



Basophil Activation Test nelle allergie alimentari in età pediatrica

Giovanni Raimondo Pieri, Silvia Caimmi, Amelia Mascolo, Elena Chiodi,
Antonietta Marchi, Gian Luigi Marseglia, Mara De Amici, Vania Giunta

*Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Pavia,
Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia*

Il Basophil Activation Test nelle allergie alimentari in età pediatrica

Il Test di Provocazione Orale (TPO) è attualmente considerato il gold standard per la diagnosi di allergia alimentare in età pediatrica; purtroppo questo test è però costoso, impegnativo in termini di tempo e talvolta pericoloso, da qui la necessità di un test più rapido, sicuro ed economico. Il Basophil Activation Test è un recente strumento che non è ancora stato esaminato nella diagnosi delle allergie alimentari, nonostante alcuni studi abbiano mostrato risultati interessanti. Il nostro scopo è stato valutare se il BAT possa o meno essere utile nel decidere se effettuare o meno un TPO per valutare la persistenza di una allergia alimentare. Abbiamo analizzato i dati di 55 bimbi che sono stati sottoposti a 59 TPO. Ognuno di questi era stato testato anche attraverso il Prick by Prick (PBP), il dosaggio delle IgE specifiche (sIgE) e il BAT nei mesi prima di essere sottoposto a TPO. I bimbi sono stati testati per l'uovo (43), il latte (12), la nocciola (2) e il kiwi (1). L'età media della popolazione in studio è stata 4.8 anni. Otto bimbi testati per l'uovo hanno reagito al TPO. Il BAT ha mostrato una sensibilità del 63%, una specificità del 96%, un'efficienza del 91%, un Valore Predittivo Positivo del 71% e un Valore Predittivo Negativo VPN del 94%. Crediamo infine di poter affermare che il BAT potrebbe essere un test utile nell'aiutare il clinico a decidere se effettuare o meno il TPO.

Basophil Activation test in children food allergy

Oral Food Challenge (OFC) is considered as the gold standard for the diagnosis of food allergies in children; yet, it's a time consuming, expansive and sometimes dangerous procedure, hence the need of a faster, cheaper and safer test. Basophil Activation Test is a recent tool that hasn't been extensively investigated yet in diagnosing food allergy: however, specific studies have showed interesting results. Our aim was to assess if BAT could be helpful in deciding whether or not to practice an OFC to evaluate the persistence of food allergy in diagnosed patients. We analyzed the data from 55 young patients who underwent 59 OFCs. Each of them has done Prick By prick testing (PBP), dosage of serum-specific IgE concentration (sIgE) and BAT in the last few months before OFC. Children were tested for egg (43), milk (12) hazelnut (3) and kiwi (1). The mean age of our population was 4.8 years. Eight children who were tested for egg had a positive OFC. In our population BAT had a 63% of sensibility, 96% if specificity, 91% efficiency, a Positive Predictive Value (PPV) of 71% and a Negative Predictive Value (NPV) of 94%. We believe the BAT could be a useful test, helping the clinician in deciding whether or not to practice an OFC.

Introduzione

Quello delle allergie alimentari in età pediatrica è un ambito tanto importante quanto delicato. Da un lato la frequenza di questa patologia e la moltitudine di condizioni cliniche che devono essere prese in considerazione nel processo di diagnosi differenziale, dall'altro la difficoltà creata dalla mancanza di strumenti diagnostici precisi e poco costosi e la frequente necessità di ricorrere a difficili diete di esclusione. Trattare un bimbo con sospetta allergia alimentare comporta considerare elementi clinici, anamnestici e laboratoristici: il ruolo di questi ultimi costituisce, negli ultimi anni, un ampio campo di ricerca. Insieme a un costante miglioramento dei test in vitro in uso da anni stiamo recentemente assistendo al proporsi di nuovi strumenti: la diagnostica molecolare, che promette di rivoluzionare il nostro modo di approcciare il paziente, ma anche il test di attivazione dei basofili, un'altra realtà emergente che sta mostrando promettenti risultati in diversi ambiti della diagnostica allergologica. La necessità di precisi strumenti diagnostici è resa ancora più pressante da quello che ad oggi è il gold standard: il Test di Provocazione Orale (TPO). Questa procedura, consistente nella somministrazione di dosi crescenti di un alimento al bimbo in un ambiente ospedaliero, prevedibilmente gravata da una serie di svantaggi: come lunghi tempi di esecuzione, ricovero in ambiente ospedaliero, necessità di assistenza specialistica, perdita di giorni di lavoro e scuola, etc. Alla luce di queste riflessioni abbiamo condotto uno studio nella Clinica Pediatrica della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia, su un campione di 55 piccoli pazienti che hanno eseguito 59 TPO, indirizzato all'indagine dell'effettiva efficacia del BAT.

