

## Valore clinico della determinazione quantitativa delle IgE specifiche

**Mario Plebani**

Dipartimento Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università di Padova e Centro Regionale Specializzato di Ricerca Biomedica Ospedale di Castelfranco Veneto.

### ABSTRACT

#### Clinical value of quantitative measurements of specific IgE

The diagnosis of human allergic diseases involves the combined use of a careful clinical history, physical examination, and in vitro and in vivo assay methods for the detection of IgE antibodies of defined allergen specificities. In vivo (skin testing) and in vitro (measurement of specific IgE in serum) techniques cannot be considered interchangeable, the former reflecting not only the presence of IgE but also mast cell integrity, vascular and neural responsiveness. Both techniques have similarities and differences, advantages and disadvantages. Recently introduced "second generation" immunoassays have continued to improve the analytical sensitivity and reproducibility thanks to automation and improved reagent quality. Quantitative assays may allow the use of specific clinical thresholds able to differentiate symptomatic from asymptomatic patients. False negative and false-positive results should derive from lability of some major extracts, and from possible cross-reactivities, respectively. Characterization of allergens at a molecular and submolecular level and, where necessary, the use of recombinant allergens can reduce cross-reactions and further improve the quality of immunoassays.

### RIASSUNTO

La diagnosi delle allergopatie si basa sulla valutazione ragionata di informazioni cliniche provenienti da fonti diverse: anamnesi, esame obiettivo, test in vivo (test cutanei) ed in vitro (determinazione nel siero) degli anticorpi specifici di classe E delle immunoglobuline (IgE). La valutazione in vivo ed in vitro delle IgE avviene mediante tecniche fra loro non intercambiabili, che presentano caratteristiche e problematiche differenti. In particolare, i test cutanei non valutano solamente la presenza delle IgE ma la loro attività biologica, e quindi, il risultato dei test cutanei dipende anche dall'integrità delle mast cellule, e dalla risposta vascolare e nervosa. Le tecniche in vivo ed in vitro, quindi se raffrontati, presentano aspetti simili e differenze, vantaggi e svantaggi. Gli immunodosaggi di "seconda generazione" per le IgE specifiche hanno migliorato significativamente la sensibilità analitica e la riproducibilità, grazie anche alla superiore qualità dei reattivi ed all'automazione totale. I metodi quantitativi, inoltre, possono consentire l'adozione di specifici livelli soglia in grado di differenziare i soggetti asintomatici (atopici) dai sintomatici. Tuttavia, esiste ancora la possibilità di risultati falsamente positivi e falsamente negativi. I primi sono dovuti soprattutto alla presenza di reattività crociata (cross-reattività), mentre i secondi derivano dalla labilità di allergeni clinicamente importanti o da possibili difficoltà nella preparazione di estratti purificati, a partire dal materiale grezzo. La caratterizzazione degli allergeni a livello molecolare e sub-molecolare, e l'uso di allergeni ricombinanti possono ridurre le cross-reazioni e migliorare ancor più la qualità degli immunodosaggi.

### INTRODUZIONE

Le allergopatie, condizioni infiammatorie croniche causate dall'esposizione ad un'ampia varietà di agenti esterni, nella maggior parte dei casi si presentano clinicamente come rinite, asma, dermatite atopica ed altre manifestazioni cutanee, e solo occasionalmente compaiono come eventi capaci di porre in pericolo la vita del paziente, come nel caso dello shock anafilattico. Le ricerche scientifiche svolte nelle ultime due decadi hanno portato ad un sicuro progresso nelle conoscenze sulle cause e sui meccanismi coinvolti nella genesi delle malattie allergiche. Appare di fondamentale rilievo, in particolare, il riconoscimento dell'esistenza di un particolare tipo di infiammazione che è il risultato di una complessa interazione fra differenti cellule effettrici ed i rispettivi mediatori chimici. Un'altra

pietra miliare, in quest'ambito di ricerca, è sicuramente l'identificazione di un nuovo isotipo di immunoglobuline umane, chiamate immunoglobulina E (IgE). I laboratori clinici hanno un ruolo sempre più rilevante nella diagnosi e cura delle allergopatie: dall'identificazione della diatesi allergica alla diagnosi di malattia, dalla valutazione dell'entità dell'infiammazione al monitoraggio dei pazienti in trattamento terapeutico (1). Ancor oggi, benché siano disponibili marcatori vecchi e nuovi dell'attivazione degli eosinofili (ad esempio, la proteina cationica degli eosinofili), di degranolazione dei basofili (istamina e N-metil-istamina) e di attivazione delle mast cells (triptasi), l'esame più diffuso e sulla cui importanza clinica permane aperto il dibattito, è la determinazione delle IgE specifiche nel siero. Scopo di questo lavoro è, pertanto, esaminare i vantaggi ed i limiti delle metodiche per la determinazione delle IgE

specifiche e chiarire il loro reale valore nella pratica clinica.

## 1. Epidemiologia: prevalenza delle allergopatie

Le allergopatie colpiscono all'incirca il 15-25% della popolazione generale (2,3). In anni recenti si sono accumulate evidenze sull'aumento della prevalenza dell'atopia e dell'asma in tutti i Paesi sviluppati. Negli U.S.A., dove si è registrato un aumento della prevalenza del 75% ad iniziare dal 1980, il numero di americani che soffrono di allergopatie risulta così suddiviso: 14.6 milioni di pazienti affetti da asma, 27 milioni da rinite allergica, 10% dei bambini affetti da dermatite atopica, 13.8 milioni con allergie alimentari, da 1,1 a 2.8 milioni di soggetti con allergia ad insetti e circa 27.500 episodi/anno di reazioni anafilattiche (4). Uno studio recente, volto ad indagare la frequenza dell'atopia attraverso la determinazione delle IgE specifiche per gli otto allergeni inalatori più comuni, ha dimostrato che la frequenza dell'atopia nella Groenlandia è aumentata fra il 1987 ed il 1998 di circa il 90%, con un aumento dell'8% per anno. L'aumento è stato più rilevante fra gli adolescenti nelle fasce di età compresa fra 15 e 19 anni, ma è risultato presente anche negli anziani, a suggerire che i fattori di rischio non sono attivi solo in età pediatrica (5). A dispetto di significative variazioni in aree geografiche diverse (ad esempio, la prevalenza attuale dell'asma varia dal 2.3% in bambini finlandesi ad oltre il 10% in soggetti di pari età del Regno Unito), vi è sicura evidenza dell'aumento della frequenza delle allergopatie nelle ultime decadi ed in tutto il mondo (6-8). La natura del fenomeno è conosciuta solo in parte, ma sembra correlata a modifiche nello stile di vita ben visibili nei Paesi sviluppati, comprese le variazioni nella flora batterica intestinale, l'ampio uso degli antibiotici, gli inquinanti ambientali, l'obesità ed, in generale, uno stile di vita più sedentario (9). Il ruolo delle infezioni è più controverso. Esse possono esacerbare l'asma, ma si ritiene che il controllo delle malattie infettive e l'elevato livello igienico raggiunto negli scorsi anni abbiano contribuito ad aumentare i casi di atopia. Le attuali evidenze scientifiche suggeriscono che il miglioramento delle condizioni sanitarie nei Paesi industrializzati abbia ridotto il numero o la tipologia di infezioni capaci di modulare il viraggio del profilo immunologico da TH2 (fenotipo atopico) a TH1 (fenotipo non-atopico) (10). Un altro elemento di grande rilievo, è l'elevato costo che le patologie allergiche, asma e rinite in primis, determinano in tutti i Paesi sviluppati. Negli USA, le spese coperte dal sistema sanitario e dai singoli individui per queste malattie ammontano ad oltre 8 miliardi di dollari per anno (11). Questa somma, peraltro, rappresenta sicuramente una sottostima rispetto alla reale spesa complessiva, dato che molti soggetti non ricorrono al sistema sanitario e/o si affidano a terapie alternative. Anche i costi indiretti, derivanti dall'assenza dai posti di lavoro e da scuola, dalle limitazioni nell'attività, dagli effetti sulla carriera scolastica e da altri costi intangibili, rappresentano una fonte di preoccupazione crescente (12). A fronte di questi costi, veramente significativi, un dato recente dimostra che i costi della diagnostica sono assolutamente limitati e tali da

non superare l'1% dei costi complessivi (13).

Le difficoltà nella diagnosi delle allergopatie derivano essenzialmente dal fatto che molte altre patologie di diversa eziologia si presentano con quadri clinici simili e che non vi è un singolo "gold standard" in grado di stabilire, in modo affidabile, la diagnosi (14). Solo uno specialista esperto, avvalendosi di dati clinici e di laboratorio, può porre con certezza la diagnosi che si basa, ancor oggi, sull'attento esame anamnestico ed obiettivo del paziente, sulla valutazione dei sintomi, sui dati di laboratorio e su ogni altra indagine strumentale che sia ritenuta appropriata rispetto allo specifico quadro clinico. Se, quindi, l'esame anamnestico ed obiettivo rimangono i cardini su cui va costruita l'ipotesi diagnostica, sono altrettanto dimostrati i limiti della semeiotica tradizionale e la necessità di integrare quest'informazione con altre indagini (prove cutanee ed esami di laboratorio) per ridurre il rischio di errore che, in questi casi, si traduce soprattutto in rischio di falsi-positivi, e quindi, di trattamento inappropriato di soggetti non-allergici (15).

Un elemento unificante all'interno dell'eterogeneità delle malattie allergiche, che spaziano dall'asma alla dermatite atopica, dalla rinite allo shock anafilattico, è rappresentato dal fatto che esse si manifestano in soggetti con livelli significativamente elevati di anticorpi IgE (16). Perciò, dal punto di vista clinico, la determinazione accurata ed affidabile delle IgE specifiche è elemento cruciale nel selezionare i pazienti atopici ed identificare gli allergeni in causa e consente, assieme all'esame anamnestico ed obiettivo, di pervenire a stabilire la diagnosi ed assumere corrette decisioni terapeutiche.

## 2. Struttura e regolazione della sintesi delle Immunoglobuline E

Le IgE sono state, in ordine di tempo, l'ultima delle classi di immunoglobuline ad essere scoperta e caratterizzata, per la sua presenza nel siero in concentrazioni molto piccole e dell'ordine di nanogrammi, in virtù dell'equilibrio fra frazione libera e frazione legata alle mast-cellule, ai basofili, e ad altri tipi di cellule. Questa classe di immunoglobuline era semplice da dimostrare attraverso le prove cutanee, ma difficile da isolare nel siero. La scoperta, nel 1967 da parte di Stig Gunnar Johansson, di una proteina sintetizzata dal mieloma di un agricoltore svedese, ed inizialmente denominata IgND, rese possibile l'ottenimento in conigli immunizzati di antisieri specifici che furono utilizzati per sviluppare un immunodosaggio, che in realtà è stato il primo immunodosaggio per le IgE (17). La conferma, sempre nello stesso anno, che l'IgND descritta da Johansson era identica all'immunoglobulina  $\gamma$ E, scoperta da Ishizaka ed Ishizaka (18,19), e che entrambe erano reagenti coinvolte nel processo allergico, stimolò ulteriori studi e ricerche per caratterizzare la struttura e comprendere le proprietà di questa nuova classe di immunoglobuline, la regolazione della sua sintesi ed il ruolo nelle allergopatie. Dal punto di vista strutturale, le IgE umane contengono due catene leggere ( $\kappa$  e  $\lambda$ ), del tutto indistinguibili dalle catene leggere delle altre immu-

noglobuline umane (IgG, IgA, IgM, e IgD). Viceversa, sono le due catene pesanti epsilon, che contengono cinque domini strutturali (VH, Ce1, Ce2, Ce3, e Ce4) a possedere sequenze antigeniche uniche e a conferire alle IgE la specifica attività biologica. L'IgE è una molecola di massa molecolare relativa di 190,000 daltons, ricca in carboidrati (12%), ed è unica fra gli isotipi delle immunoglobuline a contenere dei legami disolfuro fra catene pesanti su entrambi i lati del dominio C<sub>H</sub>2 (20). Questa struttura è essenziale per spiegare le proprietà biologiche, del tutto uniche, dell'IgE. Le immunoglobuline E sono presenti nel siero in concentrazione molto più bassa rispetto a tutte le altre immunoglobuline (0.0005% di tutte le immunoglobuline nel siero di adulti non-atopici) e, solitamente, inferiore a 200 IU/mL (<480 mg/L). Circa il 50% delle IgE sono distribuite nello spazio extravascolare. L'immunoglobulina ha un'emivita piuttosto breve, da uno a cinque giorni nel sangue periferico, essenzialmente spiegata dall'elevato catabolismo (ogni giorno viene catabolizzato viene catabolizzato il 71% del pool intravascolare). L'IgE non passa attraverso la placenta, né è in grado di attivare la via classica del complemento. L'attività reaginica (sensibilizzazione delle mast-cellule) dipende strettamente dalla capacità di legame con la catena alpha del recettore ad elevata affinità IgE Fc-epsilon (FceRI), che risiede sulla superficie di membrana di basofili e mast-cellule (21).

La sensibilizzazione allergica è un processo a più fasi, finemente regolato, che coinvolge sia cellule B che T e che, a fronte della presentazione di antigeni ambientali (allergeni) al sistema immunitario, determina l'attivazione preferenziale del sottotipo TH2 della popolazione linfocitaria CD4+ T-helper (22). Le cellule TH2 sono programmate per esprimere, se attivate, alcune particolari citochine (ad esempio, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13) che, a loro volta, favoriscono la risposta umorale immune che comprende, anche, lo switch isotipico e la produzione di IgE. Fra le altre particolari caratteristiche delle patologie TH2-dipendenti, le prime e più rilevanti sono l'ipereosinofilia e l'iperplasia delle globet cells. Benché tutti gli individui della popolazione generale siano esposti agli allergeni, solo alcuni reagiscono con una produzione di IgE TH2-dipendente.

