



La diagnosi di allergia all'uovo in età pediatrica: test in vivo e in vitro

Luca Bosa, Lorenzo Andrea Bassi, Tiziana Boggini, Federico Cattaneo,
Valentina Domenech, Thomas Foadelli, Chiara Gagliardone, Roberta Maragliano,
Amelia Mascolo, Giovanni Raimondo Pieri, Rossella Porto,
Giulia Rossetti, Antonietta Marchi

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

La diagnosi di allergia all'uovo in età pediatrica: test in vivo e in vitro

Il gold standard per la diagnosi di allergia alimentare è il test di provocazione orale (TPO). Si tratta di un test risolutivo, che, qualora negativo, consente di reintrodurre l'alimento nella dieta. Tuttavia, è rischioso per il bambino (vi è una certa probabilità di anafilassi), è costoso e talvolta è di difficile esecuzione e interpretazione. Per tali ragioni, gli studi si sono concentrati sulla ricerca di mezzi diagnostici alternativi. Grandi progressi sono stati compiuti nella component-resolved diagnosis, che mira a studiare la reattività verso singole molecole costituenti l'alimento, attraverso test in vitro, rapidi e sicuri. I test diagnostici più promettenti sono il basophil activation test e il dosaggio delle IgE specifiche per allergeni nativi purificati o ricombinanti. Lo scopo del nostro studio è stato quello di mettere a confronto i risultati dei test in vitro attualmente in uso nella diagnosi di allergia all'uovo rispetto all'esito del test in vivo, ossia il TPO. Sono stati eseguiti 50 TPO all'uovo (prima crudo, poi cotto) su 48 bambini (età media di 5.2 anni al momento del TPO), sottoposti ai seguenti test diagnostici: prick by prick (PBP, con albume e tuorlo), dosaggio delle IgE sieriche specifiche (sIgE, utilizzando estratti allergenici a base di bianco d'uovo e tuorlo e allergeni nativi purificati, ossia ovomucoide, nGal d 1, ovoalbumina, nGal d 2, ovotransferrina, nGal d 3 e lisozima, nGal d 4) e basophil activation test (BAT, mettendo un campione di sangue a contatto con un allergene specifico, ossia albume e tuorlo e determinando la percentuale di basofili attivati in vitro, rilevando l'aumento di espressione del marker di attivazione CD63 sulla superficie cellulare, mediante citometria a flusso). Dei 50 TPO eseguiti, 10 (20%) sono stati considerati positivi. I PBP con albume si sono dimostrati estremamente sensibili (100%), ma poco specifici (42.5%); l'allergia alimentare avrebbe potuto essere esclusa nei bambini con PBP negativi (VPN 100%). Risultati analoghi sono stati ottenuti con le sIgE per bianco d'uovo (sensibilità 90%, specificità 52.5%). Considerando invece le sIgE specifiche per gli allergeni nativi purificati dell'uovo (compresi ovomucoide e ovoalbumina), la metodica si è dimostrata altrettanto sensibile (100%), ma più specifica (60.9%) rispetto ai PBP e alle sIgE. Il BAT si è rivelato un ottimo test per la diagnosi in vitro di allergia, con discreta sensibilità (70%), ma ottima specificità (90%), maggiore rispetto alle metodiche convenzionali; un BAT negativo, quindi, indica un'elevata probabilità di tollerare l'uovo, mentre un test positivo potrebbe indurre il clinico a posticipare il TPO. Le dimensioni del pomfo dopo PBP, i livelli di sIgE per albume, tuorlo, ovomucoide e ovoalbumina e la percentuale di basofili attivati nel BAT sono risultati significativamente più elevati nei pazienti con TPO positivo.

The diagnosis of egg allergy in pediatric age: in vivo and in vitro tests

The gold standard for the diagnosis of food allergy is oral food challenge (OFC). It's a resolving test, that, when negative, allows to reintroduce the food into diet. Nevertheless, it's risky for the child (there's a chance of anaphylaxis), it's expensive and sometimes it's difficult to perform and interpret. For these reasons, studies focused on the search for alternative diagnostic tools. Great progress were made in component resolved diagnosis, which aim to study the reactivity to single molecules that constitute the food, through in vitro tests, fast and safe. The most promising diagnostic tests are basophil activation test and determination of specific IgE to purified natural or recombinant allergens. The purpose of our study was to compare the results of in vitro tests currently used in the diagnosis of egg allergy with the outcome of in vivo test, OFC. 50 OFC with egg (first raw, than cooked) were performed on 48 children (median age 5.2 years at the time of OFC), who underwent the following diagnostic tests: prick by prick (PBP, with egg white and yolk), determination of serum specific IgE (sIgE, using allergenic extracts from egg white and yolk and purified natural allergens, ovomucoid, nGal d 1, ovoalbumin, nGal d 2, ovotransferrin, nGal d 3 and lysozyme, nGal d4) and basophil activation test (BAT, putting a blood sample in contact with a specific allergen, that is egg white and yolk and determining the percentage of basophils activated in vitro, detecting the increase in the expression of the activation marker CD63 on the cell surface, through flow cytometry). Of the 50 OFC performed, 10 (20%) were considered positive. PBP to egg white proved to be extremely sensitive (100%), but little specific (42.5%); food allergy could have been excluded in children with negative PBP (NPV 100%). Similar results were obtained with sIgE to egg white (sensitivity 90%, specificity 52.5%). Considering specific IgE to purified natural allergens of egg (including ovomucoid and ovoalbumin), the method proved to be as much sensitive (100%), but more specific (60.9%) compared with PBP and sIgE. BAT proved to be a very good test for the in vitro diagnosis of allergy, with a discrete sensitivity (70%), but a noteworthy specificity (90%), greater than the conventional methods; a negative BAT, therefore, suggests a high chance to tolerate egg, while a positive test might induce the physician to postpone OFC. The wheal dimensions after PBP, the levels of sIgE to egg white, yolk, ovomucoid and ovoalbumin and the percentage of activated basophils in BAT resulted significantly higher in patients with positive OFC.

