

# Annali italiani di Dermatologia allergologica *clinica e sperimentale*

SOTTO GLI AUSPICI DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI DERMATOLOGIA ALLERGOLOGICA PROFESSIONALE E AMBIENTALE

ANNO 66, NUMERO 2, MAGGIO-AGOSTO 2012

CO-DIRETTORI: PAOLO LISI  
LUCA STINGENI



Monte Meru Editrice



Università degli Studi di Napoli Federico II  
Dipartimento di Patologia sistematica  
Sezione di Dermatologia clinica, allergologica e venereologica

CORSO DI DERMATOLOGIA AMBIENTALE

# cute e clima

in occasione "save the world" e flash 3. fabiohouse@hotmail.it



**Napoli**  
**6-7 dicembre 2012**  
Centro Congressi Federico II  
via Partenope, 36

**presidente onorario**  
Fabio Ayala

**presidenti**  
Nicola Balato  
Cataldo Patruno

**comitato scientifico**  
Guido Barone  
Francesco Cusano  
Ornella De Pittà  
Giuseppe Monfrecola  
Andrea Peserico  
Paolo Pigatto  
Andrea Romani

**segreteria scientifica**  
Anna Balato  
Luisa Di Costanzo  
Serena Lembo  
Maddalena Napolitano  
Orlando Zagaria

**contatti**  
tel. +39 081 5466062  
fax +39 081 7462442  
info@cuteclima.it  
www.cuteclima.it

**sede del corso**  
Centro Congressi Federico II  
via Partenope, 36  
80121 Napoli  
+39 081 2535706  
+39 081 2537395  
eventi@unina.it  
www.centrocongressi.unina.it

**segreteria organizzativa**  
SGC congressi  
via Salvo d'Acquisto, 73  
81031 Aversa (CE)  
tel. +39 0818154619  
fax +39 0815044177  
info@sgccongressi.it  
www.sgccongressi.it



# Annali italiani di Dermatologia allergologica

*clinica e sperimentale*

già *Annali Italiani di Dermatologia Clinica e Sperimentale*  
Sotto gli auspici della *Società Italiana di Dermatologia Allergologica, Professionale e Ambientale*

Quadrimestrale di Dermatologia clinica, allergologica, professionale e ambientale dell'Università degli studi di Perugia



Iscritto al Registro della stampa al n. 547 con ordinanza del Tribunale di Perugia in data 27 settembre 1978

#### Direzione editoriale

Monte Meru soc. coop.  
Via San Martino, 20  
06081 Assisi (PG), Italia  
Tel. amministrazione  
+39.075.8197105  
Fax: 178.227.7437  
e-mail: info@montemeru.it  
Internet: www.montemeru.it

#### Recensita in:

Faxon Finder,  
Faxon XPRESS,  
EMBASE / Excerpta Medica

#### Co-Direttori

Paolo Lisi (Perugia)  
Luca Stingeni (Perugia)

#### Comitato editoriale

Giovanni Angelini (Bari)  
Fabio Ayala (Napoli)  
David Basketter (London)  
Giuseppe De Panfilis (Parma)  
Caterina Foti (Bari)  
Margarida Gonçalo (Coimbra)  
An Goossens (Leuven)  
Jean-Pierre Lepoittevin (Strasbourg)  
Paolo Pigatto (Milano)  
Achille Sertoli (Firenze)  
Gino Antonio Vena (Bari)

#### Redattore capo

Katharina Hansel (Perugia)

#### Segreteria di redazione

Veronica Bellini (Perugia)  
Simona Pelliccia (Perugia)

#### Comitato scientifico

Nicola Balato (Napoli)  
Anna Belloni Fortina (Padova)  
Domenico Bonamonte (Bari)  
Andrea Cavani (Roma)  
Monica Corazza (Ferrara)  
Antonio Cristaudo (Roma)  
Paolo Fabbri (Firenze)  
Maria Laura Flori (Siena)  
Stefano Francalanci (Firenze)  
Rosella Gallo (Genova)  
Fabrizio Guarneri (Messina)  
Cataldo Patruno (Napoli)  
Luigi Rigano (Milano)  
Donatella Schena (Verona)  
Roberto Zerboni (Milano)

#### Pubblicità

Paolo Lisi (Perugia)

Finito di stampare  
nell'agosto 2012  
da Dimensione Grafica  
Spello (PG) - Italia

Centro di spesa: Dipartimento di Specialità medico-chirurgiche e Sanità pubblica, Sezione di Dermatologia clinica, allergologica e venereologica



Monte Meru Editrice

**Notizie amministrative****Abbonamenti 2012**

Per l'Italia:

- Privati..... € 50,00
- Istituti, Enti, Biblioteche..... € 85,00

Per l'estero

- Privati, Istituti, Enti, Biblioteche.....€ 100,00

L'abbonamento decorre da gennaio a dicembre. L'abbonato potrà far richiesta all'Editore di fascicoli non pervenuti o di quelli perduti per tardivo rinnovo dell'abbonamento; l'Editore corrisponderà le copie arretrate, senza alcuna spesa aggiuntiva, solo fino ad esaurimento delle scorte.

La rivista viene inviata gratuitamente a tutti i Soci SIDAPA in regola con la quota associativa annuale.

Richieste ed abbonamenti vanno inoltrati a Monte Meru soc. coop., via San Martino 20, 06081 Assisi (PG) Italia, indicando sempre, nella causale del versamento, la dicitura: Annali italiani di Dermatologia allergologica. Per ulteriori informazioni sugli abbonamenti telefonare al +39.075.8197105.

L'abbonamento può essere regolarizzato a mezzo assegno circolare, assegno di conto corrente, vaglia postale, versamento su c/c postale n. 30700058, bonifico bancario presso il Credito Cooperativo Cassa Rurale ed Artigiana di Spello e Bettona - Filiale di Passaggio di Bettona, abi 8871, cab 38291, c/c 007010006177 intestato a Monte Meru soc. coop.

**Privacy**

L'Editore si impegna a gestire i dati personali degli abbonati e i Soci SIDAPA con la massima riservatezza, secondo quanto disposto ai sensi del Dlgs 30 giugno 2003 n.196 e sue eventuali succes-

sive modifiche. In particolare, l'Editore si impegna a non cedere ad alcuno i dati trasmessi dagli abbonati e dai Soci SIDAPA e a non inviare loro proposte commerciali diverse da quella di rinnovo dell'abbonamento alla Rivista. Abbonati e Soci SIDAPA potranno in qualsiasi momento richiedere all'Editore la rettifica o la cancellazione dall'archivio. La cancellazione comporterà tuttavia l'impossibilità di procedere a nuovi invii della Rivista. Titolare del trattamento presso l'Editore è il Dott. Marco Fazion, coadiuvato quando necessario dalla responsabile, Valentina Baldini. Copia integrale del documento sulle procedure di privacy adottate da Monte Meru soc. coop. sarà disponibile, secondo quanto disposto dal Garante, per consultazione collettiva sul sito [www.montemeru.it](http://www.montemeru.it) al link privacy.