L'induzione della produzione delle IgE specifiche nelle cellule B richiede tre segnali separati. Primo, il reclutamento del recettore antigenico delle cellule B dà inizio al processo che esita nell'attivazione, a cascata, di un segnale citoplasmatico e nucleare. Affinché l'attivazione della cellula B proceda ed esiti nell'espressione delle IgE, sono richiesti due ulteriori segnali. Il primo di questi segnali è generato da citochine specifiche, mentre il secondo deriva dall'interazione molecolare che segue alla "cognate interaction" tra cellule B e T attivate. Il segnale iniziale, citochine-dipendente, determina l'attivazione della trascrizione a livello di specifiche regioni del locus immunoglobulinico e, quindi, confersice la specificità isotipica. Il secondo segnale attiva meccanismi di ricombinazione che esitano nello switch del DNA ed, in particolare, nella trascrizione a livello del locus e nell'interazione CD40/li-gando del CD40 (CD40L/CD154) che stimola la ricombi-

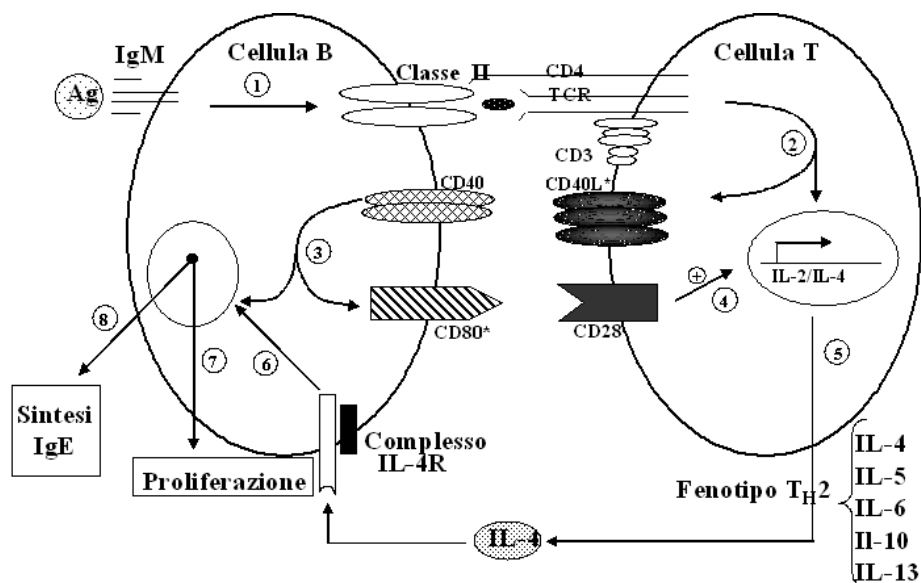
nazione (23,24). I due segnali vengono comunicati alle cellule B dalle cellule T attraverso una complessa serie di interazioni (Figura 1).

Benché gli aspetti fondamentali di questo modello rimangano validi, studi più recenti che si fondano su linee di ricerca di epidemiologia e di immunologia molecolare, hanno portato alla proposizione di paradigmi innovativi e più complessi. Da un lato, si sottolinea l'importanza delle interazioni gene-ambiente che divengono sempre più interessanti e degne di rilievo come determinanti essenziali del tipo e dell'ampiezza della risposta anticorpale indotta da allergeni. Dall'altro lato, la connessione intima fra trascrizione e ricombinazione switch ha ricevuto ulteriori conferme e sottolineature con la scoperta che quest'ultima necessita dell'azione della citidina deaminasi (AID), enzima di recente identificazione e capace di modificare l'RNA.

In particolare, la cosiddetta "hygienic hypothesis" ha focalizzato l'attenzione dei ricercatori sul ruolo dell'esposizione a prodotti batterici, quali endotossine e lipopolisaccaridi, nell'influenzare la sensibilizzazione allergica. Lo scenario che emerge da queste nuove ricerche vede i lipopolisaccaridi, il CD 14 e la differenziazione T helper come principali attori in un complesso circuito stimolato da differenti combinazioni ambientali, e capace sia di attivare che sopprimere le reazioni IgE-dipendenti (25). Lo sviluppo di uno stato allergico IgE-mediato, comprende una fase di sensibilizzazione ed, una successiva, di stimolo. Nella fase di sensibilizzazione, le cellule plasmatiche attivate producono anticorpi IgE, che si legano al recettore Fc delle IgE sulla superficie dei basofili nel sangue e/o delle mast-cells nel tessuto connettivo di cute, nel tratto respiratorio e digestivo, ed attorno ai vasi. Quando i soggetti sensibilizzati vengono nuovamente esposti ad uno stimolo allergico, il legame a ponte degli anticorpi IgE determina degranulazione e rilascio di molti mediatori chimici fra i quali, istamina, leucotrieni, fattore chemotattico dei neutrofilii, fattore attivante le piastrine, enzimi produttori chinine, kallikreine, e nel caso delle mast-cellule, prostaglandina D2. Questi mediatori chimici inducono dilatazione delle piccole vene, aumentano la permeabilità vascolare, determinano la contrazione della muscolatura liscia nelle rete venosa polmonare, aumentano la secrezione ghiandola mucosa, attivano le piastrine e inducono altre azioni flogistiche. Tutti questi eventi possono, alla fine esitare in una risposta di ipersensibilità immediata di tipo I che può variare da semplice eritema localizzato a fenomeni molto più gravi e sistemici quali broncospasma, orticaria, angioedema e, nei casi più severi, possono causare anafilassi e persino la morte (26).

### 3. Determinazione in vivo delle IgE specifiche

Dal momento della scoperta delle IgE più di 30 anni orsono fino ad oggi, sono sorte e rimaste vive molte controversie sui vantaggi ed i limiti della determinazione in vivo ed in vitro di queste immunoglobuline. Nella letteratura scientifica sono ugualmente rappresentati lavori che dimostrano un sostanziale accordo, ed altri che evi-



**Figura 1**

*Interazione delle cellule coinvolte nella sintesi delle IgE (Riferimento bibliografico 24, modificato). Il legame di un antigene (Ag) da parte di un linfocita B che presenta IgM specifiche di superficie conduce all'internalizzazione (1) del complesso IgM/Ag ed è seguito da processazione e presentazione della cellula B nel contesto delle molecole HLA di classe II (2). Il riconoscimento di questo complesso da parte di un complesso T-cell receptor Ag-specifico, induce espressione di CD40L (3). Il legame CD40-CD40L determina "upregulation" dell'espressione di CD80 (4). A sua volta, il legame CD80-CD28 determina un segnale capace di stimolare le cellule T che, assieme al segnale TCR (2), conduce alla sintesi (5) di citochine e alla proliferazione di cellule T (6). La citochina IL-4 si lega al suo recettore specifico sulla superficie delle cellule B e, in sinergia con il segnale CD40 (3 e 6), induce (7) proliferazione delle cellule B (8), viraggio verso l'isotipo IgE ed, infine, sintesi delle immunoglobuline stesse*

denziano mancanza di correlazione fra queste due tecniche di determinazione (27,28). Nella pratica clinica, le prove cutanee, sia in prick test che in intradermico rappresentano, generalmente, la modalità più comune di evidenziazione dell'attività degli anticorpi di classe IgE. Le prove per via per cutanea vengono eseguite utilizzando allergeni diluiti e fatti penetrare all'interno della superficie cutanea mediante puntura o scarificazione. Per una corretta interpretazione della reazione, sono necessari un test di controllo positivo (istamina) ed uno negativo (diluente). Dopo circa 15 minuti dall'applicazione dell'allergene, si esamina l'area cutanea per vedere se è interessata da arrossamento e ponfo. Una reazione positiva (tipicamente, un ponfo di diametro superiore ai 3 mm rispetto alla reazione del controllo negativo, accompagnato da eritema circostante) riflette la presenza di IgE legate a mast-cells, specifiche per l'allergene testato (29). Il test intradermico, invece, viene eseguito iniettando l'allergene o gli allergeni all'interno del derma e, solitamente, viene riservato ai casi in cui permane il sospetto clinico, nonostante siano risultati negativi i test percutanei. L'allergene viene diluito da 10 - a 100 volte più che nei prick test e, benché questa tecnica aumenti la sensibilità clinica, di solito comporta una perdita di specificità. Com'è chiaro dai presupposti fisiopatologici, sia i prick test che intradermoreazioni dipendono non solo dalla presenza delle IgE, ma anche dall'integrità delle mast-cells e delle risposte vascolari e nervose. Dato che si assumono come relativamente costanti gli ultimi due fattori, i test cutanei vengono ritenuti in grado di riflettere

la presenza/assenza di IgE specifiche, ma da un punto di vista teorico, le determinazioni in vivo ed in vitro non possono essere ritenute intercambiabili. Si conoscono molte variabili in grado di interferire sulla risposta ai test cutanei, compresi la stagione, l'ora e l'area cutanea. Gli studi epidemiologici hanno permesso di documentare, con evidenza significativa, il fatto che la reattività cutanea all'istamina contribuisce significativamente ai risultati dell'esame (30). Nel 34% di soggetti che abbiano eseguito prove cutanee in duplicato, si sono osservate variazioni di titolo superiori a due volte (31), così come significative variazioni nella risposta ad allergeni diversi (32), e a diversi lotti di allergene proveniente dallo stesso produttore (33). Un'altra variabile capace di interferire con i risultati delle prove cutanee è l'uso di farmaci, in particolare antistaminici, compresi molti farmaci usati come antidepressivi. Gli antistaminici interferiscono con lo sviluppo dell'eritema e del ponfo e, pertanto, dovrebbero essere sospesi prima dell'esecuzione delle prove cutanee. Se gli antistaminici di prima generazione possono essere sospesi solamente due o tre giorni prima delle prove, i farmaci di seconda-terza generazione possono interferire per periodi più lunghi, da tre fino a dieci giorni ed oltre. Analogamente, dovrebbero essere sospesi tutti i trattamenti con sostanze che possiedono attività antiistaminica, quali agenti anticolinergici, fenotiazina, ed antidepressivi triciclici. Gli antagonisti del recettore H2 dell'istamina (ad esempio, cimetidina e ranitidina) manifestano un modesto effetto inibitorio e possono essere sospesi solo nel giorno del test. L'assunzione

di corticosteroidi per via inalatoria o per via sistemica, se ad effetto rapido, non dimostra capacità di sopprimere la reazione di arrossamento e rigonfiamento (34). I vantaggi più frequentemente riportati a favore delle prove cutanee sono lo scarso costo e l'immediata disponibilità dei risultati. Un ulteriore vantaggio, non sempre considerato, è la possibilità di rendere evidenti i risultati anche di fronte ad un paziente dubbioso e critico. Inoltre, l'immediata disponibilità dei risultati delle prove cutanee facilita il ragionamento clinico e rende possibile allo specialista una valutazione complessiva della storia clinica, della sintomatologia e del test, di fronte al paziente e senza visite ulteriori.

#### 4. Determinazione in vitro delle IgE specifiche

La determinazione in vitro delle IgE allergene-specifiche nel siero avviene mediante dosaggi immunometrici, disponibili da varie fonti commerciali. Le principali differenze nel disegno e nelle proprietà degli immunodosaggi disponibili nel commercio saranno oggetto di trattazione successiva. La determinazione in vitro delle IgE specifiche presenta vantaggi potenziali rispetto alle prove cutanee, fra i quali la precisa definizione dei parametri di performance (sensibilità, specificità, precisione, stabilità, etc). I reagenti utilizzati negli immunodosaggi su fase solida presentano notevole stabilità nel tempo e si prestano a controlli di qualità per valutarne stabilità e riproducibilità, mentre queste prove risultano di difficile attuazione nel caso di test cutanei eseguiti nell'ambulatorio di uno specialista. I risultati dei test in vitro non risentono di alcun effetto da parte di farmaci eventualmente assunti dal paziente, e pertanto non è necessario interrompere alcuna terapia in atto. Sono indipendenti dallo stato della cute e non presentano rischio di reazioni sistemiche (28). Per tutte queste ragioni, i test in vitro rappresentano la modalità preferita e raccomandata di determinazione delle IgE nei seguenti casi: a) elevata sensibilità agli allergeni, nel caso di precedenti reazioni gravi e pericolose per la vita; b) patologie della pelle quali dermatografismo severo e dermatite attiva; c) durante eventuali periodi di ipo o mancata reattività dovuta a deplezione delle mast cells, ad esempio dopo una grave reazione allergica; d) assunzione di farmaci, come già sottolineato prima, capaci di interferire con la reattività cutanea; e) pazienti scarsamente collaborativi o che rifiutano il test cutaneo (35).

In accordo con il documento di consenso dell'executive Committee dell'American Academy of Allergy and Immunology, "l'uso selettivo dei test in vitro è giustificato nei pazienti con estesa dermatite o dermatografismo, in pazienti che non possono sospendere un trattamento farmacologico capace di interferire con il test cutaneo, ed, occasionalmente, nei pazienti che si rifiutano di sottoporsi al test stesso (36).

#### 5. Prove cutanee versus immunodosaggio delle IgE specifiche

In circostanze ideali, e con la disponibilità di un allergene purificato per l'esecuzione di prove cutanee intradermiche e per l'allestimento di un immunodosaggio, Ford e

coll. hanno dimostrato valori di sensibilità e specificità per l'immunodosaggio pari al 100% (37). Le differenze di sensibilità e specificità descritte in altri lavori della letteratura dipendono in parte da differenze nei criteri di inclusione dei pazienti e nello standard di riferimento utilizzato per la loro classificazione, ed in parte dalla qualità dell'immunodosaggio stesso (38-40). Negli studi in cui si è assunto come gold standard il risultato della prova cutanea, il test in vitro si è dimostrato meno sensibile (41). Tuttavia, quando si è utilizzato come gold standard l'insieme di storia clinica e risultati delle prove cutanee, i test in vitro, ed in particolare i test di "seconda generazione" hanno dimostrato eccellente efficienza (98%) e specificità (100%) clinica (42). Il nostro gruppo, ha dimostrato un'ottima concordanza fra i risultati del test in vivo ed in vitro. Nel caso di discordanze ed analizzando i campioni con tecniche di laboratorio più sofisticate e più adatte alla ricerca che alla routine (RAST-inibizione e/o immunoblot), si è dimostrata la maggior accuratezza diagnostica del test in vitro (43). Nel mondo reale della comune pratica clinica, comunque, i risultati delle prove cutanee e degli immunodosaggi danno più frequentemente risultati concordanti che discordanti (27).

Non esistono studi che abbiano valutato in modo sistematico i problemi economici ed i costi associati alle due diverse modalità di determinazione delle IgE specifiche, ma i dati provenienti dal rimborso delle prestazioni indicano che, in genere, il test in vitro è più oneroso delle prove cutanee, anche se quest'ultimo è considerato spesso parte della visita specialistica e, quindi, il suo costo è occultato all'interno dell'esame complessivo del paziente. Al livello più semplicistico possibile, un confronto del carico economico per test dimostra che il test in vitro è all'incirca 3-4 volte più oneroso del test cutaneo. Tuttavia, considerando la pratica clinica attuale, quale si desume dai dati del Medicare raccolti nel 1996 sul numero medio di test in vitro (24) ed in vivo (50), la differenza fra pazienti che hanno eseguito prove cutanee rispetto a quelli che hanno eseguito test in vitro è molto minore e di soli 65\$ (44). E' inoltre da sottolineare come l'AAOA (American Academy of Otolaryngic Allergy) abbia rilasciato un documento a dimostrazione della possibilità di diminuire il numero di test in vitro senza compromettere l'accuratezza diagnostica, attuando questi principi: a) uso di test di screening per evitare l'esecuzione di determinazioni inappropriate e costose di IgE specifiche in soggetti non allergici; b) eliminare dai pannelli diagnostici allergeni che presentino cross-reattività o poco usuali, tranne nei casi in cui la storia clinica sia altamente suggestiva ed indichi la reale necessità di eseguire queste analisi (45). La discussione sul costo dei test diagnostici, poi, diviene pura accademia se si pensa che, attualmente, questi costi rappresentano solo l'1% dei costi complessivi dei costi diretti per atopia e asma (13). La Tabella 1 illustra le analogie e le principali differenze fra tecniche in vivo ed in vitro per la determinazione delle IgE specifiche.

