

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE**

**Facoltà di Medicina e Chirurgia**

**Dipartimento di Scienza della Riproduzione e dello Sviluppo**

**Clinica Pediatrica**

**TESI DI DOTTORATO IN:**

**"MEDICINA MATERNO-INFANTILE, PEDIATRIA DELLO  
SVILUPPO DELL'EDUCAZIONE E PERINATOLOGIA"**

*Terapia aereosolica con adrenalina nelle reazioni allergiche in  
corso di desensibilizzazione orale al latte*

**Dottoranda: Dr.ssa Elena Neri**

**Relatore: Chiar.mo Prof. Alessandro Ventura**

**Tutore: Dr. Egidio Barbi**

**Correlatore: Dr. Giorgio Longo**

## ALLERGIA ALIMENTARE

L'allergia alimentare è stata definita come "reazione non tossica dipendente dalla suscettibilità individuale verso alcuni alimenti" dal Sottocomitato Europeo per le Reazioni Avverse agli Alimenti dell'Accademia Europea di Allergologia ed Immunologia Clinica<sup>1</sup>.

E' una condizione caratterizzata da una risposta immunologica anomala ed esagerata verso specifiche proteine alimentari che può comprendere reazioni IgE-mediate e non IgE-mediate. Va differenziata da altre reazioni agli alimenti, definite "intolleranze alimentari", che comprendono sia reazioni immunomEDIATE (ad esempio l'intolleranza al glutine) sia reazioni non immunologiche (ad esempio enzimatiche come l'intolleranza al lattosio). Vanno inoltre distinte le cosiddette "pseudoallergie alimentari", reazioni non immunologiche indotte da cibi ad alto contenuto istaminico o contenenti liberatori d'istamina (ad esempio formaggi ben stagionati).

### EPIDEMIOLOGIA:

L'allergia alimentare interessa circa il 6-8% dei bambini di età inferiore ai 3 anni, in età adulta solo l'1,5-2% della popolazione risulta allergica.

L'incidenza dell'allergia alle proteine del latte vaccino (APLV) nei neonati sembra essere del 2-3% nei Paesi Sviluppatis<sup>2</sup>. L'insorgenza della patologia è in molti casi strettamente correlata al periodo dell'introduzione del latte vaccino e raramente si sviluppa dopo i primi 12 mesi.

La prognosi dell'APLV nei neonati è buona, con una frazione di remissione totale dell'85-90% a 3 anni ed una remissione del 100% dei sintomi gastrointestinali. Fanno eccezione quei casi nei quali sia evidenziabile un precoce incremento della risposta IgE alle proteine del latte vaccino; questi

bambini, in genere, vanno incontro ad un aumentato rischio di persistenza dell'allergia al latte, a sviluppo di reazioni nei confronti di altri cibi, (soprattutto uova) ed a sviluppo di asma e rinocongiuntivite nella seconda infanzia<sup>3</sup>.

#### PATOGENESI:

Il tratto gastrointestinale è il più grande organo immunologico del nostro corpo. L'epitelio intestinale è direttamente esposto all'ambiente esterno e subisce una continua sollecitazione antigenica da parte di batteri e proteine alimentari. È essenziale, quindi, una regolazione complessa che permetta l'assorbimento dei nutrienti e contemporaneamente la difesa nei confronti di eventuali agenti lesivi.

Un'importante funzione è mediata da numerosi meccanismi protettivi, schematicamente distinti in non immunologici ed immunologici<sup>4</sup>:

- **MECCANISMI NON IMMUNOLOGICI:** ovvero tutti quei meccanismi che contribuiscono ad evitare una eccessiva penetrazione di patogeni o di allergeni alimentari
  - acidità gastrica,
  - secrezioni enzimatiche endoluminali (gastrica e pancreatica),
  - peristalsi intestinale,
  - secrezione di muco,
  - barriera fisica costituita dall'epitelio e dalle tight junction intercellulari;
- **MECCANISMI IMMUNOLOGICI:** sono mediati dal sistema GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue), l'organo linfatico più grande dell'organismo che è costituito da tessuto linfatico organizzato nelle placche del Peyer, nell'epitelio, nella lamina propria e nei linfonodi mesenterici. Esso seleziona, da un punto di vista immunologico, tutte le sostanze con le quali viene a

contatto, consentendo, da un lato l'assorbimento dei nutrienti, riducendo il più possibile la risposta immunologica verso di essi e verso la flora batterica saprofita, e dall'altro, contrastando l'assorbimento e penetrazione dei patogeni

L'assorbimento degli antigeni alimentari avviene fisiologicamente attraverso le cellule epiteliali. Le proteine alimentari vengono inglobate dagli enterociti attraverso un processo di transitosi; successivamente, per il 90%, subiscono un processo di parziale digestione da parte dei lisosomi ed infine vengono elaborate e processate per la presentazione ai linfociti T situati nella lamina propria. Gli enterociti, quindi, si comportano come APC (Antigen Presenting Cell).

Durante l'assorbimento avviene il riconoscimento immunologico delle sostanze, dal quale potrà attivarsi un'eventuale risposta immune.

In condizioni normali non si assiste ad un passaggio di proteine attraverso le giunzioni transcellulari, dato che le tight junction costituiscono una barriera impermeabile alle macroproteine, tuttavia, diverse condizioni possono determinare un rilascio di mediatori da parte di mastociti mucosali con conseguente allentamento delle tight junction ed aumento del passaggio di proteine intatte (assorbimento mastocita dipendente).

## TOLLERANZA ORALE:

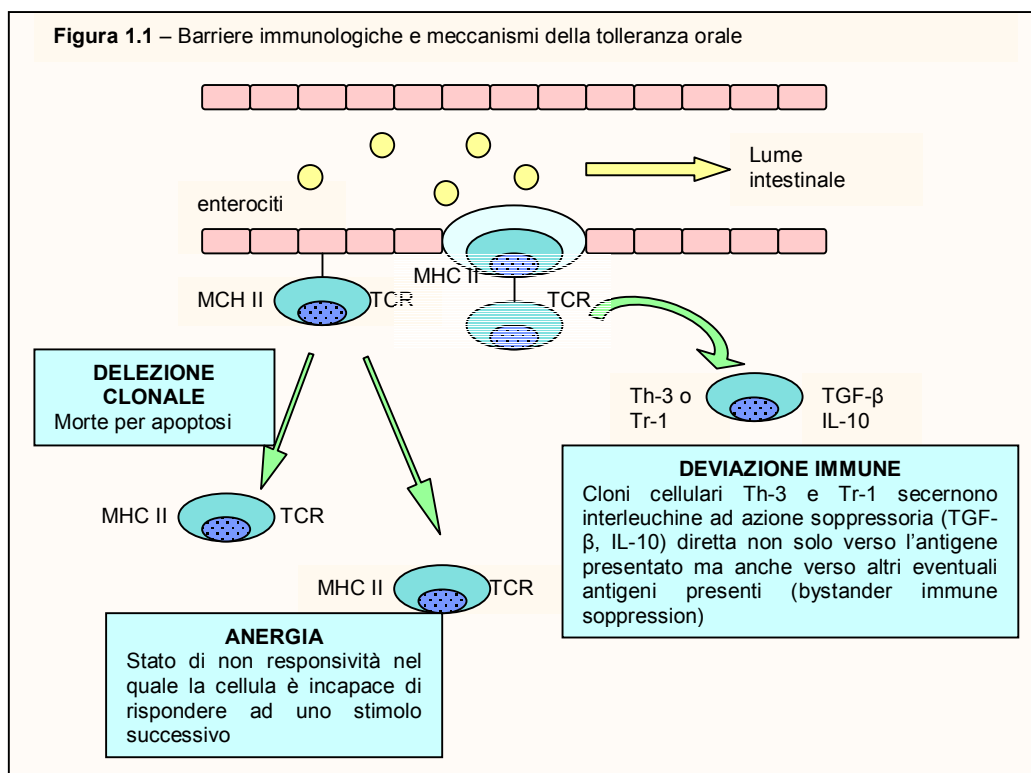
La tolleranza orale è stata definita, nel 1946 da Chase, come uno stato di inibizione attiva della risposta immune nei confronti di antigeni introdotti per via orale. Il concetto di non risposta immunologica sistemica indotta da una precedente esposizione orale ad antigeni dietetici fu, però, avanzato per la prima volta in termini immunologici da Wells e Osborne nel 1911. Questi verificarono che la somministrazione di antigeni proteici inerti, in un animale immunologicamente vergine, era in grado di generare una risposta immune iniziale; quest'ultima, col persistere dell'esposizione, tendeva ad autolimitarsi e ad essere sostituita da uno stato di "non risposta" antigene-specifica: la tolleranza orale<sup>5</sup>.

Il processo che porta alla fisiologica tolleranza verso gli antigeni alimentari si svolge nei primi periodi della vita. È noto, grazie a studi effettuati con tecniche di linfoproliferazione, che durante gli ultimi periodi della gravidanza esiste una debole risposta Th-2 verso i più comuni antigeni alimentari ed essa si protrae talora nei primi 2 anni di vita.

Probabilmente esiste una gerarchia nell'induzione della tolleranza; essa è più facilmente ottenibile per le cellule Th-1 mentre lo è meno per quelle Th-2 e ancor di meno per il linfocita B. Ciò spiegherebbe perché sia più facile acquisire la tolleranza nell'allergia alle proteine del latte vaccino non IgE-mediata rispetto a quella IgE-mediata e giustificherebbe anche il frequente riscontro di anticorpi IgG per gli alimenti in soggetti senza allergia alimentare. Una volta indotta la tolleranza, essa persiste, solitamente, per tutta la vita.

I principali meccanismi immunologici (Figura 1.1) attraverso i quali si verifica la tolleranza orale sono:

1. **DELEZIONE CLONALE** - processo che porta all'eliminazione, attraverso apoptosi, dei cloni antigene-specifici; sembra che abbia scarsa importanza in condizioni fisiologiche<sup>6</sup>
2. **ANERGIA** - stato di non responsività che determina incapacità dei linfociti T di rispondere in modo proliferativo o mediante la produzione di IL-2 ad uno stimolo ripetuto<sup>7</sup>
3. **DEVIAZIONE IMMUNE** o **SOPPRESSIONE ATTIVA** - processo mediato dalla presenza di particolari linfociti helper (Th-3) e suppressor regolatori (Tr-1) in grado di secernere particolari citochine (soprattutto TGF- $\beta$ , IL-10, IL-4) e di moderare la risposta immune<sup>8</sup>.



L'impiego di uno o di un altro meccanismo dipende da diversi fattori, correlati sia all'antigene (caratteristiche, quantità, frequenza di somministrazione, ecc.) che alle cellule presentanti (APC). Diverse cellule infatti hanno la capacità di captare gli antigeni, processarli e presentarli ai

linfociti T. Tra tutte, molta importanza rivestono le cellule M (Microfold cell), anche se recenti studi hanno suggerito che le cellule epiteliali ed i linfociti intraepiteliali intestinali possano contribuire allo sviluppo della tolleranza, comportandosi da APC.

## CAPTAZIONE E PROCESSAMENTO DELL'ANTIGENE

Le proteine, essenziali per l'omeostasi nutrizionale, vengono assimilate in modo efficace grazie all'azione delle proteasi (gastriche, pancreatiche, dell'orletto a spazzola), che riducono la maggior parte delle proteine della dieta in amminoacidi liberi, dipeptidi, tripeptidi e le rendono assorbibili da parte degli enterociti. I prodotti della proteolisi possono venir processati da diversi tipi di cellule immunitarie, creando uno stato di tolleranza immunologica attraverso differenti meccanismi:

- **PROCESSAMENTO DELL'ANTIGENE NEL LUME**

Le proteine dietetiche sono soggette alla degradazione e distruzione dei loro epitopi conformazionali, ciò risulta, nella maggior parte dei casi, nella distruzione degli epitopi immunogenetici e nella conseguente anergia immunologica.

Quelle proteine che sfuggono alla digestione intraluminale ed al seguente processo di contatto con l'epitelio intestinale, sotto il quale è presente un sistema immunitario mucoso, generano un'ampia varietà di risposte immunitarie. Questi antigeni proteici possono, in base alle loro proprietà intrinseche, venir captati da differenti tipi cellulari o influenzare il loro sito d'entrata, determinando la natura della risposta immune.

- **SITI DI SAGGIO ANTIGENICO**

Placche del Peyer - sono organi linfoidei localizzati nel piccolo intestino e nel retto. La loro struttura è organizzata in centri germinativi, costituiti da linfociti B circolanti e da una piccola componente T.

Le cellule B sono deputate alla produzione di IgA: in seguito ad un segnale appropriato, migrano ai linfonodi mesenterici, acquisiscono lo stato maturativo di precursori delle plasmacellule e si localizzano nella lamina propria, a livello della quale si possono differenziare e quindi secernere IgA-dimeriche<sup>9</sup>.

Le placche del Peyer sono coperte da cellule epiteliali specializzate, chiamate cellule M (Microfold cells), che sono cellule dendritiche deputate al processamento di antigeni solubili e corpuscolari (virus, batteri, parassiti) e all'instaurazione di una risposta immune sia di tipo protettivo (secrezione di IgA) che di tipo tolleritogeno (linfociti Th-3 e Tr-1).

L'antigene, captato dalla cellula M, viene liberato nello spazio subepiteliale (dominio della placca del Peyer), processato dalle cellule dendritiche ed infine presentato ai linfociti B follicolari. A questo punto il linfocita T secreta il TGF- $\beta$  che promuove lo switch isotipico e la produzione di IgA da parte della cellula B stimolata<sup>10</sup>.

Cellule dendritiche - queste potenti cellule presentanti l'antigene sono localizzate in vari compartimenti del tratto gastrointestinale, inclusa la lamina propria, le placche del Peyer ed i linfonodi mesenterici. A livello dell'epitelio intestinale esse s'intercalano agli enterociti attraverso la protrusione di dendriti che, aggettandosi nel lume, permettono il contatto e l'eventuale captazione degli antigeni intraluminari. Gli antigeni captati dalle cellule dendritiche verranno condotti, attraverso i linfatici, ai linfonodi mesenterici.



Viney et al<sup>11</sup>, durante i loro studi funzionali *in vivo* condotti sulle cellule dendritiche, evidenziarono una minima espressione di CD80/CD86, ovvero uno stato d'immaturità. Evidenziarono altresì che l'esposizione a stimoli infiammatori era in grado di determinare una sovraespressione di tali molecole e l'induzione di una potente risposta stimolatoria.

Le cellule dendritiche quindi svolgono un ruolo centrale nel determinare un bilancio tra tolleranza ed immunità attiva a livello intestinale, generando il microambiente citochinico ed esprimendo molecole costimolatorie.