**Inserzioni pubblicitarie**

Le richieste vanno indirizzate al Dipartimento di Specialità medico-chirurgiche e Sanità pubblica dell'Università degli studi di Perugia, Sezione di Dermatologia clinica, allergologica e venereologica, nella persona del Prof. Paolo Lisi (tel: 075.5783881; fax: 075.5783452).

**Estratti**

Gli eventuali estratti, oltre ai 20 gratuiti, debbono essere richiesti all'atto del rinvio delle bozze e pagati in contrassegno sulla scorta della tariffa che l'Editore avrà preventivamente inviato all'Autore.

Per Enti, Istituti, Biblioteche, Ospedali, ASL è consentito il pagamento a ricevimento della fattura, ma dovrà essere inviato il relativo buono d'acquisto. Gli estratti verranno forniti dopo il saldo della fattura.

I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica, di riproduzione e di adattamento totale o parziale con qualsiasi mezzo (compresi i microfilm e le copie fotostatiche o la pubblicazione web) sono riservati per tutti i paesi. La violazione di tali diritti è perseguibile a norma di legge per quanto previsto dal Codice penale

## Contenuto

### Corso educazionale SIDAPA

#### LA DIAGNOSTICA ALLERGOLOGICA (Bari, 1 ottobre 2011)

Introduzione		
<i>Caterina Foti</i> .....	»	71
TEST DIAGNOSTICI NELLE REAZIONI DA IPERSENSIBILITA' IMMEDIATA		
<i>Moderatori: F. Ayala, P. Lisi, A. Vacca</i>		
Prick test		
<i>Eustachio Nettis, Anna Maria Aloia, Elisabetta Di Leo e Antonio Ferrannini</i> .....	»	73
RAST: applicazioni cliniche		
<i>Anna Balato, Nicola Balato, Matteo Megna, Angela Patrì, Annunziata Raimondo e Fabio Ayala</i> .....	»	76
Immunoblotting: laboratorio e applicazioni cliniche		
<i>Elisabetta Damiani, Anna Maria Aloia, Maria Giovanna Priore, Angela Pastore, Cristina Lippolis, Antonella Lovecchio, Luigi Macchia e Antonio Ferrannini.</i> .....	»	83
Diagnostica allergologica molecolare: microarray		
<i>Mauro Gianì</i> .....	»	86
Microarray: applicazioni cliniche		
<i>Paolo Daniele Pigatto e Samuele Burastero.</i> .....	»	89
Test diagnostici nelle reazioni da ipersensibilità immediata a farmaci: il test di attivazione dei basofili		
<i>Gennaro Maietta</i> .....	»	93
Reazioni di ipersensibilità immediata: test di esposizione orale nell'allergia alimentare		
<i>Francesca Giusti</i> .....	»	97
Test diagnostici nell'allergia ad imenotteri		
<i>Fabrizio Guarneri</i> .....	»	101
TEST DIAGNOSTICI NELLE REAZIONI DA IPERSENSIBILITA' RITARDATA		
<i>Moderatori: A. Ferrannini, C. Foti, A. Vacca</i>		
Dermatite allergica da contatto da corticosteroidi: procedimento diagnostico		
<i>Luca Stingeni</i> .....	»	110
Dermatite allergica da contatto da colliri: procedimento diagnostico		
<i>Monica Corazza e Alessandro Borghi.</i> .....	»	116
Dermatite da contatto con piante: procedimento diagnostico		
<i>Domenico Bonamonte</i> .....	»	120
Patch test con materiali forniti dal paziente		
<i>Katharina Hansel</i> .....	»	123
Atopy patch test		
<i>Francesca Giusti</i> .....	»	126
<b>Notiziario</b> .....	»	129

## Contents

### SIDAPA educational course

#### ALLERGOLOGICAL DIAGNOSTIC PROCEDURES (Bari, October 1th 2011)

<b>Introduction</b>		
<i>Caterina Foti</i> .....	»	71
<b>DIAGNOSTIC TESTS IN IMMEDIATE HYPERSENSITIVITY REACTIONS</b>		
<i>Chairs: F. Ayala, P. Lisi, A. Vacca</i>		
<b>Prick test</b>		
<i>Eustachio Nettis, Anna Maria Aloia, Elisabetta Di Leo and Antonio Ferrannini</i> .....	»	73
<b>RAST: clinical applications</b>		
<i>Anna Balato, Nicola Balato, Matteo Megna, Angela Patrì, Annunziata Raimondo and Fabio Ayala</i> .....	»	76
<b>Immunoblotting: laboratory and clinical applications</b>		
<i>Elisabetta Damiani, Anna Maria Aloia, Maria Giovanna Priore, Angela Pastore, Cristina Lippolis, Antonella Lovecchio, Luigi Macchia and Antonio Ferrannini</i> .....	»	83
<b>Molecular diagnostics: microarray</b>		
<i>Mauro Gianì</i> .....	»	86
<b>Microarray: clinical applications</b>		
<i>Paolo Daniele Pigatto and Samuele Burastero</i> .....	»	89
<b>Diagnostic tests in immediate hypersensitivity drug reactions: basophil activation test</b>		
<i>Gennaro Maietta</i> .....	»	93
<b>Immediate reactions: oral challenge test in food allergy</b>		
<i>Francesca Giusti</i> .....	»	97
<b>Diagnostic tests in <i>Hymenoptera</i> venom allergy</b>		
<i>Fabrizio Guarneri</i> .....	»	101
<b>DIAGNOSTIC TESTS IN DELAYED HYPERSENSITIVITY REACTIONS</b>		
<i>Chairs: A. Ferrannini, C. Foti, A. Vacca</i>		
<b>Allergic contact dermatitis to corticosteroids: diagnostic procedure</b>		
<i>Luca Stingeni</i> .....	»	110
<b>Allergic contact dermatitis to ophthalmic products: diagnostic procedure</b>		
<i>Monica Corazza and Alessandro Borghi</i> .....	»	116
<b>Contact dermatitis from plants: diagnostic procedure</b>		
<i>Domenico Bonamonte</i> .....	»	120
<b>Patch testing with patient's own products</b>		
<i>Katharina Hansel</i> .....	»	123
<b>Atopy patch test</b>		
<i>Francesca Giusti</i> .....	»	126
<b>News and notices</b> .....	»	129

La diagnostica allergologica ha visto negli ultimi anni importanti sviluppi. Obiettivo del Corso Educazionale SIDAPA su “La diagnostica allergologica”, annesso all’11° Congresso nazionale SIDAPA tenutosi a Bari dal 29 settembre al 1° ottobre 2011, è stato quello di presentare ai professionisti che si occupano di dermatologia e di allergologia una panoramica su metodologie e strumenti idonei all’esecuzione di test *in vivo* ed *in vitro* per la diagnosi delle allergie cutanee, respiratorie ed alimentari.