L'allergia alimentare in età pediatrica

Quando si parla di reazioni avverse agli alimenti ci si riferisce ad ogni manifestazione patologica che sia riconducibile all'assunzione di un alimento: tali reazioni possono essere suddivise in intolleranze alimentari e allergie alimentari, in base al meccanismo fisiopatologico che vi sottogiacce.

Le intolleranze alimentari sono reazioni avverse alla cui base non sta un meccanismo immunomediato. Esse dipendono da caratteristiche dell'alimento ingerito (cibi avariati, contaminati, o contenenti sostanze ad azione farmacologica) o da caratteristiche del soggetto (deficit enzimatici, disturbi psicologici o reazioni idiosincrasiche). Nel caso delle allergie alimentari è invece il sistema immunitario dell'individuo a giocare il ruolo principale: questi reagisce all'esposizione a determinate proteine alimentari in maniera abnorme e inappropriata. Tali manifestazioni necessitano di una predisposizione individuale e si verificano ogni volta che la persona viene in contatto col cibo. Il meccanismo immunologico che sta alla base di queste malattie non è però univoco: dobbiamo infatti distinguere reazioni IgE-mediate [1], le più frequenti e meglio caratterizzate, da reazioni non-IgE mediate, tra le quali quelle determinate da un'ipersensibilità ritardata di tipo cellulomediato e alcuni casi particolari come la malattia celiaca; tra i due modelli descritti troviamo infine reazioni di tipo misto [2].

Va infine puntualizzato il concetto di pseudo allergia alimentare: un tipo di reazione avversa che, pur non avvenendo su base immunomediata, ne riproduce fedelmente la sintomatologia. È indotta da cibi ad altro contenuto o liberatori di istamina o sostanze simil-istaminiche, come le fragole e alcuni tipi di formaggi. Queste reazioni non sono affatto rare, ed è frequente che vengano confuse con le allergie alimentari. Per quanto riguarda la prevalenza di questa categoria di malattia una vasta meta-analisi [3] degli articoli in letteratura riporta che mediamente il 12% della popolazione pediatrica è sospettata o riferisce avere un'allergia alimentare, mentre solo il 3% ha una diagnosi basata su dati clinici e oggettivi: se da un lato questi dati sottolineano quanto sia importante la pubblica percezione del problema e quanto questa differisca dalla realtà, dall'altro ci inducono a prendere atto delle notevoli dimensioni del problema. In età pre-scolare la prevalenza di questa affezione va, a seconda dello studio, dall'0.5% a 2.5% della popolazione generale [4], mentre nelle età successive è difficile

che superi l'1%. Da questi dati e dalla comune esperienza clinica emerge chiaramente come molti dei bimbi affetti riescano a superare, nel tempo, la condizione. Negli anni passati si credeva che la maggior parte vi riuscisse entro l'età scolare: in realtà evidenze più recenti [5-6] suggeriscono che il processo possa essere più lento, prolungandosi spesso fino alle porte dell'adolescenza. Gli alimenti che in età pediatrica più frequentemente si rendono responsabili di allergia alimentare sono latte e uovo: basti pensare, a titolo di esempio, che in Italia l'80% dei TPO viene eseguito testando uno di questi due alimenti. Analizzando il problema da un punto di vista squisitamente clinico, possiamo asserire che l'ipersensibilità agli alimenti IgE-mediata è caratterizzata da una grande varietà di quadri clinici: questi possono coinvolgere qualsiasi organo e si manifestano in un ventaglio di tempo che va da pochi minuti a poche ore dopo l'ingestione del cibo offendente. Le manifestazioni più precoci sono solitamente cutanee: prurito al palmo delle mani o dei piedi, orticaria o eritema; accanto a queste poniamo le manifestazioni respiratorie (broncospasmo, dispnea, gemiti espiratori, afonia, stridore), che dovrebbero costituire, per il clinico, un importante campanello d'allarme, in quanto potenzialmente letali.