Introduzione

L'allergia alimentare in età pediatrica è una tematica di grande attualità, soprattutto in considerazione delle sempre più pressanti evidenze di un incremento nella prevalenza di questa patologia nelle ultime decadi [1]. La problematica di maggiore interesse è la diagnosi di questa condizione. Gli strumenti a disposizione del pediatra sono numerosi, ma come sempre accade, la difficoltà maggiore è insita nel confrontare i vari test, valutando rischi, benefici, costi e performance. Il gold standard per la diagnosi di allergia alimentare è il test di provocazione orale (TPO), che consiste nel somministrare l'alimento sospetto al bambino sotto la stretta sorveglianza medica, al fine di verificare l'eventuale insorgenza di reazioni [2]. Si tratta di un test risolutivo, che, qualora negativo, consente di reintrodurre l'alimento nella dieta. Tuttavia, non mancano gli aspetti negativi: è rischioso per il bambino, in quanto responsabile di anafilassi in una certa quota di pazienti; è costoso, dato che va effettuato in regime di day hospital o di ricovero, con un dispendio non indifferente di risorse economiche e di ore di lavoro degli operatori sanitari; è impegnativo per il soggetto e la sua famiglia, in quanto richiede tempo e disponibilità. Oltretutto, può essere di difficile esecuzione e interpretazione, soprattutto nei lattanti e nei bambini più piccoli. Per tutte queste ragioni, gli studi si sono concentrati sulla ricerca di mezzi diagnostici alternativi, che, da soli o in combinazione, consentissero di porre con ragionevole probabilità diagnosi di allergia alimentare. Sono stati ideati numerosi algoritmi diagnostici, che hanno permesso di ridurre il numero di pazienti da sottoporre al TPO, così da testare solo chi avesse buone possibilità di aver raggiunto uno stato di tolleranza o i soggetti con una storia clinica tendente ad escludere la problematica allergica. Grandi progressi sono stati compiuti nella component-resolved diagnosis, che mira a studiare la reattività dell'individuo verso

single molecole costituenti l'alimento in esame, attraverso test in vitro, rapidi e sicuri. I test diagnostici più promettenti sono il basophil activation test e il dosaggio delle IgE specifiche per allergeni nativi purificati o ricombinanti. Per utilizzarli in modo razionale nella pratica clinica e, soprattutto, per interpretarne correttamente l'esito, sono ancora necessari studi che ne determinino la reale utilità diagnostica.

L'allergia alimentare

Le reazioni avverse agli alimenti sono risposte sfavorevoli che seguono l'ingestione di alimenti o additivi alimentari. Sono classicamente suddivise in due categorie, sulla base del meccanismo fisiopatologico sottostante: intolleranze alimentari e allergie alimentari. Le intolleranze alimentari sono dovute a fattori dell'ospite (deficit enzimatici, malattie gastroenteriche, reazioni idiosincrasiche, fattori psicologici, emicrania) o dell'alimento ingerito (microrganismi, tossine, agenti farmacologici, contaminanti). Le allergie alimentari comprendono, invece, risposte immunologiche avverse che fanno seguito all'ingestione di un alimento.

Si tratta di un disordine comune: alcuni studi suggeriscono una prevalenza cumulativa del 3-6% (oltre il 10% se si considerano lievi reazioni a frutta e verdura), con un impatto significativo su qualità di vita e costi. Vi è una discrepanza tra la prevalenza di allergia riferita dal paziente o dai suoi genitori (che va dal 3 al 35% per tutti gli alimenti) e quella di allergia provata da un TPO (tra l'1 e il 10.8%). Molte allergie alimentari dell'infanzia si risolvono durante la vita [3].

Dal punto di vista fisiopatologico, l'allergia alimentare è il risultato di una disregolazione del network immune, che deriva dalla complessa interazione tra genetica, ambiente (o epigenetica), risposta immune dell'ospite e biochimica delle proteine alimentari. Si possono definire tre tipi di meccanismi immunitari: IgE-mediato, cellulo-mediato e misto IgE-mediato e non IgE-mediato [4].

Le reazioni allergiche agli alimenti si presentano con una varietà di sintomi diversi e con tempistiche differenti; possono essere immediate (avvengono da minuti a poche ore dopo l'assunzione; sono generalmente dovute ad un meccanismo IgE-mediato) o ritardate (si verificano da diverse ore a pochi giorni dopo l'assunzione; si basano tipicamente su un meccanismo cellulare). Le malattie allergiche indotte da alimenti possono invece essere classificate sulla base delle reazioni immunopatologiche che le determinano: reazioni IgE-mediate (orticaria, angioedema, sindrome orale allergica, ipersensibilità gastrointestinale immediata, rinite e asma, anafilassi, anafilassi esercizio-indotta associata ad alimenti), reazioni cellulo-mediate (enterocolite indotta da proteine alimentari, proctite indotta da proteine alimentari, dermatite allergica da contatto), reazioni IgE-associate/cellulo-mediate (dermatite atopica, gastroenterite eosinofila, esofagite eosinofila) [5-6].