L’obiettivo che mi ero prefissata, quando i Professori Angelini e Vena, Presidenti del Congresso, mi hanno chiesto un piccolo aiuto nell’organizzazione del Corso, era quello di mettere a punto “come e quando” eseguire i test allergodiagnostici.

I relatori hanno con chiarezza indicato l’utilizzo dei test nelle differenti patologie sottolineando l’importanza dell’appropriatezza della richiesta clinica. Sono state altresì illustrate le principali criticità legate alla diagnosi delle reazioni allergiche alla luce delle più recenti evidenze scientifiche e delle linee guida internazionali.

La vasta partecipazione al Corso e l’interesse suscitato dai vari argomenti, sfociato in un ampio dibattito con la partecipazione di numerosi Colleghi, hanno spinto i Presidenti del Congresso ed i Direttori degli “Annali italiani di Dermatologia allergologica clinica e sperimentale” a raccogliere le relazioni del Corso in questo fascicolo della rivista. Si desidera ringraziare quanti dei Relatori hanno aderito alla nostra iniziativa.

Sono molto lusingata per questo riconoscimento e pertanto invito con molto piacere alla lettura del fascicolo che contiene numerosi suggerimenti per dermatologi ed allergologi.

Caterina Foti



## Prick test

Eustachio Nettis<sup>1</sup>, Anna Maria Aloia<sup>1</sup>, Elisabetta Di Leo<sup>1,2</sup> e Antonio Ferrannini<sup>1</sup>

**Riassunto.** I prick test (PT) rappresentano l'indagine di primo livello nella diagnostica delle malattie allergiche IgE-mediate. Si basano sull'introduzione di una piccola quantità di estratto allergenico negli strati superficiali del derma mediante puntura, eseguita con una lancetta sterile monouso attraverso la goccia dell'estratto allergenico posta sulla cute della faccia volare dell'avambraccio del paziente, precedentemente disinfettata. La risposta cutanea al PT deve essere analizzata attentamente sulla base della storia clinica del paziente. I test cutanei rappresentano una tecnica semplice, economica, poco invasiva e rapida per la diagnosi di reazioni allergiche IgE-mediate, che può essere eseguita a tutte le età. Pur essendo una metodica diagnostica piuttosto sicura, non è scevra da possibili effetti indesiderati; pertanto, l'esecuzione dei PT richiede personale adeguatamente formato ed ambienti idonei, provvisti di presidi terapeutici per far fronte ad eventuali reazioni anche gravi.

**Parole chiave:** prick test, reazioni IgE-mediate, diagnostica allergologica.

**Summary.** *Prick test.* Prick tests (PTs) are the first diagnostic method in the allergological field and are widely used to demonstrate an IgE-mediated allergic reaction. They are performed on one or both forearms using a fine metal needle which goes through a drop of allergen extract placed on the disinfected skin. The positive results must be carefully evaluated according to the anamnesis and clinical symptoms. PTs, which are a simple, economic, rapid, and minimally invasive method, can be used from infancy to old age. Despite it being a relatively safe diagnostic tool, side effects are possible. So their performance and their result evaluation require experienced professionals and should be carried out in healthcare settings, equipped with therapeutic emergency aids to treat the possible severe reactions.

**Key words:** prick test, IgE-mediated reactions, allergy diagnostics.

### Introduzione

I prick test (PT) rappresentano l'indagine di primo livello nella diagnostica delle malattie allergiche IgE-mediate. Riproducono, *in vivo*, il legame tra l'allergene e le IgE specifiche adese alla superficie dei mastociti, con conseguente degranolazione delle stesse e rilascio dei mediatori (soprattutto di istamina), responsabili dei sintomi di una reazione allergica mediata da IgE<sup>1-5</sup>.

### Tecnica di esecuzione

I PT si basano sull'introduzione di una piccola quantità di estratto allergenico negli strati

superficiali del derma mediante puntura eseguita con una lancetta sterile monouso attraverso la goccia dell'estratto allergenico posta sulla cute della faccia volare dell'avambraccio del paziente, precedentemente disinfettata.

Le gocce degli estratti vengono disposte sulla cute su due file parallele distanziate, tra di loro, di circa 3 cm per ridurre il rischio di eventuali false positività indotte dalla vicinanza dei test per attivazione del riflesso assonico. Dopo aver eseguito i vari prick, le singole gocce vengono asportate singolarmente con cotone idrofilo e la lettura deve essere effettuata dopo 15-20 minuti.

Per conferire validità al test si esegue contemporaneamente un controllo negativo (rappresentato dal diluente utilizzato per gli estratti allergenici) e un controllo positivo (generalmen-

<sup>1</sup>Sezione di Allergologia e Immunologia clinica, Dipartimento delle Emergenze e dei Trapianti d'organo, Università degli studi di Bari "Aldo Moro";

<sup>2</sup>U.O. di Medicina interna, Sezione di Immunologia e Allergologia clinica, Ente ecclesiastico Ospedale "F. Miulli", Acquaviva delle Fonti, Bari. Dr. Eustachio Nettis, Sezione di Allergologia e Immunologia clinica, Policlinico, Piazza Giulio Cesare 11, 70124 Bari (e-mail: e.nettis@allergy.uniba.it).

Conflitto d'interesse: dichiarato assente dagli Autori.

Accettato per la pubblicazione il 25 giugno 2012.

te istamina), per escludere rispettivamente reazioni falsamente positive e falsamente negative.

Il test è considerato positivo in caso di comparsa di un pomfo pruriginoso, circondato da un alone eritematoso, nella sede di applicazione dell'allergene nei confronti del quale il paziente è sensibilizzato.

Una metodica particolare di prick, denominata prick by prick, è indicata nella diagnosi dell'allergia alimentare quando i test condotti con gli estratti commerciali abbiano dato esito negativo, in presenza di una storia clinica fortemente suggestiva di reazione allergica verso un preciso alimento. Il prick by prick viene eseguito infiggendo una lancetta sterile prima nell'alimento e, successivamente, nella cute del paziente. Tale metodica è utilizzata per testare, generalmente, frutta e verdura fresche, in quanto contengono allergeni labili, che possono deteriorarsi nel corso dell'allestimento degli estratti commerciali. Inoltre, poiché la cottura dell'alimento può modificarne l'allergenicità, l'alimento andrebbe testato con le stesse caratteristiche con cui viene abitualmente consumato dal paziente (cotto e/o crudo).