Cellule epiteliali intestinali - captano gli antigeni dietetici solubili, sfuggiti alla proteolisi intraluminale e ne determinano la degradazione. In condizioni fisiologiche, le molecole rimaste intatte dopo la digestione, ammontanti a circa il 2%, vengono esocitate negli spazi intercellulari ed avviate alla circolazione portale.

Un'ulteriore importante funzione svolta da queste cellule è quella di APC-non professionali. Esse esprimono costitutivamente le molecole MHC II<sup>12</sup> e sono in grado di presentare l'antigene ai linfociti T vergini. A differenza delle APC professionali, queste cellule, in condizioni normali, attivano selettivamente i linfociti T CD8<sup>+</sup> suppressor, giocando un ruolo nella soppressione della risposta immune locale<sup>13</sup>.

Esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che le cellule epiteliali, prelevate da un paziente con malattia infiammatoria intestinale, sono in grado di stimolare potentemente linfociti T CD4<sup>+</sup> helper piuttosto che linfociti T CD8<sup>+</sup> suppressor<sup>14</sup>.

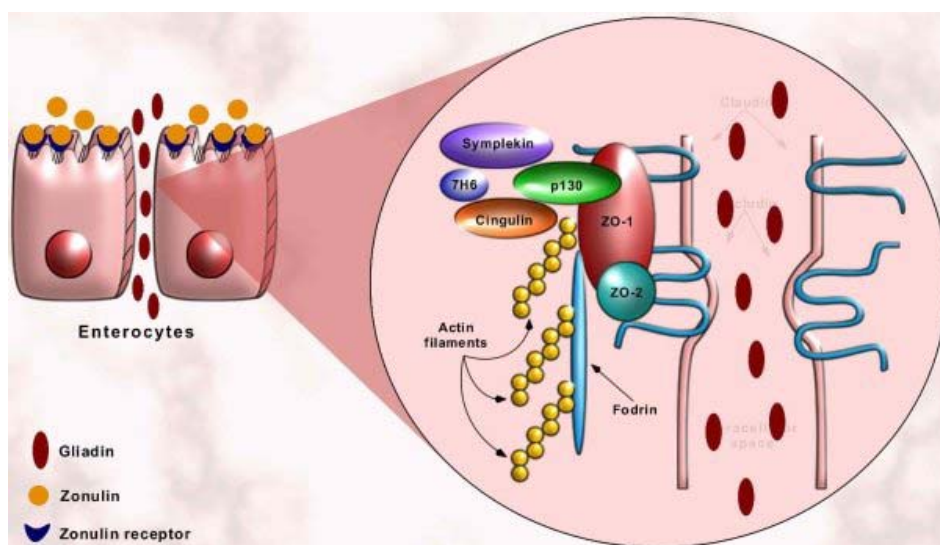
Spazi paracellulari - sono degli spazi impermeabili; la presenza di tight junction tra gli enterociti adiacenti prevengono qualsiasi passaggio di aminoacidi o di piccoli peptidi.

L'aumento della permeabilità di questi spazi può essere determinata dall'aumento della captazione transcellulare e dalla distruzione delle tight junction.

In uno studio effettuato su bambini con enteropatia sensibile al latte vaccino, fu evidenziato, attraverso il test lattulosio/mannitolo, un aumento della permeabilità intestinale dopo provocazione con l'alimento offendent<sup>15</sup>.

Recenti studi dimostrerebbero che una nuova proteina, chiamata Zonulina, è coinvolta nei processi di apertura delle tight junction e quindi di aumento della permeabilità intestinale. E' stato ipotizzato (figura 1.2) che questa molecola sia alla base del meccanismo patogenetico della celiachia, ma è possibili anche che aumenti in seguito all'infiammazione e che quindi consenta il passaggio di antigeni macromolecolari che normalmente non passano la barriera intestinale e che possono quindi innescare una risposta immunitaria non fisiologica<sup>16</sup>.

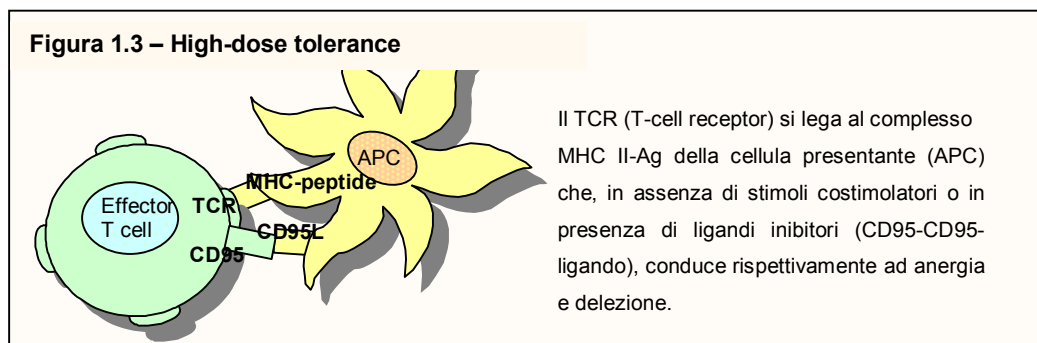
FIGURA 1.2: Ipotesi fisiopatologica del meccanismo d'azione dell'attivazione della zonulina con gliadina sulle tight junction



## CELLULE COINVOLTE NELL'INDUZIONE DELLA TOLLERANZA ORALE

La tolleranza orale può essere indotta nei topi attraverso la somministrazione sia di una singola alta dose di antigene che di basse dosi ripetute<sup>17</sup>.

- High-dose tolerance - è mediata da anergia o delezione linfocitaria (Figura 1.3).

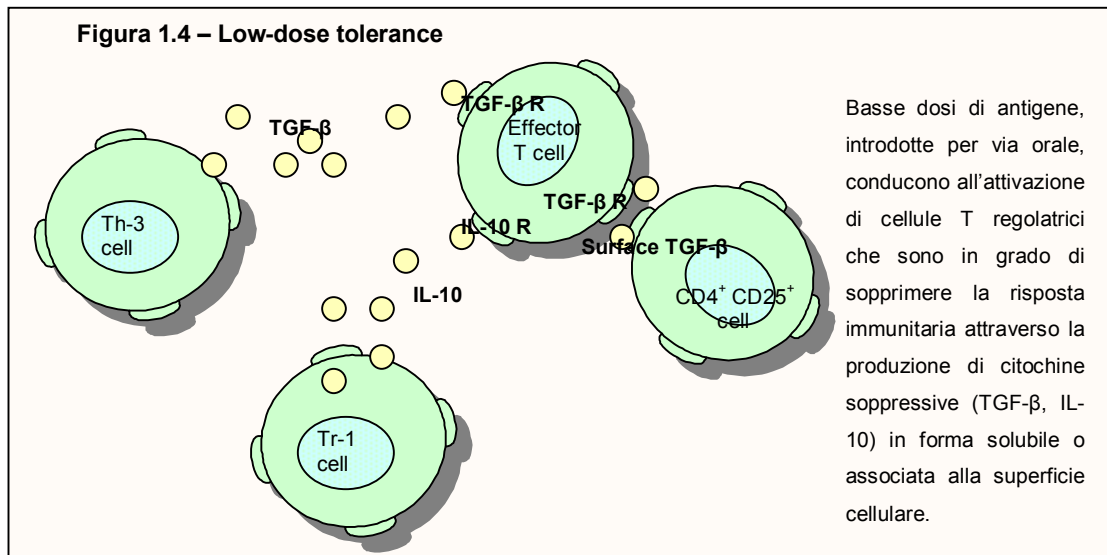


L'anergia linfocitaria può essere indotta dal legame recettoriale del linfocita T in assenza di segnali costimolatori, che possono essere forniti da citochine solubili (es. IL-2) o dall'interazione tra molecole costimolatrici presenti sulle cellule T (CD28) e sulle APC (CD80, CD86).

La delezione clonale avviene attraverso l'apoptosi FAS-mediata; processo che può venir bloccato dalla presenza di citochine proinfiammatorie (es. IL-12).

- Low-dose tolerance - è mediata da cellule T regolatrici che portano ad una risposta soppressiva, fenomeno detto "bystander suppression" (Figura 1.4).

In aggiunta ai linfociti T CD8<sup>+</sup>, esistono vari tipi linfocitari CD4<sup>+</sup> (cellule Th-3, cellule Tr-1, cellule CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) ed un gruppo di linfociti T Natural Killer (NK 1.1<sup>+</sup>) importanti nel processo d'induzione della tolleranza orale.



Cellule Th-3 - producono principalmente il TGF- $\beta$  ed una variabile quantità d'IL-4 ed IL-10.

Il TGF- $\beta$  sembra possa giocare un ruolo importante nel processo della tolleranza orale, poichè, oltre a determinare lo switch isotipico linfocitario nel senso della produzione di IgA, ha un'azione soppressiva nei confronti dei linfociti T effettori<sup>18</sup>. Beyer et al<sup>19</sup> hanno dimostrato, nei bambini con gastroenteropatia allergica latte-indotta, la mancata espressione di TGF- $\beta$  e di IL-10 da parte dei linfociti latte-specifici della mucosa duodenale.

Studi suggeriscono che TGF- $\beta$  ed IL-12/IFN- $\gamma$  giochino ruoli opposti nella regolazione dell'immunità intestinale e che la modulazione di queste citochine possa essere la chiave dell'induzione dell'immunità e/o della tolleranza<sup>18</sup>.

Cellule Tr-1 - producono IL-10, un'interleuchina capace di sopprimere la risposta immune-Th-1 attraverso la downregulation dell'espressione di molecole costimolatorie e della produzione d'IL-12 da parte delle APCs<sup>19,20</sup>. Frossard et al<sup>21</sup> dimostrarono la presenza di IL-10 nei linfociti (prelevati dalle placche del Peyer) appartenenti a topi tolleranti dopo la

somministrazione per via orale di  $\beta$ -lattoglobulina, ma non in quelli dei topi con anafilassi  $\beta$ -lattoglobulina-indotta.

Cellule  $CD4^+ CD25^+$  - sono cellule caratterizzate da un fenotipo nativo, da una bassa capacità proliferativa e di produzione d'IL-2, che sono implicate nel processo della tolleranza orale, ma il loro ruolo non è ancora ben conosciuto.

Karlsson et al<sup>22</sup> hanno valutato la risposta delle cellule T nei bambini allergici che, dopo un periodo di dieta priva di latte, hanno effettuato un test di scatenamento orale col latte vaccino. I bambini, che avevano risolto la loro allergia, avevano un'alta percentuale di linfociti  $CD4^+ CD25^+$  circolanti ed una riduzione *in vitro* della risposta proliferativa alla  $\beta$ -lattoglobulina rispetto a quei bambini che avevano mantenuto la loro allergia.

## TIPO DI PRESENTAZIONE

Il tipo di presentazione rappresenta l'evento cruciale per l'induzione della tolleranza. La presentazione dell'antigene al linfocita T, in assenza di molecole costimolatorie, determina un'anergia o una delezione clonale. Al contrario, ciò che induce le APC ad evocare una risposta immune attiva o soppressiva, piuttosto che l'anergia o la delezione clonale, sembra essere legato al microambiente (citochine e segnali infiammatori) nel quale ha luogo la presentazione dell'antigene. La comparsa di molecole costimolatorie sulla APC, quali CD80 o CD86, interagendo col CD28 linfocitario, porterebbe all'attivazione del linfocita T, che orienterà la sua risposta in senso prevalentemente Th-1, Th-2 (immunità attiva) o Th-3, Tr-1 (immunità soppressiva) a seconda della predisposizione genetica.

Le due risposte, quella immune attiva e quella soppressiva, non sono alternative ma si verificano contemporaneamente a livello della mucosa

intestinale e dall'equilibrio tra queste due risposte deriva la normale omeostasi immunologica<sup>23</sup>. Ad esempio, se la presentazione dell'antigene alimentare avviene in presenza di microrganismi in grado di stimolare i Toll-like Receptors, la risposta immune viene orientata prevalentemente in senso Th-1.

## FATTORI COINVOLTI NELL'INDUZIONE DELLA TOLLERANZA ORALE

Diversi fattori agiscono nell'induzione della tolleranza orale nei confronti degli antigeni dietetici; alcuni sono antigene-correlati (quantità, natura), altri sono ospite-dipendente (età, fattori genetici, flora batterica intestinale).

- DOSE - alcuni recenti studi sembrano supportare l'ipotesi che la somministrazione di dosi piccole ed infrequenti di un determinato antigene possa favorire lo sviluppo di IgE specifiche<sup>24</sup>. Saarinen, ad esempio, ha segnalato che, in un gruppo di bambini affetti da allergia alle proteine del latte vaccino, quelli con sensibilizzazione IgE-mediata risultavano alimentati con dosi più piccole ed infrequenti di latte vaccino rispetto a quelli senza IgE specifiche<sup>25</sup>.

I meccanismi, attraverso i quali la dose attiverrebbe la tolleranza o l'immunità attiva, sarebbero legati alle APC coinvolte: alte dosi attivano prevalentemente le cellule epiteliali che, in assenza di molecole costimolatorie, determinano l'anergia o la soppressione attiva per mezzo delle cellule regolatorie; la tolleranza per le basse dosi sembra invece legata alla prevalente attivazione delle cellule M della placca del Peyer, con produzione di TGF- $\beta$  da parte dei Th-3 o di IL-10 da parte dei Tr-1<sup>26</sup>

- TIPO DI ANTIGENE - numerose sono le caratteristiche che rendono allergenica una proteina:
  - PESO MOLECOLARE - un antigene solubile è più tollerigeno rispetto ad uno particolato; gli allergeni infatti hanno più frequentemente un P.M. tra 10 e 70 kD

- NUMERO di DETERMINANTI ANTIGENICI
- TIPO di DETERMINANTI ANTIGENICI - gli epitopi conformazionali degli alimenti sono molto meno allergizzanti di quelli sequenziali<sup>27</sup> in quanto vengono distrutti più facilmente da tutti i processi che alterano la struttura terziaria delle proteine (digestione, cottura, ecc.). Uno studio recente, eseguito su un gruppo di bambini con allergia alle proteine del latte vaccino, ha evidenziato che, nei bambini con allergia persistente, sono riscontrabili più frequentemente IgE specifiche dirette verso antigeni lineari che conformazionali della caseina<sup>28</sup>
- FATTORI GENETICI - un'anamnesi familiare positiva per patologia allergica è frequente tra i bambini con allergia alimentare e talora si riscontra anche una concordanza nei confronti di uno stesso allergene alimentare. Gli studi condotti finora, però, hanno evidenziato solo un'associazione coi geni responsabili della risposta IgE (loci cromosoma 5q), ma non significative correlazioni tra allergie alimentari e particolari markers genetici
- EPOCA DELL'INTRODUZIONE DEGLI ALIMENTI - la precoce introduzione degli alimenti costituisce un importante fattore di rischio per lo sviluppo delle allergie alimentari. I primi periodi della vita (soprattutto i primi 2 mesi) sono caratterizzati da un'aumentata permeabilità intestinale, da una fisiologica inefficienza dei meccanismi di difesa aspecifici (bassa acidità gastrica nel primo mese di vita, ridotta attività proteolitica nei primi 2 anni di vita) e da una bassa produzione di IgA secretorie.
 