La Figura 2 propone una possibile strategia clinica per la diagnosi ed il trattamento delle allergie utilizzando sia le tecniche in vivo che in vitro. Nei casi in cui il paziente

presenti sintomi inequivocabili ed una storia suggestiva, e si ritengono in causa solo uno o pochi allergeni, si consiglia

**Tabella 1**

*Somiglianze e differenze fra prove cutanee e test in vitro (citazione 28, modificata)*

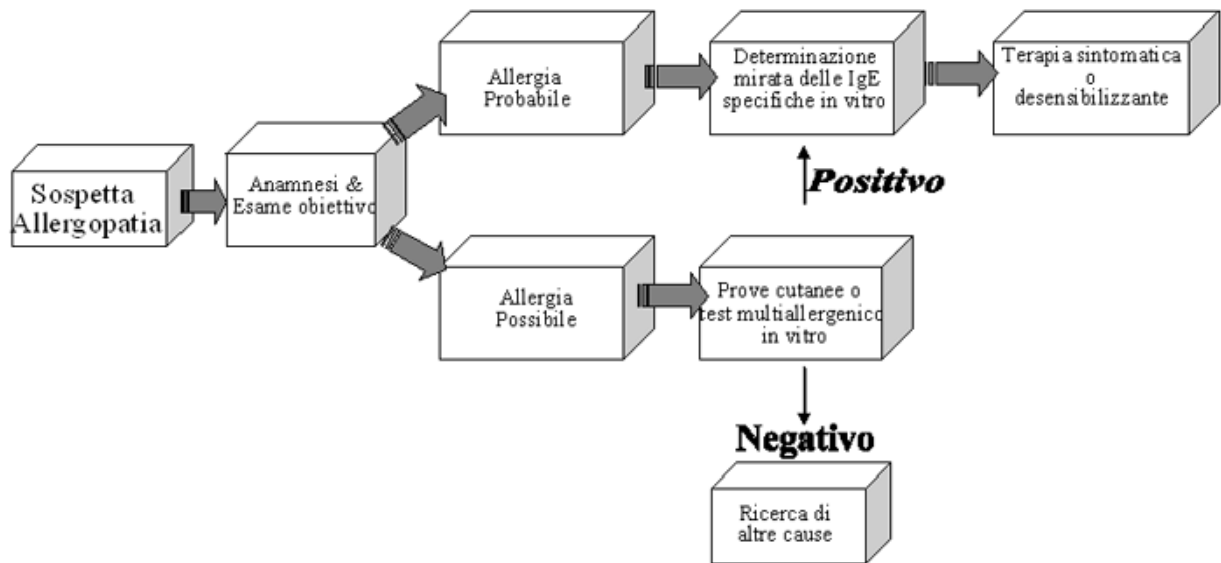
PROVE CUTANEE	TEST IN VITRO
Riflette non solo la presenza, ma anche l'attività biologica delle IgE	Determinano esclusivamente la concentrazione delle IgE nel siero
Varie modalità di esecuzione, e dispositivi per puntura cutanea con caratteristiche diverse	Standardizzazione dei metodi in progress
La qualità degli estratti può degradarsi nel tempo, specie per alcuni allergeni	Il legame con fasi-solide è in grado di prevenire la perdita/labilità di specificità antigeniche
I test per cutanei ed intradermici non presentano la stessa sensibilità e specificità clinica	La rilevanza clinica dei risultati debolmente positivi, è ancora in discussione
Tecnica manuale che richiede appropriata formazione, abilità ed esperienza.	Metodi parzialmente o totalmente automatizzati
La presenza di sistemi diversi di refertazione rende difficile il confronto fra centri diversi	Risultati quantitativi con i metodi di "seconda generazione"
Nessuno standard per le modalità operative, per il personale, per il controllo di qualità	Standard di accreditamento nazionali ed internazionali (ISO 15189, CLIA '88 etc)
Risultati disponibili in pochi minuti	Risultati disponibili nel giro di alcune ore o giorni, a seconda dell'organizzazione del laboratorio
Costo per test inferiore	Costo per test più elevato, modeste differenze nei costi complessivi
Interferenza da parte di alcuni farmaci	Nessuna interferenza da farmaci
L'interpretazione dei risultati richiede un'appropriata formazione ed esperienza	L'interpretazione dei risultati, nello specifico contesto clinico, richiede conoscenze appropriate
Tecnica di carattere specialistico	contesto clinico, richiede conoscenze appropriate
Alcuni pazienti possono rifiutare il test	Procedura diagnostica largamente accettata
Rischio, anche se modesto, di reazioni sistemiche	Test non-invasivo, nessun rischio di reazioni sistemiche

la determinazione selettiva delle IgE specifiche nel sangue. Nei casi, invece, nei quali la diagnosi sia incerta, o nel sospetto di sensibilizzazione multipla, si ritiene utile eseguire inizialmente le prove cutanee o un test di screening con miscela di allergeni diversi e, se test risulta positivo, viene raccomandata la determinazione quantitativa delle IgE nel siero con tecniche immunometriche per una diagnosi definitiva ed un trattamento mirato.

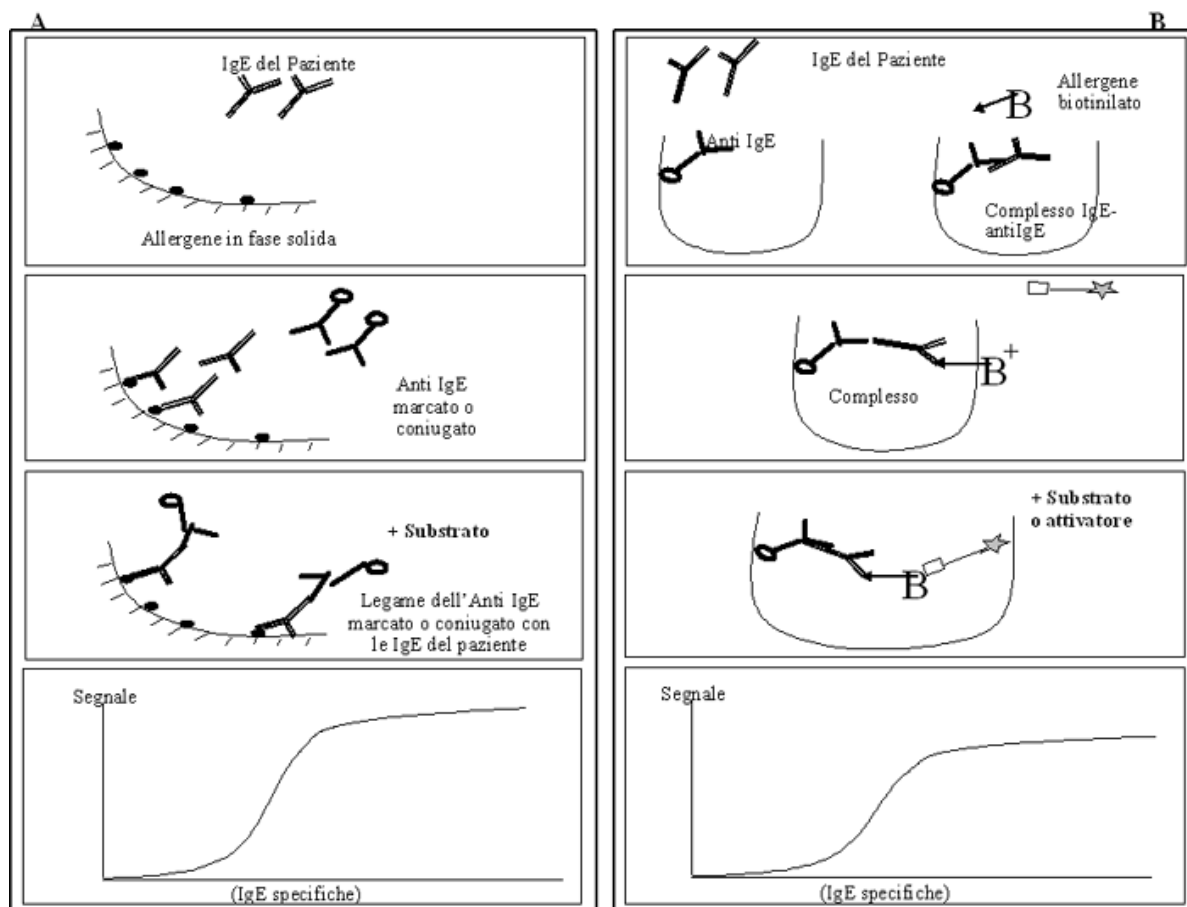
**6. Metodi diversi per la determinazione in vitro delle IgE specifiche**

Nelle ultime decadi, l'importanza e la qualità delle tecniche per la determinazione delle IgE specifiche nel sospetto di allergie di tipo I, sono andate progressivamente aumentando. Il prototipo della determinazione in vitro delle IgE specifiche nel siero è rappresentato dal cosiddetto RAST (radioallegosorbent test), descritto per la prima volta da Wide e collaboratori nel 1967 (46). Nella sua forma originale, il RAST utilizzava un dischetto di carta come fase solida alla quale era legato con legame covalente (allergosorbent) l'allergene per consentire la cattura degli anticorpi allergene-specifici di tutti gli isotipi, ed in particolare IgE, IgG ed IgA, presenti nel siero del soggetto in esame. Dopo un lavaggio con tampone per rimuovere le proteine non legate, le IgE adese al dischetto venivano riconosciute mediante un anticorpo policlonale anti-IgE umane, marcato con <sup>125</sup>I. I risultati venivano riportati in classi o in unità arbitrarie mediante interpolazione di una curva di calibrazione eterologa con IgE anti-betulla. Nel formato originale, la curva di riferimento consisteva di diluizioni scalari di un campione di siero contenente IgE specifiche per la betulla. Le diluizioni erano studiate in modo da costruire una curva di calibrazione capace di esprimere i risultati in unità arbitrarie (PRU/mL) e calibrata contro lo standard dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO). Il test originario, il cosiddetto Phadebas-RAST, fu commercializzato da Pharmacia Laboratories (Uppsala, Svezia) a partire dal 1974, ed il marchio "RAST" venne usato, ed è tuttora erroneamente utilizzato, per descrivere tutti gli immunodosaggi per la determinazione delle IgE specifiche.

Sono stati effettuati molti tentativi per migliorare l'immunodosaggio originale: Nabeluff e collaboratori, già nel 1979 utilizzarono una incubazione più lunga ed un diverso sistema di classi per ottenere una sensibilità simile a quella dei test cutanei, senza perdita di specificità (47). I ricercatori tentarono di sostituire la fase solida in forma di destrano insolubile con altri supporti, quali cellulosa sotto forma di dischetti di carta (48), particelle microcristalline (49), strisce di carta (50), minicolonne (51), e particelle paramagnetiche (52). Altre fasi solide sperimentate, sono state nitrocellulosa (53), provette di polistirene (54) e micropiastre (55). Molti di questi tentativi hanno portato alla predisposizione di metodi commerciali, già oggetto di una rassegna (1). Più recentemente, gli immunodosaggi delle IgE specifiche sono stati migliorati in modo sostanziale, sia sostituendo gli anticorpi policlonali radiomarcanti con anticorpi monoclonali coniugati con traccianti enzima-



**Figura 2**  
 Proposta di percorso diagnostico e terapeutico nel sospetto di malattia allergica



**Figura 3**  
 Principali tipologie di immunodosaggi per le IgE specifiche. A) Immunodosaggio basato su allergeni legati alla fase solida. Se il tracciante è  $^{125}$ , il metodo prende il nome di dosaggio immunoradiometrico a due siti (IRMA). In alternativa, gli anticorpi anti-IgE possono essere marcati con enzimi o altro tracciante non-isotopico. B) Immunodosaggio "a sandwich" basato su allergeni in fase liquida. La streptavidina può essere coniugata con per ossidasi, esteri di acridinolo, o altro tracciante. La reazione è scatenata dall'aggiunta di uno specifico substrato o altro agente chimico

tici, sia sviluppando una fase solida con capacità di legame più elevata, ed infine, rendendo possibile un'automazione parziale o totale della procedura analitica. La Figura 3 illustra le due principali categorie di immunodosaggi per la determinazione delle IgE nel siero che si basano su allergeni in fase solida o liquida, rispettivamente. Infatti, attualmente, gli immunodosaggi disponibili sono tutti di tipo non-competitivo, utilizzano vari tipi di tracciante, per lo più non-isotopici, e, quindi, la differenza principale è rappresentata dall'uso di allergeni in fase solida o liquida. Tuttavia, malgrado questi significativi miglioramenti nelle tecniche di determinazione delle IgE in vitro, la maggior parte dei clinici ritiene ancora che le prestazioni analitiche e cliniche degli immunodosaggi attuali siano sovrapponibili a quelle del RAST originale e, pertanto, non sono in grado di apprezzare le potenzialità diagnostiche di queste nuove metodologie. E' quindi tempo di caratterizzare e classificare in modo più corretto gli immunodosaggi per la determinazione delle IgE specifiche sulla base delle loro reali prestazioni.

In accordo con la linea-guida emanata dall'NCCLS (56), gli immunodosaggi per le IgE specifiche dovrebbero essere classificati in tre gruppi: qualitativi, semiquantitativi e quantitativi, a seconda dell'accuratezza e della precisione nella determinazione della concentrazione degli anticorpi specifici di classe IgE nel siero.

- **Qualitativi.** Un metodo qualitativo (di screening) può produrre uno fra due soli e possibili risultati, ossia a) non-reattivo, negativo, non rivelabile; o b) presente o reattivo, positivo, rivelabile. Questi metodi, solitamente, prevedono un solo campione di riferimento che definisce il livello-soglia (threshold) del metodo stesso. L'esempio più esplicativo e diffuso di questa categoria di metodi qualitativi è rappresentato dai test di screening (o test di primo livello) con allergeni multipli (ad esempio, il Phadiatop Pharmacia). In questo tipo di test, il reagente è in realtà una miscela di cinque o più specificità allergeniche diverse e la eventuale presenza di anticorpi IgE specifici per questi diversi allergeni viene messa in evidenza con un'unica reazione (57-62). Vista la presenza di un gran numero di specificità allergeniche diverse, questi metodi presentano difficoltà intrinseche nel controllo di qualità per problemi di riproducibilità della composizione e quantità di allergeni.
- **Semiquantitativi.** In questi metodi le variazioni del segnale vengono espresse in classi o gradi progressivi (ad esempio, dal basso verso l'alto, da classe 0 a classe VI), oppure in unità arbitrarie, rapportate ad un volume espresso in millilitri (U/mL), o litri (kU/L), sulla base di una curva dose-risposta eterologa e non standardizzata. I risultati ottenuti non sono tracciabili rispetto ad un qualsiasi materiale di riferimento, e questi metodi non sempre rispettano i criteri di linearità, recupero, e parallelismo, come invece è caratteristica degli immunodosaggi quantitativi. In questo gruppo, rientrano il RAST originale e la maggior parte degli "analoghi del RAST".