### Valutazione e lettura del prick test

Il PT è considerato valido se il pomfo indotto dall'istamina presenta un diametro pari o superiore a 3 mm.

L'intensità di una reazione positiva nei confronti di un determinato allergene può essere valutata mediante due differenti criteri: a) confronto tra il pomfo indotto dall'allergene e quello prodotto dall'istamina (tabella I); b) valutazione della reazione, calcolando il diametro medio del pomfo, ottenuto dalla media tra il diametro maggiore e quello perpendicolare ad esso.

La reazione cutanea al prick deve essere

Tabella I - *Valutazione delle reazioni positive al prick test.*

Quantificazione	Valutazione
+	Pomfo da 1/4 a 1/2 rispetto al pomfo indotto da istamina
++	Pomfo da 1/2 a 1 rispetto al pomfo indotto da istamina
+++	Pomfo da 1 a 2 rispetto al pomfo indotto da istamina
++++	Pomfo superiore a 2 rispetto al pomfo indotto da istamina

analizzata attentamente sulla base della storia clinica del paziente. Durante l'esecuzione dei test, infatti, si possono verificare reazioni falsamente positive o falsamente negative, come riportato nella tabella II.

### Indicazioni

I PT sono indicati per la diagnosi di: a) allergopatia respiratoria; b) allergia alimentare; c) allergia a farmaci (indicati solo per quei farmaci in grado di indurre una reazione IgE-mediata, quali alcuni antibiotici, anestetici e ormoni); d) allergia al veleno di imenotteri; e) allergia al lattice della gomma.

### Controindicazioni

I PT sono controindicati in presenza di: a) patologie cutanee estese (dermatite atopica, orticaria in fase acuta), poiché un test positivo potrebbe indurre un'alterazione della reattività cutanea e il peggioramento delle lesioni in atto; b) asma in fase acuta, per il rischio di insorgenza di broncospasmo; c) terapia con antistaminici, in quanto possono inibire la reazione cutanea. Tali medicinali andrebbero sospesi per un periodo variabile a seconda dell'emivita del farmaco assunto; d) terapie corticosteroidi sistemiche,

Tabella II - *Cause di reazioni falsamente positive o falsamente negative al prick test.*

#### Cause di falsa positività

Iperreattività cutanea (dermografismo)  
Estratti troppo concentrati  
Vicinanze a test cutanei positivi, per riflesso assonico  
Presenza di sostanze irritanti o inquinanti negli estratti  
Eventuale trasporto accidentale degli allergeni (positivi) durante l'esecuzione del prick test  
Pressione eccessiva sulla cute  
Sanguinamento  
Utilizzo della stessa lancetta per più allergeni

#### Cause di falsa negatività

Iporeattività cutanea per età (bambini e anziani possono presentare solo eritema), malattie cutanee, pazienti emodializzati o affetti da neoplasie maligne, precedenti reazioni intensamente positive  
Utilizzo di estratti inattivi o scaduti  
Terapia in atto con antistaminici, corticosteroidi  
Allergia d'organo, per cui alcuni soggetti possono presentare una sensibilità solo locale o d'organo  
Mancata esecuzione del test ("salto della goccia")  
Insufficiente penetrazione della lancetta

eseguite per lunghi periodi o con formulazione ritardo, e trattamenti con preparazioni corticosteroidi topiche, applicate in sede di esecuzione del test, in quanto possono ridurre parzialmente o totalmente la risposta cutanea. Tali farmaci andrebbero sospesi 2-3 settimane prima dell'esecuzione del test; e) anamnesi positiva per reazioni sistemiche gravi.

### **Possibili effetti indesiderati**

I PT rappresentano una metodica diagnostica piuttosto sicura pur presentando, in rare occasioni, possibili effetti indesiderati. Sono segnalate: a) reazioni locali (prurito, intenso eritema, edema); b) reazioni d'organo (riacutizzazione della sintomatologia); c) reazioni sistemiche (rare), quali lipotimia, malessere generale; d) reazioni anafilattiche (eccezionali).

Gli ambienti sanitari, preposti all'esecuzione di tali test, devono essere provvisti di un kit di rianimazione e presidi terapeutici per far fronte ad eventuali reazioni sistemiche gravi o anafilassi.

### **Conclusioni**

I PT rappresentano una tecnica semplice, economica, poco invasiva e rapida per la diagnosi di reazioni allergiche IgE-mediate; possono essere eseguiti a tutte le età. Bisogna considerare, però, che nel bambino molto piccolo le reazioni cutanee possono essere meno intense o, persino, dare esito negativo. Pertanto, in caso di persistenza dei sintomi, è consigliabile ripetere i PT negli anni successivi, prima di escludere definitivamente la patogenesi allergica del quadro clinico.

### **Bibliografia**

1. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Skin tests used in type I allergy testing. Position paper. *Allergy* 1989; 44: 1.
2. "Memorandum" sulla diagnostica delle allergopatie. Società Italiana di Allergologia e Immunologia Clinica. Tursi A, Bonini S, et al. *G Ital Allergol Immunol Clin* 1992; 2: 351.
3. The European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Position paper: allergen standardization and skin tests. *Allergy* 1993; 48: 48.
4. Bernardini R, Galli E, Marseglia GL, et al. Il prick test nella diagnostica allergologica. Cento (FE): EDITEAM sas gruppo editoriale, 2005.
5. Cardinale F, Nettis E. Manuale di Allergologia, Immunologia e Broncopneumologia pediatrica. FRI Communication Div. HealthCare Edizioni (in stampa).

## Il RAST: applicazioni cliniche

Anna Balato, Nicola Balato, Matteo Megna, Angela Patrì, Annunziata Raimondo e Fabio Ayala

**Riassunto.** Le malattie allergiche sono una delle più frequenti cause di morbilità nella popolazione generale. Rappresentano un rilevante problema di salute sia per il costante aumento della loro prevalenza che per il conseguente aumento della spesa pubblica, non solo per la diagnosi e la terapia farmacologica, ma anche per la possibile inabilità temporanea o permanente al lavoro che ne può derivare. Le allergopatie comprendono un vasto spettro di entità cliniche, tra cui la dermatite allergica da contatto e l'orticaria che rappresentano senza dubbio le forme più comuni di coinvolgimento cutaneo. Questa rassegna si propone di analizzare in maniera critica le potenzialità e le applicabilità della metodica *in vitro* del test radioallergosorbente (RAST) nel contesto del processo diagnostico di patologie allergiche cutanee, un contesto complesso e intricato nel quale preminenza assoluta deve essere attribuita al dialogo medico-paziente e, quindi, ad un'accurata anamnesi.