Strobel e Ferguson dimostrarono che la somministrazione di una dose di ovalbumina peso-correlata, nella prima settimana di vita, determina l'innescò di una risposta immune sia umorale che cellulo-mediata<sup>29</sup>.
- FLORA BATTERICA INTESTINALE - contribuisce alla degradazione degli antigeni alimentari, rendendoli più tollerigeni, mentre in sua assenza il

trasporto degli antigeni appare aumentato e la tolleranza orale abrogata. Essa, generando una flogosi intestinale minima, è ritenuta necessaria per la maturazione delle cellule immunitarie che costituiscono il GALT e quindi per lo sviluppo della tolleranza orale<sup>30</sup>.

Già da diversi anni è stata avanzata l'ipotesi che il vertiginoso aumento delle malattie allergiche nei Paesi Occidentali industrializzati sia attribuibile a variazioni dello stile di vita; queste sembrano in grado di modificare, tra le varie cose, la composizione della flora batterica intestinale che, non fornendo più gli stimoli necessari al sistema immunitario, non permette il riequilibrio del fisiologico squilibrio in senso Th-2. La ridotta colonizzazione da parte degli Enterobatteri e l'aumento corrispondente degli Stafilococchi e Clostridi sarebbero responsabili dell'aumentata risposta immune di tipo Th-2 sia verso gli antigeni alimentari che verso quelli respiratori.<sup>31</sup>

- STIMOLI INFIAMMATORI - la secrezione di citochine quali IL-4, TNF- $\beta$  e IFN- $\gamma$ <sup>32</sup>, riscontrabili sia nella fase acuta di processi infiammatori che nella convalescenza, possono determinare un aumento della permeabilità intestinale alle macromolecole ed interferire con lo sviluppo della tolleranza a causa della presentazione di antigeni dietetici in un contesto infiammatorio.



## CLASSIFICAZIONE DELLE ALLERGIE ALIMENTARI

Un mancato sviluppo della tolleranza orale può risultare in una varietà di risposte nell'ospite suscettibile. Ai fini classificativi, le risposte immuni dell'allergia alimentare vengono suddivise in quattro tipi (classificazione secondo Gell e Coombs).

### I. IPERSENSIBILITA' TIPO I o IMMEDIATA

Nei soggetti geneticamente suscettibili, alcuni antigeni proteici presenti nell'ambiente, detti allergeni, sono in grado di stimolare la differenziazione dei linfociti CD4<sup>+</sup> in cellule effettrici Th-2. I Th-2 sono in grado, tramite la secrezione di IL-4 e l'interazione intercellulare diretta, d'indurre lo switch isotipico nei linfociti B che quindi produrranno IgE. Le IgE circolanti nei fluidi corporei possono legarsi agli FcεRI (recettori ad alta affinità per la catena ε del frammento Fc dell'anticorpo) espressi sulle membrane dei granulociti basofili circolanti e sui mastociti tissutali. Una volta avvenuto tale legame, la seconda esposizione all'allergene causa la formazione di complessi antigene-anticorpo, che determineranno, mediante l'aggregazione dei recettori a livello della membrana di basofili e mastociti, la traduzione del segnale, con conseguente liberazione dei granuli citoplasmatici (proteasi neutre ed istamina) e rapida sintesi di mediatori (PGD<sub>2</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>, PAF, TNF-α, IL-4, IL-5, IL-13).

La sintesi delle IgE e la flogosi, che caratterizza le reazioni d'ipersensibilità immediata, dipendono dall'attivazione dei linfociti T helper CD4<sup>+</sup> appartenenti alla sottopopolazione Th-2 e dalla secrezione da parte di questi di IL-4, IL-5 ed IL-13.

- IL-4 è un'interleuchina necessaria per lo scambio isotipico verso le IgE
- IL-5 è il fattore attivante gli eosinofili più potente

- IL-13 ha numerose attività in comune col l'IL-4 ed è in grado di regolare altri aspetti dell'infiammazione che caratterizzano l'ipersensibilità immediata

Oltre alle manifestazioni immediate, le reazioni d'ipersensibilità tipo I, si accompagnano ad una reazione tardiva che insorge nelle 2-4 ore successive, caratterizzata da infiltrato eosinofilo, basofilo, neutrofilo e linfocitario. Il ripetersi di episodi di questo tipo può provocare un danno rilevante al tessuto coinvolto.

L'esposizione ripetuta all'allergene, determinando rilascio dell'Histamine Release Factor da parte dei mastociti, causa l'aumento della risposta immunologica e quindi un aumento dei sintomi (ipersensibilità cutanea e polmonare).

## II. IPERSENSIBILITA' TIPO II - III

Le reazioni da ipersensibilità di tipo II sono reazioni citotossiche antigene-anticorpo dipendenti, che, ad esempio, sono alla base della trombocitopenia secondaria nell'allergia alle proteine del latte vaccino.

Le reazioni d'ipersensibilità tipo III sono determinate dalla formazione di immunocomplessi circolanti; questi complessi allergene-anticorpo sono di frequente riscontro nei soggetti con allergia alimentare.

## III. IPERSENSIBILITA' TIPO IV

Questo tipo di reazione è provocata dai mediatori dei macrofagi attivati (enzimi lisosomiali, gli intermedi reattivi dell'ossigeno, l'ossido nitrico e le citochine proinfiammatorie) che inducono le cellule endoteliali, in sede lesionale, ad esprimere livelli più elevati di proteine di superficie, come molecole di adesione e d'istocompatibilità MHC II. Le reazioni croniche provocano spesso una reazione fibrotica a causa della secrezione da parte dei macrofagi di citochine e fattori di crescita.

Questo è il meccanismo fisiopatologico principale dell'enteropatia allergica<sup>33</sup>.

## CLINICA DELL'ALLERGIA ALLE PROTEINE DEL LATTE VACCINO

Molti lattanti con allergia alle proteine del latte vaccino (ALPV) sviluppano sintomi entro il 2° mese d'età, spesso entro la prima settimana dopo l'introduzione del latte di formula.

Approssimativamente, il 50-70% dei bambini con allergia alimentare hanno sintomi cutanei ed il 50-60% sintomi gastrointestinali (coliche, colite allergica). Nei bambini allattati al seno, con ALPV, la manifestazione predominante è l'eczema atopico.

I sintomi possono essere suddivisi, a prescindere dall'età, in base all'organo bersaglio ed alla patogenesi in:

### REAZIONI CUTANEE

- IgE-MEDIATE - dermatite atopica, orticaria, angioedema
- NON IgE-MEDIATE - rash da contatto, dermatite atopica

### REAZIONI GASTROINTESTINALI

- IgE-MEDIATE - sindrome allergica orale, nausea, vomito, coliche, dolore addominale e diarrea
- NON IgE-MEDIATE - reflusso gastro-esofageo, sindrome enterocolitica, colite, gastroenterite eosinofila, proctite eosinofila (stipsi), enteropatia transitoria (simula malattia celiaca), enteropatia protido-disperdente

### REAZIONI RESPIRATORIE

- IgE-MEDIATE - rinocongiuntivite, broncospasmo e tosse, edema laringeo
- NON IgE-MEDIATE - emosiderosi polmonare (sindrome di Heiners, rara)

### ALTRE REAZIONI

- ANAFILASSI SISTEMICA - anafilassi allergene alimentare-dipendente, asma/anafilassi esercizio indotta
- MECCANISMO SCONOSCIUTO - anemia (non colite-dipendente), artrite (rara), porpora di Schönlein-Henoch, irritabilità/sonnolenza, cefalea, sindrome tensione-fatica

I sintomi possono insorgere da pochi minuti fino ad un'ora dopo l'esposizione al latte (reazione ritardata) ed, in alcuni casi, dopo diversi giorni. Molto spesso le reazioni tardive sono non IgE-mediate<sup>34</sup>.

## ANAFILASSI ALIMENTARE:

Nella pratica corrente il termine "anafilassi" è variabilmente utilizzato per etichettare tutto quell'insieme di sintomi sistemici che compare acutamente dopo l'esposizione ad un antigene ed è considerato emblematico di una reazione IgE-mediata.

In una recente "position paper" dell'European Academy of Allergology and Clinical Immunology viene proposto di utilizzare tale termine soltanto per le reazioni particolarmente gravi (a rischio di vita) con interessamento di più organi, anche in assenza d'ipotensione od asma grave<sup>35</sup>.

L'anafilassi, in senso stretto, è una reazione sistemica causata dal rapido rilascio in circolo di mediatori da parte di mastociti tissutali e basofili circolanti, che si sviluppa in pochi secondi o minuti dall'esposizione all'allergene. Le reazioni tardive (dopo un'ora) sono possibili ma, in genere, sono caratterizzate da un decorso più benigno; infatti questo tipo di reazione è tanto meno grave, quanto maggiore è il tempo di latenza tra l'esposizione all'allergene e la reazione stessa<sup>36</sup>.

La clinica iniziale è caratterizzata da eritema, prurito localizzato a mani, piedi, inguine, cavo ascellare e successiva evoluzione in senso orticarioide. Il paziente spesso riferisce un senso di evento grave ed imminente. Si assiste ad un tipico coinvolgimento respiratorio, caratterizzato da edema laringeo (raucedine, dispnea, sensazione di "nodo alla gola" fino allo stridore laringeo), tosse, gemiti espiratori, broncospasmo, dispnea e cianosi, fino all'asfissia, nei casi più gravi. Le manifestazioni gastrointestinali sono caratterizzate da vomito, crampi addominali e diarrea. Nei casi più gravi può esserci un coinvolgimento dell'apparato cardiocircolatorio con una sintomatologia dominata dal dolore retrosternale; in questa circostanza, l'ipotensione grave può determinare l'insorgenza di sincope.

Altri sintomi che si possono verificare in corso di anafilassi, sono: prurito al palato, agli occhi, al naso, rinorrea e starnuti, sudorazione algida, disorientamento e perdita del controllo degli sfinteri.

In alcuni soggetti, peraltro molto rari, la reazione può avere un andamento bifasico, con comparsa, dopo un intervallo libero di 4-8 ore, di una seconda ondata di sintomi.

La terapia in questi casi deve essere tempestiva, in quanto la precocità dell'intervento si associa ad una prognosi migliore.

**Tabella 1.1 - GRADI DELL'ANAFILASSI ALIMENTARE**

grado	Cute	App. digerente	App. respiratorio	App. circolatorio	Sist. nervoso
1	Prurito, eritema, orticaria (singoli elementi)	Prurito o pizzicore orale, lieve gonfiore labbro			
2	Prurito, eritema, orticaria diffusa	Idem + lieve gastralgia	Lieve congestione nasale		
3	Idem	Idem + forte dolore addominale e/o vomito	Rinorrea, congestione, starnuti, prurito in gola	Tachicardia (aumento >15 b/m)	Cambiamento livello d'attività
4	Idem	Idem + diarrea	Idem + edema laringeo (cambiamento voce, tosse abbaillante, difficoltà deglutitoria, tirage), broncospasmo	Idem + lieve ipotensione	Idem + ansie, lieve cefalea
5	Idem	Idem + perdita del controllo intestinale	Idem + grave dispnea (importante tirage, broncospasmo, arresto respiratorio)	Bradycardia e/o ipotensione o arresto cardiaco	Angoscia, obnubilamento del sensorio, perdita di coscienza

I sintomi che richiedono l'utilizzo di Adrenalina sono evidenziati dalla scrittura in **grassetto**

L'American Academy of Allergy, Asthma and Immunology ha elaborato una scala di gravità delle reazioni allergiche ai fini di uniformare la descrizione degli episodi, la severità delle manifestazioni allergiche e l'atteggiamento terapeutico da attuare (Tabella 1.1)<sup>37</sup>. È importante sottolineare che la gravità della sintomatologia non è legata soltanto al grado della sensibilità individuale, ma è strettamente correlata alla dose di esposizione all'allergene, alla via ed alla modalità del contatto (ingestione, contatto cutaneo, inalazione).



## ANAFILASSI ASSOCIATA ALLO SFORZO FISICO:

Questa condizione, definita FREIA (Food Related Exercise Induced Anaphylaxis), è caratterizzata dall'insorgenza di una reazione mediata dalla degranolazione dei mastociti (orticaria, angioedema, fino ad una vera e propria anafilassi) correlata alla coesistenza di assunzione del pasto entro le 2-3 ore e sforzo fisico. I due eventi agiscono in modo consecutivo, avendo tra loro un rapporto di concausalità nel determinismo della reazione.

Questo tipo di reazione può avere un'eziologia alimento-specifica o non alimento-specifica<sup>38</sup>. Nel primo caso risulta utile ai fini diagnostici l'esecuzione di un pannello MULTI-RAST per una definizione eziologica.

## SINDROME ORALE ALLERGICA:

Vengono definite, come "sindrome orale allergica", quell'insieme di manifestazioni che coinvolgono prevalentemente il cavo orale e che insorgono in seguito al contatto del cavo orale con l'alimento allergizzante. Di solito, i sintomi orofaringei, caratterizzati da prurito, pizzicore, eruzioni mucosali papulo-vescicolari, edema labiale, si risolvono rapidamente ma, in alcuni casi, è possibile l'evoluzione sistemica entro qualche ora dall'esordio dei sintomi locali orali.

L'allergia a qualsiasi alimento può avere queste manifestazioni ma, in genere, questa insorge nei soggetti allergici a frutta e verdure fresche che, spesso, sono anche soggetti allergici ai pollini. Già da qualche anno è stata infatti segnalata una cross-reattività tra alimenti vegetali ed i pollini<sup>39</sup> (Tabella 1.2).

**Tabella 1.2 - CROSS-REATTIVITA' TRA POLLINI ED ALIMENTI VEGETALI**

Graminacee	Frumento, melone, anguria, pomodoro, arancia, kiwi, pesca, albicocca, ciliegia, prugna
Urticacee	Gelso, basilico, piselli
Composite	Sedano, melone, anguria, mela, banana, zucca, camomilla
Betullacee	Mela, pera, albicocca, ciliegia, banana, noce, nocciola, carota, finocchio, sedano, patata

Vari studi hanno dimostrato la presenza di epitopi comuni tra pollini ed alimenti vegetali. Due dei più importanti epitopi responsabili della cross-reattività inalanti-alimenti sono stati purificati: l'allergene maggiore della Betulla (Bet v1) e la profilina (Bet v2). La profilina è presente in vari pollini ed alimenti vegetali (sedano, patata, pomodori, carote, pesche, pere e noci) e, nel 50% degli allergici ai pollini con accertata ipersensibilità ai vegetali, sono state riscontrate IgE-profilina specifiche<sup>40</sup>.

