero T, Martin-Munoz F, Sanchez S, Martin-Esteban M. Tomato allergy in children and young adults: cross-reactivity with latex and potato. *Allergy* 2001 ; 56: 1197-1201.
13. van Ree R,Hoffman DR, van Dijk W, Brodard W.,Mathieu K,Koelleman CA, Grande M., van Leeuwen WA, Aalberse RC. Lol PXI ,a new major grass pollen allergen, is a member of a family of soybean trypsin inhibitor-related proteins . *J Allergy Clin Immunol* 1995; 970-978 .
14. Chapman M, Smith A.,Vailles L D, Arruda L.K, Dhanaraj V, and Pomés A. Recombinant allergenes for diagnosis and therapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:409-418.
15. Sampson HA. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:891-896.
16. Leifermann KM, Gleich GJ. The cross reactivities of IgE antibodies with pollen antigens.1.Analysis of various species of grass pollens. *J Allergy Clin Immunol* 1976; 58: 129-139.
17. Kazemi-Shirazi L, Pauli G, Purohit A, Spitzauer S, Froschi R, Hoffmann-Sommergruber K., Breiteneder H., Scheiner O., Kraft D, and Valenta R. Quantitative IgE inhibition experiments with purified recombinant allergenes indicate pollen-derived allergenes as the sensitizing agents responsible for many forms of plant food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:116-125.
18. Bufe A. Significance of IgE binding epitopes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:219-221.