Ricordiamo poi le manifestazioni gastroenteriche (vomito, diarrea e crampi addominali) e generali (malessere, sudorazione, disorientamento, sensazione di grave evento imminente). Le manifestazioni cardiocircolatorie, dal dolore retrosternale all'ipotensione, caratterizzano i casi più gravi [7-9].

Il Basophil Activation Test

Questo test si basa sull'esistenza di alcuni marker di attivazione dei basofili, CD63 e CD203c su tutti, che vengono quantificati dopo l'esposizione del campione di sangue all'allergene, grazie a tecniche di citofluorometria e con l'ausilio di anticorpi monoclonali [10]. CD 63 è una glicoproteina di 53 kDa appartenente alla famiglia delle tetraspanine, conosciuta anche come Gp53 o LAMP-3 (lysosomal-associated membrane glycoprotein-3), la quale è molto poco espressa sui basofili quiescenti, essendo prevalentemente presente in granuli intracellulari: in concomitanza di un'attivazione della cellula i granuli vengono esposti in superficie, con loro il CD63. Il risultato dell'attivazione di questo marker viene espresso come % di basofili CD63+. L'uso di questo test nella diagnostica delle allergie alimentari sta muovendo i primi promettenti passi: uno studio belga [11] ha dimostrato come il BAT sia in grado di discriminare tra bimbi allergici, sensibilizzati all'uovo o pazienti-controllo, mentre uno studio francese [12] ha recentemente sostenuto l'utilità del BAT nel decidere quando reintrodurre il latte vaccino in una popolazione di bimbi allergici. È quindi lecito sperare che arrivino, nei prossimi anni, ulteriori conferme dell'utilità del test nella diagnostica delle allergie alimentari.

Scopo del lavoro

Tra le molteplici condizioni che possono costituire un'indicazione all'esecuzione di un TPO la più frequente è sicuramente la diagnosi di avvenuta tolleranza nei confronti di un alimento verso il quale il paziente era considerato allergico. Quello che appare meno chiaro, in letteratura, è quando sia appropriato proporre un simile test al paziente: quale il timing, quali fattori di rischio che ne controindicano l'esecuzione o, al contrario, gli elementi che rendono inutile la procedura, già di per sé costosa e dispendiosa. Nella pratica clinica questo processo di valutazione viene effettuato dallo specialista, che integra in ogni caso clinico la sua esperienza e conoscenza con i dati anamnestici, clinici e laboratoristici del paziente. Lo scopo del nostro studio è quindi quello di capire se il BAT possa aiutare il clinico nella decisione se intraprendere o meno un TPO per diagnosticare l'avvenuta tolleranza a un alimento. Questo obiettivo è stato conseguito attraverso lo studio, sulla nostra popolazione, delle caratteristiche dei seguenti test: PBP, dosaggio delle IgE e BAT.

Materiali e metodi

Lo studio è stato condotto presso la Clinica Pediatrica della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia. Sono stati inclusi nello studio 55 bambini seguiti presso l'Ambulatorio di Immuno-Allergologia della clinica, sui quali sono stati eseguiti 59 TPO: 43 eseguiti per l'uovo (73%), 12 per il latte (20%), 3 per la nocciola (5%) e 1 per il kiwi (2%). I TPO sono stati eseguiti nel periodo compreso tra Settembre 2009 e Settembre 2011. Il campione si componeva di 36 maschi (61%) e 23 femmine (39%), di età compresa tra 1 e 14 anni, con una media di 4.8 anni. La popolazione presa in esame presentava le seguenti caratteristiche cliniche: 26 (47%) avevano ricevuto una diagnosi di dermatite atopica, 16 (29%) soffrivano di broncospasmi ricorrenti o erano seguiti per asma, 16 (29%) erano polisensibilizzati, 13 (24%) avevano avuto almeno un episodio di orticaria, 8 (15%) erano seguiti per rinite o oculorinite, 3 (5%) avevano avuto un episodio di angioedema, infine 14 (32%) dei pazienti che hanno eseguito il TPO per l'uovo assumeva tracce o derivati prima del test.