- **Quantitativi.** Un metodo quantitativo, per definizione, fornisce una determinazione accurata e riproducibile della concentrazione di un qualsiasi analita, compresi gli anticorpi di classe IgE, e risponde a ben definiti criteri analitici, fra i quali parallelismo, recupero, e linearità nell'intero intervallo di lavoro. Questo tipo di metodo si avvale di una curva di riferimento a più punti con interpolazione eterologa o omologa. La calibrazione eterologa, tipicamente utilizzata nel caso delle IgE specifiche, viene unanimemente considerata un'alternativa accettabile in quanto la concentrazione di IgE specifiche per qualsiasi allergene viene desunta dall'interpolazione su una curva di calibrazione eterologa, ed in particolare la curva di calibrazione delle IgE totali utilizzando lo standard WHO 75/502 (56). Pertanto, il metodo è tracciabile rispetto a questa preparazione internazionale (WHO 75/502). I risultati vengono, di conseguenza, riportati in unità gravimetriche (mg/L) e/o, più comunemente, in unità internazionali (kU<sub>A</sub>/L).

Le principali caratteristiche delle tre diverse categorie di immunodosaggi attualmente disponibili per la determi-

**Tabella 2**

*Classificazione degli immunodosaggi per le IgE specifiche (ripreso e modificato dal riferimento bibliografico 56)*

Classificazione	Presentazione dei Risultati	Calibrazione dei Metodi	Calibratori, Materiali di Riferimento e Controllo
Qualitativi	-Positivo o negativo -Indeterminato o zona "grigia"	- Calibratore -Calibratore per normalizzare il test	-Unico campione di rifer. - Controllo positivo o negativo
Semiquantitativi	-Unità arbitrarie o classi	-Calibratore singolo o duplice per normalizzare il test	-Controllo negativo e positivo a due livelli (talora a tre livelli) -Unico sistema di riferimento con pool di origine umana
Quantitativi	- Unità quantitative (kUA/L) tracciabili rispetto ad una preparazione di riferimento (Standard WHO 75/702 per IgE totali)	-Curva di calibrazione e interpolazione dati	-Controlli positivi a tre livelli -Materiali di riferimento

nazione delle IgE specifiche, sono schematizzate nella Tabella 2.

Mentre i metodi qualitativi mantengono un ben preciso loro valore nella pratica clinica, se utilizzati come test di primo livello nell'algoritmo diagnostico e/o come metodica di scelta negli studi epidemiologici, i metodi semiquantitativi presentano numerosi e gravi limiti. Nel documento di consenso dell'American Academy of Allergy and Immunology (36), la determinazione quantitativa ed accurata delle IgE viene considerata "un prerequisito necessario per definire con maggior precisione l'accuratezza diagnostica della determinazione delle IgE in vitro ed i rapporti fra concentrazione delle IgE e sintomi o rischio di malattia. Inoltre, l'approccio quantitativo facilita l'adozione dei tradizionali criteri statistici per la definizione del livello decisionale (ad es. curve ROC) e la determinazione del profilo di precisione (63,64). Pastorello e collaboratori, hanno ben dimostrato l'utilità clinica di un appropriato livello decisionale per le IgE specifiche nel distinguere la semplice sensibilizzazione dalla vera allergia con sintomatologia clinica in pazienti con prove cutanee positive (65). Quest'evidenza può essere fondamentale nel superare il supposto limite della determinazione delle IgE specifiche che, in teoria, sembrerebbero riflettere semplicemente la sensibilizzazione verso uno o più allergeni e non presenterebbero invece una precisa correlazione con la sintomatologia o il reale rischio di malattia. Più recentemente, alcuni lavori hanno dimostrato che il passaggio da metodi in grado di determinare la presenza/assenza delle IgE specifiche, a tecniche quantitative migliora significativamente l'informazione clinica. Infatti, si è visto non solo che esiste una correlazione fra concentrazione di IgE specifiche e reazioni allergiche, ma che è possibile costruire una curva per ogni singolo allergene che evidenzia la crescente probabilità di diagnosi di allergia sulla base della concentrazione delle IgE nel siero. In tal modo, il risultato quantitativo diviene un'informazione di valore per ridurre l'incertezza diagnostica ed essere di effettivo supporto al clinico (66). Perciò, la disponibilità di risultati quantitativi può realmente tradursi in un valore aggiunto da punto di vista clinico in quanto consente allo specialista di evidenziare non solo la presenza delle IgE, quanto piuttosto la relazione esistente fra la loro concentrazione e la sintomatologia clinica e/o il rischio di malattia. Inoltre, l'espressione quantitativa dei risultati consente di abbandonare le attuali modalità arbitrarie di refertazione, basate su classi e risultati non tracciabili, migliorando la standardizzazione e la confrontabilità dei risultati ottenuti da laboratori diversi. In teoria, tutti gli immunodosaggi di "seconda generazione" per la determinazione delle IgE specifiche, calibrati contro lo Standard del WHO 75/502, dovrebbero essere considerati metodi "quantitativi". Tuttavia, Williams e collaboratori hanno sottoposto ad un'attenta valutazione alcuni immunodosaggi disponibili nel commercio per la determinazione delle IgE prendendo come riferimento i criteri di performance analitica (specifiche di qualità), ed in particolare una pendenza della retta di correlazione vicina all'unità per tutti gli allergeni, una ridotta imprecisione analitica, e limiti di sensibilità analitica stabiliti con criteri

statistici. Quattro su cinque immunodosaggi hanno dimostrato prestazioni insufficienti rispetto agli standard, in alcuni casi per scarsa accuratezza o elevata imprecisione, particolarmente per alcune classi di allergeni quali muffe e graminacee (67). In un altro lavoro, del nostro gruppo di ricerca, sono state descritte discrepanze significative nel confronto fra risultati di dosaggi di "seconda generazione", ma si è dimostrata la possibilità di ridurre la significatività clinica di queste discrepanze adottando limiti decisionali basati sull'analisi delle curve ROC (receiver-operating characteristics) (68). Un'analisi attenta di questi dati, perciò, permette di concludere che i metodi di "seconda generazione" calibrati verso lo standard WHO 75/502 migliorano solo in parte la standardizzazione la confrontabilità dei risultati che, ancor oggi, possono variare da laboratorio a laboratorio se vengono utilizzati metodi diversi. Il disegno dell'immunodosaggio, la qualità degli estratti allergenici come pure la qualità degli altri reagenti, influiscono in modo significativo sulle performance analitiche e possono spiegare l'eventuale corrispondenza ai criteri del metodo ideale o la deviazione rispetto a questi stessi criteri.

## 7. Variabili che influiscono sulla qualità degli immunodosaggi per le IgE specifiche

Le prestazioni analitiche degli immunodosaggi per le IgE dipendono dall'architettura complessiva del metodo, ma in particolare da alcune variabili fondamentali. Ogni variabile gioca un ruolo indipendente ma influenza anche le altre variabili, producendo in tal modo un effetto aggiuntivo sulla qualità ultima del test. Le variabili fondamentali negli immunodosaggi per le IgE sono le seguenti:

### *Anticorpi anti-IgE umane*

Gli anticorpi specifici per IgE umane possono essere utilizzati come reagenti di cattura o di rivelazione. Quando siano ben purificati, gli anticorpi anti-IgE possono essere utilizzati direttamente nel metodo di determinazione, oppure essere sottoposti a modifiche chimiche nelle varie forme di tracciante isotopico, tracciante enzimatico o di altra natura, oppure possono essere immobilizzati mediante legame fisico o chimico ad una fase solida. Dato che questi reagenti-chiave conferiscono specificità agli immunodosaggi, devono essere altamente specifici per determinanti ben caratterizzati della catena pesante epsilon (69,70). All'inizio, sono stati utilizzati reagenti policlonali, preparati immunizzando varie specie di animali (ad es. capra, coniglio, cavallo) con IgE purificate da mieloma umano (71,72). Più recentemente, si sono resi disponibili anticorpi monoclonali specifici per le IgE, utilizzabili sia a fini di ricerca che per lo sviluppo di immunodosaggi commerciali (73,74). I monoclonali, se utilizzati come reagente per immunodosaggi, presentano indubbi vantaggi quali la specificità e la mancanza di variazioni fra lotti diversi, spesso osservabile nel caso di anticorpi policlonali (75). Tuttavia, spesso presentano bassa affinità ed avidità, e per tali motivi alcune case produttrici utilizzano delle miscele di anticorpi mono- e policlonali come reagenti di cattura e rivelazione delle IgE. La specificità dei reagenti

per le IgE umane può essere dimostrata mediante tecniche di legame diretto (analisi in diluizione) utilizzando immunoglobuline umane purificate e rese insolubili, e mediante inibizione competitiva, introducendo nel dosaggio immunoglobuline non-IgE.

**Reagenti contenenti allergeni**

Il reagente contenente l'allergene, componente critico per assicurare specificità alla determinazione, è unanimemente considerato la variabile più complessa e critica del metodo, sia per quanto riguarda gli aspetti di preparazione a partire dal materiale grezzo, sia per le problematiche di controllo della qualità di lotti diversi, ed infine per le tematiche inerenti la validazione. L'eterogeneità del reagente dipende da molti fattori, anche nel caso lo stesso produttore utilizzi le medesime fonti per ottenere un estratto purificato, gli stessi reagenti chimici e adotti procedure di produzione standardizzate (Tabella 3).

L'importanza della qualità e della standardizzazione degli allergeni nella pratica clinica è stata riconosciuta già molti anni orsono e, nel primo meeting dell'American Academy of Allergy, Louis Tuft affermò: "Credo che tutti noi siamo convinti dell'importanza strategica della standardizzazione degli estratti allergenici" (76). La qualità dell'estratto allergenico "naturale" è molto migliorata nelle scorse decadi grazie alla più approfondita conoscenza della chimica delle proteine e grazie alla capacità delle industrie del diagnostico di tradurre queste conoscenze nella produzione di prodotti più affidabili (77-84). La standardizzazione degli allergeni non si basa più sulle unità di azoto proteico o sulla stima del rapporto peso/volume. Tuttavia, gli estratti allergenici preparati a partire da materiali presenti in natura non possono che essere preparati eterogenei, contenenti proteine ed altre macromolecole non-allergeniche, e, fino ad oggi, solo pochi estratti, a fronte delle centinaia disponibili per indagini diagnostiche, sono stati approvati dal WHO per l'uso come standard internazionale (Tabella 4).

Inoltre, gli allergeni prodotti a partire da materiale di

origine naturale variano nella composizione e nel contenuto di allergene, possono essere contaminati da altri allergeni, e possono contenere enzimi proteolitici (85). La maggior parte del materiale di partenza contiene molti allergeni maggiori e minori, ed anche utilizzando tecniche di purificazione avanzate, è difficile standardizzare una miscela di proteine diverse (86,87). Negli ultimi anni, si è assistito ad un incredibile progresso nella biologia molecolare degli allergeni; tutti gli allergeni maggiori sono ormai stati clonati ed è disponibile un numero sempre più esteso di allergeni ricombinanti che sono rappresentativi, in misura significativa, della complessità degli epitopi presenti negli estratti allergenici di origine naturale (Tabella 5).

Vi sono varie aree di applicazione degli allergeni ricombinanti per migliorare la diagnostica delle allergopatie. In primo luogo, è possibile utilizzare combinazioni di allergeni ricombinanti che rappresentino la sommatoria degli epitopi più rilevanti di alcune specificità e fonti allergeniche, quali pollini di alberi, graminacee, acari, veleni, etc. Si è anche visto che l'aggiunta di allergeni ricombinanti a preparati estrattivi può migliorare la sensibilità dei test diagnostici (88,89). In secondo luogo, è possibile disegnare test diagnostici basati su singoli allergeni ricombinanti che consentano la quantizzazione affidabile di anticorpi di classe IgE che possano assumere un preciso valore di marcatore di sensibilizzazione. Infine, gli allergeni ricombinanti sono essenziali per sviluppare tecniche innovative, che utilizzano ad esempio i microchip, e siano finalizzate a migliorare le nostre conoscenze sui problemi della cross-reattività delle IgE rispetto ai vari allergeni (90).

**Sistemi di calibrazione**

La terza componente degli immunodosaggi delle IgE, che varia ampiamente a seconda della tipologia di metodo commerciale adottato, è il sistema di calibrazione utilizzato per definire la concentrazione di immunoglobuline all'inter-

**Tabella 3**

*Cause potenziali dell'eterogeneità del reattivo contenente l'allergene (riferimento bibliografico 56, modificato)*

- Fonte dell'allergene: errata identificazione, contaminazione e inerente variabilità biologica del materiale grezzo (56)
- Processo di estrazione: variazioni fra lotto e lotto nella composizione dell'allergene (56);
- Variazione fra lotti della produzione del reagente contenente l'allergene (56);
- Legame variabile alla fase solida o al tracciante (75);
- Variabile stabilità dell'allergene durante la conservazione e possibile perdita di alcune specificità (75);
- Eterogeneità degli standard tandard di riferimento interno utilizzati nel controllo di qualità (56);
- Eterogeneità delle specificità dell'anticorpo IgE nei sieri umani dei materiali di controllo (56);
- Differenze negli immunodosaggi e nei criteri di accettazione utilizzati per la validazione finale dei reagenti (68).

