

**DIAGNOSI DI LABORATORIO DELLE
REAZIONI AVVERSE AD ALIMENTI
METODICHE A CONFRONTO**

M.Ruffelli , O.De Pità

Laboratorio di Allergologia e Immunologia
Istituto Dermatologico dell'Immacolata – IDI- IRCCS Roma

Introduzione

Negli ultimi anni le allergie alimentari sono andate assumendo sempre maggior interesse e sono divenute più frequenti, anche in conseguenza delle variazioni che si sono verificate nell'ambito delle abitudini alimentari, con particolare riguardo al mondo occidentale.

L'allergia alimentare (Campisi e Di Liberto, 2003; Moneret-Vautrin e Morisset, 2005) rappresenta, tuttavia, un problema di difficile valutazione, soprattutto perché risulta spesso sovrastimata. Le reazioni gravi da allergia alimentare sono in effetti abbastanza rare anche se la loro prevalenza sta aumentando e stime europee indicano che nella popolazione generale adulta la frequenza si aggiri intorno all'1-2% (Molckhou, 2005).

Gli alimenti, stimolando la produzione di IgE specifiche verso antigeni proteici, determinano la comparsa di manifestazioni cliniche polimorfe che possono coinvolgere diversi organi. La conseguenza più temibile dell'allergia alimentare è l'anafilassi che può essere scatenata anche da minime quantità di alimento. I quadri clinici più frequenti (Fontana et al., 2005) sono rappresentati da:

- sindrome orale allergica (SOA)
- manifestazioni intestinali
- manifestazioni cutanee (orticaria acuta e angioedema)

Molta confusione esiste ancora oggi circa il concetto di allergia e quello di intolleranza alimentare (Crespo et al., 2004) anche se, già nel 1994 l'European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) ha proposto una classificazione basata sui meccanismi patogenetici e che distingue le reazioni tossiche (gastroenteriti da tossine batteriche, intossicazioni da funghi) da quelle non tossiche, suddivise a loro volta in immunomediate (allergie alimentari propriamente dette) e non immunomediate (intolleranze alimentari).

In realtà tra le reazioni non tossiche immunomediata vanno considerate non solo quelle mediate dalle IgE, ma anche quelle il cui meccanismo immunologico è di tipo IgG mediato (Mills e Breiteneder, 2005).

Sembra inoltre che la sensibilizzazione IgG mediata ad allergeni alimentari nella prima infanzia possa essere indicativa di un aumentato rischio futuro di sensibilizzazione IgE specifica ad allergeni inalanti (Eysink et al., 1999) e pertanto la valutazione delle IgG specifiche potrebbe rivelarsi utile non solo nell'ambito di una diagnosi di allergia alimentare ma anche per la valutazione del rischio di allergia IgE mediata.

Un altro aspetto interessante riguarda il ruolo delle IgG specifiche quale marker di una alterata permeabilità della mucosa intestinale conseguente a malattie infiammatorie croniche intestinali e/o a malassorbimento intestinale (Lea e Whorwell, 2005; Zar et al., 2005). Diversi studi hanno infatti dimostrato che, in pazienti con sindrome dell'intestino irritabile, una dieta di esclusione formulata sulla base della presenza di IgG specifiche per determinati alimenti porta ad un significativo miglioramento della sintomatologia rispetto a quelli sottoposti invece a dieta di eliminazione solo di quegli alimenti ritenuti particolarmente allergenici (Atkinson et al., 2004; Whorwel et al., 2005). Alla luce di queste conoscenze appare evidente come il dosaggio delle IgG specifiche possa rivelarsi uno strumento utile per stabilire le sensibilità agli alimenti in pazienti da sottoporre a dieta di eliminazione quale terapia efficace nel controllo della sintomatologia clinica (Senna et al., 2002). A tale scopo risulta interessante individuare sistemi diagnostici in vitro affidabili e riproducibili per il dosaggio sierico della concentrazione delle IgG circolanti specifiche per i singoli allergeni alimentari.

