

Percorsi
Pediatrici
del
Val di Noto
2016



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MESSINA
D.A.I. Materno-Infantile
U.O.C. di Genetica ed Immunologia Pediatrica
Direttore Prof. Carmelo Salpietro



**Diagnostica
molecolare in
allergologia**

Dott.ssa Laura Colavita



30/01/2016

Oggi è possibile non solo dosare le **IgE specifiche** per gli estratti di una fonte allergenica (ad esempio Betulla), ma anche quelle dirette verso le singole molecole allergeniche di cui la fonte allergenica è costituita (nel caso della betulla le molecole Bet v1, Bet v 2, Bet v 4)

ISAC

Test immunologico in cui le componenti allergeniche immobilizzate in formato di microarray su un substrato solido, vengono incubate con campioni di plasma o siero umano al fine di rilevare gli anticorpi IgE specifici. Il legame IgE -allergene viene rilevato grazie ad un Ab anti-IgE marcato con un composto fluorescente. L'ISAC permette di saggiare 112 allergeni simultaneamente, altamente purificati.

CAP-system

Il CAP system è un test immunoenzimatico simile all' ISAC, tranne che per il fatto che si utilizza una miscela di allergeni per capsula. Il supporto è appunto una capsula e la strumentazione rileva la densità ottica dell'avvenuto legame allergene-anticorpo IgEs.

Sigla d'identificazione degli allergeni molecolari

r Bet

v

1

Origine dell'allergene:

- n = naturale
- r = ricombinante
- s = sintetico

Genere della sorgente allergenica (es.: Bet = betullaceae)

Specie della sorgente allergeniva (es.: v = verrucosa)

Ordine d'identificazione dell'allergene

Diagnostica molecolare nell'allergia inalanti



Immunoterapia specifica?



Markers di sensibilizzazione
primaria specie-specifico



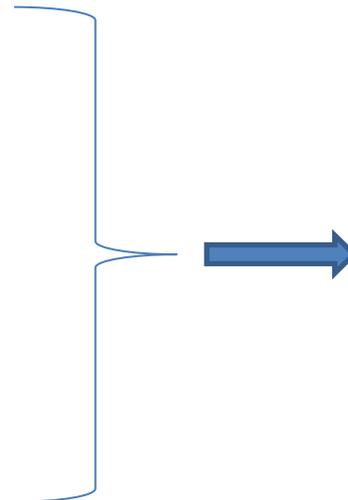
ITS SI

+

Markers di cross reattività
(Bet v 2; Phl p 7)

+

- Profiline
- Polcalcine
- CCD



ITS NO

Diagnostica molecolare nell'allergia ad alimenti

Indicazioni

- Studiare il “profilo” delle sensibilizzazioni IgE mediate del pz polisensibilizzato
- Valutare la possibile gravità delle singole sensibilizzazioni
- Valutare la tollerabilità dell'alimento se cotto
- In casi selezionati e complessi come l'anafilassi
- Identificazione di eventuali cross-reattività con altri alimenti o pollini



Epitopi sequenziali ➡ sintomi orali e sistemici fino all'anafilassi

Proteine
stabili

Storage proteins

**Termo-
stabilità**

**LTP (non-specific lipid
transfer proteins)**

**PR-10 (Pathogenesis-
Related Proteins 10)**

Profiline

**Gastro-
stabilità**

**Rischio di
reazioni
gravi**

Proteine
labili

Epitopi in 3D ➡ solo sintomi orali

Profiline

Termolabili e gastrolabili

Le profiline sono una famiglia di proteine altamente conservate, presenti in tutte le cellule eucariotiche di piante, funghi, protozoi, e nei virus. Catalizzano l'aggiunta di monomeri ai filamenti di actina preformati e, interagendo con altri ligandi, come il fosfatidilinositolo-bisfosfato, la profilina è un mediatore della trasduzione dei segnali intercellulari

Nei pollini:

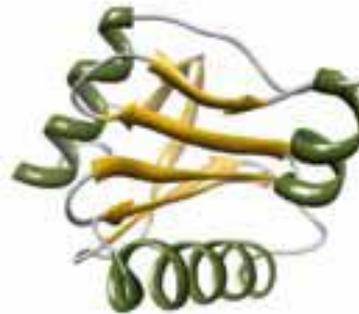
Betulla (Bet v2), ambrosia (art v4), olivo (nOle e2), lattice (rHev b8), coda di topo (rPhl p12)

In alimenti vegetali:

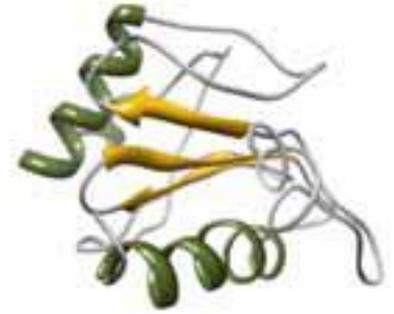
Spezie, sedano, carota, mela, pesca, nocciola, arachide, kiwi, zucchine, ananas, banana, cachi, melone, ecc...

La struttura tridimensionale delle profiline presenta un comune motivo strutturale che ne determina la cross-reattività IgE. Poiché le profiline sono denaturate dal calore e dalla digestione gastrica, la sensibilizzazione non avviene solitamente per via digestiva bensì per via respiratoria attraverso i pollini cross-reattivi: si parla in tal caso di **allergeni alimentari incompleti di classe II**.

Bet v 2



Hev b 8

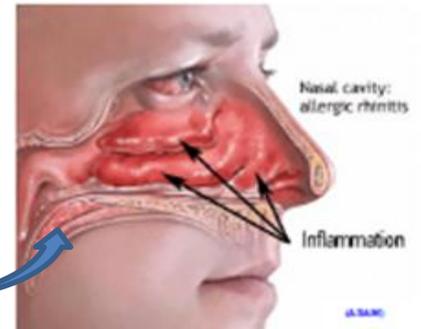
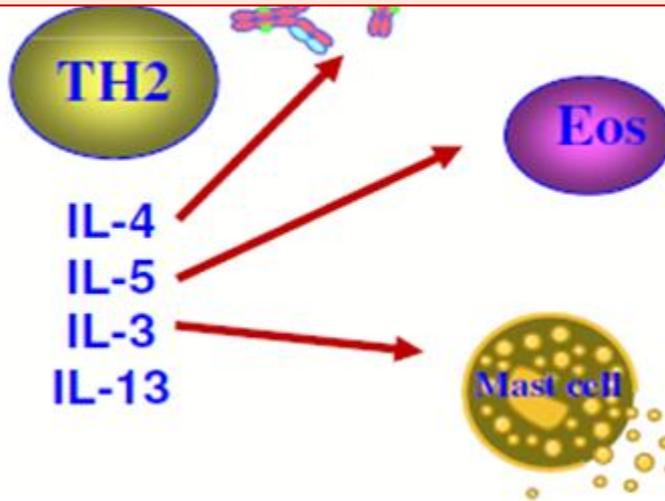
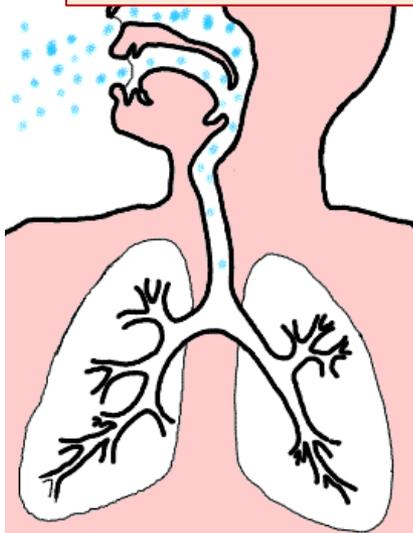