La diagnosi di allergia alimentare si avvale di un'accurata anamnesi e di test di primo ed eventualmente di secondo livello. I test cutanei possono essere eseguiti con estratti commerciali (skin prick test convenzionali) o con l'alimento fresco o nativo (prick by prick, più sensibili). Sono utili per identificare la sensibilizzazione verso un alimento (cioè la presenza di sIgE legate alla superficie di mastcellule cutanee), ma da soli non sono diagnostici di allergia alimentare. Hanno elevata sensibilità, quindi sono utili per determinare gli alimenti responsabili. I risultati sono immediati, in quanto il pomfo si sviluppa entro 10-15 minuti dall'introduzione dell'allergene; è considerato positivo con un diametro medio maggiore o uguale di 3 mm. Analogamente, il dosaggio delle IgE sieriche specifiche, con metodo fluoro-immunoenzimatico (non più RAST, come in passato), è utile per identificare la sensibilizzazione verso un allergene, ma da solo non è diagnostico di allergia alimentare; sensibilità e specificità sono paragonabili agli SPT, ma si tratta di un test più costoso, che richiede un prelievo ematico. Dermatite estensiva e antistaminici non influenzano il test sierologico. Il gold standard per la diagnosi di allergia alimentare è il test di provocazione orale (TPO). Consiste nel somministrare gradualmente l'alimento sospetto, in ambiente ospedaliero, dopo almeno due settimane di completa privazione. Vi sono varie modalità: aperto, in singolo cieco o in doppio cieco contro placebo. Un TPO può essere positivo (riscontro oggettivo di una reazione allergica) o negativo (porta a reintroduzione dell'alimento nella die-

ta). I progressi della biologia molecolare hanno permesso l'estrazione e la produzione di ricombinanti di proteine allergeniche. Questo ha portato alla Component-resolved diagnosis, per identificare le IgE specifiche per una proteina o per un epitopo. Essa consente di rivelare il pattern di sensibilizzazione individuale e distinguere tra sensibilizzazione e allergia clinica, tra soggetti con allergia alimentare persistente e pazienti che hanno raggiunto la tolleranza. Il sistema più diffuso è l'ISAC, un microarray che testa 112 diversi allergeni ricombinanti utilizzando solo una piccola quantità di siero (microlitri; utile nel bambino). Un'altra metodica innovativa è il basophil activation test, che si effettua mettendo un campione di sangue del paziente a contatto con un allergene specifico e determinando la percentuale di basofili attivati in vitro, rilevando l'aumento dell'espressione del marker di attivazione CD63 sulla superficie cellulare mediante citometria a flusso, usando un reagente di colorazione contenente anticorpi monoclonali diretti contro il CD63 e contro il recettore umano per le chemochine CCR3, espresso costitutivamente su eosinofili e basofili. Il BAT è una metodica costosa, ma presenta diversi vantaggi: minime quantità di sangue richieste, studio delle cellule nel loro ambiente naturale, analisi rapida (circa 1 ora) [7-9].

La terapia primaria dell'allergia alimentare consiste nell'eliminazione dalla dieta dell'alimento o degli alimenti causali.

L'allergia all'uovo

L'uovo di gallina è uno degli alimenti più frequentemente responsabili di allergia alimentare. □ La prevalenza di allergia auto-riportata va dallo 0.2% al 7%, mentre la prevalenza di soggetti sintomatici e sensibilizzati all'uovo (con SPT o IgE positivi) va dallo 0.5% al 2.5%. Considerando invece allergici i soggetti con test di provocazione orale positivo, la prevalenza è inferiore, assestandosi tra lo 0% e l'1.7%. Molto più frequente è la sensibilizzazione all'uovo: dall'1% al 9% dei soggetti hanno sIgE positive, mentre tra lo 0.5% e il 5% hanno skin prick test positivi [3]. L'allergia all'uovo è l'allergia alimentare più frequente (due terzi del totale, se si considerano i challenge positivi) nei bambini con dermatite atopica.

L'albumina è la maggiore fonte di allergeni dell'uovo; contiene 23 diverse glicoproteine, la maggior parte delle quali sono state purificate. □ Gli allergeni maggiori dell'uovo, contenuti nell'albumina, sono, in ordine di allergenicità decrescente, ovomucoide (OVM o Gal d 1), ovoalbumina (OVA o Gal d 2), ovotransferrina/conalbumina (OVT o Gal d 3) e lisozima (LYS o Gal d 4). L'ovomucoide è l'allergene dominante, anche se costituisce solo l'11% delle proteine dell'albumina. È allergenico anche in quantità minime. Possiede diverse caratteristiche uniche, come la stabilità al calore e alla digestione da parte di proteinasi. Bollire l'uovo per almeno 10 minuti determina una riduzione di più del 75% della sua allergenicità. Il riscaldamento non distrugge completamente la capacità di ovomucoide e ovoalbumina di legare IgE, ma ne aumenta la digeribilità in vitro. Questo potrebbe spiegare perché la maggior parte dei bambini con allergia all'uovo lo tollera nel contesto di cibi riscaldati o cotti. Gli epitopi conformazionali, quindi, avrebbero un ruolo primario, soprattutto nella sensibilizzazione all'ovomucoide. Tra gli allergeni minori dell'uovo, invece, α -livetina (Gal d 5) e YGP42 (Gal d 6), sono proteine del tuorlo, riconosciute per lo più da adulti allergici.

La sensibilizzazione all'uovo avviene generalmente tramite la mucosa intestinale, ma non sono infrequenti le reazioni che si verificano alla prima ingestione dell'uovo: la sensibilizzazione potrebbe quindi verificarsi a causa del trasferimento di allergeni dell'uovo per via transplacentare o attraverso il latte materno. Le prime reazioni allergiche all'uovo sono generalmente osservate durante il primo anno di vita.

I sintomi più comuni sono eritema e orticaria, seguiti da sintomi gastrointestinali, come dolore addominale e vomito. Le reazioni anafilattiche all'uovo non sono comunemente riportate, neanche nei bambini.