Materiali e metodi

In questo lavoro abbiamo voluto mettere a confronto i risultati ottenuti utilizzando un test in immunoenzimatica per il dosaggio delle IgG specifiche circolanti (James, 1999; Herman e Drost, 2004) con quelli avuti, invece, utilizzando una metodica di citotossicità (Bryan e Bryan, 1969; Terr, 1983). Il test di citotossicità si basa sul presupposto che, l'aggiunta in vitro di uno specifico allergene al sangue intero o a sospensioni leucocitarie determina, in soggetti sensibilizzati, modificazioni morfologiche e quantitative dei leucociti, fino alla completa citolisi, ritenendo pertanto che tale situazione possa essere indicativa di Reazione Avversa all'alimento considerato. Per questo studio sono stati arruolati 190 pazienti adulti (età compresa tra i 18 e i 60 anni) con manifestazioni cliniche ritenute indicative di possibile intolleranza alimentare, quali orticaria, disturbi intestinali, gonfiore addominale e cefalea, con lo scopo di valutare la presenza nel siero di IgG specifiche per alimenti. A tal fine è stata utilizzata una metodica in immunoenzimatica, che ha

permesso di cimentare il siero di ciascun paziente con un pannello prestabilito di 40 alimenti (Tab 1). Tutti i campioni nei quali si è riscontrata la presenza di IgG specifiche sono stati testati anche per le IgE specifiche allo/agli stessi alimenti, per escludere una reazione allergica di tipo IgE mediata.

Inoltre, tra gli stessi pazienti del primo gruppo di studio sono stati selezionati 30 soggetti da sottoporre anche ad un prelievo di sangue in citrato di sodio al 3,8% sul quale eseguire, in parallelo al dosaggio delle IgG specifiche in immunoenzimatica, il test di intolleranza alimentare con il metodo citotossico utilizzando il pannello di screening riportato in Tab. 2.

Risultati

Dei 190 pazienti esaminati con la metodica in immunoenzimatica, 51 sono risultati completamente negativi a tutti gli alimenti del pannello, mentre, tra i 139 positivi, 42 erano monosensibili e pertanto presentavano positività per un singolo allergene; gli altri 97 soggetti sono, invece, risultati polisensibili (Tab 3). Dall'osservazione della casistica totale, inoltre, si è visto come alcuni degli allergeni risultino più ampiamente rappresentati, sia come numero che come classe di positività e questo appare evidente in particolar modo per il latte e l'albume (Tab 4).

I 30 campioni testati con la metodica citotossica hanno dato tutti positività per 1 o più allergeni e anche in questo caso alcuni degli alimenti sono risultati maggiormente sensibilizzanti rispetto agli altri.

Dall'analisi dei dati ottenuti abbiamo constatato che le due metodiche, soprattutto per alcuni allergeni quali il latte, l'albume e l'avena hanno dimostrato un buon indice di concordanza (92 – 97%), anche se c'è da segnalare che non tutte le sostanze presenti nel pannello del test in immunoenzimatica sono poi comprese in quello utilizzato per il test in citotossicità; questo riguarda, comunque in gran parte sostanze alle quali non è riconosciuto un elevato grado di allergenicità.

Discussione e conclusioni

Dai dati emersi da questo studio si evince che nell'ambito dell'allergia alimentare, accanto a test di ormai indiscussa validità diagnostica, si senta sempre più la necessità di affiancare metodiche complementari che possano essere di supporto nel chiarire i possibili fattori eziologici e le diverse situazioni patologiche causa di Reazioni Avverse agli alimenti (Beyer e Teuber, 2005). Per quanto concerne le IgG specifiche alimentari sarebbe auspicabile riuscire a chiarire se il loro livello in circolo possa essere considerato solo un indice di esposizione cronica all'allergene o se, invece, sia

da ritenersi la causa della sintomatologia clinica stessa. La presenza di IgG specifiche, probabilmente, non è espressione di malattia ma può essere considerato marker di una alterata permeabilità della mucosa conseguente a patologie infiammatorie croniche intestinali, allergie alimentari e malassorbimento intestinale (Isolauri et al., 2004).

Nell'intento di riuscire a chiarire l'importanza, da un punto di vista clinico, di avere a disposizione un dato di laboratorio circa la presenza di IgG specifiche verso gli alimenti, alcuni dei pazienti inseriti nello studio e in particolare quelli risultati monosensibili o con una positività per un massimo di tre allergeni sono stati sottoposti a dieta di eliminazione per un periodo complessivo di tre mesi. Al successivo controllo si è visto che al miglioramento della sintomatologia clinica iniziale non si associava, in realtà, nessuna variazione circa la presenza delle IgG specifiche, così come non si riscontrava una diminuzione delle classi di positività. Probabilmente un più lungo follow-up potrebbe mettere in evidenza una normalizzazione del dato di laboratorio, tale da poter essere meglio correlato al miglioramento della sintomatologia.