**Tabella 4**

*Preparazioni Internazionali biologiche di riferimento del WHO per allergeni (84)*

Nome comune	Genere/Specie	Approvato dal WHO nel	Codice WHO
Betulla	Betula verrucosa	1986	86/522
Artemisia	Ambrosia artemisiifolia	1983	84/581
Pelo di cane	Canis familiaris	1986	84/685
Acaro domestico	Dermatophagoides p.	1983	82/518
Erba codolina	Phleum pratense	1983	82/520
Erba canina	Cynodon dactylon	Da approvare	-
Logliarello	Lolium perenne	Da approvare	-
Alternaria	Alternaria alternata	Da approvare	-

no del sistema di analisi. Nei metodi semiquantitativi, l'ampiezza del segnale si correla con la quantità di IgE realmente presenti nel siero solo entro un ordine di classi, ma non è proporzionale con la quantità stessa. I metodi quantitativi utilizzano i sistemi di calibrazione più avanzati, ed in particolare l'interpolazione sia omologa che eterologa. Tuttavia, viste le difficoltà nell'utilizzo dell'interpolazione omologa, specialmente per la difficile disponibilità di pool di sieri umani contenenti IgE, la procedura di interpolazione eterologa viene attualmente considerata la strategia di calibrazione di più semplice adozione. Nella maggior parte degli immunodosaggi di "seconda generazione" viene eseguita una curva di calibrazione per IgE totali contemporaneamente all'analisi delle IgE specifiche presenti nel siero dei vari pazienti. Questo tipo d'interpolazione eterologa, che utilizza un calibratore tracciabile rispetto ad uno standard primario delle IgE, com'è lo standard WHO 75/502, viene attualmente considerata la soluzione più pratica e diffusa per migliorare la standardizzazione e confrontabilità dei risultati fra laboratori diversi. In alcuni metodi attualmente disponibili nel commercio, grazie all'automazione ed alla stabilità dei reattivi, sono disponibili sistemi che permettono la conservazione della curva standard nella memoria del computer per un certo tempo. Per validare la serie analitica, è così sufficiente analizzare dei sieri di controllo e confrontare i risultati ottenuti con quelli attesi sulla base dei dati già memorizzati nel computer. Tuttavia, non è ancora dimostrato che tutti gli immunodosaggi calibrati contro lo standard WHO 75/502 consentano ai laboratori di ottenere risultati accurati e riproducibili. Williams e collaboratori hanno dimostrato che diluendo progressivamente alcuni campioni di siero e valutando i risultati con il test di regressione, la pendenza della retta è sostanzialmente diversa da quella ideale,

**Tabella 5**  
*Vantaggi degli allergeni ricombinanti nella diagnostica*

- garantiscono la continuità nel tempo delle caratteristiche di elevata purezza (86);
- costituiscono reagenti specifici e più facilmente standardizzabili in termini di unità di massa (86);
- possono essere prodotti con concentrazioni definite e con contenuto proteico verificabile (87);
- possono essere facilmente immobilizzati su vari tipi di supporti e fasi solide (87);
- garantiscono maggior specificità e minori pericoli di reazioni-crociate in confronto agli estratti di origine naturale (86);
- esistono già o sono in via di sviluppo ricombinanti per tutte le principali categorie di allergeni (pollini, alimenti, annessi di animali, etc) che possano essere utilizzati come singolo reagente o parte di una miscela di reagenti ad uso diagnostico(87);
- è possibile riprodurre la complessità degli allergeni naturali attraverso la selezione e la miscela di vari allergeni ricombinanti (87).

tranne che nel caso del sistema CAP Pharmacia (67). Questa deviazione dalla pendenza ideale, riflette l'incapacità di molti immunodosaggi di determinare in modo realmente quantitativo la concentrazione delle IgE. Un'altra importante osservazione riguarda la mancanza di riproducibilità, effettuando il test in triplicato, di alcuni immunodosaggi. In effetti, oltre al sistema di calibrazione, è tutta l'architettura del metodo che può influire sul risultato finale e sulla confrontabilità dei dati. Alcuni sistemi diagnostici, sviluppati in tempi molto recenti (ADVIA Centaur, Bayer Diagnostici, Milano), Diagnostic Product Corporation (IMMULITE 2000, Medical Systems, Genova) e Adaltis (ALLERGEN, Adaltis Inc., Montreal, Canada), sono attualmente in fase di valutazione per dimostrare la loro efficienza ed efficacia, visto che, sulla carta, presentano interessanti caratteristiche analitiche.

#### *Fase-solida ed altre variabili*

La qualità e la capacità di legame della fase solida rappresentano elementi critici nell'assicurare la qualità ultima degli immunodosaggi delle IgE specifiche, e quest'evidenza ha portato a sviluppare una serie di nuovi materiali per assicurare alla fase-solida una più elevata capacità legante. Nel sistema CAP Pharmacia, che può essere considerato a ragione, il prototipo degli immunodosaggi di "seconda generazione", il nuovo polimero idrofilico consente di ottenere un aumento di almeno tre volte rispetto ai dischetti di cellulosa (91). Applicando la legge di azione di massa agli immunodosaggi eterogenei con utilizzo di una fase solida, si può concludere che, nel caso la concentrazione dell'allergene moltiplicata per la costante di equilibrio superi 10, più del 90% degli anticorpi IgE sono legati, e la reazione diviene indipendente dall'affinità dell'anticorpo (14,69). Pertanto, la fase-solido e gli allergeni devono essere presenti in largo eccesso per rendere possibile quest'elevata capacità di legame. Esperimenti condotti con l'immunoblot hanno dimostrato che pressoché tutte le IgE presenti nel siero vengono legate dagli allergeni presenti nell'ImmunoCAP (92). Anche altri immunodosaggi sono in grado di soddisfare questo requisito di qualità (67,93).

Anche il tracciante e il sistema di rilevazione del segnale influiscono sulla sensibilità e qualità finale dei risultati. Nel passato, gli immunodosaggi utilizzavano anticorpi marcati con radioisotopi ma i metodi attuali preferiscono usare anticorpi marcati con enzimi, e sistemi di rivelazione del segnale in spettrofotometria, fluorimetria o chemiluminescenza per superare i problemi legati all'uso degli isotopi e per rendere più agevole l'automazione delle metodiche.

#### **8. Qualità e valore clinico degli attuali immunodosaggi delle IgE specifiche**

Benché molti clinici richiedano ancora il "RAST" e considerino le prestazioni analitiche degli immunodosaggi attuali alla stregua di quelle del "RAST" e degli "analoghi del RAST", qualità, standardizzazione ed importanza delle tecniche in vitro per la diagnosi delle allergie di tipo I sono andate progressivamente aumentando nelle ultime deca-

di. Tuttavia, una risposta in vitro non può tradursi automaticamente in una diagnosi clinica. Il miglioramento dell'utilizzazione dei metodi in vitro per le IgE specifiche richiede un'ottimizzazione sia della qualità analitica dei metodi che dei criteri d'interpretazione (fase post-analitica).

Nel corso di una conferenza recentemente organizzata per discutere le problematiche generali della determinazione quantitativa delle IgE, Yunginger e altri esperti hanno preso in rassegna il ruolo attuale e le potenzialità cliniche degli immunodosaggi quantitativi (94). Il primo ambito di utilizzazione della determinazione quantitativa delle IgE è la predizione dello sviluppo dell'atopia. Benché la determinazione delle IgE totali nel sangue di cordone ombelicale sia utile nell'identificare i bambini ad elevato rischio, vi è esigenza di un marcatore biochimico di atopia maggiormente specifico (95), come appunto la concentrazione delle IgE specifiche per alimenti e allergeni inalatori. Numerosi studi hanno dimostrato il valore predittivo, positivo e negativo, per lo sviluppo dell'atopia, di questo marcatore e sono tuttora in corso altri trial per conoscere quale sia l'età del bambino più indicativa per dimostrare la sensibilizzazione e quali siano i livelli decisionali più efficaci (96-100). L'identificazione dei soggetti maggiormente a rischio prima del manifestarsi dei sintomi e segni clinici dell'allergia, la cosiddetta "Allergy March" (101, 102), è assolutamente strategica per attivare programmi di prevenzione secondaria e terziaria (103-105).

Nelle allergie alimentari, le caratteristiche di prestazione degli immunodosaggi assicurano un elevato valore predittivo positivo, variabile fra il 90 ed il 95%, e possono consentire di ridurre il ricorso al test di provocazione orale nel 50% dei casi (106-109). Il monitoraggio delle concentrazioni delle IgE specifiche per alimenti quali latte, uova, soia e grano rappresenta un presidio utile per valutare la compliance del paziente, la reale astensione dall'assunzione di cibi contenenti questi allergeni e per predire l'eventuale sviluppo della tolleranza (110-112).

Un numero sempre maggiore di lavori e dati della letteratura dimostra l'utilità della determinazione quantitativa delle IgE specifiche nel caso di allergeni di carattere inalatorio, sia come misura della sensibilizzazione individuale (113-115), sia per distinguere pazienti sintomatici da quelli privi di sintomatologia, quando venga adottato un appropriato limite decisionale (66). La determinazione delle IgE può, inoltre, essere utilizzata come marcatore della esposizione all'allergene, e come indicatore di efficacia delle misure di allontanamento dell'individuo dall'allergene stesso (105-113). Altri utilizzi clinici importanti della determinazione quantitativa delle IgE specifiche riguardano i pazienti con manifestazioni allergiche da veleno da imenotteri, contribuendo così a ridurre i rischi intrinsecamente associati alle prove cutanee (114), e da allergie al lattice (117,118).

Come per qualsiasi altro test di laboratorio, è possibile classificare in due grandi gruppi i motivi di mancata correlazione fra sintomatologia clinica e risultati della determinazione in vitro delle IgE. Un primo gruppo di problemi possono essere identificati come risposte falsamente negative che, a loro volta, sono causate dalla labilità di alcuni

allergeni maggiori: tali problemi sono soprattutto evidenti nel caso di allergie alimentari. Un esempio molto noto di allergene alimentare labile, è l'allergene maggiore della mela, Mal d1 (119), ma situazioni simili si ritrovano in altri estratti di frutta, quali pesche, ciliegie e pere (120). In questi casi, risultano spesso negative sia le prove cutanee che le determinazioni in vitro. Per superare il problema, gli allergologi utilizzano la tecnica per le prove cutanee chiamata prick-by-prick, ossia usano allergeni "freschi", senza purificazione o trattamento preliminare. Ovviamente, questa soluzione può risolvere il problema della mancata reattività degli estratti purificati, ma porta con sé altri difetti intrinseci quali difficoltà nella riproducibilità dei risultati, possibilità di scatenare reazioni sistemiche e aumento dei falsi-positivi (27,28). Il nostro gruppo ha dimostrato recentemente in pazienti con sintomatologia gastrointestinale dopo ingestione di grano che tutti i soggetti atopici e solo un non-atopico erano positivi al grano sia con il test in vitro (CAP System) che con le prove cutanee. Tuttavia, in questo secondo gruppo, apparentemente costituito da non-atopici, i risultati dell'immunoblot sono risultati in contrasto con quelli dei test in vivo ed in vitro, a dimostrazione che gli estratti attualmente in uso per il grano presentano un valore clinico limitato (121). La miglior caratterizzazione di tutti i determinanti allergenici e, quando necessario, l'identificazione degli epitopi clinicamente importanti, possono migliorare l'affidabilità e l'efficacia clinica delle tecniche utilizzate per rivelare e determinare in modo quantitativo le IgE specifiche. Pertanto, la miglior caratterizzazione della struttura degli allergeni a livello molecolare e submolecolare (epitopi) è un prerequisito per migliorare la sensibilità e la qualità complessiva della determinazione delle IgE.

Il secondo gruppo di problemi che possono influire sulla affidabilità clinica degli immunodosaggi delle IgE sono riconducibili alle risposte falsamente positive causate dalla cross-reattività.

## 9. Cross-reattività e co-sensibilizzazione

Il termine "cross-reattività" in vitro porta con sé un'intrinseca ambiguità che ne determina, frequentemente, un uso inappropriato. Il riscontro piuttosto comune di positività multipla per allergeni diversi, spesso dovuta all'uso generalizzato delle prove cutanee e/o dei test in vitro, richiede la distinzione fra due fenomeni diversi, cross-reattività e co-sensibilizzazione. La cross-reattività si limita alla presenza di anticorpi che reagiscono in forma crociata con affinità diverse e senza espressione clinica. Il fenomeno, pertanto, può essere evidenziato solo ricorrendo a tecniche in vitro in eccesso di antigene (122). Viceversa, la co-sensibilizzazione si associa a sintomi di natura allergica causati dall'esposizione a varie fonti allergeniche che contengono strutture simili a livello molecolare e submolecolare (123). Il fatto che la maggior parte degli allergici reagisca a più di un allergene può essere messo in relazione ad una sensibilizzazione multipla dovuta all'aumentata risposta immunologica presente nel soggetto atopico. Una risposta TH2 ad un allergene specifico determina

facilmente risposte TH2 successive creando e mantenendo un ambiente che favorisce questo tipo di risposta immunologica; questa situazione viene usualmente denominata come "IgE breeds IgE" (124). Tuttavia, anche nel caso in cui gli allergeni vengano presentati simultaneamente al sistema immunitario, la co-sensibilizzazione non avviene sempre e comunque (125).

Profondamente diverso è il caso di reazione crociata in vivo come responsabile di reattività multipla. La definizione di cross-reattività si basa sul riconoscimento immunologico: due allergeni sono cross-reattivi se esiste un anticorpo (o recettore di cellula T) capace di reagire con entrambi. Nel meccanismo che porta a sviluppare fenomeni di cross-reattività sono riconoscibili tre momenti diversi e tre differenti tipi di cellule coinvolte. Il primo momento è rappresentato dal riconoscimento dell'allergene, che coinvolge cellule vergini immunologicamente di tipo T e B. Il secondo momento temporale prevede il contatto dell'allergene con cellule di memoria di tipo T e B, mentre l'ultimo punto è rappresentato dal contatto fra l'allergene e mast-cellule sensibilizzate (126).

In molti casi di cross-reattività sintomatica, il sistema immunitario viene stimolato solamente da uno degli allergeni che reagisce con anticorpi legati alle mast-cellule vicine alle mucose, ma non raggiunge il vero e proprio sistema immunitario. La prevalenza relativamente elevata di anticorpi cross-reattivi è stata spiegata formulando varie ipotesi, ed in particolare sono stati invocati tre possibili meccanismi. Il primo, è strettamente correlato con il fenomeno conosciuto come "the original antigenic sin" (127), una metafora utilizzata per descrivere l'effetto della prima infezione virale sul sistema immunitario in confronto alle infezioni successive con varianti virali.

Il secondo meccanismo è la policlonalità, e l'aumento della policlonalità dopo esposizioni ripetute allo stesso antigene: più è diverso il repertorio anticorpale, più aumenta la probabilità che questo sia causa di cross-reattività in alcuni individui.

Il terzo meccanismo, maturazione dell'affinità, si basa essenzialmente sull'aumento dell'affinità dopo ripetuti contatti con l'antigene (124). Storicamente, i momenti salienti nella scoperta della cross-reattività in allergia sono rappresentati dall'identificazione, nel 1970 del legame fra allergia a composite e banana (128), da quella betulla/mela (129), dai determinanti carboidratici cross-reattivi (130,131), dalla profillina (132,133), artemisia/sedano (134) latex/banana/avocado (135), e acaro/lumaca/gambero (136-138).