Al momento, la terapia standard per l'allergia all'uovo è l'esclusione dalla dieta.

La prognosi dell'allergia all'uovo nei bambini è in genere buona: si risolve nel 4% dei casi prima dei 4 anni, nel 12% prima dei 6 anni, nel 37% prima dei 10 anni e nel 68% prima dei 16 anni. La riduzione nella concentrazione delle IgE specifiche per l'albumina nel tempo correla con la probabilità di sviluppare tolleranza. In bambini con allergia all'uovo persistente sono presenti livelli significativamente più alti di IgE specifiche per l'ovomucoide [10-15].

Scopo del lavoro

Lo scopo del nostro studio è stato quello di mettere a confronto i principali test in vitro attualmente in uso nella diagnosi di allergia alimentare, in particolare di allergia all'uovo, rispetto all'esito del test in vivo, ossia il test di provocazione orale, la metodica gold standard secondo le principali linee guida.

Nel dettaglio, ci siamo posti i seguenti obiettivi:

- determinare sensibilità, specificità, efficienza, valore predittivo positivo e negativo di prick by prick (test cutaneo più sensibile rispetto agli SPT), IgE specifiche per albumina (di gran lunga più allergenico rispetto al tuorlo) e per allergeni naturali purificati (ovomucoide, ovoalbumina, ovotransferrina e lisozima, provenienti dall'albumina) e basophil activation test;
- valutare l'esistenza di una differenza significativa tra gli esiti dei soggetti tolleranti rispetto ai reattivi al challenge;
- confrontare le metodiche da tempo in uso nella pratica clinica con quelle più innovative e tuttora oggetto di studio, ossia la determinazione delle sIgE specifiche per singole molecole allergeniche e il basophil activation test.

Materiali e metodi

Campione dello studio

Lo studio è stato condotto nella Sezione di Scienze Pediatriche del Dipartimento di Scienze Clinico-Chirurgiche, Diagnostiche e Pediatriche dell'Università degli Studi di Pavia, presso la Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia.

Sono stati eseguiti 50 TPO all'uovo su 48 bambini. Due bambini, infatti, sono stati sottoposti due volte al TPO: in un caso, il test è stato interrotto per riscontro di segni e sintomi dubbi; nell'altro caso, il bambino è stato rivalutato a distanza di tempo dal primo TPO positivo, per tentare di reintrodurre l'uovo nella dieta in caso di acquisita tolleranza (il soggetto è risultato positivo anche al secondo scatenamento). I challenge si sono svolti in un periodo di tempo compreso tra ottobre 2009 e luglio 2012. Il campione era composto da 31 maschi (64.6%) e 17 femmine (35.4%), di età compresa tra gli 2 e i 16 anni, con un'età media di 5.2 anni al momento del TPO.

La popolazione presa in esame era eterogenea dal punto di vista anamnestico. In particolare, su 48 soggetti:

- 28 (58.3%) presentavano storia di dermatite atopica;
- 14 (29.2%) soffrivano di broncospasmi ricorrenti;
- 10 (20.8%) avevano anamnesi positiva per rinocongiuntivite allergica;
- 8 (16.7%) avevano avuto episodi di orticaria;
- 4 (8.3%) erano asmatici;
- 3 (6.3%) presentavano anamnesi positiva per angioedema.

Per quanto riguarda la sensibilizzazione verso i comuni aeroallergeni e trofoallergeni, determinata sulla base di SPT e sIgE sieriche, 19 pazienti (39.6%) risultavano polisensibilizzati. Infine, 19 (39.6%) assumevano tracce di uovo prima del TPO.

Procedure utilizzate

Tutti i pazienti del campione sono stati sottoposti a procedure standard, così da rendere possibile la comparazione a fini statistici. Sono stati eseguiti i seguenti test diagnostici:

- prick by prick (PBP), a livello della superficie volare dell'avambraccio o sulla schiena, introducendo nell'epidermide disinfettata una porzione di alimento, tramite una lancetta. Sono stati utilizzati bianco d'uovo e tuorlo freschi, portati da casa dai familiari del paziente. I risultati ottenuti sono stati confrontati con il controllo positivo (istamina) e negativo (diluente). La lettura avveniva 10-15 minuti dopo il test, considerato positivo se il pomfo era di diametro maggiore o uguale a 3 mm.
- Dosaggio delle IgE sieriche specifiche, con il sistema ImmunoCAP® fornito dalla ditta Phadia®. Si tratta di uno strumento diagnostico che misura i livelli ematici delle IgE allergene specifiche presenti nel siero o nel plasma umano. Nel nostro studio, gli allergeni utilizzati, prodotti da Phadia®, erano estratti allergenici a base di bianco d'uovo (f1) e tuorlo (f75) e allergeni nativi purificati, ossia ovomucoide (nGal d 1, f233), ovoalbumina (nGal d 2, f232), ovotransferrina (nGal d 3, f323) e lisozima (nGal d 4, k208). Sono stati considerati positivi valori superiori a 0.35 kU_A/L. Non per tutti i soggetti era disponibile il valore delle IgE specifiche per gli allergeni nativi purificati dell'uovo. Infatti, mentre nei challenge più recenti il dato era parte del pannello di esami richiesti prima di sottoporre il bambino al TPO, per i test di provocazione svolti all'inizio del periodo di studio è stato necessario recuperare il siero congelato del soggetto per eseguire il dosaggio. Purtroppo, non sempre tale campione era presente; spesso, l'intero siero prelevato era già stato utilizzato per eseguire le comuni determinazioni diagnostiche. Inoltre, non per tutti i pazienti è stato eseguito il pannello completo delle sIgE relativo ai quattro allergeni maggiori dell'uovo. Talvolta si è deciso di dosare solo le sIgE relative agli allergeni più importanti, in particolare ovomucoide (Gal d1) e ovoalbumina (Gal d2). Di conseguenza, il dato relativo ad ovomucoide e ovoalbumina era presente per 29 su 48 bambini (60.4%). Di questi, in 1 caso (2.1% del campione) non erano state effettuate altre determinazioni, in 6 pazienti (12.5%) erano state dosate anche le IgE specifiche per ovotransferrina o lisozima, mentre nei rimanenti 22 soggetti (45.8%) era disponibile il pannello completo.
- Basophil activation test (BAT), eseguito utilizzando il kit Flow CAST®, prodotto dalla Bühlmann®. Il test si basa sulla determinazione diagnostica in vitro, tramite citometria a flusso, dell'espressione del marcatore di superficie CD63 (gp53) sui basofili del sangue intero dopo stimolazione con l'antigene. L'allergene forma un legame crociato con le IgE specifiche già legate alla superficie cellulare, con attivazione di una cascata intracellulare di segnali che inducono l'attivazione della cellula basofila. Come conseguenza, le componenti intracellulari legate alla proteina transmembrana CD63 si fondono con la membrana cellulare e vengono quindi esposte alla matrice extracellulare. Per ciascun paziente, sono necessarie almeno 4 provette: l'allergene (o più allergeni, in provette diverse; in questo caso, albume e tuorlo), un controllo negativo, contenente il tampone di stimolazione (PB, background del paziente) e due controlli positivi, il controllo di stimolazione con anticorpi anti-FcεRI, il recettore ad alta affinità per le IgE (PC1) e il controllo di stimolazione con l'attivatore cellulare aspecifico fMLP (PC2). Perché i risultati forniti dai campioni dei pazienti possano essere definiti positivi, l'attivazione basofila allergene-specifica deve presentare un indice di stimolazione (SI, stimolazione allergenica diviso controllo negativo) di almeno 2. Nel caso degli allergeni alimentari, compresi albume e tuorlo, il test viene considerato positivo con una percentuale di basofili attivati dall'allergene maggiore del 15%.

- Test di provocazione orale, in regime di day hospital o di ricovero presso la struttura sanitaria di pediatria della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, a Pavia. Per essere sottoposti al test, i pazienti dovevano presentarsi in condizioni di benessere generale e dovevano aver sospeso l'assunzione di antistaminici e steroidi da almeno una settimana. Prima dell'inizio del TPO è stato posizionato un catetere venoso periferico e sono stati preparati i farmaci da usare in caso di urgenza (adrenalina, clorfenamina, e metilprednisolone). I soggetti hanno quindi ingerito dosi crescenti dell'alimento in causa ogni 20 minuti; si è iniziato con l'uovo crudo, per poi passare all'uovo cotto. Lungo tutta la durata del test sono stati valutati i parametri vitali e le condizioni generali dei pazienti, in modo da cogliere ogni possibile segno o sintomo di reazione allergica.

Risultati

Dei 50 TPO eseguiti, 10 (20%) sono stati considerati positivi: tutti erano stati fatti con lo scopo di testare l'uovo, prima crudo e poi cotto, secondo le modalità precedentemente esposte (Tabella 1). In 9 casi si è osservata anafilassi, ossia l'interessamento di più sistemi dell'organismo (almeno due tra cute, tratto gastroenterico, apparato respiratorio, apparato cardiocircolatorio e sistema nervoso); nel paziente rimanente si è invece verificata orticaria. I segni più frequentemente osservati sono stati orticaria (70%) e vomito (40%). Altri segni, meno frequenti, sono stati broncospasmo (10%), angioedema (10%) e diarrea (10%). Tutte le reazioni sono state di grado lieve e si sono risolte con la somministrazione di antistaminico (oxatomide) associato o meno a corticosteroide (betametasona o metilprednisolone), ad eccezione di una che ha richiesto la somministrazione di antistaminico, corticosteroide, β_2 -agonista (salbutamolo) e adrenalina.

La raccolta dei dati dei pazienti relativi ai test in vivo ed in vitro effettuati ha consentito di confrontare tra di loro le tecniche indagate nello studio: PBP per albume, sIgE per albume e allergeni nativi purificati dell'uovo (ovomucoide, ovoalbumina, ovotransferrina e lisozima) e BAT (Tabella 2).

Prendendo in considerazione la risposta del test in vivo prick by prick, è risultato che la dimensione del pomfo (in mm) indotta da stimolazione in vivo con albume è significativamente (p -value=0.0282) più elevata nei pazienti con una risposta positiva al TPO (Figura 1).

I livelli sierici di IgE specifiche per l'albume sono risultati significativamente (p -value=0.0001) più elevati in coloro che hanno mostrato una risposta positiva al TPO. Medesimo comportamento se si analizzano i livelli di IgE specifiche per il tuorlo (p -value=0.0002), per l'ovoalbumina (p -value=0.008) e per l'ovomucoide (p -value=0.0093): i livelli di IgE sono significativamente più elevati nei pazienti con risposta positiva al test di provocazione orale (Figura 2). Nessuna differenza, invece, è emersa analizzando i livelli di IgE specifiche di lisozima (p -value=0.2783) e ovotransferrina (p -value=0.1047).

Prendendo in considerazione i dati del test di attivazione dei basofili, è stato evidenziato come la percentuale di CD63 indotta in vitro da stimolazione con albume sia significativamente (p -value=0.0033) più elevata nei pazienti che hanno mostrato una risposta positiva al TPO (Figura 3). 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=0.1072).