Per quanto riguarda le metodiche prese in considerazione nel nostro studio, inoltre, ci sembra di poter affermare che alcuni allergeni necessitano probabilmente di ulteriori standardizzazioni nella preparazione degli estratti per ridurre al minimo la loro aspecificità.

Sembra comunque che, l'utilizzo di tali test nello studio per l'inquadramento di pazienti con Reazioni Avverse agli alimenti possa essere visto nell'ottica di individuare meccanismi di ipersensibilità agli alimenti dovuti ad una alterata permeabilità e funzionalità della barriera intestinale e che possa avere un possibile ruolo predittivo di allergia IgE mediata ad inalanti con la finalità di risparmiare al paziente una eventuale terapia farmacologica.

Ministero della Sanità

SERVIZIO PER LA VIGILANZA SUGLI ENTI

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS – 2004

ISTITUTO: Istituto Dermopatico dell'Immacolata - Via dei Monti di Creta, 104 Roma

LINEA DI RICERCA N°: 3 – Dermatosi immunomediate

Progetto 3.5 Allergie alimentari: validazione dell'iter diagnostico – codice obiettivo 2581

Obiettivi

Verranno reclutati pazienti con anamnesi suggestiva di allergia alimentare.

Con l'obiettivo di individuare un corretto iter diagnostico, i pazienti saranno sottoposti a skin prick test, a prelievo per il dosaggio sierico di IgE totali e specifiche tramite metodica fluoroimmunoenzimatica

Sarà inoltre valutata l'attendibilità diagnostica di alcune metodiche di recente introduzione nella diagnostica delle allergie alimentari quali il dosaggio sierico di IgG specifiche in immunoenzimatica

Altri obiettivi saranno

1. **analisi retrospettiva** di un campione di 200 pazienti per anno (decennio 1993-2002) affetti da allergia alimentare che abbiano eseguito test diagnostici in vivo e/o in vitro
Valutazione in percentuale dei pazienti monosensibili rispetto ai polisensibili verificando nel corso degli aa la comparsa di nuove sensibilizzazioni
2. Riscontro di **associazioni prevalenti** tra i vari allergeni nei pazienti polisensibili

Tabella 1 – Alimenti presenti nel pannello utilizzato per lo screening delle IgG specifiche in immunoenzimatica


Mais
Avena
Riso
Segale
Frumento
Latte di mucca
Albume
Tuorlo
Mix pesce
(*merluzzo, eglefino, platessa*)
Mix crostacei
(*granchio, aragosta, gamberetto*)
Carota
Mix legumi
(*fagioli, fagioli bianchi, soia, piselli*)
Mix brassicacee
(*cavolo, broccoli, cavolfiore*)
Patata
Mela e pera
Mix frutti di bosco
(*lampone, fragola, mora*)
Mix agrumi
(*arancia, limone, pompelmo*)
Mix frutta secca
(*mandorla, anacardio, nocciola, arachide*)
Lievito (del pane e di birra)
Pollo e tacchino
Maiale

Tabella 2 – Alimenti presenti nel pannello utilizzato per lo screening delle IgG specifiche con metodica citotossica su vetrino (kit fornito dalla I.C.T. s.r.l. – Roma)