#### STORIA NATURALE:

Generalmente le allergie alimentari hanno una spiccata tendenza alla guarigione in tempi variabili indipendentemente dal momento della sensibilizzazione.

La prevalenza dell'ipersensibilità agli alimenti è maggiore nel primo anno di vita. I bambini con allergia al latte solitamente acquisiscono la tolleranza entro pochi anni, mentre, in caso di allergia a uovo, arachidi, noccioline e pesce, il processo è più lento.

Uno studio prospettico sull'allergia alle proteine del latte vaccino, condotto su bambini fino ai tre anni d'età, ha dimostrato che il 56% dei bambini guarisce entro l'anno, il 77% entro i due anni e l'87% entro i tre anni; questo studio ha dimostrato inoltre che il 92% dei bambini allergici alle proteine del latte vaccino presenta almeno due sintomi e che il 49% ha familiarità atopica (23% riguardante entrambi i genitori).

I bambini con allergia alle proteine del latte vaccino non IgE-mediata guariscono tutti entro i tre anni di vita mentre quelli con allergia IgE-mediata hanno il rischio che ci sia una persistenza dell'ipersensibilità e anche di sviluppare un'altra allergia alimentare.

Alcuni studi hanno sottolineato l'importanza strutturale dell'epitopo nella determinazione della storia naturale dell'allergia. Gli epitopi lineari sono stati associati, rispetto a quelli conformazionali, alla persistenza dell'ipersensibilità.

## DIAGNOSI DELL'ALLERGIA ALLE PROTEINE DEL LATTE VACCINO

La diagnosi è clinica e si fonda su un'anamnesi approfondita (compatibilità clinica) e su un iter diagnostico che preveda una dieta di eliminazione e successivo test di provocazione. I test di laboratorio (IgE, RAST, etc.) supportano il sospetto diagnostico, ma vanno sempre valutati nel contesto clinico.

### TEST DI PROVOCAZIONE ORALE (CHALLENGE)

Il test consiste nella somministrazione per via orale di dosi crescenti dell'alimento (Tabella 1.3), sospettato di essere allergogeno, in modo tale da verificare la relazione causa-effetto e la dose minima capace di innescare la clinica allergica.

---

**Tabella 1.3 - Protocollo del Test di Provocazione Orale Latte**

1 dose ogni 10 minuti	1 gtt, 2 gtt, 4 gtt, 8 gtt latte
1 dose ogni 15 minuti	16 gtt, 2 ml, 4 ml, 8 ml latte
1 dose ogni 20 minuti	16 ml, 35 ml, 70 ml, 150 ml latte

I 4ml rappresentano il cut off per l'invio del paziente alla desensibilizzazione orale domiciliare piuttosto che una procedura di rush ospedaliera. L'eventuale avvio di un protocollo di desensibilizzazione verrà condotto partendo da due dosi precedenti quella che ha determinato i sintomi allergici.

---

Questa procedura deve essere eseguita in ambiente protetto e deve essere interrotta in caso di comparsa di sintomi allergici.

Nei protocolli di comportamento ufficiali, il test di scatenamento orale viene considerato il solo test che permette la formalizzazione diagnostica nei confronti di un'allergia alimentare. Negli adulti e nei bambini più grandi, il challenge dovrebbe essere eseguito con la metodica del doppio cieco contro

placebo (gold standard), soprattutto in quei pazienti psicologicamente suggestionabili o con reazioni ritardate (es. dermatite atopica).

Nella pratica corrente, nei bambini con allergia IgE-mediata, esistono due principali indicazioni al test di scatenamento:

- definizione della gravità clinica in bambini con allergia alimentare nota che, essendo stati sottoposti ad una dieta di eliminazione, non hanno più avuto contatti con quel determinato allergene. Questo approccio permetterà di stabilire, conoscendo la soglia di reattività, il punto di partenza per l'avvio di una desensibilizzazione orale
- valutazione dello stato atopico in bambino che, per riscontro di test cutanei o RAST positivi, non ha mai assunto l'alimento (tipicamente bambino allattato al seno con dermatite atopica) o che è sottoposto ad un lungo periodo di dieta.

#### PRICK TEST:

È una metodica semplice, poco invasiva e di basso costo che prevede l'applicazione di una goccia dell'estratto da testare sull'avambraccio e successiva scarificazione cutanea con la punta di un ago o la diretta scarificazione cutanea dopo inserimento dell'ago nell'alimento da testare (metodica "prick by prick"). Il risultato del test è visibile dopo 10-15 minuti e la presenza di un ponfo istaminico di diametro  $> 3$  mm circondato da un alone eritematoso (Figura 1.5) indica la positività del test.

È importante, ai fini dell'attendibilità, che il paziente abbia sospeso da almeno 7 giorni qualsiasi trattamento antistaminico.

È un test molto sensibile, in quanto ha un'alta capacità d'identificare le IgE-allergene specifiche, ma poco specifico (Tabella 1.4). Il soggetto con prick test negativo non ha le IgE specifiche verso l'allergene testato e viene definito "non atopico", mentre quello con prick test positivo ha le IgE

specifiche, ma questo non si correla sempre alla presenza o meno di manifestazioni cliniche. Soltanto la metà delle persone positive al prick test ha fatto una sintomatologia concordante con la cutipositività<sup>41</sup>.

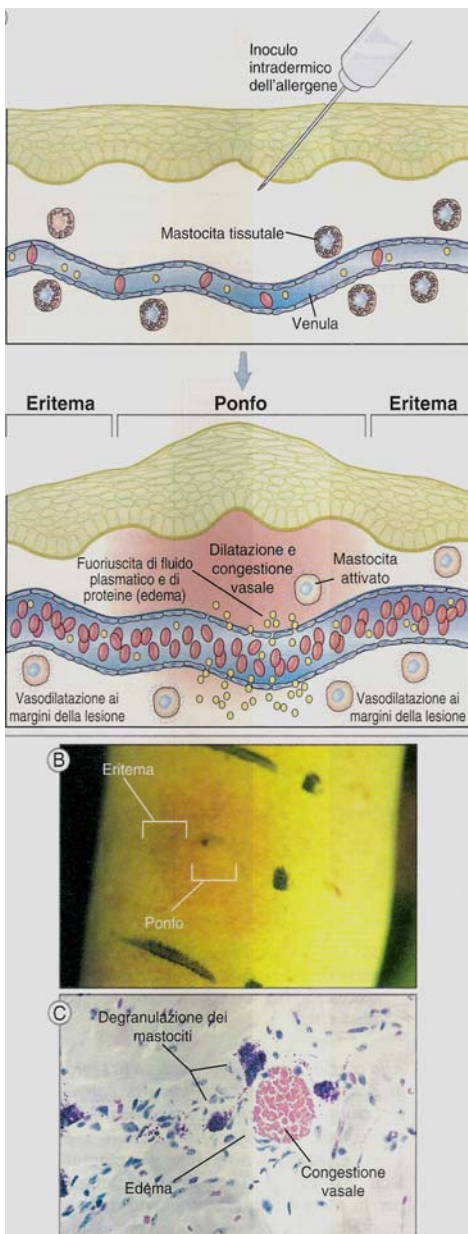


Figura 1.5 – La risposta cutanea ponfo-eritematosa IgE-mediata

In risposta alla liberazione dei mediatori preformati da parte dei mastociti, stimolati dall'allergene, si verifica vasodilatazione del microcircolo locale con fuoriuscita di liquidi e macromolecole dal letto capillare e conseguente arrossamento e rigonfiamento dell'area (ponfo). La dilatazione dei vasi presenti ai margini del ponfo produce un alone arrossato (eritema).

Tipico aspetto di una reazione ponfo-eritematosa cutanea in risposta all'inoculo di un allergene.

Aspetto istologico del tessuto sottocutaneo in corso di una reazione d'ipersensibilità immediata dopo circa 10 minuti dall'inoculo dell'agente offendente.

**Tabella 1.4 - Efficienza del prick test (cut off 3mm)**

	uovo	latte
Sensibilità (%)	98	96
Specificità (%)	53	51
VPP standardizzato (prevalenza 10%)	19	18
VPN standardizzato (prevalenza 10%)	99	99

Il prick test, nelle fasce d'età più piccole, è più sensibile del RAST in quanto riesce ad evidenziare le IgE specifiche per un allergene presenti sui mastociti tissutali ma non ancora, in titolo dosabile, nel siero. In uno studio di popolazione Sporik et al<sup>41</sup> hanno comparato il valore del prick test (diametro in mm) con la positività al test di scatenamento; è risultato che la specificità è aumentata all'aumentare del diametro ed ha raggiunto il valore del 100% per diametri di 8mm per il latte vaccino e le arachidi e di 7 mm per l'uovo.

#### RAST:

È una tecnica radioimmunologica che permette di dosare le IgE specifiche per un allergene in modo quantitativo (kilounità IgE specifiche per allergene per litro; kU<sub>A</sub>/l). Il saggio viene calibrato attraverso gli standard dettati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità ed i risultati vengono espressi attraverso una classe, compresa tra 0 e 6, definita in base alla concentrazione sierica (Tabella 1.5).

CLASSE	Valore (kU <sub>A</sub> /l)	Interpretazione
CLASSE 0	< 0,35 kU <sub>A</sub> /l	Negativo
CLASSE 1	0,35 - 0,69 kU <sub>A</sub> /l	Positivo
CLASSE 2	0,70 - 3,49 kU <sub>A</sub> /l	Molto positivo
CLASSE 3	3,50 - 17,49 kU <sub>A</sub> /l	Molto positivo
CLASSE 4	17,50 - 52,49 kU <sub>A</sub> /l	Molto positivo
CLASSE 5	52,50 - 99,9 kU <sub>A</sub> /l	Molto positivo
CLASSE 6	> 100 kU <sub>A</sub> /l	Molto positivo

Questo è un test altamente sensibile ma poco specifico (Tabella 1.6)<sup>42</sup>. Spesso capita che in soggetti con IgE totali elevate alcuni RAST specifici siano falsamente positivi, per effetto di trascinamento.

Tabella 1.6 - Efficienza del RAST (cut off 0,35kU<sub>A</sub>/l)

	uovo	latte
Sensibilità (%)	98	100
Specificità (%)	45	30
VPP standardizzato (prevalenza 10%)	17	2
VPN standardizzato (prevalenza 10%)	99	100

Il Prick test tuttavia risulta più sensibile del RAST ed andrebbe preferito.

Ci sono solo tre condizioni nelle quali il RAST è superiore al Prick test:

- 1) eczema esteso a tal punto da non permettere l'esecuzione del Prick test;
- 2) bambino in antistaminico;
- 3) anafilassi associata allo sforzo fisico.

In uno studio di popolazione, condotto su 300 bambini ed adolescenti con un follow up di 10 anni, effettuato da Sampson et al<sup>42</sup>, l'efficienza del prick test e del RAST sono risultati comparabili, entrambi con eccellente sensibilità e valore predittivo negativo, bassa specificità e valore predittivo positivo. In questo studio sono stati inoltre, identificati i livelli di IgE specifiche per un allergene capaci di predire una reattività clinica (test di scatenamento positivo) con un'accuratezza maggiore del 95%: uovo-6 kU<sub>A</sub>/l; latte-32 kU<sub>A</sub>/l; arachidi-15 kU<sub>A</sub>/l; pesce-20 kU<sub>A</sub>/l.

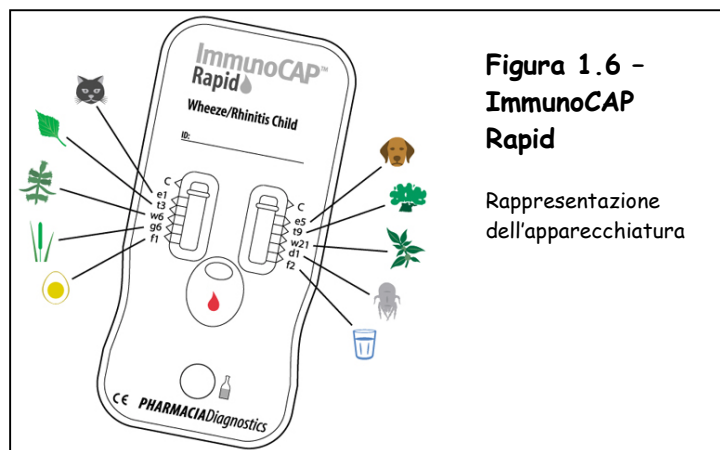
Il valore assoluto di IgE specifiche per un allergene sembra poter predire in parte la storia naturale dell'allergia alimentare. Dati preliminari, infatti, suggeriscono che i pazienti con sintomi allergici e bassi livelli di IgE specifiche hanno più probabilità di perdere la loro reattività rispetto ai pazienti con alti livelli di IgE specifiche.

NUOVE TECNICHE PER IL DOSAGGIO DI IgE SPECIFICHE PER UN ALLERGENE:

- IMMUNO-CAP™ RAPID

È un test rapido per la misurazione qualitativa e semiquantitativa delle IgE specifiche contro i 10 più comuni allergeni: Betulla, Composita (Assenzio), Olivo, Parietaria, Graminacee (Coda di topo), epitelio e forfora di gatto, forfora di cane, acaro, albume e latte (Figura 1.6). L'esecuzione del test prevede la deposizione di 1 goccia di sangue sulla carta bibula, nella quale sono stati adsorbiti i 10 allergeni; dopo 5 minuti è necessario aggiungere 1 goccia di soluzione di sviluppo.

Il risultato del test è visibile dopo 15 minuti. La presenza di IgE-specifiche per un determinato allergene determinerà la comparsa di una linea rossa in sua corrispondenza e l'intensità del colore darà un'informazione di tipo semiquantitativo.