Per l'analisi dei pazienti è stata anzitutto presa in considerazione l'anamnesi (familiare, fisiologica e patologica), in modo da avere un inquadramento clinico che fosse il più completo possibile.

I pazienti del campione sono poi stati sottoposti ai seguenti esami in vivo e in vitro: PBP, considerato positivo nel caso in cui il pomfo risultasse ≥ 3 mm, dosaggio delle sIgE, eseguito con il sistema ImmunoCAP Specific IgE (PHADIA). Il BAT è stato eseguito con il kit Flow2 CAST® (Bühlmann): l'allergene, insieme al tampone di stimolazione, viene addizionato ad un campione di sangue intero: in caso di risposta positiva ne risulterà un'aumentata esposizione in superficie del marker CD63. Questa viene oggettivata aggiungendo al campione anticorpi marcati diretti contro CD63 e contro il recettore umano per le chemochine CCR3, espresso costitutivamente su eosinofili e basofili: la presenza dei seguenti marker viene infine quantificata attraverso un procedimento di citometria a flusso. Il test, per gli allergeni alimentari, viene considerato positivo se la stimolazione è $\geq 15\%$. Ogni test necessita inoltre un controllo negativo del grado di attivazione basofila basale (PC), e due controlli positivi (PC1, con l'anticorpo monoclonale anti-FcεRI, e PC2, con l'attivatore cellulare aspecifico fMLP): almeno uno di questi ultimi deve avere un'attivazione $\geq 10\%$. I TPO sono stati tutti eseguiti in regime di day hospital o di ricovero presso la nostra Clinica. I pazienti dovevano presentarsi in condizioni di benessere, e dovevano aver sospeso da almeno una settimana l'assunzione di antistaminici e steroidi. Ai genitori dei piccoli pazienti è stato fatto firmare un consenso informato e, prima dell'esecuzione di ogni challenge è stato posto un catetere venoso periferico e sono stati preparati farmaci d'emergenza. Quindi i singoli bimbi sono stati sottoposti all'ingestione di dosi crescenti dell'alimento in causa ogni 20 minuti.

Risultati

Dei 59 TPO eseguiti, 8 sono stati considerati positivi: tutti erano stati fatti con lo scopo di testare l'uovo. Tutte le reazioni sono state osservate da un'ora dopo l'assunzione della prima dose a un'ora dopo l'assunzione dell'ultima. I segni più frequentemente osservati sono stati cutanei: pomfi orticarioidi (37% bimbi), orticaria (25%) e prurito (37%), seguiti da segni gastrointestinali come nausea e vomito (37%). Tutte le crisi sono state di grado lieve, e si sono risolte con la somministrazione di Oxatomide, ad eccezione di una, classificabile come reazione anafilattica di II grado, che ha richiesto anche la somministrazione di steroidi e di adrenalina. La raccolta dei dati dei pazienti relativi ai test in vivo ed in vitro effettuati ci ha permesso di svolgere una prima analisi di confronto fra le tecniche indagate nello studio: PBP, sIgE e BAT. In tabella 1 vengono riportati sensibilità, specificità, efficienza e valori predittivi positivi e

negativi ottenuti considerando i cut-off di riferimento. I pazienti sono stati poi suddivisi in due gruppi: coloro che avevano presentato una risposta negativa al Test di Provocazione Orale (TPO) per l'uovo (33 pazienti) e chi invece ha mostrato una risposta positiva al TPO (8 pazienti).

Prendendo in considerazione i dati sul test di attivazione dei basofili, è stato evidenziato come la percentuale di CD63 indotta in vitro da stimolazione con albume sia significativamente (p -value=0.0084) più elevata nei pazienti che hanno mostrato una risposta positiva al TPO, come mostrato in figura 1. È stato inoltre calcolato il rapporto tra CD63(%) attivata dopo stimolazione con albume e CD63 (%) attivata dopo controllo positivo (PC1). Il confronto tra pazienti con TPO positivo o negativo all'uovo non ha mostrato differenze significative (p -value=0.2946). Il valore soglia di CD63 (%) indotto da stimolazione con uovo che ottimizza il valore predittivo positivo (VPP=71.4%) è pari a 16.1%. Analizzando il valore predittivo negativo (VPN), invece, il valore soglia che massimizza il risultato (100%) è pari a 2.81%.