vetrino n. 1	<i>grano tenero</i>	<i>grano duro</i>	<i>lievito</i>
vetrino n. 2	<i>riso</i>	<i>mais</i>	<i>soia</i>
vetrino n. 3	<i>latte albumina</i>	<i>latte caseina</i>	<i>bovini</i>
vetrino n. 4	<i>tuorlo</i>	<i>albume</i>	<i>pollo</i>
vetrino n. 5	<i>maiale</i>	<i>coniglio</i>	<i>zucchero</i>
vetrino n. 6	<i>pomodoro</i>	<i>patata</i>	<i>carciofo</i>
vetrino n. 7	<i>fagioli</i>	<i>piselli</i>	<i>oliva</i>
vetrino n. 8	<i>tonno</i>	<i>gamberi</i>	<i>carota</i>
vetrino n. 9	<i>caffè</i>	<i>thè</i>	<i>cacao</i>
vetrino n. 10	<i>mela</i>	<i>banana</i>	<i>arancia</i>
vetrino n. 11	<i>limone</i>	<i>ananas</i>	<i>uva</i>
vetrino n. 12	<i>fragola</i>	<i>ciliegia</i>	<i>pesca</i>
vetrino n. 13	<i>mandorla</i>	<i>noce</i>	<i>camomilla</i>
vetrino n. 14	<i>orzo</i>	<i>grano saraceno</i>	<i>lenticchie</i>
vetrino n. 15	<i>aglio</i>	<i>trota</i>	<i>salmone</i>
vetrino n. 16	<i>merluzzo</i>	<i>tacchino</i>	<i>cipolla</i>
vetrino n. 17	<i>peperoni</i>	<i>cavolfiore</i>	<i>cicoria</i>

Tabella 3 – Risultati dello screening immunoenzimatico per IgG specifiche alimentari nei pazienti considerati per lo studio

- 139 pazienti positivi per IgG specifiche
(42 monosensibili e 97 polisensibili)
- 51 pazienti negativi



n=65	Latte	21/65 monosensibili
n=39	Albume	4/39 monosensibili
n=31	Noci-nocciole	3/31 monosensibili
n=25	Mix agrumi	8/25 monosensibili
n=17	Avena	6/17 monosensibili
n=18	Lievito di birra	polisensibili
n=6	Patata	polisensibili
n=5	Ananas	polisensibili
n=3	Pomodoro	polisensibili

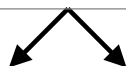
Tabella 4 – Distribuzione per classi e prevalenza degli alimenti maggiormente rappresentati nei campioni positivi al test immunoenzimatico per IgG specifiche

<i>Alimenti</i>	<i>Classe 1</i>	<i>Classe 2</i>	<i>Classe 3</i>
Latte	12	29	24
Albume	14	18	7
Mix agrumi	14	5	6
Avena	9	6	2
Noci	15	14	2
Patata	2	3	1
Lievito	8	6	4
Ananas	4	1	
Pomodoro	2		1

Campione di 30 pazienti con manifestazioni cliniche orticaria, disturbi intestinali, gonfiore addominale, cefalea

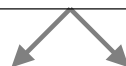
valutazione in parallelo di
IgG specifiche e Test di citotossicità

IgG specifiche



2/26 (8%) monosensibili
(latte o albume)
24/26 (92%) polisensibili

Test citotossicità



1/30 (3%) monosensibile
(albume)
29/30 (97%) polisensibili

IgG specifiche e Test di citotossicità
*Allergeni maggiormente rappresentati
 nei pazienti polisensibili*

<p>↑ IgG specifiche</p> <p>Latte</p> <p>Avena</p> <p>Albume</p> <p>Agrumi</p> <p>Noci-nocciole</p> <p>Lievito</p> <p>Riso</p>	<p>↑ Test citotossicità</p> <p>Latte</p> <p>Avena</p> <p>Albume</p> <p>Riso</p> <p>Lievito</p> <p>Agrumi</p> <p>Frutta secca</p> <p>Soia</p> <p>Gambero</p>
---	---

*Latte, albume, avena
 (92 - 97 % di concordanza)*

10/30 pazienti
 valutati per IgG specifiche e Test di citotossicità
 sono stati dosati e confrontati i livelli di IgG4 specifiche

	<i>IgG</i>	<i>IgG4</i>	<i>Test citotossicità</i>
<i>Latte</i>	7/10	5/10	10/10
<i>Albume</i>	6/10	9/10	8/10
<i>Lievito</i>	3/10	4/10	9/10
<i>Frutta secca</i>	6/10	5/10	7/10

Avena e mix agrumi
 non considerati per la loro possibile aspecificità

Conclusioni e prospettive

Da tali risultati preliminari, che necessitano di essere validati su una più ampia casistica comprendente anche la popolazione sana di controllo, si può evincere che

Buona concordanza tra le metodiche
(>90%)
soprattutto se riferita ad alcuni
particolari allergeni
(*latte, albume*)