**Parole chiave:** RAST, applicazioni cliniche, orticaria, dermatite atopica, reazioni a farmaci, reazioni ad alimenti.

**Summary.** *RAST: clinical applications.* Allergic diseases are multifactorial, heterogeneous disorders caused by the interaction of environmental and genetic factors. Over 25% of the world's population suffer from allergic diseases including asthma, allergic rhinitis, eczema, and drug reactions. In recent years, the prevalence of allergic diseases has increased annually throughout the world seriously affecting the quality of life of the patients, and creating a serious burden on both health and society. Such conditions constitute a challenge for both public health organizations and healthcare providers. The pathogenesis of allergic diseases has generally been considered to be driven by immunity, including IgE overproduction, IgE receptor abnormality, and Th2-skewed Th cell differentiation. The present review aims to critically analyze the potential and the applicability of the radioallergosorbent test (RAST) in the diagnostic process of allergic skin diseases. This is a very intricate and complex process which should have to be founded on patients' medical history. However, the patient and family's own perceptions and knowledge may influence history so laboratory studies represent a very informative tool in the diagnosis of allergic skin diseases. In particular, *in vivo* methods, such as prick test, often represent the first choice because they are not expensive, immediate and not invasive. Therefore, alternative *in vitro* methods like RAST are preferred in particular conditions, including severe eczema or when there is persistent dermatographism.

**Key words:** RAST, clinical applications, urticaria, atopic dermatitis, drug reactions, food allergy.

### Introduzione

Le patologie allergiche sono di frequente riscontro nella popolazione generale, interessando tutte le fasce di età. I tassi di prevalenza variano tra i diversi paesi, potendo giungere sino al 50% della popolazione<sup>1</sup>. Lo sviluppo e la severità delle patologie allergiche sono il risultato dell'interazione complessa sussistente tra fattori genetici ed ambientali, come l'esposizione ad allergeni e fattori aspecifici

coadiuvanti quali stile di vita, fumo di tabacco, inquinamento atmosferico e infezioni precoci in età pediatrica<sup>1</sup>. Le allergopatie comprendono un vasto spettro di entità cliniche tra cui la rinite allergica, l'asma, la dermatite atopica e le reazioni allergiche o anafilattiche ad alimenti, farmaci, veleno d'imenotteri o ad altri allergeni<sup>2</sup>.

L'allergia alimentare costituisce una delle forme maggiormente indagate sia per l'alta incidenza nella popolazione generale che per

Sezione di Dermatologia clinica, allergologica e venereologica, Dipartimento di Patologia sistematica, Università di Napoli Federico II.  
Dr.ssa Anna Balato, Sezione di Dermatologia clinica, allergologica e venereologica, Università di Napoli Federico II, Via Pansini 5, 80131 Napoli  
(e-mail: annabalato@yahoo.it).

Conflitto d'interesse: dichiarato assente dagli Autori.

Accettato per la pubblicazione il 25 giugno 2012.

le possibili ripercussioni sulle abitudini alimentari dei soggetti affetti. Negli Stati Uniti d'America è stato stimato che fino al 25%<sup>3</sup> della popolazione riferisce episodi di reazione allergica ad alimenti; inoltre, molti studi hanno dimostrato che il 40-60% dei genitori associano i sintomi allergici sviluppati dai figli al consumo di alimenti, nonostante solo il 4-8% dei bambini mostrasse sintomi riproducibili mediante test di provocazione orale<sup>4-7</sup>. La prevalenza dell'allergia agli alimenti è massima tra i bambini e gli adolescenti (6-8%), si riduce lievemente con l'età, raggiungendo quasi il 4% negli adulti<sup>8</sup>. I più comuni alimenti scatenanti reazioni allergiche sono: latte, uovo, arachidi, soia, farina, noci, pesce e frutti di mare.

Un'accurata anamnesi, l'esecuzione di test cutanei (prick test) (PT) e del test radioallergo-sorbente (RAST) rappresentano le principali fasi della diagnostica allergologica.

## Diagnostica allergologica

### Anamnesi

La raccolta e l'interpretazione dei dati anamnestici costituiscono la premessa alla diagnosi di qualsiasi patologia. Nelle allergopatie, tuttavia, l'anamnesi assume particolare importanza, considerando che l'obiettività clinica potrebbe essere del tutto negativa, poiché spesso si tratta di manifestazioni che compaiono in modo accessoriale. In caso di sospetta allergia alimentare, è necessario ottenere attraverso una dettagliata storia clinica una serie d'informazioni riguardanti: a) l'alimento che si sospetti abbia provocato la reazione allergica; b) il lasso di tempo intercorso tra l'assunzione dell'alimento e lo sviluppo dei sintomi; c) se l'assunzione del cibo sospettato abbia scatenato una sintomatologia simile in altre occasioni; d) se al momento dell'ingestione siano intervenuti altri fattori, come l'assunzione di alcol o l'esercizio fisico.

Nonostante l'anamnesi sia essenziale per la programmazione del percorso diagnostico, la sola storia clinica non è sufficiente per una diagnosi definitiva. Infatti, solo nel 30-40% dei casi la presunta allergia è confermata dal test di provocazione orale in doppio cieco controllato con placebo ("Double-Blind Placebo-Controlled oral Food Challenge", DBPCFC), metodica gold standard per la dia-

gnosi di allergia alimentare<sup>3</sup>. Tuttavia, il dato anamnestico rappresenta un imprescindibile elemento, e nel caso di una reazione allergica immediata, se supportato dalla presenza di immunoglobuline E (IgE) specifiche per l'alimento incriminato, rende superfluo il ricorso al test di provocazione orale per la diagnosi<sup>9</sup>. Testare vasti pannelli di allergeni senza porre in giusta considerazione l'anamnesi può esitare in risultati positivi del tutto irrilevanti dal punto di vista clinico, che, se sopravvalutati, possono condurre alla messa in atto di condotte di eliminazione degli allergeni incriminati, dannose da un punto di vista economico, sociale, emotivo e, a volte, anche nutrizionale.

### Prick test e RAST

La maggior parte delle malattie allergiche riconosce una genesi immunitaria da ascrivere al coinvolgimento delle IgE. Le due principali tecniche allergodiagnostiche adoperate nell'identificazione di tali anticorpi sono il PT e il RAST.

Attualmente il PT, se correttamente eseguito, costituisce il migliore metodo disponibile per individuare la presenza di IgE specifiche (IgEs)<sup>10</sup>, essendo rapido, semplice, attendibile ed economico. Ha anche il vantaggio che i risultati sono visibili anche al paziente.