Discussione

I prick by prick con albume si sono dimostrati una metodica estremamente sensibile: una sensibilità pari al 100% indica che tutti i pazienti che hanno reagito al TPO avevano un test cutaneo positivo. Del resto, i PBP sono più sensibili degli SPT eseguiti con estratti commerciali. Ne consegue che l'allergia alimentare avrebbe potuto essere esclusa nei bambini con PBP negativi (VPN 100%). La specificità della metodica si è rivelata invece deludente, pari al 42.5%: oltre la metà dei soggetti senza reazioni al challenge era risultato positivo al PBP. Teoricamente, questi dati non possono essere considerati falsi positivi, in quanto il test rileva la sensibilizzazione ad un allergene, che non sempre si traduce in allergia. Quindi, il test è molto specifico nel rivelare la presenza di sIgE sulla superficie di mastcellule cutanee, ma non lo è nella diagnosi di allergia alimentare. Confrontando poi il diametro (in millimetri) del pomfo di soggetti positivi e negativi al TPO, si è visto che le sue dimensioni erano significativamente più elevate nei pazienti con risposta positiva al challenge.

Le IgE specifiche per l'albume si sono dimostrate molto sensibili (90%), anche se meno rispetto ai prick by prick. La specificità (52.5%) e l'efficienza (60%) erano invece analoghe nelle due metodiche e piuttosto basse. Analogamente ai test cutanei, infatti, anche il dosaggio delle sIgE rileva lo stato di sensibilizzazione, non l'allergia del soggetto. Anche valore predittivo positivo (32.1%) e negativo (95.5%) erano comparabili. Confrontando poi i livelli sierici di IgE specifiche per l'albume di soggetti positivi e negativi al TPO, è risultato che essi erano significativamente più elevati nei bambini reattivi al challenge. È stato ottenuto un risultato analogo considerando le IgE specifiche per il tuorlo. Per quanto riguarda invece le sIgE specifiche per gli allergeni nativi purificati dell'uovo, si è deciso di considerare positivo l'intero pannello con almeno un valore di sIgE positivo (superiore cioè a 0.35 kUA/L). Infatti, proprio per il rationale della metodica, che valuta il pattern di sensibilizzazione individuale verso l'una o l'altra molecola allergenica, è possibile che il sistema immunitario del soggetto abbia sviluppato uno stato di iperresponsività solo verso alcuni dei determinanti allergenici dell'uovo. Per lo stesso motivo, è possibile che il soggetto non riconosca nessuno degli allergeni maggiori, perché sensibilizzato verso altre componenti dell'uovo, o verso sostanze derivate in modo indiretto dall'assunzione di uovo (es. molecole di sintesi). Considerando i pazienti nei quali almeno tre valori di sIgE erano disponibili (compresi ovomucoide e ovoalbumina), la metodica si è rivelata altrettanto sensibile (100%), ma più specifica (60.9%) ed efficiente (70%) rispetto ai PBP e alle sIgE sieriche dirette contro l'albume. Anche il valore predittivo positivo era maggiore (43.8%), anche se ridotto, mentre il valore predittivo negativo era analogo (100%). La maggiore specificità si spiega con la capacità del test di distinguere in modo migliore la sensibilizzazione dall'allergia, contraddistinta dalla capacità del soggetto di riconoscere in modo abnorme gli allergeni cosiddetti maggiori. D'altro canto, l'immunopatogenesi è individuale e i pattern più frequenti possono non applicarsi al singolo individuo. Nel nostro studio, inoltre, i livelli di IgE specifiche per ovoalbumina e ovomucoide erano significativamente più elevati nei pazienti con risposta positiva al TPO. Lo stesso non si può dire, invece, per i livelli di IgE specifiche per lisozima e ovotransferrina. L'ovomucoide è la proteina dell'albume più allergenica, anche per la sua termostabilità, che le conferisce la capacità di indurre reazioni anche in cibi contenenti uovo cotto. L'ovalbumina ha minor potere allergizzante, ma è la proteina quantitativamente maggiore del bianco d'uovo.

Il BAT si è rivelato un ottimo test per la diagnosi in vitro di allergia, con discreta sensibilità (70%), ma ottime specificità (90%) ed efficienza (86%), maggiori rispetto alle metodiche convenzionali. Anche valore predittivo positivo (63.6%) e negativo (92.3%) sono risultati elevati; il VPP è addirittura il maggiore tra tutti i test utilizzati. Inoltre, la percentuale di basofili attivati in vitro da stimolazione con albume era significativamente più elevata nei pazienti reattivi al challenge. Di conseguenza, un BAT negativo indica con elevata probabilità tolleranza all'uovo, mentre un test positivo potrebbe indurre il clinico a posticipare il TPO eventualmente programmato, vista la discreta probabilità di allergia.

Applicazioni attuali e prospettive future

Per quanto sarebbe ideale, non è possibile eseguire un test di provocazione orale in doppio cieco in ogni paziente con sospetta reattività clinica ad un alimento. Se l'anamnesi è suggestiva per una reazione non collegabile all'assunzione di cibo o non IgE-mediata, gli SPT dovrebbero essere il test di scelta per escludere l'allergia alimentare. Al contrario, di fronte ad una convincente storia clinica di reazioni IgE-mediate severe, potrebbe essere più prudente controllare solo il livello di sIgE sieriche come prima indagine diagnostica. Nel tempo, è possibile seguire i livelli delle sIgE del paziente, come marker surrogato di sviluppo di tolleranza. Se i valori continuano a decrescere e il paziente non ha reazioni all'ingestione accidentale dell'alimento sospetto, è possibile tentare di reintrodurlo nella dieta, con un TPO o a domicilio, se la probabilità di tollerarlo è alta.