La vicenda betulla/mela, inizia nel 1977 quando Hannuksela & Lahti descrivono quest'associazione su basi prettamente cliniche (129). A quel tempo, la caratterizzazione delle cross-reattività era difficile per la scarsa qualità degli estratti, carenti di proteine significative e "inquinati" da molte strutture cross-reattive. Le nostre conoscenze delle cross-reattività sono fortemente migliorate grazie alla miglior qualità degli allergeni, l'evidenza di test cutanei con positività multiple e presenza di IgE specifiche verso diversi

tipi di estratti. Fino a poco tempo fa, risultava impossibile differenziare la cross-reattività dalla co-sensibilizzazione. Un significativo passo in avanti fu fatto verso la metà degli anni '70, utilizzando la tecnica denominata RAST-inibizione con estratti grezzi. La Rast-inibizione permette di stabilire la presenza di cross-reattività, ma non consente di identificare con accuratezza gli allergeni coinvolti. Ulteriori passi in avanti furono fatti utilizzando delle tecniche separative quali immunoblot e cross-radio elettroforesi. L'immunoblot comparativa di due allergeni diversi consente di identificare la massa molecolare relativa e/o il punto isoelettrico di frazioni potenzialmente cross-reattive. Sottoponendo ad analisi i sieri di numerosi pazienti allergici ad estratti diversi, è possibile identificare quanti siano i casi con pattern di legame per le IgE identico o simile. Gli allergeni cross-reattivi venivano definiti, di solito, sulla base delle loro proprietà chimico-fisiche, ma la loro natura molecolare non veniva identificata e chiarita. Solo agli inizi degli anni '90, con la disponibilità di allergeni purificati e ricombinanti, di anticorpi monoclonali specifici per indagini in vitro, ed anche di allergeni ricombinanti da utilizzare per le prove cutanee, è stato possibile migliorare lo studio e l'identificazione delle cross-reattività a livello molecolare (139).

Nella Tabella 6, viene riportata una classificazione dei meccanismi che possono portare a sensibilizzazione clinica concomitante (CCS) (140).

- **Proteine simili, specie simili o correlate.** In generale, la cross-reattività riflette il rapporto filogenetico fra organismi: più stretto è il rapporto botanico fra due piante, maggiore è il grado di somiglianza strutturale e immunologico degli allergeni (141). La somiglianza strutturale richiede omologia della sequenza primaria che, a sua volta, determina un'omologia della struttura tridimensionale. Le albumine sieriche dei vertebrati sono, di frequente, cross-reattive; allergeni omologhi di erbe filogeneticamente correlate sono tendenzialmente cross-reattive, e le

**Tabella 6**  
Meccanismi che producono co-sensibilizzazione (da Steinman HA, 140, modificato)

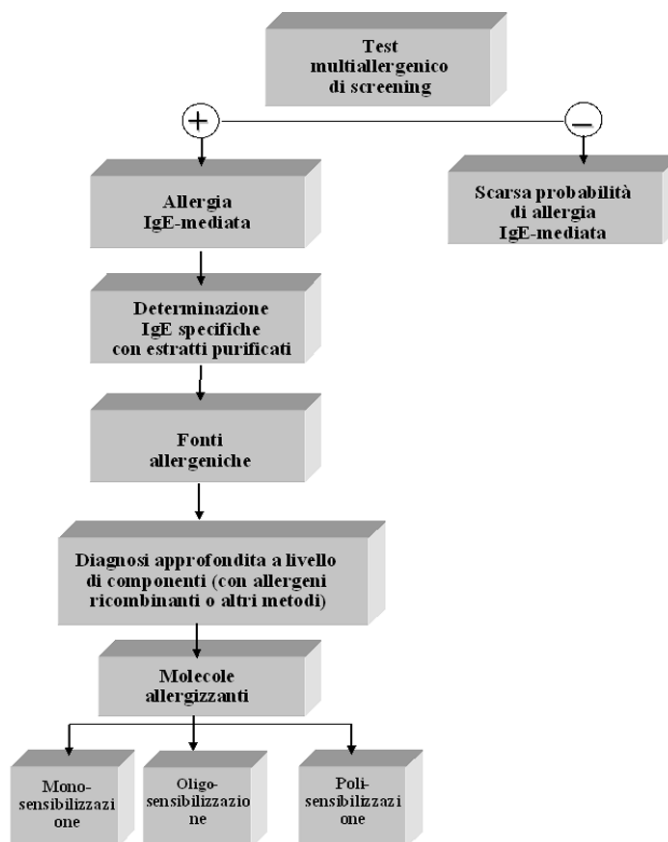
Tipo di meccanismo	Esempi	Spiegazione
1. Proteine simili, specie simili o correlate	Lolium perenne e phleum pratense	Rapporti fra famiglie (allergeni identici)
2. Proteine simili, specie non simili e non correlate	Sedano, spezia, carota, artemisia	Dimostrata cross-reattività, non identificazione di panallergeni
3. Panallergeni	Pesca, mela, arachidi	Presenza di panallergeni (ad es. profillina)
4. Evenienza prossimale	Allergia da piume nel cuscino	Presenza di allergeni nella stessa localizzazione (es. acari)
5. Raggruppamenti	Alimenti comuni associati all'allergia al melone	Eventi statistici senza base e spiegazione biochimica

IgE specifiche per arachidi sono spesso reattive per proteine omologhe presenti nei semi di soia e in altri legumi (142).

- **Proteine simili, specie dissimili o non-correlate.** Sono passati oltre trent'anni da quando è stata descritta per la prima volta la cross-reattività fra due o più specie dissimili. La sindrome "sedano-spezia-carota-artemisia", esempio paradigmatico di questo meccanismo associativo, è dovuta alla presenza di uno o più allergeni simili fra loro anche se provenienti da specie dissimili (143).
- **Panallergeni.** La sensibilizzazione a più pollini rappresenta un evento piuttosto usuale e l'identificazione di molecole allergeniche con elevato grado di omologia nei pollini di piante diverse ha portato alla scoperta di "panallergeni". La profillina rappresenta l'esempio più noto di questa categoria che, peraltro, annovera anche gli omologhi di Bet v1, chitinasi, tropomiosina, ciclofillina, e lipocalina. Le profilline, probabilmente la forma più comune di panallergene, sono state scoperte come allergeni ad elevata cross-reattività ed importanti componenti del citoscheletro delle piante, attraverso l'isolamento del cDNA che codifica per un allergene cross-reattivo con la betulla e, successivamente, identificato come profillina. La cross-reattività fra le IgE specifiche di pazienti allergici e profilline non è solo di origine da piante diverse, ma anche da altri organismi, uomo incluso. Le profilline, quindi, rappresentano una famiglia di allergeni ad elevata cross-reattività nei pollini di provenienza da alberi, graminacee e composite, ma sono espresse, anche se in misura minore, da altre fonti quali frutti, semi, radici e lieviti (144-148)
- **Evenienza prossimale.** Avviene quando l'effetto avverso è causato non dall'allergene apparentemente in gioco ma da un altro, ad esso associato fisicamente o per vicinanza, come nel caso del Red Spider Mite nel pomodoro, e per allergeni nascosti nel cibo, nei cosmetici e nelle medicine (149).
- **Clustering (raggruppamento).** Il clustering degli allergeni può essere specifico per località, tipo di lavoro o gruppi di persone, e spiega la natura della sensibilizzazione clinica concomitante quando non sono in gioco gli altri meccanismi descritti (150).

Dal punto di vista clinico, è necessario progredire ulteriormente nella conoscenza dei profili di cross-reattività perché questi ultimi spesso riflettono il profilo clinico della sensibiliz-

zazione e delle malattie allergiche ad essa correlata. Dal punto di vista immunologico, una miglior conoscenza di questi fenomeni può tradursi in un approfondimento dei meccanismi che regolano la sensibilizzazione allergica e, infine, dal punto di vista terapeutico, lo studio dei meccanismi di co-sensibilizzazione può essere utile per predire la reattività verso nuovi alimenti ed allergeni. Altri importanti benefici che possono derivare dallo studio della cross-reattività sono, ad esempio, la consapevolezza che nel caso due allergeni presentino forti somiglianze strutturali, l'inclusione di entrambi in un pannello non aumenta l'accuratezza diagnostica, ma anzi crea problemi interpretativi. Allo stesso tempo, la terapia desensibilizzante con uno specifico allergene può produrre effetti positivi sui sintomi provocati da allergeni strutturalmente simili. Nelle ultimi decenni, si sono ottenuti progressi significativi nella conoscenza della tipologia, della prevalenza e dei determinanti molecolari dei fenomeni di cross-reattività, e sicuramente ulteriori progressi saranno possibili grazie alla sempre più estesa disponibilità di allergeni ricombinanti. Gli allergeni ricombinanti, già oggi, non vengono utilizzati solo come strumento per la ricerca scientifica, ma come reagenti degli immunodosaggi più recenti. In tal modo, si riducono i fenomeni di cross-reattività "spurie" e non significative dal punto di vista clinico.



**Figura 4**  
 Proposta di algoritmo diagnostico per la caratterizzazione molecolare di sospetta allergia. La diagnosi di mono-, oligo-, o poli-sensibilizzazione determina scelte terapeutiche diverse

Se è vero che la distinzione fra cross-reattività e co-sensibilizzazione deve basarsi su esperimenti in vitro (151), è altrettanto vero che bisogna tener sempre presenti possibili ambiguità e fonti di complessità interpretativa. La cross-reattività in vitro non sempre si riflette in un'analoga cross-reattività in vivo e la differenziazione fra legame delle IgE ed attività biologica richiede una stretta collaborazione fra clinico e specialista di laboratorio. Una rassegna recente sulle implicazioni cliniche della cross-reattività degli allergeni alimentari ha dimostrato il basso rischio di reazioni clinicamente significative per alcune famiglie di antigeni alimentari che presentano cross-reattività in vitro con altre famiglie di allergeni alimentari (152). I fattori che determinano la comparsa di sintomi clinici nel caso di sensibilizzazione multipla sono complessi e legati in parte all'ospite (risposta immune ed iperreattività d'organo-bersaglio) ed in parte all'allergene (labilità e digeribilità). Pertanto, l'approfondimento clinico richiede sia indagini di laboratorio come pure la conoscenza completa della storia e della sintomatologia del paziente. Spesso sono necessari anche test di stimolo in doppio cieco e contro placebo ed altre indagini sofisticate. In generale, comunque, la disponibilità di allergeni ricombinanti e la possibilità di caratterizzare a livello molecolare la natura dell'allergene(i) responsabili dell'allergopatia, hanno aperto nuove prospettive diagnostiche e terapeutiche. Infatti, una diagnosi approfondita attraverso la risoluzione a livello dei componenti che determinano la sensibilizzazione e la sintomatologia, può determinare dei vantaggi significativi nella gestione del paziente. La caratterizzazione delle specificità allergeniche, anche a livello di epitopi significativi, può chiarire se il paziente stesso è sensibilizzato contro una sola o comunque contro poche specificità allergeniche (soggetti mono- o oligo-sensibilizzati), o se invece è affetto da polisensibilizzazione verso una grande varietà di molecole, spesso non correlate dal punto di vista immunologico. La Figura 4 illustra l'algoritmo diagnostico che può essere utilizzato per differenziare la natura della sensibilizzazione, ed in particolare può portare a chiarire se il paziente sia mono, oligo o poli-sensibilizzato, e quali siano le specificità allergeniche in gioco. Quest'informazione è assolutamente necessaria per impostare una più corretta ed efficace strategia terapeutica, ed in particolare è indispensabile nel caso si ritenga di avviare una terapia desensibilizzante (immunoterapia). A sua volta, la disponibilità di specificità allergeniche purificate o di natura ricombinante da utilizzarsi nell'immunoterapia desensibilizzante, migliora la risposta ed evita il pericolo dello sviluppo di IgE contro nuovi allergeni, come descritto nel caso di terapie con estratti poco purificati (153).

Dal punto di vista dell'appropriatezza nella richiesta e dell'analisi di laboratorio, il messaggio più importante è che, se due allergeni sono molto simili strutturalmente, la presenza di entrambi nel pannello diagnostico non aumenta, ma semmai diminuisce, l'accuratezza diagnostica.

## 10. Assicurazione e controllo di qualità

L'assicurazione di qualità, nel caso della determinazio-

ne delle IgE specifiche, inizia e dipende strettamente dal produttore che deve seguire e documentare le specifiche di tutte le fasi attraverso le quali avviene il processo di produzione. La verifica della qualità del reagente e delle sue caratteristiche di prestazione non può prescindere dall'evidenza della qualità del processo di produzione e dei materiali utilizzati nel sistema diagnostico. I sistemi diagnostici, in questi ultimi anni, sono stati sottoposti con sempre maggior attenzione a regolamentazione (36), ed è quindi ormai sufficientemente consolidato il concetto della responsabilità etica e legale del produttore non solo di garantire un prodotto qualitativamente valido, ma anche di documentare ai laboratori clinici alcune informazioni essenziali per quanto riguarda i reagenti utilizzati, la loro fonte, la qualità degli estratti, la stabilità nel tempo, la riproducibilità da lotto a lotto e le caratteristiche di prestazione (precisione, sensibilità, specificità, etc.). Tuttavia, spetta al singolo laboratorio la responsabilità di verificare e validare le caratteristiche di prestazione di questi metodi.

Il secondo livello nell'assicurazione di qualità è sicuramente rappresentato dal controllo interno di qualità (CIQ), che dev'essere eseguito nel singolo laboratorio per documentare che il metodo ed i risultati sono tenuti costantemente "sotto controllo". Le strategie di CIQ adottate dai singoli laboratori possono variare a seconda del disegno del metodo e della strumentazione utilizzata, e sinteticamente possono essere schematizzate in due posizioni estreme. La prima esprime l'opinione che ogni reagente che contenga un allergene dev'essere considerato come un test singolo che richiede uno specifico siero di controllo che, a sua volta, dev'essere esaminato in ogni seduta analitica. La seconda posizione estrema considera, invece, la determinazione delle IgE come un sistema che impiega diverse centinaia di reagenti contenenti ognuno un allergene diverso. A questa complessità fa da contraltare l'evidenza che ogni reagente è stato sottoposto a controllo di qualità da parte del produttore. Secondo questa impostazione, quindi, i sieri di controllo sarebbero superflui.

Entrambe queste posizioni sembrano superficiali e pericolose. La proposta più percorribile e praticabile in tutti i laboratori, ma soprattutto in grado di monitorare il sistema e dare documentazione dell'andamento nel tempo dei risultati, è di: a) identificare il gruppo di specificità allergiche più frequentemente richieste e clinicamente più importanti, b) preparare o acquistare materiali di controllo per queste specificità e c) sottoporle ad analisi in ogni seduta analitica. Nel caso in cui il numero dei materiali di controllo fosse veramente importante, si possono sottoporre a rotazione, utilizzandone solo alcuni nella singola seduta analitica ed alternandoli nelle sedute successive.

Il terzo livello dell'assicurazione di qualità è rappresentato dalla partecipazione a programmi di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ) o Proficiency Testing (PT, Prove di Abilità). Attualmente, vi sono numerosi programmi nazionali ed internazionali di VEQ per la determinazione delle IgE ed il loro obiettivi primari sono: a) identificare i laboratori ed i sistemi diagnostici che determinano le IgE specifiche in modo accurato, e b) permettere ai singoli

laboratori di confrontare i loro risultati con quelli di altri centri. In questi ultimi anni, la confrontabilità dei risultati fra i laboratori è andata migliorando in modo significativo ed in particolare per i laboratori che utilizzano metodi di "seconda generazione" capaci di assicurare risultati quantitativi (154).