Il RAST è un'indagine allergodiagnostica di secondo livello che consiste nella determinazione delle IgEs presenti nel siero del soggetto in esame. La necessità di un prelievo ematico, il risultato non immediato e il costo relativamente alto rappresentano svantaggi rispetto al più semplice e veloce PT. Il RAST è da preferire quando il PT non può essere eseguito per la presenza di un'estesa dermatite, di dermografismo intenso, nel caso in cui il trattamento antistaminico non possa essere sospeso, quando la storia clinica è suggestiva di possibile reazione anafilattica e, ancora, in presenza di pazienti non collaboranti<sup>10,11</sup>.

Il RAST è un'indagine di tipo semi-quantitativo, per la quale sono stati elaborati sistemi di punteggio al fine di organizzare i risultati ottenuti in classi. La validità del RAST come indicatore di patologia allergica dipende dal cut-off adoperato per la suddivisione in classi; in termini di predittività, il RAST risulta tanto più informativo quanto più alta è la classe alla quale appartiene il risultato ottenuto<sup>12</sup>.

Diversi studi in letteratura hanno compa-

rato le proprietà diagnostiche dei test *in vivo* e *in vitro*, valutando la rilevanza clinica di un eventuale risultato positivo. Schäfer *et al*<sup>13</sup> hanno dimostrato che i test cutanei hanno una specificità significativamente maggiore rispetto al RAST, mentre questo ultimo presenta una maggiore sensibilità per valutare la storia clinica positiva per febbre da fieno. Il valore predittivo negativo (VPN) è molto alto per entrambi i test, mentre il valore predittivo positivo (VPP) è piuttosto basso e maggiore per il PT rispetto al RAST. Appare chiaro, tuttavia, che il VPP dipende altamente dal cut-off utilizzato: al suo incremento corrisponde un VPP maggiore, fino a superare quello dello stesso PT<sup>13</sup>.

Attualmente sono disponibili metodiche quantitative di misurazione delle IgEs, saggi enzimatici destinati a sostituire il tradizionale RAST, come il CAP system, che ha dimostrato avere un valore predittivo maggiore per le allergie alimentari IgE-mediate. Nello specifico, per ciascun alimento potenzialmente implicato nella patogenesi allergica esistono livelli diagnostici di IgEs, oltre i quali sussiste una probabilità superiore al 95% che il paziente sviluppi una reazione allergica in seguito all'ingestione dello stesso. Tali valori sono di 7 kU/l per le uova e di 15 kU/l per il latte (2 kU/l e 5 kU/l rispettivamente se il paziente ha meno di 2 anni), 14 kU/l per le arachidi, 20 kU/l per il pesce. Esiste inoltre una correlazione diretta tra i livelli di IgEs e la probabilità di reazione allergica verso l'alimento ingerito<sup>3</sup>. Dati recenti suggeriscono che la misurazione quantitativa delle IgE possa predire il risultato di un test di provocazione orale in doppio cieco, potendosi sostituire ad esso nella metà dei casi. Quando la determinazione quantitativa delle IgE è associata alla raccolta dettagliata della storia clinica, solo pochi pazienti necessitano ancora dell'esecuzione di un test di provocazione orale.

L'identificazione di una sensibilizzazione verso uno specifico allergene tramite test sierologici e/o cutanei non equivale, tuttavia, ad una diagnosi clinica: è possibile che pazienti con test positivi non sviluppino alcuna sintomatologia allergica quando esposti all'allergene incriminato. Tale limite diagnostico sottolinea la necessità della raccolta di una dettagliata storia clinica che, associata alla conoscenza della fisiopatologia della malattia

allergica, deve guidare la corretta interpretazione del dato laboratoristico. Similmente, un risultato negativo è da interpretare criticamente alla luce della storia clinica, considerando che anche valori molto bassi di IgE (< 0,35 kU/l) possono indurre una reazione allergica, giustificando il ricorso ad ulteriori approfondimenti diagnostici, come un test di provocazione orale<sup>8</sup>. Effettuare delle indagini diagnostiche specifiche per l'identificazione di IgE non risulta utile quando la fisiopatologia della malattia non ne prevede il coinvolgimento (malattie allergiche non mediate da IgE specifiche, come la dermatite allergica da contatto)<sup>11</sup>.

In ultima analisi, appare dunque chiaro quali siano i momenti clinico-diagnostici successivi ed interdipendenti da mettere in atto per la definizione clinica e laboratoristica di allergopatia: a) valutazione anamnestica approfondita; b) PT test come indagine di primo livello; c) dosaggio delle IgEs sieriche (RAST), come esame di secondo livello. In particolari condizioni cliniche, come l'orticaria e la grave dermatite atopica, il RAST rappresenta un utile e valido ausilio diagnostico da eseguire anche come indagine di primo livello.

### **RAST e orticaria**

L'orticaria è una delle dermopatie più comuni, colpendo, almeno una volta nella vita, circa il 15-20% della popolazione<sup>14</sup>. Può manifestarsi come unico episodio isolato oppure assumere carattere ricorrente, potendo durare anche molti anni. Si caratterizza clinicamente per la comparsa di lesioni eritematose, solide e rilevate, denominate pomfi, che tendono a presentare nella maggioranza dei casi una durata fugace (da qualche minuto a poche ore) nonché ad accompagnarsi ad intenso prurito. Queste lesioni sono il risultato del rilascio di istamina, IgE-mediato o meno, da parte di mastociti e basofili.

Convenzionalmente l'orticaria può essere definita acuta (se di durata inferiore a 6 settimane) o cronica (se di durata superiore). Tale distinzione non costituisce esclusivo interesse accademico visto che nel 75% delle orticarie acute si riesce a identificare l'agente causale rispetto alle forme croniche che, invece, nella gran parte dei casi rimangono idiopatiche<sup>15</sup>.

Clinicamente l'orticaria può essere classificata in 6 principali varietà<sup>16</sup>. La più frequente è

quella dell'orticaria "comune" che comprende diverse eziopatogenesi, come allergie, pseudo-allergie, infezioni e autoimmunità. Le altre varietà, meno frequenti, comprendono quella delle orticarie fisiche, orticaria-vasculite, orticaria da contatto, angioedema senza pomfi e sindromi orticarioidi (ad esempio sindrome di Muckle Wells e sindrome di Schitzler). Tali gruppi non sono mutuamente esclusivi potendosi sovrapporre come avviene, ad esempio, per le orticarie "comuni" e quelle fisiche<sup>17</sup>.