È fondamentale che il clinico comprenda appieno le potenzialità e i limiti dei test diagnostici a sua disposizione, in modo da evitare di sovra o sottodiagnosticare l'allergia alimentare. L'eccesso di diagnosi può condurre a restrizioni dietetiche, paura di alimenti e modificazioni non necessarie dello stile di vita del bambino e della sua famiglia. Di contro, mancare la diagnosi potrebbe causare reazioni allergiche anche mortali in caso di ingestione dell'alimento.

La component-resolved diagnosis costituisce certamente uno strumento in più a disposizione del medico, ma sono necessari ancora molti studi per comprendere appieno la sua efficienza e per perfezionare le metodiche. Inoltre, si tratta di test costosi, anche se l'utilizzo estensivo e i progressi tecnologici dovrebbero ridurre questo problema. In futuro, potrebbe essere possibile porre con certezza la diagnosi di allergia alimentare utilizzando solo una goccia di sangue, senza rischi per il bambino.

Tabelle e figure

Tabella 1. Popolazione in studio ed esiti degli esami eseguiti.

Pazienti	PBP	IgE	BAT	TPO
14 pazienti	Neg	Neg	Neg	Negativo
6 pazienti	Pos	Neg	Neg	Negativo
2 pazienti	Neg	Pos	Neg	Negativo
16 pazienti	Pos	Pos	Neg	Negativo
1 paziente	Pos	Pos	Neg	Positivo
4 pazienti	Pos	Pos	Pos	Negativo
9 pazienti	Pos	Pos	Pos	Positivo

Tabella 2. Vengono riportati sensibilità, specificità, efficienza, valore predittivo positivo (VPP) e valore predittivo negativo (VPN) dei test in vivo ed in vitro presi in esame, considerando i cut-off di riferimento.

	Prick by prick	IgE specifiche per albume	IgE specifiche per allergeni nativi purificati	BAT
Sensibilità	100%	90%	100%	70%
Specificità	42,5%	52.5%	60.9%	90%
Efficienza	54%	60%	70%	86%
VPP	30.3%	32.1%	43.8%	63.6%
VPN	100%	95.5%	100%	92.3%

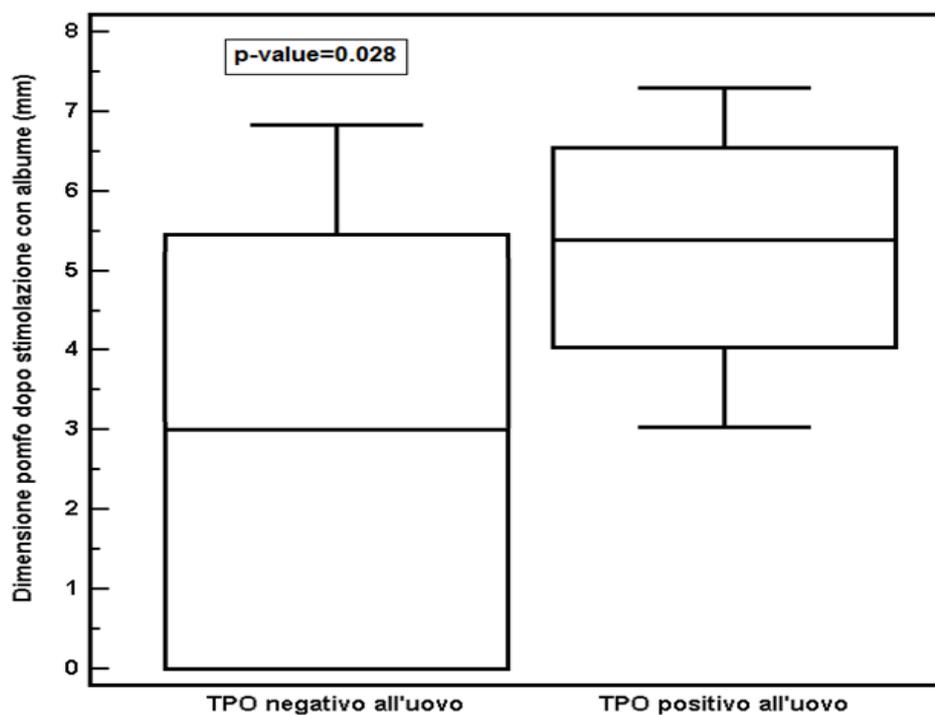


Figura 1. Distribuzione della dimensione del pomfo (mm) per l'albume in pazienti che hanno avuto una risposta negativa o positiva al TPO. I dati sono espressi come mediana (linea nera), 25° e 75° percentile e viene riportato il p-value tra i due gruppi.