Le 2 profiline hanno una omologia di sequenza del 75%

Etiopatogenesi



Sindrome Orale Allergica (SOA)



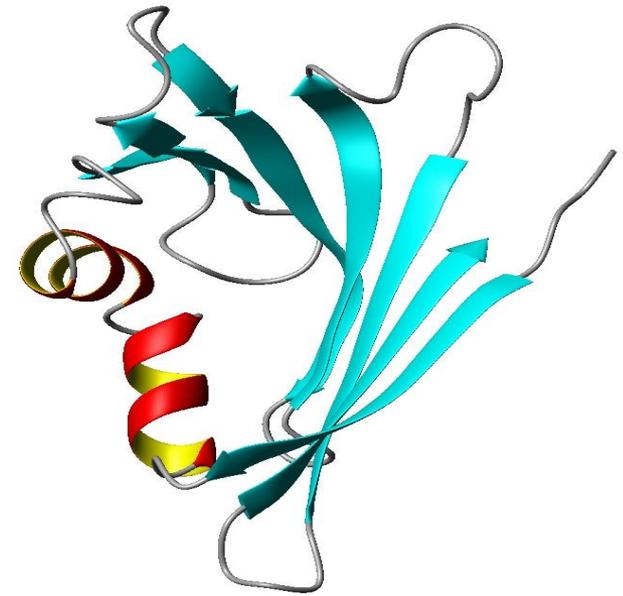
PR-10 (Pathogenesis-Related Proteins 10)

Proteine difensive prodotte in risposta a stimoli infettivi e abiotici.

Bet v1

Termolabili e gastrolabili

Gli omologhi di Bet v 1 contenuti nelle nocciole, sedano, arachide e soia sono più stabili al calore ed alla digestione delle corrispondenti proteine presenti nelle *Rosacee* (mela, pesca, ciliegia), con possibili reazioni sistemiche.



Cross-
reattività
con alimenti

Famiglia	Sottofamiglia	Genere
Nothofagales	Famiglia del faggio meridionale	faggio meridionale
Fagaceae	Famiglia del faggio	Faggio, Quercia, Castagno
Juglandaceae	Famiglia del noce	Noce
Myricaceae	Famiglia del Bayberry	Myrica
Rhoiptelea	Famiglia de Rhoiptelea	Roiptelea - equisetò
Ticodendraceae	Famiglia del ticodendro	Ticodendro
Betullaceae	Famiglia della betulla	Betulla Ontano
	Famiglia delle Corylaceae	Nocciolo, Carpine, Carpine nero
	Famiglia delle Ostryopsis	3 specie strettamente correlate a nocciolo e carpine nero
Casuarinaceae	Famiglia della quercia	Quercia

LTP (Lipid Transfer Protein)

Termo-stabili e gastro-stabili



Possono indurre reazioni GRAVI

Sono presenti nella **buccia della frutta** appartenente alla famiglia delle *Rosacee* (*soprattutto pesca*), ma anche delle *Betulacee* (*nocciola*) ed in altri alimenti vegetali (arachide, mais, orzo, uva, verza, kiwi, fragola, mela, mora, albicocca, ciliegia, susina, pera, limone, mandarino, arancio, pomodoro, sesamo, carota, cipolla, asparago, lattuga, castagna, sedano, riso, frumento, mandorla).

Sono contenute anche nei **pollini** (Art v3, Par j2) e nel **lattice**.