**Figura 1.6 -  
ImmunoCAP  
Rapid**

Rappresentazione  
dell'apparecchiatura

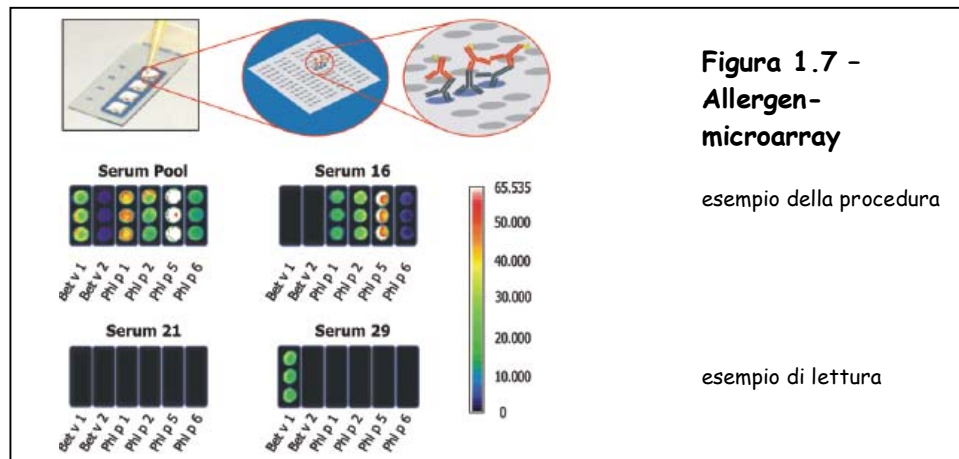
In uno studio condotto da Ballardini et al<sup>43</sup>, questo strumento diagnostico è stato messo a confronto col Prick test, ed è stato dimostrato che è una valida alternativa nei bambini al di sopra dei 2 anni in via di definizione clinica. E' stato dimostrato che l'ImmunoCAP Rapid è capace di differenziare, in bambini con l'eczema, quelli con componente atopica della malattia da quelli senza la componente atopica.

- **ALLERGEN-MICROARRAY**

Grazie all'impiego crescente delle nanotecnologie, negli ultimi anni si è assistito all'avvento dei gene-microarrays<sup>44</sup>, tecnica nella quale la



distribuzione regolare di centinaia di sequenze di DNA gene-specifiche, legate ad una matrice solida, rende possibile l'analisi di modificazioni dell'espressione genica. Questo tipo di tecnologia è stata applicata oggi alla proteomica, consentendo analisi proteiche attraverso la miniaturizzazione della strumentazione già utilizzata nei gene-microarrays<sup>45</sup> (Figura 1.7).



Le molecole allergeniche vengono adsorbite ad un protein-chip su un supporto solido<sup>46</sup>. Il chip viene messo ad incubare con il siero del paziente (20 µl) e poi gli anticorpi legati vengono evidenziati con un antisiero marcato. In sostanza, si tratta di un test immunoenzimatico con la particolarità delle dimensioni, infatti un singolo spot di allergene ha una larghezza dell'ordine di alcune decine di micron e l'intero allergen-array (un quadrato di 7 mm per lato) può contenere centinaia di singoli test differenti.

Il siero ed i reattivi da impiegare per tutte queste determinazioni sono dell'ordine di decine di microlitri per ogni array.

La lettura del biochip viene restituita sia in termini quantitativi (IU/ml) che semiquantitativi (classi: bassa, intermedia, elevata), analogamente a quanto avviene per altri test in vitro classici<sup>46</sup>.

La grande maggioranza dei test diagnostici e dei vaccini disponibili in commercio utilizza in fase solida estratti allergenici, misurando di fatto una reattività polispecifica. Con l'avanzamento tecnologico dei microchip, si è aperta quindi la prospettiva di una definizione più fine del pattern di reattività individuale che potrà condurre in futuro alla realizzazione dell'immunoterapia specifica, ovvero di un'immunoterapia costruita in funzione delle specifiche reattività individuali. Tale "Component Resolved Diagnosis" (CRD) è una delle nuove frontiere in allergologia molecolare<sup>47</sup>.

La metodica illustrata costituisce un avanzamento sotto 3 aspetti fondamentali :

1. offre informazioni sulla reattività contro numerose singole molecole allergeniche (non più miscele o estratti)
2. utilizza volumi di siero minimi ricavabili da un semplice prelievo di sangue capillare (aspetto rilevante specialmente in pediatria) e corrispondenti minimi volumi di reattivi, riducendo quindi drammaticamente anche i costi per singola determinazione
3. apre prospettive allo studio di specificità epitopiche

Le prime proposte vedono questi esami come test di 3° livello, da effettuarsi per approfondire la diagnostica di particolari sottogruppi di pazienti già sottoposti ai test immunoenzimatici classici<sup>48</sup>.

## EOSINOFILIA:

La conta degli eosinofili, mediante l'esecuzione di un esame emocromocitometrico, permette il riscontro di un'eventuale ipereosinofilia (valore assoluto superiore 300 cell/mm<sup>3</sup>) che, dopo l'esclusione di una patologia parassitaria, permette un orientamento nel senso di un'atopia.

Questo esame risulta molto utile e pratico per valutare, in tempi più brevi rispetto la risposta clinica, gli effetti della dieta e del test di scatenamento<sup>49</sup>.

#### TEST DI PERMEABILITA' INTESTINALE:

I test che esplorano le alterazioni mucosali ed in particolare i test di permeabilità intestinale agli zuccheri sono utili soprattutto nei bambini con enteropatia allergica alle proteine del latte vaccino in fase attiva. In questa condizione, infatti, la permeabilità intestinale risulta alterata con diminuito assorbimento di piccole molecole come lo xilosio. Lo xilosio è uno zucchero che non viene metabolizzato e viene assorbito come tale nella porzione prossimale dell'intestino tenue; e quindi lo rendono idoneo alla valutazione della funzione intestinale di assorbimento. Lo zucchero viene somministrato per via orale e successivamente dosato nel sangue (dopo 1 ora) e nell'urina (dopo raccolta urinaria di 5 ore). Una bassa concentrazione indica una bassa capacità di assorbimento da parte della mucosa intestinale, quindi un danno.

Il test allo xilosio viene utilizzato anche per aumentare la sensibilità del test di scatenamento, consentendo l'identificazione dell'azione lesiva enterica, prima che questa sia clinicamente valutabile<sup>50</sup>.

## TRATTAMENTO DELL'ALLERGIA ALLE PROTEINE DEL LATTE VACCINO

L'unico trattamento correntemente utilizzato nei casi di allergia alimentare è rappresentato da una stretta eliminazione dell'alimento offendente<sup>51</sup>, eventualmente associato ad un'adeguata terapia farmacologica nei casi di ingestione accidentale.

Negli ultimi anni è stata sperimentata, da vari autori, una terapia eziopatogenetica, l'immunoterapia.

### DIETA DI ELIMINAZIONE:

L'eliminazione dell'allergene rappresenta un approccio terapeutico in grado di dare, nella maggioranza dei casi, una rapida risoluzione della clinica. Tale approccio, però, non è sempre possibile in quanto l'allergene offendente può rappresentare un "elemento essenziale" della dieta, avendo un elevato valore biologico (come latte e uova), o può trovarsi come "alimento nascosto" in varie preparazioni industriali. E' facile che nei soggetti con allergia a latte, uovo o con poliallergia alimentare, si instaurino disturbi della nutrizione.

La reattività clinica per allergeni alimentari è solitamente molto specifica ed i pazienti sono reattivi solo ad un componente di una determinata famiglia (botanica o animale). È necessario comunque assicurarsi che il paziente non presenti cross-reattività verso alimenti appartenenti alla stessa famiglia in modo tale da evitarne il contatto.

La dieta di eliminazione non deve essere mantenuta a tempo indeterminato ed anzi vanno programmate delle prove di reintroduzione dell'alimento.

Nonostante le evidenze sull'acquisizione della tolleranza in bambini a dieta, recenti segnalazioni in letteratura hanno rilevato casi nei quali una stretta dieta di eliminazione ha condotto ad un aggravamento del quadro clinico<sup>52</sup>.

## TERAPIA MEDICA:

La terapia medica non è molto efficace nel prevenire la sintomatologia clinica in caso di assunzione dell'alimento offendentente e spesso dà degli effetti collaterali non facilmente accettabili per un utilizzo cronico.

Le classi di farmaci utilizzate sono:

- **ANTISTAMINICI** - sono antagonisti competitivi dell'istamina sui siti recettoriali. La reversibilità della loro azione, determinata dalla concentrazione d'istamina competente per il sito di legame, ne limita l'efficacia. Per tale ragione gli antistaminici sono più efficaci nel prevenire piuttosto che nell'antagonizzare gli effetti dell'istamina e vengono impiegati soprattutto in campo profilattico.

Il sistema istaminergico agisce, attraverso tre tipi di recettori (H1, H2, H3), a livello dei vari tessuti e, attraverso l'interazione coi neurotrasmettitori, a livello del sistema nervoso centrale, intervenendo nel controllo del ritmo sonno-veglia e nella regolazione del microcircolo.

La classe d'interesse allergologico principale è quella anti-H1. I recettori H1 sono i principali responsabili della reazione allergica, mediando la costrizione della muscolatura liscia, l'aumento della permeabilità vasale, la produzione di prostaglandine e l'aumento della produzione di muco nasale. Oggi vengono impiegati i farmaci di terza generazione (Cetirizina, Loratadina, ecc.) che, avendo un'alta selettività d'azione, presentano meno effetti collaterali.

**EFFETTI COLLATERALI:** sono causati dall'interazione (inversamente correlata alla selettività-H1) tra farmaco e recettori non-H1: recettori H2, recettori colinergici, adrenergici e serotoninergici. L'azione sedativa è mediata dall'interazione con recettori istaminergici centrali ed è vincolata dalla capacità di tali molecole di diffondere attraverso la barriera ematoencefalica

- KETOTIFENE - è un antistaminico ad azione antinfiammatoria. Questa proprietà è legata alla capacità inibitoria sulla produzione del fattore d'attivazione piastrinico (PAF), da parte dei macrofagi bronco-alveolari ed all'azione stabilizzante di membrana.

È un farmaco efficace nel ridurre l'accessualità asmatica, soprattutto nel bambino in età prescolare, ma, data la sua azione sistemica, non può essere considerato un'alternativa al DSCG e nella pratica corrente viene utilizzato in associazione ad esso o allo steroide inalatorio.

EFFETTI COLLATERALI: è un farmaco ben tollerato; può indurre, nei primi giorni di trattamento, sonnolenza, riduzione dell'attenzione, astenia ed aumento dell'appetito

- DISODIOCROMOGLICATO (DSCG) - è un farmaco in grado di bloccare le reazioni d'ipersensibilità, inibendo la liberazione d'istamina, leucotrieni e proteasi contenuti nei granuli dei mastociti e basofili.

Il DSCG ha un'azione esclusivamente preventiva, non avendo capacità d'azione nei casi di avvenuta liberazione dei granuli o di attacco asmatico già in atto.

L'utilizzo topico prolungato si è dimostrato in grado d'innalzare la soglia di reattività bronchiale aspecifica ma la potenza antinfiammatoria ed antiasmatica risulta inferiore rispetto a quella degli steroidi topici.

EFFETTI COLLATERALI: possono verificarsi tosse, irritazione faringea e tracheale soprattutto in soggetti con broncolabilità in atto

- CORTICOSTEROIDI - sono dei derivati sintetici del cortisolo in grado di agire su numerosi stipiti cellulari. L'impiego in allergologia sfrutta la loro spiccata azione antinfiammatoria nei casi di anafilassi (dopo la somministrazione di Adrenalina, alla dose di 1mg/kg di peso corporeo), di accesso acuto d'asma e nella profilassi dell'asma bronchiale. In questo senso, gli steroidi agiscono bloccando l'azione fosfolipasica ed

impedendo la produzione di acido arachidonico che, una volta prodotto, prenderebbe la via ciclossigenasica, con liberazione di prostaglandine, prostacicline, trombossani ed endoperossidi ciclici, o quella lipossigenasica, con produzione di leucotrieni. I glucocorticoidi possono altresì determinare ridistribuzione dei mastociti mucosali, riducendo la quantità d'istamina locale.

Gli steroidi per uso topico (Beclometasone, Fluticasone, ecc.) hanno un effetto di down-regulation sui geni per le citochine e di up-regulation sui geni dei recettori  $\beta_2$ -adrenergici, degli enzimi responsabili della degradazione delle bradichinine e della lipocortina, meccanismo principale dell'inibizione del sistema ciclo e lipossigenasico.

EFFETTI COLLATERALI: in questo particolare tipo di applicazione, gli effetti collaterali sono minimi, in quanto la somministrazione sistemica (x os o e.v.) è limitata al periodo critico, mentre quella topica, utilizzata anche cronicamente a scopo profilattico, non ha, se eseguita correttamente, effetti sistemici (metabolismo epatico di primo passaggio).

- ADRENALINA - è un farmaco "salvavita" in quanto capace di mediare, attraverso i diversi tipi di recettori:
  - α, la vasocostrizione periferica,
  - quelli  $\beta_1$ , l'inotropismo ed il cronotropismo miocardico
  - quelli  $\beta_2$ , la broncodilatazione.

Nel contesto allergologico, questo farmaco viene utilizzato nei casi di shock anafilattico e di broncospasmo severo alla dose di 0,01 mg/kg di peso corporeo mediante somministrazione sottocutanea o intramuscolare (ripetibile dopo 20 minuti), mentre nei casi di broncospasmo senza sintomi sistemici può essere somministrata per via aerosolica alla dose di 0,1 mg/kg di peso corporeo.

EFFETTI COLLATERALI: aritmie ipercinetiche, variazioni pressorie (puntate ipertensive), ischemia tissutale (miocardica).

#### IMMUNOTERAPIA:

Nel 1977 fu avviato il primo trial (8 pazienti) che utilizzava l'immunoterapia iniettiva sottocutanea per il trattamento dell'allergia alimentare<sup>53</sup>. Successivi studi hanno poi suggerito che l'approccio iniettivo sottocutaneo non era raccomandato nella terapia dell'allergia alimentare a causa dell'inaccettabile alto tasso di reazioni avverse sistemiche<sup>54</sup>. Tuttavia, da qui presero avvio molti studi che permisero, in anni più recenti, di valutare i meccanismi dell'induzione della tolleranza e le varie strategie terapeutiche attuabili.

#### DESENSIBILIZZAZIONE ORALE

Oggi appare promettente la possibilità di eseguire un trattamento di desensibilizzazione orale. Il primo protocollo fu proposto nel 1998 dall'équipe del prof. Giampiero Patriarca<sup>55</sup>, direttore del Servizio di Allergologia dell'Università Cattolica "del Sacro Cuore" di Roma. Tale protocollo (Tabella 1.7) prevede la somministrazione di dosi crescenti dell'alimento, iniziando dalla diluizione di 10 gocce di latte in 10 ml d'acqua e proseguendo, con incrementi ogni 2-3 giorni, fino a 100 ml di latte non diluito.