## 11. Il futuro

Negli ultimi anni, gli immunodosaggi per le IgE specifiche hanno subito un miglioramento significativo grazie all'utilizzazione di estratti allergenici più purificati, grazie alla possibilità di una espressione quantitativa in unità di massa dei risultati, ed ancora in virtù dell'automazione totale. Tuttavia, i sistemi diagnostici attuali, almeno in gran parte, richiedono notevole spesa di tempo, grandi quantità di campione, utilizzano solo raramente allergeni ricombinanti o miscele (cocktail) di allergeni ricombinanti, e la produttività è inadeguata per effettuare lo screening degli allergeni più comuni a costi ragionevoli. Pertanto, sono in corso numerosi tentativi per superare queste limitazioni e mettere a disposizione dei laboratori clinici una nuova generazione di sistemi diagnostici.

Già sono disponibili strumenti automatici ad elevata produttività totalmente dedicati alle indagini allergologiche (ad esempio, Unicap 100, Pharmacia), o che permettono di consolidare la determinazione delle IgE specifiche con altri dosaggi immunometrici (ad esempio, ADVIA Centaur, Bayer Diagnostici o Immulite 2000, Medical Systems). Altre tecnologie molto sofisticate sono in via di sviluppo. Ad esempio, i microarrays sono in grado di superare molte limitazioni attuali, consentendo l'analisi simultanea e multiparametrica dei campioni in esame per svariate categorie di allergeni (155). La possibilità dei microarrays di consentire la determinazione di diverse centinaia di specificità dello stesso allergene e di allergeni diversi può tradursi in una più approfondita conoscenza delle basi molecolari e submolecolari delle allergopatie (156, 157).

Tuttavia, il laboratorio in allergologia può rappresentare il nuovo ruolo che spetta alla medicina di laboratorio ed ai laboratori clinici nel prossimo futuro. Infatti, i progressi delle tecniche analitiche sono necessari ma non sufficienti per assicurare un'adeguata qualità clinica. L'appropriatezza nella richiesta è un prerequisito per migliorare l'efficacia clinica nell'approccio alle allergopatie e, pertanto, la richiesta generica di "RAST", senza alcuna indicazione sulle possibili specificità allergeniche in causa o sospette, non dev'essere più considerata accettabile. Alcuni allergeni che cross-reagiscono con altre specificità allergeniche senza dare un corrispettivo clinico, non devono comparire assieme nei pannelli diagnostici perché possono causare confusione e diminuire l'accuratezza diagnostica. L'interpretazione clinica dei risultati qualitativi deve basarsi su livelli-soglia accuratamente selezionati per consentire al clinico di apprezzare la severità della sensibilizzazione e, possibilmente, differenziare l'atopia dalle vere allergopatie con sintomatologia clinica. L'informazione di laboratorio deve integrarsi con altre indagini, quali la visita, le prove cutanee ed eventuali test da scatenamento, in processi

assistenziali razionali e ben definiti. Infine, lo specialista di laboratorio non deve limitarsi ad assicurare un processo analitico accurato, ma deve divenire un vero consulente per il clinico all'interno di percorsi sempre più orientati a dare risposte ai bisogni del paziente.

## BIBLIOGRAFIA

1. Salkie ML. Role of clinical laboratory in allergy testing. *Clin Biochem* 1994; 27: 343-55.
2. Sly RM. Changing prevalence of allergic rhinitis and asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 82: 233-48.
3. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *Lancet* 1998; 351: 1225-32.
4. Zeiger RS, Schatz M. Effect of allergist intervention on patient-centered and societal outcomes: allergists as leaders, innovators, and educators. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:995-1016.
5. Krause TG, Koch A, Friberg J, Poulsen LK, Kristensen B, Melbye M. Frequency of atopy in the Arctic in 1987 and 1998. *Lancet* 2002; 360: 691-2.
6. Bjorksten B, Kiellman NIM, Zeiger RS. Development and prevention of allergic disease in childhood. In: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF jr, Yunginger JW, Busse WW, editors. *Allergy: principles and practice*. 5th ed. St Louis: Mosby; 1998. p 816-37.
7. Nielsen NH, Svendsen UG, Madsen F, Dirksen A. Allergen skin test reactivity in an unselected Danish population: the Glostrup Allergy Study, Denmark. *Allergy* 1994; 49: 86-91.
8. Remes ST, Korppi M. Asthma and atopy in schoolchildren in a defined population. *Acta Paediatr* 1996; 85: 965-70.
9. Martinez FD. Role of viral infections in the inception of asthma and allergies during childhood: could be protective? *Thorax* 1994; 49: 1189-91.
10. Holt PG. Environmental factors and primary T-cell sensitisation to inhaled allergens in infancy: reappraisal of the role of infections and air pollution. *Pediatr Allergy Immunol* 1995; 6: 1-10.
11. Weiss KB, Sullivan SD. The health economics of asthma and rhinitis. I. Assessing the economic impact. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 3-8.
12. Marion RJ, Creer TL, Reynolds RV. Direct and indirect costs associated with the management of childhood asthma. *Ann Allergy* 1985; 54: 31-4.
13. Weinmann S, Karntsiuris P, Henke K-D, Wickman M, Jenner A, Wahn U. The costs of atopy and asthma in children: assessment of direct costs and their determinants in a birth cohort. *Pediatr Allergy Immunol* 2003; 14: 18-26.
14. Ahlstedt S. Understanding the usefulness of specific IgE blood tests in allergy. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 11-16.
15. Williams PB, Ahlstedt S, Barnes J, Soderstrom L, Portnoy J. Are our impressions of allergy test performances correct? *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 91: 26-33.
16. Oettgen HC, Geha RS. IgE regulation and roles in asthma pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 429-40.
17. Johansson SGO, Bennich H. Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin. *Immunology* 1967; 13: 381-94.
18. Ishizaka K, Ishizaka T. Identification of E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *J Immunol* 1967; 99: 1187-98.
19. Ishizaka K, Ishizaka T. Physicochemical properties of reaginic antibody. I. Association of reaginic activity with an immunoglobulin other than gamma A or gamma G globulin. *J Allergy* 1967; 37: 169.

20. Hamilton RG, Adkinson NF. Clinical laboratory assessment of IgE-dependent hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: S687-S701.
21. Hamilton RG. Human immunoglobulins. N. Rose, ed. In *Handbook of Human Immunology*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1996, p 135-140.
22. Jelinek DF. Regulation of B lymphocyte differentiation. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 84: 375-86.
23. Bacharier LB, Geha RS. Regulation of IgE synthesis: the molecular basis and implications for clinical modulation. *Allergy and Asthma Proc* 1999; 20: 1-8.
24. Bacharier LB, Geha RS. Molecular mechanisms of IgE regulation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: S547-58.
25. Vercelli D. Immunoglobulin E and its regulators. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1: 61-5.
26. Hamid QA, Minshall EM. Molecular pathology of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 20-36.
27. Dolen WK. It is not yet time to stop skin testing, but... *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 1074-6.
28. Dolen WK. Skin testing and immunoassays for allergen-specific IgE. *Clin Rev Allergy Immunol* 2001; 21: 229-39.
29. Li JT. Allergy testing. *Am Fam Physician* 2002;66:221-4.
30. Stuckey MS, Witt CS, Schmitt LH, Warlow R, Lattimore M, Dawkins RL. Histamine sensitivity influences reactivity to allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75: 373-6.
31. Henocq E, Brighton WD, Topping MD. Variability of skin tests. *Lancet* 1979;1:674.
32. Clarke CW, Mitchell J, Nunn AJ. Reproducibility of prick skin tests to five common allergens. *Clin Allergy* 1982;12:1-8.
33. Vanto T, Viander M, Koivikko A. Skin prick test in the diagnosis of dog dander allergy. A comparison of different extracts with clinical history, provocation tests and RAST. *Clin Allergy* 1980;10: 121-32.
34. Lasley MV, Shapiro GG. Testing for allergy. *Pediatr rev* 2000;21:39-43.
35. Bernstein IL, Storms WW. Practice parameters for allergy diagnostic testing. Joint Task Force on Practice Parameters for the diagnosis and Treatment of Asthma. The American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995;75:543-625.
36. Lockey R, Lichtestein L, Bloch K, Kaliner M, Zweiman B, Rochelesky G. Position statement. The use of in vitro tests for IgE antibody in the specific diagnosis of the IgE-mediated disorders and in the formulation of allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 263-7.
37. Ford JL, Dolen WK, Feger TA, Hoffman DR, Stafford CT. Evaluation of an in vitro assay for fire ant venom specific IgE. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 425-7.
38. Eriksson NE, Ahlstedt A, Belin L. Comparison between RAST, skin tests, and provocation tests. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1976; 52: 335-46.
39. Plebani M, Borghesan F, Bernardi D, Faggian D. Clinical evaluation of a new quantitative method for specific IgE antibodies. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34: 579-84.
40. Witterman AM, Stapel AO, Perdok GJ, Sjamsodein DHS, Jansen HM, Aalberse RC. The relationship between RAST and skin test results in patients with asthma or rhinitis: a quantitative study with purified allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 97: 16-25.
41. Kelso JM, Sodhi N, Gosselin VA, Yunginger JW. Diagnostic performance characteristics of the standard Phadebas RAST, modified RAST, and Pharmacia CAP system versus skin testing. *Ann Allergy* 1991;67:511-514.
42. Boccagni P, Favari F, Zanoni G, Pezzini A, Tridente G. Comparison of four in vitro assays for specific IgE detection. *Int J Clin Lab Res* 1994;24:102-5.
43. Plebani M, Borghesan F, Faggian D. Clinical efficiency of in vitro and in vivo tests for allergic diseases. *Ann Allergy* 1995; 74: 23-8.
44. Poon AW, Goodman CS, Rubin RJ. In vitro and skin testing for allergy: comparable clinical utility and costs. *Am J Man Care* 1998;4:469-85.
45. American Academy of Otolaryngic Allergy: A presentation to medicare B carrier Illinois regarding in vitro diagnostic allergy testing. Silver Spring, MD 1996.
46. Wide L, Bennich H, Johansson SGO. Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen antibodies. *Lancet* 1967; 2: 1105-7.
47. Nalebuff DJ, Fadal RG, Ali M. The study of IgE in the diagnosis of allergic disorders in an otolaryngology practice. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1979; 87: 351-8.
48. Ceska M, Eriksson R, Varga JM. Radioimmunosorbent assay of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1972; 49: 1-9.
49. Gleich GJ, Jones RT. Measurement of IgE antibodies by the radioallergosorbent test. Technical considerations in the performance of the test. *J Allergy Clin Immunol* 1975;55:334-45.
50. Miller SP, Marinkovich VA, Riege DH. Application of the MAST immunodiagnostic system to the determination of the allergen-specific IgE. *Clin Chem* 1984;30:1467-72.
51. Bousquet J, Chanez P, Chanal I, Michel F-B. Comparison between RAST and Pharmacia CAP system: a new automated specific IgE assay. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85:1039-43.
52. Kleine-Tebbe J, Eickholt M, Gatjen M, Brunnée T, O'Connor A, Kunkel G. Comparison between MAGIC LITE and CAP system: two automated specific IgE antibody assays. *Clin Exp Allergy* 1992; 22:475-84.
53. Derer MM, Miescher S, Johansson B, Frost H, Gordon J. Application of the dot immunobinding assay to allergy diagnosis. *J Allergy Clin Immunol* 1984;74:85-92.
54. Zeiss CR, Pruzansky JJ, Patterson R, Roberts M. A solid phase radioimmunoassay for the quantitation of human reaginic antibody against ragweed antigen E. *J Immunol* 1973;110:414-21.
55. Olivieri V, Beccarini I, Gallucci G, Romano T, Santoro F. Capture assay for specific IgE. An improved quantitative method. *J Immunol Methods* 1993;157:65-72.
56. NCCLS. Evaluation methods and analytical performance characteristics of immunological assays for human immunoglobulin E (IgE) antibodies of defined allergen specificities; approved guideline. NCCLS Document I/LA20-A, NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 1997.
57. Merrett J, Merrett TG. Phadiatop- a novel IgE antibody creening test. *Clin Allergy* 1987; 17: 409-16.
58. Matricardi PM, Fattorossi A, Nisini R, Le Moli S, Castagliuolo PP, D'Amelio R. A new test for specific IgE to inhalant allergens (Phadiatop) in the screening of immediate respiratory hypersensitivity states. *Ann Allergy* 1989; 63: 532-5.
59. Molkhou P. Allergic progression: importance of Phadiatop and RAST fx5 as screening measures for childhood atopy. *Allerg Immunol* 1999; 31: 31-5.
60. Lilja G, Kusoffsky E, Johansson SG, Oman H. Screening of atopic allergy in 5-year-old children: a comparison of the diagnostic properties of Phadiatop Paediatric and Phadiatop. *Allergy* 1995; 50: 316-21.
61. Costongs GM, Bas BM. The first fully automated allergy analyser UniCAP: comparison with Immulite for allergy panel testing. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35: 885-8.
62. Williams PB, Siegel C, Portnoy J. Efficacy of a single diagnostic test for sensitization to common inhalant allergens. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 86: 196-202.