Discussione

Il problema della diagnosi delle allergie alimentari in età pediatrica è, ad oggi, molto frequente, e i dati di cui disponiamo indicano che in futuro, molto probabilmente, la sua incidenza andrà aumentando. Costituisce quindi un argomento che non può e non deve cogliere impreparato il pediatra [13]. Abbiamo già sottolineato quali siano gli strumenti diagnostici con i quali il medico può affrontare la problematica, e quanto sia importante affinare l'utilizzo delle metodiche in uso da più tempo, sviluppandone, contemporaneamente, di nuove: nell'ottica di semplificare il processo diagnostico al medico e fornire al piccolo paziente un pronto riconoscimento del suo stato di salute o malattia.

L'uso clinico di PBP ed sIgE è ormai da anni alla base della diagnostica allergologica: il nostro studio ha sostanzialmente confermato, in questo ambito, quanto presente in letteratura [14-16]. Sia PBP che sIgE si sono confermati essere esami di ottima sensibilità (entrambi 100% nel nostro studio) e scarsa specificità (40% e 48% rispettivamente). Questo, unito al dato dell'efficienza (48% e 55%) e del VPN (100% per ambedue), ci permette di concludere che questi test si propongono come ottimi esami di screening. I risultati più interessanti sono stati comunque raggiunti valutando l'utilità del BAT: è stato confermato, anzitutto, che i suoi risultati correlano con l'esito del TPO, i valori dei bimbi che hanno reagito (mediana 17.5%) sono significativamente più elevati di quelli che non hanno reagito (mediana 3%). Il test si è poi rivelato, nella nostra popolazione, un buono strumento: con una sensibilità del 63%, una specificità del 96% e una efficienza del 91%. Questi dati sono preziosi perché in linea con uno dei pochi studi ad oggi condotti sull'uso del BAT nelle allergie alimentari [12]. Le implicazioni pratiche di questa conclusione sono forti: il clinico sa che di fronte a un BAT positivo il TPO è da considerarsi a rischio (PPV di 71%), al contrario, di fronte a un BAT negativo, il rischio risulta essere basso (NPV del 94%). Nella consapevolezza che sarebbe sicuramente auspicabile ampliare la popolazione in studio e verificare nella stessa la solidità dei dati da noi riscontrati, riteniamo di poter concludere sostenendo che il BAT possa essere considerata una valida alternativa nelle mani del clinico che debba approcciare un paziente nel quale valutare se eseguire o meno un TPO.

Tabelle e figure

Tabella 1. I risultati ottenuti dallo studio della nostra popolazione, considerati positivi o negativi a seconda dei cut-off di riferimento (3mm per il PBP, 0.35kU_Al per le sIgEt e 15% per il BAT).

Pazienti	PBP	IgE	BAT	TPO
14 (25%)	neg	neg	neg	neg
9 (16%)	pos	neg	neg	neg
5 (9%)	neg	pos	neg	neg
18 (32%)	pos	pos	neg	neg
3 (5%)	pos	pos	neg	pos
2 (4%)	pos	pos	pos	neg
5 (9%)	pos	pos	pos	pos

Tabella 2. Sensibilità, specificità, efficienza, valore predittivo positivo (VPP) e valore predittivo negativo (VPN) dei test in vivo e in vitro presi in esame.