Le LTP derivanti da varie fonti allergeniche vegetali sono spesso tra loro **cross-reattive**

Pru p 3 → via d'assorbimento intestinale preferenziale rispetto alle altre LTP e maggiore risp Th2. E' il marker di sensibilizzazione per le LTP della frutta (ciliegia, albicocca, mela, pera, zucca, mandorle)

Bet v 1 è simile a Pru p 1 → x conflitto sterico e occupazione dei siti di legame, la sensibilizzazione a Bet v 1 protegge da reazioni gravi da Pru p 1, 3 e 4



Storage proteins (proteine di deposito)

Termo-stabili e gastro-stabili



Possono indurre reazioni GRAVI, fino all'anafilassi

La famiglia delle proteine di deposito è costituita da un gruppo eterogeneo di proteine appartenenti a due superfamiglie differenti: le **Cupine** e le **Prolamine**. Esse sono spesso designate in base al coefficiente di sedimentazione: le globuline 7S e 11S appartengono alle *Cupine*; le Albumine 2S appartengono alle *Prolamine*.

Le proteine di deposito sono gli allergeni predominanti dei semi e del guscio e la loro struttura chimica è notevolmente stabile al calore e alle proteasi.

- **Arachide (Ara h 1, 2, 3, 6, 7)**
- **Noce brasiliana (Ber e1)**
- **Sesamo (Ses i1)**
- **Anacardo (Ana o2)**
- **Nocciola (Cor a9)**
- **Soia (Gly m5 e m6)**

2S Albumin Storage Proteins: What Makes them Food Allergens?

[Moreno FJ](#), [Clemente A](#).

Source

Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), C/ Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain.

Abstract

2S albumin storage proteins are becoming of increasing interest in nutritional and clinical studies as they have been reported as major food allergens in seeds of many mono- and dicotyledonous plants. This review describes the main biochemical, structural and functional properties of these proteins thought to play a role in determining their potential allergenicity.

(GIT). The hi
skeleton of cy
proteins are a

Although 2S albumins have high structural homology, cross-reactivity seems to be uncommon in this protein family

and/or elicit an allergic response. ~~The flexible and solvent-exposed hypervariable region of these proteins is immunodominant and has the ability to bind IgE from allergic patients sera.~~ Several linear IgE-binding epitopes of 2S albumins spanning this region have been described to play a major role in allergenicity; the role of conformational epitopes of these proteins in food allergy is far from being understood and need to be investigated. Finally, the interaction of these proteins with other components of the food matrix might influence the absorption rates of immunologically reactive 2S albumins but also in their immune response.

COMPONENTI MOLECOLARI DELLA FRUTTA SECCA

	Nocciola	Arachide	Noce brasiliana	Noce	Anacardo
<i>PR-10</i>	Cor a1	Ara h8			
<i>LTP</i>	Cor a8	Ara h9		Jug r3	
<i>Storage proteins</i>	Cor a9 Cor a14	Ara h1 Ara h2 Ara h3	Ber e1	Jug r1 (cross-reattività con nocciola americana)	Ana o2 Ana o3 (cross-reattività con pistacchio)



Grano

- ✓ **WDEIA** è scatenata dall'esercizio fisico o altri co-fattori come NSAID, stress, etc. dopo l'assunzione di grano
- ✓ I pazienti **WDEIA** generalmente non hanno una storia di allergia immediata al grano e molti (30 – 50%) hanno il dosaggio dell'estratto del grano negativo
- ✓ La maggioranza dei pazienti sono sensibilizzati a Tri a19 e/o gliadina

Sintomi: anafilassi, vomito, diarrea, orticaria, eczema, WDEIA, gluten sensitivity