63. De Blay F, Zana H, Offner M, Verot A, Velten M, Pauli G. Receiver Operating Characteristic analysis: a useful method for a comparison of the clinical relevance of two in vitro IgE tests. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 255-63.
64. Plebani M, Borghesan F, Basso D, Faggian D. Receiver-operating characteristic (ROC) curves: a fundamental tool for improving the clinical usefulness of in vitro IgE tests. *Allergy* 1996; 51: 407-11.
65. Pastorello E, Incorvaia C, Ortolani C, Bononi S, Canonica GW, Romagnani S, Tursi A, Zanussi C. Studies on the relationship between the level of specific IgE antibodies and the clinical expression of allergy: I. Definition of levels distinguishing patients with symptomatic from patients with asymptomatic allergy to common aeroallergens. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96: 580-7.
66. Soderstrom L, Kober A, Ahlstedt S, de Groot H, Lange C-E, Paganelli R, Rooovers MHWM, Sastre J. A further evaluation of the clinical use of specific IgE antibody testing in allergic diseases. *Allergy* 2003; 58: 921-8.
67. Williams PB, Barnes JH, Szeinbach SL, Sullivan TJ. Analytic precision and accuracy of commercial immunoassays for specific IgE: establishing a standard. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 1221-30.
68. Plebani M, Bernardi D, Basso D, Borghesan F, Faggian D. Measurement of specific immunoglobulin E: intermethod comparison and standardization. *Clin Chem* 1998; 44: 1974-9.
69. Yman L. Allergy. In: *Immunoassay Handbook*. Frome, Somerset; Tradespools Ltd, 2000
70. Hamilton RG, Adkinson NF Jr. Serological assays for antigens and antibodies. *Immunol Allergy Clin* 1994; 14:351-69.
71. Foucard T, Bennich H, Johansson SG, Lundkvist U. Human antibodies to bovine alpha-globulin. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1975; 48: 812-23.
72. Phillips TM, Queen WD, More NS, Thompson AM. Protein A-coated glass beads. Universal support medium for high-performance immunoaffinity chromatography. *J Chromatogr* 1985; 26: 213-9.
73. Zaunders JJ, Ziegler JB, Penny R, Cooper DA. A monoclonal antibody-based radioimmunoassay for the in vitro production of IgE by lymphocyte cultures. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; 78: 1-8.
74. Grassi J, Didierlaurent A, Stadler BM. Quantitative determination of total and specific human IgE with the use of monoclonal antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77: 808-22.
75. Johansson SGO, Yman L. In vitro assays for Immunoglobulin E. *Crit Rev Allergy* 1988; 6: 93-139.
76. Reed Ce, Yunginger JW, Evans R. Quality assurance and standardization of allergy extracts in allergy practice *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84: 4-8.
77. Stewart GA, Thompson PJ. The biochemistry of common aeroallergens. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 1020-44.
78. King TP, Norman PS. Standardized extracts, weeds. *Clin Rev Allergy* 1986; 4: 405-33.
79. Anderson MC, Baer H. In vitro methods for standardization of allergenic extracts. *Clin Rev Allergy* 1986; 4: 363-70
80. Lowenstein H, Osterballe O. Standardized grass-pollen extracts. *Clin Rev Allergy* 1986; 4: 405-23.
81. Hoffman DR, Golden DB. Standardized extracts: stinging-biting insects. *Clin Rev Allergy* 1987; 5: 75-8.
82. Ford AW, Platts-Mills TA. Standardized extracts, dust mite and other arthropods (inhalants). *Clin Rev Allergy* 1987; 5: 49-73.
83. Bush RK, Yunginger JW. Standardization of fungal allergens. *Clin Rev Allergy* 1987; 5: 3-21.
84. <http://www.who.int/biologicals>
85. Van der Veen MJ, Mulder M, Witteman AM, van Ree R, Aalberse RC, Jansen HM. False-positive skin prick test responses to commercially available dog dander extracts caused by contamination with house dust mite allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 1028-34.
86. Scheiner O, Kraft D. Basic and practical aspects of recombinant allergens. *Allergy* 1995; 50: 384-92.
87. Chapman MD, Smith AM, Vailes LD, Arruda LK, Dhanaraj V, Pomes A. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 409-18.
88. Valenta R, Kraft D. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic diseases. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 751-6.
89. Lundberg M, Cn Z, Rihs HP, Wrangsjö K. Recombinant spiked allergen extract. *Allergy* 2001; 56: 794-5.
90. Hiller R, Laffer S, Harwanegg C, Huber M, Schmidt WM, Twardosz A. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy therapy. *FASEB* 2002; 16: 414-6.
91. Ewan PW, Coote D. Evaluation of a capsulated hydrophilic carrier polymer (the ImmunoCAP) for measurement of specific IgE antibodies. *Allergy* 1990; 45: 22-9.
92. Perborn H, Asman I, Holmquist I. Standardization of allergen reagents for immunoassay of allergen-specific IgE antibodies (UniCAP). Allergen excess and component specificity. In: Basomba A, Hernandez FDR, eds. XVI European Congress of Allergology and Clinical Immunology: ECACI'95. Bologna: Monduzzi Editore, 1995: 191-4.
93. Szeinbach SL, Barnes JH, Sullivan TJ, Williams PB. Precision and accuracy of commercial laboratories' ability to classify positive and negative allergen-specific IgE results. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 86: 373-81.
94. Yunginger JW, Ahlstedt S, Eggleston PA, Homburger HA, Nelson HS, Ownby DR et al. Quantitative IgE antibody assays in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 1077-84.
95. Croner S, Kjellman N-IM. Development of atopic disease in relation to family history and cord blood IgE levels; eleven-year follow-up in 1654 children. *Pediatr Allergy Immunol* 1990; 1: 14-20.
96. Hattevig G, Kjellman B, Bjorksten B. Clinical symptoms and IgE responses to common food proteins and inhalants in the first 7 years of life. *Clin Allergy* 1987; 17: 571-8.
97. Burr ML, Merrett TG, Dunstan FDJ, Maguire MJ. The development of allergy in high-risk children. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 1247-53.
98. Kulig M, Bergmann R, Tacke U, Wahn U, Guggenmoos-Holzmann I. Multicentre Allergy Study Group: Long-lasting sensitization to food during the first two years precedes allergy airway disease. *Pediatr Allergy Immunol* 1998; 9: 61-7.
99. Peat JK, Li J. Reversing the trend: reducing the prevalence of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 1-10.
100. Zeiger RS, Heller S. The development and prediction of atopy in high-risk children: follow-up at age seven years in a prospective randomized study of combined maternal and infant food allergen avoidance. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 1179-90.
101. Wahn U, Bergmann RL, Nickel R. Early life markers of atopy and asthma. *Clin Exp Allergy* 1998; 28 (Suppl.1): 20-1.
102. Sasai K, Furukawa S, Muto T, Baba M, Yabuta K, Fukuwatari Y. Early detection of specific IgE antibody against house dust mite in children at risk of allergic disease. *J Pediatr* 1996; 128: 834-40.
103. Hide DW, Matthew S, Tariq S, Arshad SH. Allergen avoidance in infancy and allergy at 4 years of age. *Allergy* 1996; 51: 89-93.

104. Nishioka K, Yasueda H, Saito H. Preventive effect of bed-dibg encasement with microfibre fibers on mite sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 28-32.
105. Sensi LG, Piacentini GL, Nobile E, Ghebregzabber M, Brunori R, Zanolla L et al. Changes in nasal specific IgE to mites after periods of allergen exposure-avoidance: a comparison with serum levels. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 377-82.
106. Sampson HA, Ho DG. Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 444-51.
107. Crespo JF, Pasual C, Ferrer A, Burks AW, Diaz Pena JM, Martin Estaban M. Egg white-specific IgE levels as a tolerance marker in the follow up of egg allergy. *Allergy Proc* 1994; 15: 73-6.
108. Sicherer SH, Burks AW, Sampson HA. Clinical features of acute allergic reactions to peanuts and tree nuts in children. *Pediatrics* 1998; 102: 131-2.
109. Sampson HA, Scanlon SM. Natural history of food hypersensitivity in children with atopic dermatitis. *J Pediatr* 1989; 115: 23-7.
110. Agata H, Kondo N, Fukutomi O, Shinoda S, Orii T. Effect of elimination diets on food-specific IgE antibodies and lymphocyte proliferative response to food antigens in atopic dermatitis patients exhibiting sensitivity to food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 668-79.
111. Sicherer SH, Sampson HA. Cow's milk protein-specific IgE concentrations in two age groups of milk-allergic children and in children achieving clinical tolerance. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 507-12.
112. Wood RA, Phipatanakul W, Hamilton RG, Eggleston PA. A comparison of skin prick test, intradermal tests and RASTs in the diagnosis of cat allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 773-9.
113. De Lovinfosse S, Charpin D, Dornelas A, Birnbaum J, Vervloet D. Can mite-specific IgE be used as a surrogate markers for mite exposure? *Allergy* 1994; 49: 64-6.
114. Halonen M, Stern DA, Wright AL, Taussig LM, Martinez FD. *Alternaria* as a major allergen for asthma in children raised in a desert environment. *Am J Resp Crit Care Med* 1997; 155: 1356-61.
115. O'Hollaren MT, Yunginger JW, Offord KP, Somers MJ, O'Connell EJ, Ballard DJ. Exposure to an aeroallergen as a possible precipitating factor in respiratory arrest in young patients with asthma. *N Engl J Med* 1991; 324: 359-63.
116. Leimgruber A, Lantin JP, Frei PC. Comparison of two in vitro assays, RAST and CAP, when applied to the diagnosis of anaphylactic reactions to honeybee or yellow jacket venom: correlation with history and skin tests. *Allergy* 1993; 48: 415-20.
117. Bernardini R, Novembre E, Lombardi E, Mezzetti P, Cianferoni A, Danti DA. Risk factors for latex allergy in patients with spina bifida and latex sensitization. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 681-6.
118. Hamilton RG, Brown RH. Natural history of latex allergy in sensitized healthcare workers. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103 (Suppl): S52.
119. Van Ree R, Aalberse RC. Specific IgE without clinical allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 1000-1.
120. Bjorksten F, Halmepuro L, Hannuksela M, Lahti A. Extraction and properties of apple allergens. *Allergy* 1980; 35: 671-7.
121. Simonato B, De Lazzari F, Pasini G, Polato F, Giannattasio M, Gemignani C, et al. IgE binding to soluble and insoluble wheat flour proteins in atopic and non-atopic patients suffering from gastrointestinal symptoms after wheat ingestion. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 1771-8.
122. Vuitton DA. Allergic cross-reactions: general and practical aspects. *Clin Rev Allergy Immunol* 1997; 15: 367-74.
123. Aalberse RC, Akkerdaas JH, van Ree R. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy* 2001; 56: 478-90.
124. Aalberse RC. The IgE response and atopy. *Eur Resp J* 1991; 4: 78s-84s.
125. Mohapata SS. Determinant spreading: implications in allergic disorders. *Immunol Today* 1994; 15: 596-7.
126. Aalberse RC. Allergen: the trigger. *Allergy Clin Immunol Int* 2000; (Suppl): 13-5.
127. Fazekas De St Groth B, Webster RG. Disquisition on original antigenic sin. I. Evidence in man. *J Exp Med* 1966; 140: 2893-8.
128. Anderson LBJ, Dreyfuss EM, Logan J, Johnstone DE, Glaser J. Melon and banana sensitivity coincident with ragweed pollinosis. *J Allergy* 1970; 45: 310-9.
129. Hannuksela M, Lahti M. Immediate reactions to fruits and vegetables. *Contact Dermatitis* 1977; 3: 79-84.
130. Aalberse RC, Koshte C, Clemens JG. Immunoglobulin E antibodies that crossreact with vegetable foods, pollen, and Hymenoptera venom. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 68: 356-64.
131. Mari A, Iacovacci P, Afferni C, Barletta B, Tinghino R, Di Felice G. Specific IgE to cross-reactive carbohydrate determinants strongly affects the in vitro diagnosis of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 1005-11.
132. Valenta R, Duchene M, Ebner C. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J Exp Med* 1992; 175: 377-85.
133. Valenta R, Duchene M, Pettenburger K. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science* 1991; 253: 557-60.
134. Kremser M, Lindermayr W. Celery allergy/celery contact urticaria syndrome and relation to allergies to other plant antigen. *Wien Klin Wochenschr* 1983; 95: 838-43.
135. M'Raihi L, Charpin D, Pons A, Bongrand P, Vervloet D. Cross-reactivity between latex and banana. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 129-30.
136. De Maat B, Akkersdaas JH, van Ree R, Aalberse RC. Vineyard snail allergy possibly induced by sensitization to house-dust mite. *Allergy* 1995; 50: 438-40.
137. Van Ree R, Antonicelli L, Akkerdaas JH, Garritani MS, Aalberse RC, Bonifazi F. Possible induction of food allergy during mite immunotherapy. *Allergy* 1996; 51: 108-13.
138. Witterman AM, Akkerdaas JH, van Leeuwen J, van der Zee JS, Aalberse RC. Identification of a cross-reactive allergen (presumably tropomyosin) in shrimp, mite and insects. *In Arch Allergy Immunol* 1994; 105: 56-61.
139. Pauli G. Evolution in the understanding of cross-reactivities of respiratory allergens: the role of recombinant allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123: 183-95.
140. Steinman HA. Using Allergy Advisor as a diagnostic aid in allergy and intolerance diagnosis. <http://www.allergyadvisor.com/index/html>.
141. Yman L. Botanical relations and immunological cross-reactions in pollen allergy. 2nd edition. Pharmacia Diagnostics AB, Sweden. ISBN 91-970475-09.
142. Spitzauer S. Allergy to mammalian proteins: at the borderline between foreign and self? *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 120: 259-69.
143. Dietschi R, Wutrich B, Johansson SGO. Zum sogenannten "Sellerie-Karotten-Beifuss-Gewuerz-Syndrom". RAST-Resultate mit neuen Gewuerzdiscs. *Z Hautkr* 1987; 62: 524-31.
144. Vieths S, Jankiewicz A, Wutrich B, Baltes W. Immunoblot study of IgE binding allergens in celery roots. *Ann Allergy* 1995; 75: 48-55.

145. Mari A. Multiple pollen sensitization: a molecular approach to the diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125: 57-65.
146. Ebner C. Cross-reacting allergens-panallergens. *Wien Med Wochenschr* 1996; 146: 404-5.
147. Salcedo G, Diaz-Perales A, Sanchez-Monge R. Fruit allergy: plant defence proteins as novel potential panallergens. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 1158-60.
148. Ebner C, Hoffman-Sommergruber K, Breiteneder H. Plant food allergens homologous to pathogenesis-related protein. *Allergy* 2001; 56: 43-44.
149. Baur X, Posch A. Characterized allergens causing baker's asthma. *Allergy* 1998; 53: 562-6.
150. Quirce S, Polo F, Figueredo E, Gonzales R, Sastre J. Occupational asthma caused by soybean flour in bakers-differences with soybean induced epidemic asthma. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 839-46.
151. Kazemi-Shirazi L, Niederberger V, Linhart B, Lidholm J, Kraft D, Valenta R. Recombinant marker allergens: diagnostic gatekeepers for the treatment of allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 127: 259-68.
152. Sicherer SH. Clinical implications of cross-reactive food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 881-90.
153. Moverare R, Elfman L, Vesterinen E, Metso T, Haahtela T. Development of a new IgE specificities to allergic components in birch pollen extract during specific immunotherapy studied with immunoblotting and Pharmacia CAP System. *Allergy* 2002; 57: 423-30.
154. Liappis N, Lantto O, Nilsson G, Ryden B. The role of interlaboratory comparisons in quality improvement of specific IgE measurements with the Pharmacia CAP System RAST RIA and FEIA. *Clin Laboratory* 1996; 42: 707-13.
155. Wiltshire S, O'Malley S, Lambert J, Kukanskis K, Edgar D, Kingsmore SF, Schweitzer B. Detection of multiple allergen-specific IgEs on microarrays with rolling circle amplification. *Clin Chem* 2000; 46: 1990-3.
156. Mullenix MC, Wiltshire S, Shao W, Kitos G, Schweitzer B. Allergen-specific IgE detection on microarrays using rolling circle amplification: correlation with in vitro assays for serum IgE. *Clin Chem* 2001; 47: 1926-9.
157. Bacarese-Hamilton T, Mezzasoma L, Ingham C, Ardizzoni A, Rossi R, Bistoni F, Crisanti A. Detection of allergen-specific IgE on microarrays by use of signal amplification techniques. *Clin Chem* 2002; 48: 1367-70.