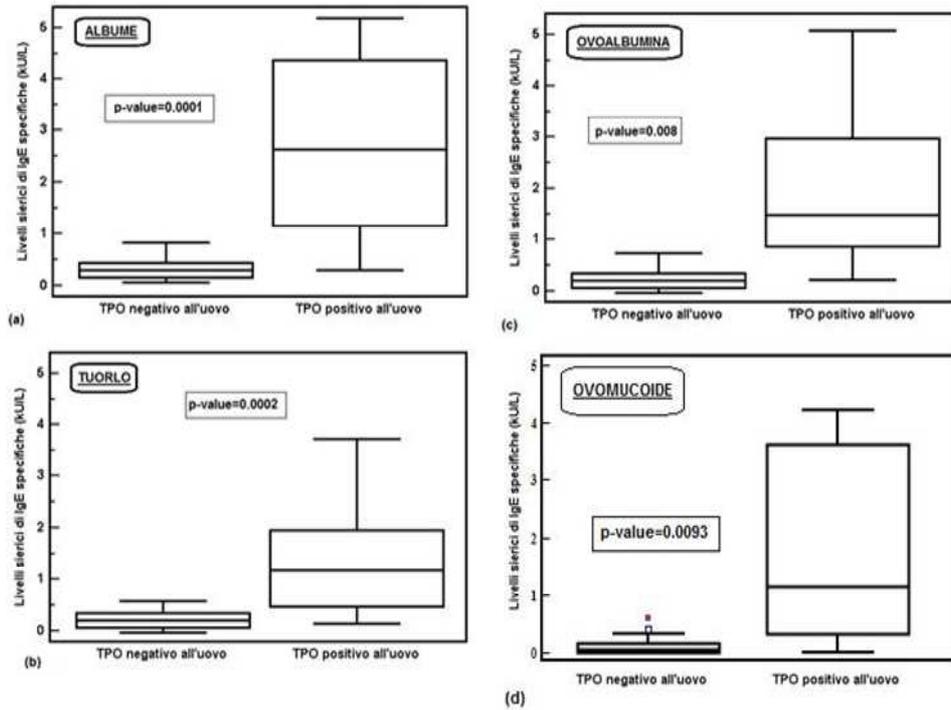


Figura 2. Distribuzione dei livelli sierici di IgE specifiche (kUA/L) per albume (a), tuorlo (b), ovalbumina (c) e ovomucoide (d) in pazienti che hanno avuto una risposta negativa o positiva al TPO. I dati sono espressi come mediana (linea nera), 25° e 75° percentile e viene riportato il p-value tra i due gruppi.

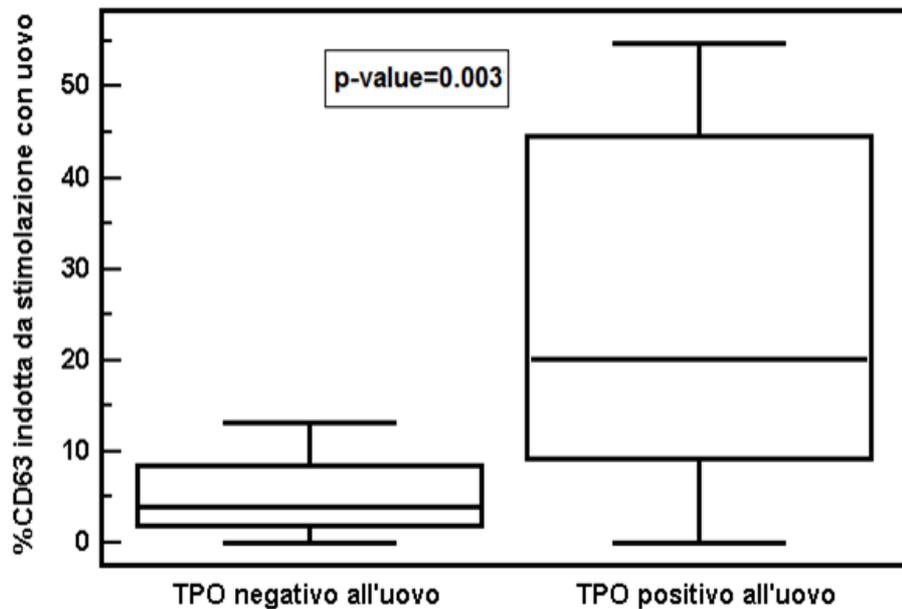


Figura 3. Distribuzione dei livelli CD63 (%) indotta da stimolazione con uovo in pazienti che hanno avuto una risposta negativa o positiva al TPO. I dati sono espressi come mediana (linea nera), 25° e 75° percentile e viene riportato il p-value tra i due gruppi.

Bibliografia

1. Sicherer SH. Epidemiology of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127(3):594-602.
2. Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126(6 Suppl):S1-S58.
3. Rona RJ, Keil T, Summers C et al. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120(3):638-646.
4. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Annu Rev Med* 2009;60:261-277.
5. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(2 Suppl 2):S116-S125.
6. Burks AW, Tang M, Sicherer S et al. ICON: Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129(4):906-920.
7. Sicherer SH, Wood RA. Allergy testing in childhood: using allergen-specific IgE tests. *Pediatrics* 2012;129(1):193-197.
8. Steckelbroeck S, Ballmer-Weber BK, Vieths S. Potential, pitfalls, and prospects of food allergy diagnostics with recombinant allergens or synthetic sequential epitopes. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121(6):1323-1330.
9. Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM et al. Basophil activation test by flow cytometry: present and future applications in allergology. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;74(4):201-210.
10. Heine R, Laske N, Hill D. The Diagnosis and Management of Egg Allergy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2006;6(2):145-152.
11. Shek LPC, Soderstrom L, Ahlstedt S et al. Determination of food specific IgE levels over time can predict the development of tolerance in cow's milk and hen's egg allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114(2):387-391.
12. Järvinen KM, Beyer K, Vila L et al. Specificity of IgE antibodies to sequential epitopes of hen's egg ovomucoid as a marker for persistence of egg allergy. *Allergy* 2007;62(7):758-765.
13. Scala E, Alessandri C, Bernardi M et al. Cross-sectional survey on immunoglobulin E reactivity in 23 077 subjects using an allergenic molecule-based microarray detection system. *Clin Exp Allergy* 2010;40(6):911-921.
14. Alessandri C, Zennaro D, Scala E et al. Ovomucoid (Gal d 1) specific IgE detected by microarray system predict tolerability to boiled hen's egg and an increased risk to progress to multiple environmental allergen sensitisation. *Clinical & Experimental Allergy* 2012;42(3):441-450.
15. Savage JH, Matsui EC, Skripak JM et al. The natural history of egg allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120(6):1413-1417.