Allergeni termo-gastro stabili

Limitata x-reattività con Pru p3
Meno termostabile di LTP del mais

Tri a 14

LTP

Tri a 19

WDEIA – anafilassi da sforzo dopo assunzione di grano

ω 5 gliadina

α, β, γ, ω 5

Gliadina

MUXF3



CCD

Valutare l'eliminazione dell'alimento

IGE PER MOLECOLE ALLERGENICHE DEL LATTE VACCINO

Origine	Gruppo proteico	Positività in allergici	SPT/IgE convenzionali/IgE ISAC microarray	Caratteristiche
Siero di latte	nBos d 4	0-80%	SI/SI/SI	Poco resistente al calore ma
<p><u>SPT e latte</u></p> <p>Valore predittivo positivo > 90% di positività al food-challenge se PPV di:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 15 mm x latte fresco - 12 mm x lattealbumina - 9 mm x caseina - 10 mm x β-lattoglobulina <p>Calvani M. et al. – “Correlation between skin prick test using commercial extract of cow’s milk protein and frash milk and food challenges” – PAI, 2007</p>				
Frazione caseinica aS1-, aS2-, b- e k-caseina	nBos d 8 (caseina)	56-100%; 15-66% x la βcaseina	NO/NO/NO SI/SI/SI No singole caseine	Resistente alla digestione proteolitica e al calore

Molecole allergeniche dell'uovo

Origine	Gruppo proteico	Allergenicità	SPT/IgE convenzionali/IgE ISAC microarray	Caratteristiche
Albume	nGal d 1 (ovomucoide)	+++	SI/SI/SI	Termo- e proteasi-resistente
Albume	nGal d 2 (ovoalbumina)	++	SI/SI/SI	Labile a calore e alle proteasi
Albume e tuorlo	nGal d 3 (conalbumina)	+	SI/SI/SI	Labile a calore e alle proteasi
Albume	nGal d 4 (lisozima)	+	SI/SI/NO	Labile a calore e alle proteasi
Tuorlo/carne di pollo	nGal d 5 (livetina)	+/-	NO/NO/SI	Termolabile
Tuorlo	nGal d 6 (vitellogenina)	+	NO/NO/NO	Termoresistente e pepsinolabile

Le IgE x OVA sono predittive di successo al challenge con uovo cotto; alta probabilità di successo anche con uovo crudo.

Le IgE x ovomucoide (nGal d 1) sono predittive di possibile reazione al challenge anche con uovo cotto.

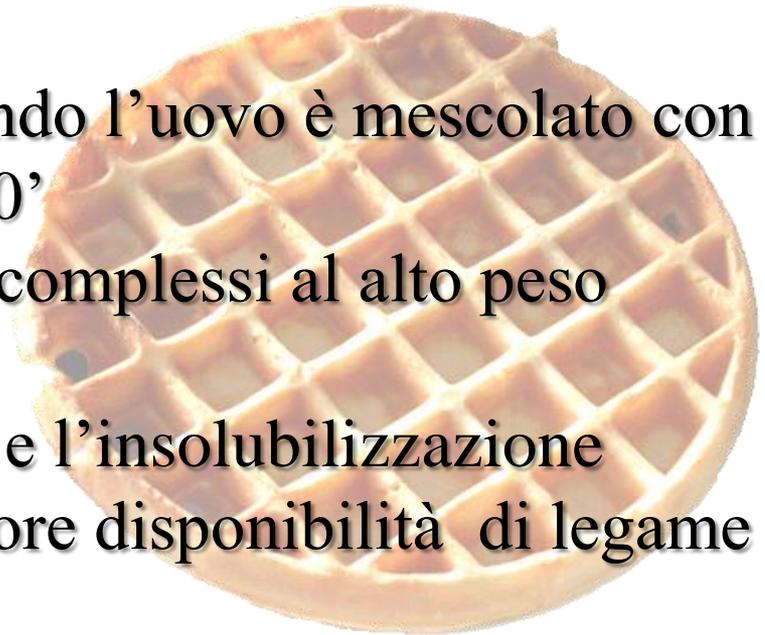
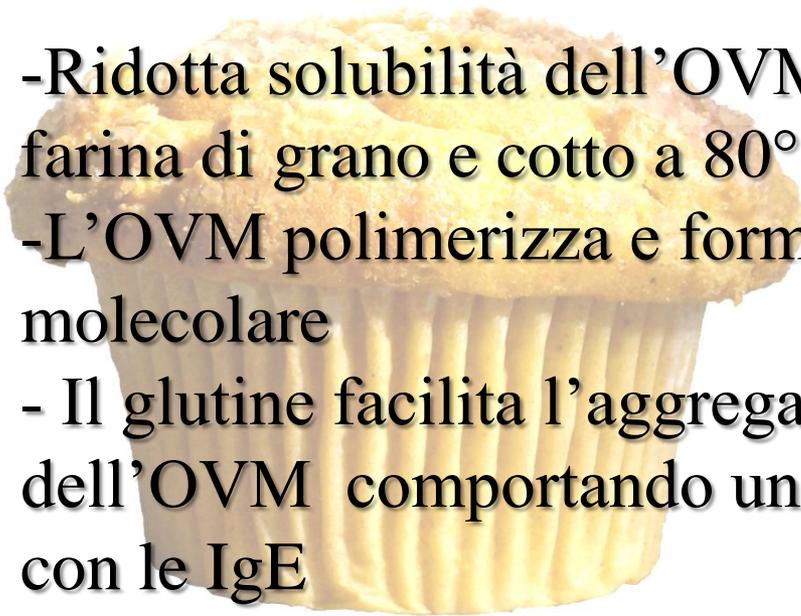
Ando H. et al. – "Utility of ovomucoid-specific IgE concentrations in predicting symptomatic egg allergy" – JACI 2008