**Tabella 1.7 - Protocollo "Patriarca": desensibilizzazione per l'allergia al latte**

1°-12° giorno	13°-24° giorno	25°-36° giorno	37°-56° giorno	57°-72° giorno	73°-88° giorno	89°-104° giorno
Soluz. 10gtt latte + 10cc acqua	Latte Non diluito					
4 gtt per 3 giorni	1 gtt per 3 giorni	10 gtt per 3 giorni	40 gtt x2 per 4 giorni	4,5 ml x3 per 4 giorni	6 ml x4 per 4 giorni	15 ml x4 per 4 giorni
6 gtt per 3 giorni	2 gtt per 3 giorni	16 gtt per 3 giorni	40 gtt x3 per 4 giorni	5 ml x3 per 4 giorni	7 ml x4 per 4 giorni	15 ml x5 per 4 giorni
10 gtt per 3 giorni	4 gtt per 3 giorni	32 gtt per 3 giorni	40 gtt x4 per 4 giorni	6 ml x3 per 4 giorni	9 ml x4 per 4 giorni	30 ml x3 per 4 giorni
12 gtt per 3 giorni	6 gtt per 3 giorni	48 gtt per 3 giorni	50 gtt x4 per 4 giorni	5 ml x4 per 4 giorni	12 ml x4 per 4 giorni	50 ml x2 per 4 giorni
			60 gtt x4 per 4 giorni			



Patriarca sperimentò il protocollo (oggi modificato) su un campione di 14 bambini allergici a latte, uovo, pesce e mela, di età compresa tra 4 e 14 anni e che presentavano, in seguito all'ingestione dell'allergene, almeno un sintomo tra orticaria, angioedema, eczema, vomito, dolore addominale, rinite ed asma. Il protocollo fu concluso da 12 bambini su 14; i restanti 2 bambini abbandonarono la sperimentazione per scarsa compliance.

Durante i primi giorni di trattamento venne effettuata una premedicazione col Disodiocromoglicato (250-500 mg in base all'età del paziente), mentre le reazioni avverse furono trattate con antistaminici per os.

Il trattamento ebbe successo nel 100% dei bambini che portarono a termine il protocollo, ovvero, essi non presentavano più alcuna reazione in seguito all'ingestione dell'alimento offendentente e non necessitavano più di assumere farmaci.

Il follow-up, a 2 mesi di distanza, evidenziò una significativa modificazione della cutireattività e dei RAST.

Per avvalorare tali risultati, il gruppo del prof. Patriarca studiò gli effetti immunologici della desensibilizzazione orale nell'allergia alimentare<sup>56</sup> in un bimbo di 6 anni con reazioni allergiche di tipo gastroenterico (vomito) ed asmatico. I Prick test al latte, fortemente positivi all'inizio del protocollo, si negativizzarono dopo 7 mesi. Allo stesso modo, il livello di IgE- $\beta$ -lattoglobulina specifiche si ridussero da 6,7 a 2,5 Uk/l, quelle  $\alpha$ -lattoalbumina specifiche da 19,8 a 2,82 e quelle caseina specifiche da 83,8 a 13,7. Le IgG ed IgA per  $\beta$ -lattoglobulina,  $\alpha$ -lattoalbumina e caseina mostrarono un progressivo incremento in 18 mesi. Le IgE totali, elevate all'inizio, subirono un ulteriore incremento iniziale e si riassestarono su livelli basali dopo 3 mesi di trattamento.

In questa occasione furono valutate anche le modificazioni citochiniche. Si assistette alla riduzione dei livelli sierici dell'IL-4 e all'incremento di quelli

dell'IFN- $\gamma$ . L'IFN- $\gamma$ , a distanza di 18 mesi dal trattamento, tornò a livelli basali.

L'analisi percentuale delle sottopopolazioni linfocitarie CD3<sup>+</sup> (linfociti totali), CD19<sup>+</sup> (linfociti B), CD8<sup>+</sup> (linfociti T suppressor/citotossici), CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> (linfociti T attivati) e CD16<sup>+</sup>-CD56<sup>+</sup> (NK) non risultarono modificate.

Un recente studio, presentato al Congresso annuale dell'American Academy of Allergy, Asthma and Immunology a marzo 2006, condotto da De Boisseieu et al<sup>57</sup>, ha valutato l'immunoterapia sublinguale (SLIT: Sublingual Immunotherapy) come alternativa alla dieta di eliminazione.

Questo gruppo ha arruolato 8 bambini con allergia alle proteine del latte vaccino di età superiore ai 6 anni, ovvero bambini nei quali la probabilità di acquisizione spontanea della tolleranza era molto bassa. Questi bambini sono stati sottoposti ad un test di scatenamento iniziale, per poter stabilire la dose minima di reattività ed il giorno seguente hanno cominciato l'immunoterapia sublinguale. Tale procedura è durata 6 mesi, durante i quali i bambini dovevano quotidianamente tenere il latte nella bocca per 2 minuti, inizialmente alla dose di 0,1 ml (prime 2 settimane) e poi incrementando di 0,1 ml ogni 15 giorni fino a raggiungere la dose di 1 ml/die.

7 bambini completarono il protocollo (uno con scarsa compliance) senza presentare effetti avversi ed 1 lo sospese per la presenza di una sindrome orale allergica insorta il 5° mese.

Questi bambini sono stati sottoposti ad un test di scatenamento finale che ha dimostrato un innalzamento della dose soglia di reattività: da una media di 39 ml di latte all'inizio ad una media di 143 ml di latte alla fine dell'immunoterapia sublinguale ( $p < 0,01$  *t-test*). La dose soglia è incrementata nei 6 bambini che hanno completato il protocollo ed in 4 di questi (bambini che hanno tollerato dosi  $> 30$  ml durante il primo test di scatenamento) la dieta è

stata liberalizzata. La dose soglia è invece rimasta imm modificata nel bambino che condusse il protocollo con scarsa compliance.

Gli Autori hanno valutato la concentrazione sierica delle IgE latte-specifiche prima e dopo l'immunoterapia, ma non hanno osservato una variazione significativa; ciò suggerisce che la tolleranza, in questi bambini, si sia realizzata mediante altri meccanismi, capaci di controbilanciare l'effetto d'attivazione delle IgE.

In letteratura esistono attualmente altri dati avvaloranti questi tipi di approccio, che però devono ancora essere approfonditi.

## OBIETTIVI

- Documentare ed informatizzare la casistica dei bambini con allergia al latte seguiti tra gennaio 2001 e settembre 2008 presso la Clinica Pediatrica dell'Istituto per l'Infanzia "Burlo Garofolo" di Trieste
- Valutare l'efficacia dell'utilizzo dell'adrenalina somministrata per via aereosolica nelle reazioni allergiche avvenute durante l'applicazione del protocollo di desensibilizzazione orale nei bambini con allergia alle proteine del latte IgE-mediata
- Valutare l'utilizzo dell'adrenalina somministrata per via intramuscolare nelle reazioni allergiche avvenute durante l'applicazione del protocollo di desensibilizzazione orale nei bambini con allergia alle proteine del latte IgE-mediata

## MATERIALI E METODI

E' stata effettuato retrospettivamente un lavoro di revisione delle cartelle cliniche di tutti i pazienti ricoverati dal gennaio 2001 al settembre 2008 presso la Clinica Pediatrica in Clinica Pediatrica dell'IRCCS Burlo Garofolo di Trieste con diagnosi finale di allergia alle proteine del latte vaccino.

La diagnosi di allergia alle proteine del latte vaccino è stata posta con il seguente iter diagnostico:

- VALUTAZIONE ANAMNESTICA di pregresse reazioni anafilattiche con particolare attenzione al rapporto causa-effetto
- PRICK TEST positivo (puffo di diametro > 3 mm)
- DOSAGGIO DELLE IgE TOTALI (> 29 IU/l tra 0-1 anni; > 50 IU/l tra 1-9 anni; > 87 IU/l adulti) E SPECIFICHE NEL SIERO (RAST classe  $\geq$  1)
- TEST DI PROVOCAZIONE ORALE è stato realizzato in regime di day-hospital, con metodica "in aperto", somministrando dosi crescenti di latte (Tabella 1.3).

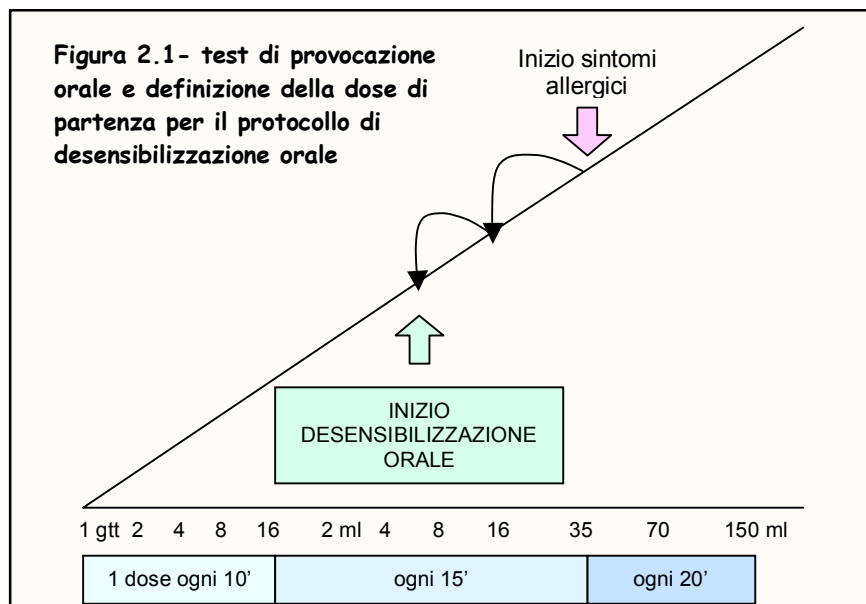
L'esecuzione è avvenuta in ambiente protetto, previo posizionamento di un'agocanula per poter trattare immediatamente reazioni anafilattiche gravi, con pronto trattamento e sospensione del protocollo nei casi di manifestazioni allergiche di gravità (grado > 0 = a 2), coinvolgenti due apparati (vedi Tabella 1.1) e con un'osservazione continua fino a 3 ore dopo la conclusione del protocollo.

Nei soggetti considerati a rischio di sviluppare reazioni gravi (racconti anamnestici recenti, RAST o Prick test molto elevati) il protocollo è stato modificato, in via precauzionale, partendo da dosi di latte diluito (1 gtt latte + 10 ml acqua).

- PROTOCOLLO DI DESENSIBILIZZAZIONE ORALE

Il protocollo prevede di partire dalla dose precedente all'ultima dose tollerata durante il test di scatenamento (Figura 2.1) e quindi può

presentare una certa variabilità nei tempi di completamento. A questa si aggiunge la possibilità di personalizzare il protocollo in base a particolari modalità (individuali) di acquisizione della tolleranza.



E' prevista la somministrazione orale di latte, dapprima diluito e poi puro, nell'arco di 10 giorni.

**Tabella 2.4 - protocollo di desensibilizzazione "rush" ospedaliero**

1° giorno	1 goccia latte + 20 ml acqua Somministrare le dosi a distanza di 1 h	1gtt - 4gtt - 12gtt - 1ml - 2ml - 4,5ml soluzione
2° giorno	4 gocce latte + 20 ml acqua Somministrare le dosi a distanza di 2 h	1ml - 3ml - 6ml - 10ml soluzione
3° giorno	20 gocce latte + 20 ml acqua Somministrare le dosi a distanza di 2 h	1ml - 3ml - 6ml - 10ml soluzione
4° giorno	3 ml latte + 20 ml acqua Somministrare le dosi a distanza di 2 h	1ml - 3,5ml - 7,5ml - 11ml soluzione
5° giorno	10 ml latte + 20 ml acqua Somministrare le dosi a distanza di 2 h	4ml - 6ml - 8ml soluzione
6° giorno	10 ml latte + 10 ml acqua Somministrare le dosi a distanza di 2 h	4ml - 6ml - 8ml soluzione
7° giorno	10 ml latte puro Somministrare le dosi a distanza di 2 h	1ml - 3ml - 6ml latte puro
8° giorno	22 ml latte puro Somministrare le dosi a distanza di 2 h	4ml - 7ml - 11ml latte puro
9° giorno	37 ml latte puro Somministrare le dosi a distanza di 2 h	10ml - 12ml - 15ml latte puro
10° giorno	49 ml latte puro Somministrare le dosi a distanza di 2 h	13ml - 16ml - 20ml latte puro

Sono stati eseguiti all'ingresso, i Prick test ed un prelievo ematico per la valutazione degli eosinofili, IgE totali, IgE-specifiche.

Tutti i pazienti hanno ricevuto una premedicazione quotidiana con Oxatomide o Cetirizina (1mg/kg) ed a tutti è stata posizionata un'agocannula per garantire un accesso venoso ed una eventuale pronta terapia in caso di reazioni anafilattiche importanti. Inoltre nei bambini con asma persistente è stata ottimizzata la terapia di fondo con uno steroide inalatorio (Fluticasone).

Un medico dedicato era sempre presente durante il protocollo ed i farmaci d'emergenza pronti per l'uso (Adrenalina pura e Adrenalina diluita 1:10, antistaminico e cortisonico) in modo tale che tutto fosse predisposto in caso di reazioni acute.

I genitori sono stati istruiti sulla possibilità di sostituire il latte con i vari derivati, utilizzando una tabella di conversione (Tabella 2.9) che permette la comparazione tra quantità di proteine del latte tollerata e quella presente nei vari latticini.

Alla dimissione, i genitori sono stati istruiti sulle modalità di prosecuzione della desensibilizzazione orale a domicilio (Tabella 2.5) e sul trattamento delle eventuali reazioni. E' stato inoltre garantito un supporto medico telefonico ed e-mail continuativo.

**Tabella 2.9 - Quantità di latticini allergenicamente equivalente a 100ml di latte**

Latticini	Cibo (gr) corrispondente a 100ml di latte vaccino puro	FATTORE CONVERSIONE
Yogurt magro	103,00	1,029
Yogurt intero	81,40	0,814
Latte di pecora	66,00	0,660
Mozzarella di mucca	17,70	0,177
Mozzarella di bufala	18	0,179
Gorgonzola	16,50	0,165
Crescenza	21	0,210
Ricotta	35,00	0,350
Parmigiano	9,50	0,095
Emmenthal	12,10	0,121
Groviera	9,50	0,095
Bel Paese	17	0,167
Stracchino	16	0,158
Caciotta romana di pecora, fontina	13	0,129
Asiago	11	0,106
Caciocavallo	13	0,127
Mascarpone	46	0,461
Provolone stagionato	10	0,103

**Tabella 2.5 - Protocollo domiciliare dopo la fase d'induzione ospedaliera**

	1°-12° giorno	13°-22° giorno	23°-30° giorno	31°-38° giorno	39°-44° giorno	45°-56° giorno	57°-66° giorno
Per 2 giorni	15 ml x 2	22 ml x 2	33 ml x 2	46 ml x 2	62 ml x 2	75 ml x 2	110 ml x 2
Per 2 giorni	16 ml x 2	24 ml x 2	36 ml x 2	50 ml x 2	66 ml x 2	80 ml x 2	120 ml x 2
Per 2 giorni	17 ml x 2	26 ml x 2	39 ml x 2	54 ml x 2	70 ml x 2	85 ml x 2	130 ml x 2
Per 2 giorni	18 ml x 2	28 ml x 2	42 ml x 2	58 ml x 2		90 ml x 2	140 ml x 2
Per 2 giorni	19 ml x 2	30 ml x 2				95 ml x 2	150 ml x 2
Per 2 giorni	20 ml x 2					100 ml x 2	

NB: la dose iniziale può essere < 15 ml in quanto dipendente dalla dose massima tollerata in ospedale



Successivamente l'antistaminico è stato lentamente scalato e poi sospeso una volta raggiunti almeno i 120 ml di dose singola.