L'orticaria "comune" può presentare numerose cause, tra cui le più frequenti sono senza dubbio rappresentate da farmaci<sup>18</sup> e alimenti. Nell'ambito delle reazioni allergiche a farmaci, gli antibiotici beta-lattamici costituiscono la principale causa di orticaria farmaco-indotta, mediata da specifici meccanismi immunologici (reazioni di ipersensibilità immediata IgE-mediata)<sup>19</sup>. L'identificazione della molecola farmacologica responsabile di tali manifestazioni allergiche è possibile grazie all'impiego di test *in vitro* che prevedono il dosaggio delle IgEs tramite CAP system e/o RAST. La loro misurazione consente di individuare il farmaco-allergene in maniera semplice, sicura ed attendibile. Fontaine *et al*<sup>20</sup> hanno valutato le proprietà diagnostiche del CAP system e del RAST per le allergie ai beta-lattamici: la specificità del CAP-system variava dall'83,3% al 100% e la sensibilità dallo 0% al 25%; la specificità del RAST oscillava dal 66,7% all'83,3% e la sensibilità dal 42,9% al 75%. Il VPP e il VPN ammontavano al 45,5% e al 77,1% per il CAP system e al 38,5% e all'81,5% per il RAST, rispettivamente. Tali risultati dimostrano che il dosaggio delle IgEs per la diagnosi di farmaco-allergia ai beta-lattamici possiede una buona specificità, a fronte di una bassa sensibilità con un non trascurabile rischio di falsi negativi. Tali indagini risultano comunque utili soprattutto nei soggetti con storia clinica predittiva di gravi reazioni allergiche, quali shock anafilattico, poiché consentono di evitare l'esecuzione di test di provocazione.

Insieme ai farmaci, gli alimenti rappresentano il più frequente fattore scatenante orticaria. In particolare, essi si configurano come una delle più comuni cause di orticaria acuta (20-60%)<sup>21</sup>: i meccanismi coinvolti sono spesso di ipersensibilità immediata (IgE-mediata). Gli allergeni alimentari più comunemente

implicati sono costituiti da latte vaccino, uova, arachidi, noci, soia, pesce e crostacei<sup>22</sup>. Nel processo diagnostico, come per le altre forme di orticaria, grande importanza assumono un'accurata anamnesi e analisi della storia del paziente. Inoltre, nel sospetto di un'allergia alimentare possono essere utilizzati i PT e il RAST. I primi hanno un VPN che supera il 95% ma il loro VPP si attesta intorno al 50%<sup>23</sup>. Tuttavia, maggiore è la dimensione del pomfo, tanto più è probabile che il paziente sia in grado di sviluppare una risposta allergica verso l'alimento testato; essa, però, non risulta capace di prevedere la gravità della reazione<sup>24</sup>.

La specificità e la sensibilità del RAST variano per i differenti tipi di allergeni alimentari testati; ad esempio, tendono ad essere più basse per frutta e verdure. Il livello delle IgEs riscontrato non può prevedere la severità della sintomatologia e non è proporzionale ad essa, ma, tanto più risulta elevato, tanto maggiore è la probabilità di allergia. In ogni caso il risultato di tali indagini va sempre integrato con la storia del paziente, in quanto il riscontro di IgEs nel siero non prova necessariamente che l'antigene in questione sia responsabile dei sintomi sotto inchiesta, né indica inevitabilmente che la sua eliminazione dalla dieta risolverà la patologia<sup>25</sup>. Difatti, alcuni individui possono presentare IgEs a comuni proteine alimentari pur non essendo allergici ad esse. Al contrario, in altri mancano IgEs per alcuni allergeni (in particolare frutta e/o verdure), ma possono presentare sintomi clinici in relazione alla loro esposizione.

I livelli di IgEs sono influenzati da una grande varietà di fattori come età, razza, sesso, fattori genetici, quantità e varietà degli allergeni ambientali con cui si viene in contatto durante la vita<sup>26</sup>. Pertanto, le IgEs da dosare devono essere selezionate in base ai sospetti emersi dalla storia clinica e, in particolare, dal rapporto temporale con l'esposizione ai presunti allergeni, resistendo alla tentazione di testare IgEs per una moltitudine di allergeni. Ciò, difatti, condurrebbe a risultati scarsamente informativi e fortemente confondenti. E' stato riportato che l'8% degli individui presenta test positivi per allergia alle arachidi, ma solo l'1% è clinicamente allergico<sup>27</sup>, così come sono frequenti i fenomeni di cross reattività: più del 50% dei pazienti con allergia alle arachidi hanno un test positivo per legumi, ma meno

del 5% presenta sintomi clinici in seguito alla loro ingestione<sup>11</sup>.

Nel caso in cui la storia clinica e il risultato dei PT e/o RAST indichino che l'orticaria è probabilmente indotta da un determinato alimento, il nutriente sospettato dovrebbe essere escluso dall'alimentazione (dieta di eliminazione), verificando se la sintomatologia si ripresenti o meno. Parimenti, la sua reintroduzione dovrebbe richiedere un ambiente protetto e la supervisione medica (test di scatenamento orale o di challenge), unico mezzo assieme alla dieta di eliminazione per raggiungere una diagnosi definitiva nel campo dell'orticaria legata ad allergie alimentari. Per quanto concerne l'orticaria cronica, invece, gli alimenti ne sono la causa solo nell'1,4% dei casi<sup>28</sup> e, in generale, le reazioni IgE-mediate sono rarissimamente implicate. Pertanto, nel processo diagnostico delle forme di orticaria cronica indagini come PT e RAST non presentano grande valore diagnostico.

### **RAST e dermatite atopica**

La dermatite atopica è una malattia cutanea infiammatoria dal decorso cronico-ricidivante che si può associare a reazioni IgE-mediate o ritardate (cellulo-mediate) verso allergeni ambientali, tra cui soprattutto alimenti ed aeroallergeni<sup>29</sup>. Numerose osservazioni cliniche e sperimentali, infatti, suggeriscono che l'esposizione agli allergeni alimentari ed inalanti gioca un ruolo importante nelle riacutizzazioni della DA<sup>30-32</sup>.

L'associazione della dermatite atopica con l'allergia alimentare è riportata con percentuali variabili tra il 30 e il 75% a seconda della gravità della malattia, ma la sua importanza patogenetica è fortemente dibattuta<sup>31</sup>. Gli alimenti responsabili dei sintomi nel 90% dei casi sono uova, latte, soia, arachidi, pesce e grano<sup>32</sup>.