*Altri allergeni, necessitano di ulteriori standardizzazioni
nella preparazione degli estratti, data la notevole
aspecificità riscontrata nello studio*

IgG4 specifiche

il dosaggio sembra risultare particolarmente utile nel caso di reazione avversa all'albumine, in quanto in grado di evidenziare positività significative anche in pazienti sintomatici con IgG specifiche negative

Test di Citotossicità

sembra avere una sensibilità superiore ai test immunoenzimatici, osservabile per tutti gli allergeni considerati.

risulta quindi di estrema importanza, per il corretto utilizzo clinico del dato di laboratorio, indicare il grado di reazione cellulare evidenziato alla lettura

(come suggerito del resto dagli stessi produttori)

*possibile utilizzo dei tests valutati
nello studio per l'inquadramento del
paziente con reazioni avverse agli alimenti
nell'ottica di individuare*

*Meccanismi di ipersensibilità agli alimenti dovuti ad una
alterata permeabilità e funzionalità della barriera intestinale*

*Un possibile ruolo predittivo di allergia (IgE-mediata)
ad inalanti ai fini del risparmio della terapia farmacologica*

BIBLIOGRAFIA

1. Atkinson W., Sheldon T.A., Shoath N., Whorwell P.J. (2004). Food elimination based on IgG antibodies in irritable bowel syndrome: a randomised controlled trial. *Gut*, 53, 1459-1464.
2. Beyer K., Teuber SS. (2005). Food allergy diagnostics: scientific and unproven procedures. *Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.*, 5 (3), 261-266.
3. Bryan WTK., Bryan MP. (1969).Cytotoxic reactions on the diagnosis of food allergy. *Laryngoscope*, 79, 1453-1472.
4. Campisi G., Di Liberto C. (2003). Food allergy in oral medicine. A review of the literature. *Minerva Stomatol.* 52 (7-8), 351-363.
5. Crespo JF., James JM., Rodriguez J. (2004). Diagnosis and therapy of food allergy. *Mol. Nutr. Food Res.* 48 (5), 347-355.
6. Eysink PE., De Jong MH., Bindels PJ., Scharp-Van Der Linden VT., De Groot CJ., Stapel SO., Aalberse RC. (1999). Relation between IgG antibodies to foods and IgE antibodies to milk, egg, cat, dog and/or mite in a cross-sectional study. *Clin. Exp. Allergy* 29 (5), 604-610.
7. Fontana M., Spertini F., Bart PA., Leimgruber A. (2005). Oral allergy syndrome and food allergy. *Rev. Med. Suisse* 13 (15), 1013-1017.
8. Herman PM., Drost LM. (2004). Evaluating the clinical relevance of food sensitivity tests: a single subject experiment. *Altern. Rev. Med.* 9 (2), 198-207.
9. Isolauri E., Rautava S., Kalliomaki M. (2004). Food allergy in irritable bowel syndrome: new facts and old fallacies. *Gut* 53 (10),1391-1393.
10. James M. (1999). Toward an understanding of allergy and in vitro testing. *Nat. Med. Journal* 2(4), 7-15.
11. Lea R., Whorwell PJ. (2005). The role of food intolerance in irritable bowel syndrome. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* 34 (2), 247-255.
12. Mills EN., Breiteneder H. (2005). Food allergy and its relevance to industrial food proteins. *Biotechnol. Adv.* 23(6), 409-414.
13. Molkhou P. (2005). Epidemiology of food allergies. *Rev. Infirm.* 111, 24-27.
14. Moneret-Vautrin DA., Morisset M. (2005). Adult food allergy. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 5 (1), 80-85.
15. Senna G., Gani F., Leo G., Schiappoli M. (2002). Alternative tests in the diagnosis of food allergies. *Recenti Prog. M.* 93 (5). 327-334.
16. Terr AI. (1983). The cytotoxic test. *West J. Med.* 139(5), 702-703.
17. Whorwell PJ, Bentley KJ, Atkinson W., Sheldon TA. (2005). IgG antibodies to foods in IBS. *Gut*, 54 (8), 1204.
18. Zar S., Benson MJ., Kumar D. (2005). Food-Specific Serum IgG4 and IgE Titers to Common Food Antigens in Irritable Bowel Syndrome. *Am.J. Gastroenterol.* 100 (7), 1550-1557.