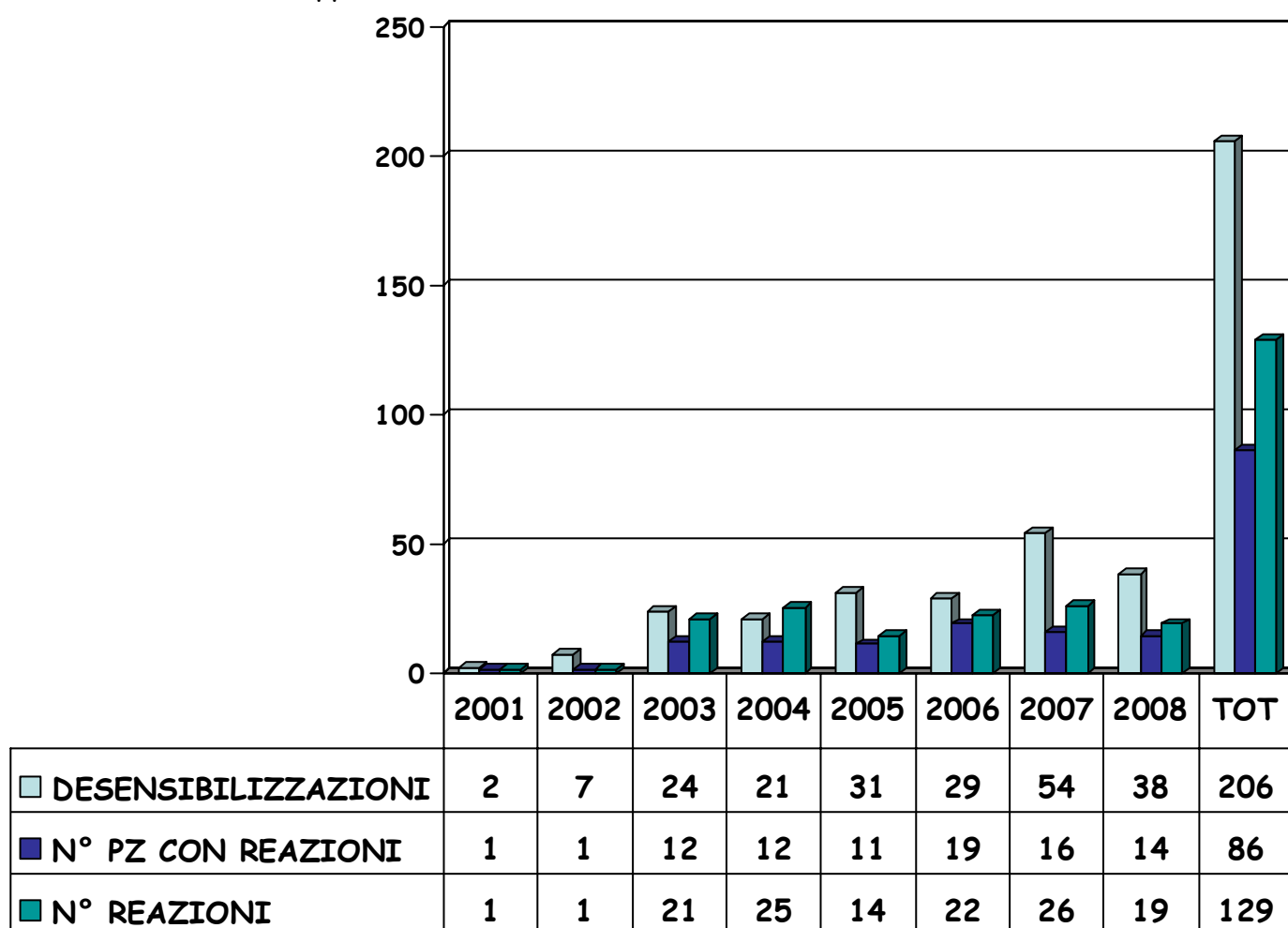
#### SOMMINISTRAZIONE ADRENALINA PER VIA AEREOSOLICA

Questa modalità di somministrazione dell'adrenalina prevede la somministrazione di 1 ml ogni 10 Kg di peso corporeo con 2 ml di soluzione fisiologica. Infatti l'aerosol viene effettuato sfruttando i dispositivi di erogazione dell'ossigeno a muro presenti nelle stanze di degenza. E' una somministrazione non invasiva e che permette inoltre di somministrare contemporaneamente ossigeno in caso di desaturazione importante.

## RISULTATI

Sono state revisionate 206 cartelle cliniche di bambini, tutti con prick positivo per latte vaccino, in cui è stata effettuata desensibilizzazione orale per il latte vaccino. Di questi 206 bambini 86 hanno presentato uno o più episodi di reazione allergica trattati con aerosol di adrenalina, con un totale di 129 reazioni trattate (vedi grafico 3.1)

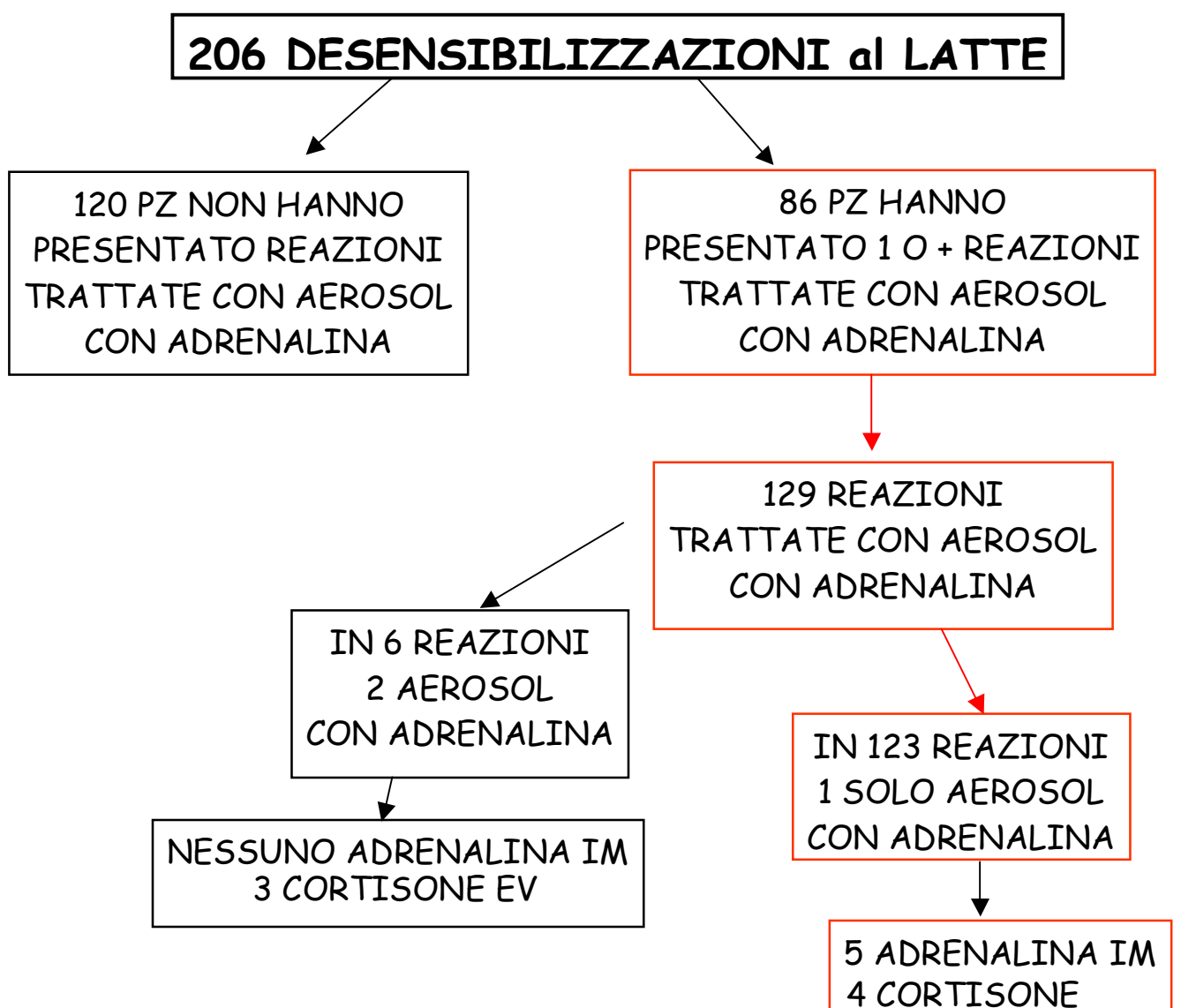
Grafico 3.1: rappresentazione della casistica in termini numerici assoluti



L'età media della popolazione era di 6 anni, con un range variabile dai 2 ai 17 anni. 50 pazienti erano maschi (pari al 58,1 %) e in media il RAST era di classe 5 (range variabile tra classe 2 e 6).

Nell'83% delle reazioni sono stati somministrati anche altri farmaci sia per via inalatoria (cortisonico e/o bronco dilatante) sia per via orale (antistaminico e/o cortisonico). Solo nel 16,9 % dei casi è stato somministrato un cortisonico endovena e nel 4,16 % è stata iniettata l'adrenalina intramuscolo. Nessuno dei bambini è stato sottoposto a manovre di rianimazione.

#### SCHEMA GRAFICO RIASSUNTIVO DEI RISULTATI DELLO STUDIO



La sintomatologia per cui è stato effettuato aerosol con adrenalina è stata in prevalenza di origine respiratoria:

- infatti nel 60,4% dei casi era presente broncospasmo,
- nel 41,5% dei casi era presente tosse,
- nel 21,7% rinite (intesa sia come rinorrea che con starnuti),
- il laringospasmo era presente nel 10,3% dei casi.

La faringodinia e la sensazione di soffocamento era presente nel 34,9% dei casi.

L'orticaria generalizzata si è manifestata nel 50% dei casi, mentre la congiuntivite nel 16,9%.

I sintomi di origine gastrointestinale erano presenti nel:

- 12,2% dei casi con nausea e/o vomito,
- nel 19,8% dei casi con dolori addominali
- e nello 0,9% dei casi con diarrea.

Tutti i bambini che presentavano sintomi gastrointestinali avevano associato almeno un sintomo respiratorio e/o orticaria generalizzata.

La saturazione media di ossigeno nel sangue prima dell'esecuzione dell'aerosol era del 95% (range 83- 99), mentre quella media misurata nei 10 minuti successivi all'aerosol era di 98% (range 96-100).

La frequenza cardiaca media prima dell'esecuzione dell'aerosol era di 110 battiti al minuto (range 76-140), mentre quella media dopo l'aerosol era di 114 (range 75-177).

La quantità media di proteine di latte somministrato prima dell'insorgenza della reazione trattata con aerosol di adrenalina è stata di 0,288082 ml (range 0,09-12) di proteine latte, che corrispondono all'assunzione di 9 cc latte puro.

Il tempo medio di comparsa della reazione dalla somministrazione della dose di latte scatenante è stato di 36 min, con un range variabile tra 2 e 90 min.

Il tempo medio di scomparsa della sintomatologia anafilattica dall'esecuzione dell'aerosol era di 29 min.

## DISCUSSIONE

La storia naturale dell'allergia alle proteine del latte vaccino dimostra una spiccata tendenza alla guarigione spontanea: circa l'85-90% dei bambini acquisisce la tolleranza nei confronti del latte entro il 3° anno di vita<sup>3</sup> ed è importante quindi eseguire, in prossimità di questa età, il test di provocazione orale per poter identificare i bambini che sono diventati tolleranti e poter quindi liberalizzare la dieta.

Nella pratica quotidiana, la maggior parte dei bambini comunque sperimenta, prima dei 3 anni, almeno un contatto accidentale col latte e quest'evento molto spesso diventa un'occasione per saggiare il grado di tolleranza o di reattività nei confronti dell'alimento. In quei bambini che non hanno presentato reazioni allergiche o che hanno sintomi minori gli stessi familiari iniziano gradualmente a reintrodurre l'alimento offendente e man mano liberalizzano la dieta.

Invece per il 10-15% dei bambini, che dopo i 3 anni continua ad essere allergico alle proteine del latte vaccino, la possibilità di acquisire la tolleranza negli anni successivi tenderà a diminuire man mano che aumenta l'età. Per questi bambini l'unica terapia correntemente accettata è quindi la dieta di eliminazione, che riduce però moltissimo la qualità di vita, poiché le proteine del latte vaccino sono presenti in moltissimi prodotti alimentari di grande distribuzione e perché ai soggetti cosiddetti "superallergici" talvolta è sufficiente a scatenare una reazione anafilattica grave anche la semplice bollitura del latte nella stanza dove si trovano o l'aver usato un cucchiaino contaminato di latte per la preparazione di un altro cibo privo di proteine di latte vaccino.

Bisogna sottolineare che è stato possibile avviare questo protocollo di desensibilizzazione orale al latte vaccino in soggetti che avevano anche

presentato reazioni allergiche talmente gravi da richiedere l'utilizzo dell'adrenalina intramuscolare, anche grazie alla possibilità di somministrare l'adrenalina per via aereosolica.

L'utilizzo dell'aerosol con adrenalina ha un ruolo ben riconosciuto in letteratura solo nel trattamento del laringospasmo o croup<sup>58</sup> (quindi un laringospasmo di origine infiammatoria su base infettiva) e non per reazioni allergiche. Solo recentemente le ultime linee guida internazionali per il trattamento delle reazioni anafilattiche ha previsto la possibilità della somministrazione di adrenalina per via aerosolica in caso di persistenza dei sintomi respiratori ma solo dopo aver già effettuato una somministrazione intramuscolare di adrenalina<sup>59</sup>.

Nel 2000 Simons e collaboratori<sup>60</sup> avevano effettuato uno studio preliminare somministrando l'adrenalina per via inalatoria con uno spray pressurizzato, su un campione di 19 bambini con storia di anafilassi. Di fatto il problema che era stato rilevato era che le inalazioni di spray che dovevano fare i bambini per poter avere una risposta clinica erano da 10 a 15 e solo 2 bambini erano riusciti a completare la dose che serviva, tant'è che le concentrazioni ematiche di adrenalina non erano aumentate rispetto al gruppo di controllo in cui era stato somministrato placebo.