	IgE specifiche	Prick by Prick	BAT
Sensibilità	100%	100%	63%
Specificità	48%	40%	96%
Efficienza	55%	48%	91%
VPP	24%	21%	71%
VPN	100%	100%	94%

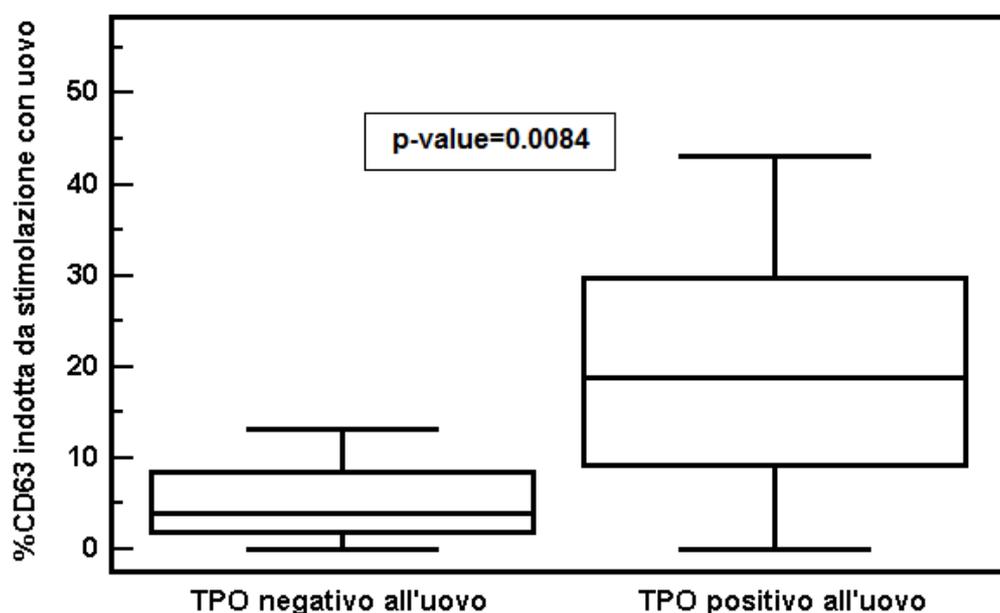


Figura 1. Distribuzione dei livelli di CD63 (%) indotta da stimolazione con uovo in pazienti che hanno avuto una risposta negativa o positiva al TPO. I dati sono espressi come mediana (linea nera), 25° e 75° percentile e viene riportato il p-value tra i due gruppi.

Bibliografia

- 1 Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Annual review of medicine* 2009;60:261-277.
- 2 Cianferoni A, Spergel JM. Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergology international: official journal of the Japanese Society of Allergology* 2009;58(4):457-466.
- 3 Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel 2010. *Elsevier*, Berlin, DH 2010.
- 4 Rona RJ, Keil T, Summers C et al. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2007;9:638-646.
- 5 Savage JH, Matsui EC, Skripak JM et al. The natural history of egg allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2007;120(6):1413-1417.
- 6 Rona RJ, Keil T, Summers C et al. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2007;9:638-646.
- 7 Venter C, Pereira B, Voigt K et al. Prevalence and cumulative incidence of food hypersensitivity in the first 3 years of life. *Allergy* 2008;63(3):354-359.
- 8 Silva R, Gomes E, Cunha L et al. Anaphylaxis in children: A nine years retrospective study (2001-2009). *Allergologia et immunopathologia* 2011;13:10-15.
- 9 Muraro A, Roberts G, Clark A et al. The management of anaphylaxis in childhood: position paper of the European academy of allergology and clinical immunology. *Allergy* 2007;62(8):857-871.
- 10 Sampson HA, Muñoz-Furlong A, Campbell RL et al. Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report--Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2006;117(2):391-397.
- 11 Ebo DG. Basophil activation tests in food allergy. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2009;39(8):1115-1116.
- 12 Ocmant A, Mulier S, Hanssens L et al. Basophil activation tests for the diagnosis of food allergy in children. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2009;39(8):1234-1245.
- 13 Rubio A, Vivinus-Nébot M, Bourrier T et al. Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children. *Allergy* 2011;66:92-100.
- 14 Vetander A, Vivinus-Nébot M, Bourrier T et al. Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children. *Allergy* 2011;66:92-100.
- 15 Sporik R, Hill DJ, Hosking CS et al. Specificity of allergen skin testing in predicting positive open food challenges to milk, egg and peanut in children. *Clinical and Experimental Allergy* 2000;30(11):1541-1546.
- 16 Sampson HA, Ho DG. Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *Journal of allergy and clinical immunology* 1997;100(4):444-451.
- 17 Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2010;125:116-125.