Allergenicità e cottura

Il 70% dei bambini con TPO positivo per uovo tolleravano uovo cotto al alta temperatura con il grano in muffin e waffle (Lemon-Mule J Allergy Clin Immunol 2008)

- Ridotta solubilità dell'OVM quando l'uovo è mescolato con farina di grano e cotto a 80° per 10'
- L'OVM polimerizza e forma dei complessi al alto peso molecolare
- Il glutine facilita l'aggregazione e l'insolubilizzazione dell'OVM comportando una minore disponibilità di legame con le IgE



Test di Provocazione Orale - TPO

Quando eseguire il TPO:

- Storia clinica poco suggestiva di reazione IgE mediata
- Storia clinica suggestiva di reazione IgE mediata ma SPT o RAST negativi o in riduzione
- Bambino che non ha mai assunto l'alimento ma con SPT o RAST positivi (spr se DA)
- Sospetta enterocolite allergica



Quando non eseguire il TPO:

- Storia clinica di una recente (entro 12 mesi) reazione anafilattica in presenza di SPT/RAST positivi
- Quando non siano stati sospesi farmaci che potrebbero modificare e attenuare la risp immune (antistaminici, CSO) o farmaci che possono accentuare eventuali reazioni (FANS, ASA) o che possano interferire con l'evtl terapia successiva (beta-bloccanti, ACE-inibitori)
- Quando il bambino presenta fatti acuti intercorrenti o malattie croniche in fase attiva
- Se storia clinica suggestiva di reazione allergica all'alimento che in seguito sia stato però assunto in più occasioni in dosi adeguate e nel medesimo grado di cottura, senza problemi (anche se con SPT/RAST positivi)
- Se ha assunto uovo o latte cotto senza problemi → il TPO è evtl da prendere in considerazione per uovo meno cotto o crudo

Take home messages



Indicazioni alla diagnostica molecolare (ISAC o Immuno-

- Valutare la possibilità di ITS nel bambino con allergia a inalanti
- Studiare il “profilo” delle sensibilizzazioni IgE mediate del pz polisensibilizzato
- Valutare la possibile gravità delle singole sensibilizzazioni
- In casi selezionati e complessi come l’anafilassi
- Identificazione di eventuali cross-reattività con altri alimenti o pollini
- Valutare la tollerabilità all’alimento se cotto
 - Profiline e PR-10 → ben tollerato l’alimento cotto; reazioni all’alimento crudo
 - LTP →buccia della frutta → può essere tollerato il frutto sbucciato
 - Uovo e latte → meglio tollerabili se cotti e coniugati al glutine (es.: muffin)



Grazie...