La somministrazione per via aereosolica dell'adrenalina, invece, ha un'ottima maneggevolezza, Inoltre, considerando il fatto che l'adrenalina blocca i recettori  $\alpha_1$  e  $\beta_2$  che attivano il meccanismo di broncostruzione, il suo uso proprio per via aereosolica è logico. Infatti le reazioni anafilattiche ad esito infausto in età pediatrica sono sempre legate ad un meccanismo di broncostruzione (di fatto sono pazienti asmatici), e non legate ad un meccanismo ipotensivo come nell'adulto<sup>61</sup>. In ogni caso una piccola quota dell'adrenalina aereosolica arriva ad essere assorbita per via sistemica (è stato calcolato fino ad un massimo di 10% della dose).

Inoltre la somministrazione per via aereosolica dell'adrenalina permette comunque, in caso di fallimento, di poter successivamente comunque somministrare l'adrenalina per via sistemica.

Infatti in quei soggetti definiti "superallergici", quelli cioè che manifestano gravi reazioni anafilattiche (grado 3 e 4) in caso di minimo contatto con l'allergene, che può portare a possibili reazioni fatali, l'unica ancora di salvezza in caso di contatto accidentale a domicilio è avere a disposizione l'adrenalina intramuscolare<sup>62</sup>. La popolazione di questo studio in media aveva un RAST di classe 5 (quindi molto elevati), che è predittivo di gravi reazioni allergiche.

Sorprendentemente invece la somministrazione di adrenalina per via intramuscolare in questa casistica è stata davvero marginale. Solo 5 pazienti hanno ricevuto infatti l'adrenalina intramuscolare e fortunatamente nessuno di questi è stato sottoposto a manovre rianimatorie. Tutti e 5 i pazienti avevano ricevuto prima una sola somministrazione di adrenalina in aereosol.

In letteratura è noto che l'uso corretto EpiPen (adrenalina i.m. pronta all'uso) avviene solo in un terzo dei pazienti che l'hanno avuta in prescrizione; un terzo dei pazienti invece, non la sa usare e un terzo di loro ha paura di usarla.

Purtroppo spesso questo timore è anche tipico dei medici, che sono spaventati dei possibili effetti collaterali<sup>63</sup> e a ciò si aggiunge che pochi sanno riconoscere la potenziale gravità dei sintomi allergici<sup>64</sup>.

Di fatto i 5 pazienti che hanno ricevuto la somministrazione intramuscolare di adrenalina sono tutti desensibilizzati nei primi 4 anni di esperienza (2001-2004). Negli anni successivi non c'è stata nessuna somministrazione intramuscolare, anche se il numero di desensibilizzazioni è maggiore (152 desensibilizzazioni con 81 aereosol di adrenalina nel periodo 2001-2004 contro le 54 desensibilizzazioni con 48 aereosol con adrenalina nel periodo 2001-2004). Questo potrebbe essere dovuto al fatto che i medici sono diventati più esperti sia a gestire l'aereosol con adrenalina o che comunque è stata presa



maggior dimestichezza con le reazioni in corso di desensibilizzazione, come è naturale che sia dopo che una fase iniziale di rodaggio per un protocollo così specifico ed innovativo.

In conclusione, questa esperienza di desensibilizzazione orale è stata possibile solo grazie alla possibilità di somministrare l'adrenalina per via aereosolica, infatti se tutti i pazienti che hanno presentato reazioni che sono state trattate e risolte con l'aerosol fossero stati trattati con adrenalina intramuscolare, avrebbero dovuto sospendere la desensibilizzazione.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bruijnze-Koomen C, Ortolani C, Aas K, Bindsle-Jensen C, Bjonstén B, Momeret Vautrin D, Wutrich B: *Adverse reaction to food. Position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology*. Allergy 1995; 50:623-35
2. Sampson HA: *Food Allergy, part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders*. J Allergy Clin Immunol 1999; 103:718-28
3. Arne Host, MD, DMCs: *Frequency of cow's milk allergy in childhood*. Ann Allergy Asthma Immunol 2002; 89(suppl):33-37
4. Mayer L: *Mucosal Immunity*. Pediatrics 2003; 111:1595-600
5. Wells HG, Osborne TB: *The biological reaction of the vegetable protein. I. Anaphylaxis*. J Infect Dis 1911; 8:66-124
6. Strobel S, Mowat AM: *Immune response to dietary antigens: oral tolerance*. Immunol Today 1998; 19:173-81
7. Schwartz RH: *Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4 and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy*. Cell 1992; 71:1065-8
8. Weiner HL: *Induction and mechanism of action of transforming growth factor- $\beta$  secreting Th-3 regulatory cells*. Immunol Rev 2001; 182:207-13

9. Roux ME, McWilliams M, Phillips-Quagliata JM, Lamm ME: *Differentiation pathway of Peyer's patch precursors of IgA plasma cells in the secretory immune system.* Cell Immunol 1981; 61:141-53
10. Kim PH, Kagnoff MF: *Transforming growth factor- $\beta$ 1 is a costimulator for IgA production.* J Immunol 1990; 144:3411-6
11. Viney JL, Mowat AM, O'Malley JM, Williamson E, Fanger NA: *Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance.* J Immunol 1998; 160:5815-25
12. Scott H., Solheim BG, Brandtzaeg P, Thorsby E: *HLA-DR-like antigen in the epithelium of the human small intestine.* Scand J Immunol 1980; 12:77-82
13. Mayer L, Shlien R: *Evidence for function of Ia molecules on gut epithelial cells in man.* J Exp Med 1987; 166:1471-83
14. Mayer L, Eisenhardt D: *Lack of induction of suppressor T cells by intestinal epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease.* J Clin Invest 1990; 86:1255-60
15. Dupont C, Barau E, Molkhov P, Raynaud F, Barbet JP, Dehennin L: *Food-induced alterations of intestinal permeability in children with cow's milk-sensitive enteropathy and atopic dermatitis.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 1989; 8:459-65

16. Fasano A. *Physiological, pathological, and therapeutic implications of zonulin-mediated intestinal barrier modulation: living life on the edge of the wall.* Am J Pathol. 2008 Nov;173(5):1243-52. 2008 Oct 2
17. Friedman A, Weiner HL: *Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage.* Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:6688-92
18. Strober W, Kelsall B, Fuss I, Marth T, Ludviksson B, Ehrhardt R, Neurath M: *Reciprocal IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  responses regulate the occurrence of mucosal inflammation.* Immunol 1997; 18: 61-61
19. Beyer K, Castro R, Bimbaum A, Benkov K, Pittman N, Sampson HA: *Human milk-specific mucosal lymphocytes of the gastrointestinal tract display a Th-2 cytokine profile.* J Allergy Clin Immunol 2002; 109:707-13
20. Garside P, Mowat M, Khoruts: *Oral tolerance in disease.* Gut 1999; 44:137-142
21. Frossard CP, Tropia L, Hauser C, Eigenmann PA: *Lymphocytes in Peyer patches regulate clinical tolerance in a murine model of food allergy.* J Allergy Clin Immunol 2004; 113:958-64
22. Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P: *Allergen-responsive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy.* J Exp Med 2004; 199:1679-88

23. Weiner HL: *Induction and mechanism of action of transforming growth factor- $\beta$  secreting Th-3 regulatory cells*. Immunol Rev 2001; 182:207-13
24. Jarret EE: *Perinatal influences on IgE responses*. Lancet 1984; 2:797-9
25. Saarinen KM, Savilahti E: *Infant feeding patterns affect the subsequent immunological features in cow's milk allergy*. Clin Exp Allergy 2000; 30:400-6
26. Smith KM, Eaton AD, Finlayson LM, Garside P: *Oral tolerance*. American J Respiratory and Critical Care Medicine 2000; 162:5175-8
27. Vila L, Beyer K, Jarvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Sampson HA: *Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy*. Clin Exp Allergy 2001; 31:1599-606
28. Chatchatee P, Jarvinen KM, Bardina L, Beyer K, Sampson HA: *Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on *as1*-caseina: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy*. J Allergy Clin Immunol 2001; 107:179-83
29. Strobel S, Ferguson A: *Immune responses to fed protein antigens in mice. Systemic tolerance or priming is related to age at which antigen is first encountered*. Pediatric Res 1984; 18:588-94
30. Bjorkesten B, Sepp E, Jugle K, Voor T, Mikelsaar M: *Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life*. J Allergy Clin Immunol 2001; 108:516-20

31. Wold E: *The hygiene hypothesis revised: is the rising frequency of allergy due to changes in the intestinal flora?* Allergy 1998; 53:20-5
32. Viswanathan VK, Hecht G: *Innate immunity and the gut.* Curr Opin Gastroenterol 2000; 16:546-51
33. Sampson HA, Metcalfe DD: *Food Allergy.* JAMA 1992; 268:2840-4
34. Host A: *Cow's milk protein allergy and intolerance in infancy. Some clinical, epidemiological and immunological aspects.* Pediatr Allergy Immunol 1994; 5(Suppl):1-36
35. Johansson SGO, O'B Hourihane J, Buosquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haatela T, Kowalski ML, Mygind N, Ring J, Van Cauwenberge P, Van Hage-Hamsten M, Wuthrich B: *A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force.* Allergy 2001; 56:813-24
36. Ewan PW: *Anaphylaxis.* BMJ 1998; 316:1442-5
37. Sampson HA: *Anaphylaxis and emergency treatment.* Pediatrics 2003; 111 Suppl 6:1601-8
38. Shimamoto SR, Bock SA: *Update on the clinical features of food-induced anaphylaxis.* Curr Opin Allergy Clin Immunol 2002; 2(3):211-6
39. Pastorello EA, Ortolani C, Ferioli L, Pravettoni V, Ispano M, Borga A, Bengtsson A, Incorvaia C, Berti C, Zanussi C: *Allergenic cross-reactivity among*

*peach, apricot, plum and cherry in patients with oral allergy syndrome: an in vivo and in vitro study.* J Allergy Clin Immunol 1994; 94:699-707

40. Ebner C, Hirschwehr R, Bauer L, Breiteneder H, Valenta R, Ebner H, Kraft D, Scheiner O: *Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v1 and Bet v2 (birch prpfilin).* J Allergy Clin Immunol 1995; 95:962-9

41. Sporik R, Hill D.J, Hosking C.S: *Specificity of allergen skin testing in predicting positive open food challenges to milk, egg and peanut in children.* Clin Exp Allergy 1999; 30:1540-6

42. Sampson H.A, Ho D.G: *Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents.* J Allergy and Clinical Immunology 1997; 100:444-51

43. Ballardini N, Nilsson C, Nilsson M, Lilja G: *ImmunoCAP™ Phadiatop Infant - a new blood test for detecting IgE sensitisation in children at 2 years of age.* Allergy 2006; 61:337-343

44. Barinaga MW: *"DNA chip" speed genome initiative.* Science 1991; 253: 1489

45. Lueking A, Horn M, Eickhoff H, Bussow K, Lehrach H, Walter G: *Protein microarrays for gene expression and antibody screening.* Anal Biochem 1999; 270:103-11.

46. Hiller R, Laffer S, Harwanegg C, et al: *Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment*. FASEB J. 2002; 16:414-6
47. Valenta R: *The future of antigen-specific immunotherapy of allergy*. Nat Rev Immunol. 2002; 2:446-53
48. Pittner G, et al: *Component-resolved diagnosis of house-dust mite allergy with purified natural and recombinant mite allergens*. Clin Exp Allergy 2004; 34:597-603
49. Novembre E, Ventura A: *Diagnosi di allergia alimentare; da atti del Congresso "Confronti in Pediatria"*. Medico e Bambino 1992; 2:122-7
50. Troncone R, Caputo N: *La diagnosi di laboratorio dell'allergia alimentare*. Medico e Bambino 1998; 2:90-2
51. Sampson HA: *Food Allergy, part 2: diagnosis and management*. J Allergy Clin Immunol 1999; 103:981-9
52. David TJ: *Anaphylactic shock during elimination diets for severe atopic eczema*. Archives of Disease in Childhood 1984; 59:983-6
53. Miller JB: *A double-blind study of food extract injection therapy: a preliminary report*. Ann Allergy 1977; 38:185-191



54. Oppenheimer JJ, Nelson HS, Bock SA, Christensen F, Leung DYM. *Treatment of peanut allergy with rush immuno-teraphy*. J Allergy Clin Immunol 1992; 90:256-262
55. Patriarca G, Schiavino D, Nucera E, Schinco G, Milani A, Gasbarrini GB: *Food allergy in children: results of a standardized protocol for oral desensitization*. Hepato-Gastroenterol 1998; 45
56. Nucera E, Patriarca G: *Immunological Aspects of Oral Desensitization in Food Allergy*. Digestive Diseases and Sciences 2000; 45:637-41
57. De Boissieu D, Dupont C: *Sublingual immunotherapy for cow's milk protein allergy: a preliminary report*. Allergy Net 2006; 61:1238-1239
58. Muraro A, Roberts G, Clark A, Eigenmann PA, Halcken S, Lack G, Moneret-Vautrin A, Niggemann B, Rancé F; EAACI Task Force on Anaphylaxis in Children. *The management of anaphylaxis in childhood: position paper of the European academy of allergology and clinical immunology*. Allergy. 2007 Aug;62(8):857-71. Epub 2007 Jun 21
59. Borland ML, Babl FE, Sheriff N, Esson AD *Croup management in Australia and New Zealand: a PREDICT study of physician practice and clinical practice guidelines*. Pediatr Emerg Care. 2008 Jul;24(7):452-6
60. Simons FE, Gu X, Johnston LM, Simons KJ. *Can epinephrine inhalations be substituted for epinephrine injection in children at risk for systemic anaphylaxis?* Pediatrics. 2000 Nov;106(5):1040-4

61. Lack G *Clinical practice. Food allergy.* N Engl J Med. 2008 Sep 18;359(12):1252-60.

62. Shah E, Pongracic J *Food-induced anaphylaxis: who, what, why, and where?* Pediatr Ann. 2008 Aug;37(8):536-41.

63. Sam Mehr, Marnie Robinson, Mimi Tang *Doctor - How do I use my EpiPen?* Ped All Immun 2007; 18; 448-452

64. Sampson HA, Mendelson L, Rosen JP. *Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents.* NEJM. 1992 Aug 6;327(6):380-4.

## INDICE

ALLERGIA ALIMENTARE	1
TOLLERENZA ORALE	4
CLASSIFICAZIONE DELLE ALLERGIE ALIMENTARI	16
CLINICA DELL'ALLERGIA ALLE PROTEINE DEL LATTE VACCINO	19
ANAFILASSI ALIMENTARE	21
DIAGNOSI DELL'ALLERGIA ALLE PROTEINE DEL LATTE VACCINO	26
TRATTAMENTO DELL'ALLERGIA ALLE PROTEINE DEL LATTE VACCINO	35
OBIETTIVI	43
MATERIALI E METODI	44
RISULTATI	49
DISCUSSIONE	53
BIBLIOGRAFIA	57