Gli strumenti che il medico ha a disposizione per valutare il possibile ruolo dell'allergia alimentare nella dermatite atopica sono distinti in test *in vivo* e *in vitro*, ma nessuno di essi è singolarmente dirimente per cui occorre usarli con accuratezza. Tra i test *in vivo* ci si può avvalere dell'ausilio delle diete di eliminazione: esse possono essere di vario tipo, empiriche, oligoantigeniche o elementari. Le diete empiriche si basano sull'eliminazione di alimenti più comunemente considerati responsabili dei sintomi; le diete oligoantigeniche prevedono

l'assunzione di pochi alimenti considerati a bassa allergenicità; le diete elementari, infine, si basano sull'alimentazione esclusiva con miscele di amminoacidi. Negli ultimi tempi è stato enfatizzato il ruolo del DBPCFC come gold standard diagnostico<sup>1</sup>, soprattutto nei casi in cui il coinvolgimento emotivo ed ansioso di madre e del bambino possono essere elementi confondenti per la diagnosi. Tutti questi strumenti diagnostici, pur se dotati di una buona validità, sono abbastanza laboriosi e costosi; le diete spesso sono molto ristrette, di scarsa palatabilità e richiedono la partecipazione non solo della madre ma anche del paziente generalmente pediatrico. Inoltre, in uno studio condotto da Monti *et al*<sup>33</sup> viene riportato che in un gruppo di 107 bambini affetti da dermatite atopica moderata-grave il 67,3% sviluppava gravi reazioni allergiche in seguito alla prima ingestione di uova durante il test di provocazione orale; nel 77,8% dei casi si trattava di reazioni IgE-mediate alcune delle quali anche molto gravi come edema della laringe, gravi attacchi d'asma e perfino shock anafilattico. Ciò indica che, in una percentuale non trascurabile dei casi, il bambino con grave dermatite atopica può avere anticorpi circolanti di tipo IgE verso alimenti anche se mai ingeriti<sup>33</sup>.

Tutti questi motivi rendono necessario l'utilizzo di alternative *in vitro*, come il RAST per alimenti che rappresenta, nel complesso percorso di individualizzazione del possibile fattore eziologico e/o riacutizzante la dermatite atopica, un primo approccio di screening<sup>33</sup>. Nella gestione della dermatite atopica moderata-grave, eseguire il RAST offre almeno due vantaggi: in primo luogo, permette di stabilire diete mirate nei confronti dei soli alimenti risultati positivi e non empiriche, che costringono il piccolo paziente a diete restrittive e spesso inutili; in secondo luogo, permette di individuare, tra i bambini con grave dermatite atopica, quelli a rischio di gravi reazioni allergiche immediate, per la presenza naturale di IgE circolanti verso alimenti anche senza un precedente processo di sensibilizzazione verso l'allergene<sup>33</sup>. D'altra parte, non sempre la presenza di IgEs per alimenti correla con la sintomatologia, per cui occorre che vengano eseguiti ulteriori test come l'atopy patch test (APT).

APT è un metodo diagnostico sviluppato negli ultimi 20 anni. Si pratica applicando

sulla cute della schiena dei pazienti alcuni allergeni alimentari oppure, più recentemente, aeroallergeni. La lettura si esegue dopo 48 e 72 ore in modo analogo ai comuni patch test. L'APT è per molti aspetti un approccio innovativo nella diagnosi delle allergie alimentari. In linea di principio, esso consente lo studio della presenza di una reazione d'ipersensibilità ritardata T-dipendente nei confronti di allergeni alimentari. Tuttavia, questa tecnica è stata criticata per la sua scarsa riproducibilità e la mancanza di standardizzazione, sia nella preparazione che nella concentrazione del materiale utilizzato prima della sua applicazione sulla cute. Recentemente, proprio allo scopo di migliorare la metodica e per ridurre gli effetti collaterali osservati per l'utilizzo di preparazioni con alimenti freschi, sono stati prodotti kit commerciali a base di proteine liofilizzate<sup>34</sup>. Grazie a questa standardizzazione, nella valutazione dell'allergia al latte e all'uovo (i principali alimenti incriminati) l'APT mostra un buon VPP, ma la combinazione con il RAST permette di raggiungere un VPP del 100% per il latte e del 96% per l'uovo<sup>35</sup>. Quindi, il RAST, in combinazione con l'APT, eseguiti come indagini di primo livello rendono del tutto superfluo il ricorso al DBPCFC nei casi di sospetta allergia al latte e all'uovo<sup>35</sup>. Questi dati sono molto importanti in quanto dimostrano che il RAST rappresenta un utile e valido strumento diagnostico nella gestione del paziente con dermatite atopica grave.

## Conclusioni

Le patologie allergiche per il loro andamento cronico-ricidivante rappresentano una delle principali cause di morbilità nella popolazione generale. In tale ambito il ruolo dello specialista dermatologo risulta rilevante nella scelta del più adeguato percorso diagnostico mirato all'individuazione della causa scatenante, tenendo in conto la necessità di effettuare in prima istanza test allergodiagnostici di facile esecuzione, economici e non invasivi. Il RAST costituisce un'indagine di secondo livello da preferire al prick test solo in specifiche circostanze, quali forme di orticaria acuta e dermatite atopica grave in cui sussista il sospetto di un'allergia alimentare come fattore causale o riattivante. E' auspicabile

che con lo sviluppo di nuovi test di laboratorio che analizzino il legame epitopo-specifico delle IgE, sia possibile in futuro ottenere un maggiore VPP, informazioni sulla storia naturale dell'allergopatia e sulla potenziale gravità delle reazioni allergiche.

## Bibliografia

1. Sampson HA. Food allergy. Part 2: diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 981.
2. Eriksson NE, Moller C, Werner S, et al. Self-reported food hypersensitivity in Sweden, Denmark, Estonia, Lithuania, and Russia. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2004; 14: 70.
3. Sampson, HA. Food allergy – accurately identifying clinical reactivity. *Allergy* 2005; 60: 19.
4. Bock SA. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics* 1987; 79: 683.
5. Roehr CC, Edenharter G, Reimann S, et al. Food allergy and non-allergic food hypersensitivity in children and adolescents. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1534.
6. Venter C, Pereira B, Grundy J, et al. Incidence of parentally reported and clinically diagnosed food hypersensitivity in the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 1118.
7. Venter C, Pereira B, Grundy J, et al. Prevalence of sensitization reported and objectively assessed food hypersensitivity amongst six-year-old children: a population-based study. *Pediatr Allergy Immunol* 2006; 17: 356.
8. Venter C, Pereira B, Voigt J, et al. Prevalence and cumulative incidence of food hypersensitivity in the first 3 years of life. *Allergy* 2008; 63: 354.
9. Järvinen KM, Sicherer SH. Diagnostic oral food challenges: procedures and biomarkers. *J Immunol Methods* 2012 (Epub ahead of print).
10. Ownby DR. Allergy testing: in vivo versus in vitro. *Pediatr Clin North Am* 1988; 35: 995.
11. Sicherer SH, Wood RA, American Academy of Pediatrics Section on Allergy and Immunology. Allergy testing in childhood: using allergen-specific IgE tests. *Pediatrics* 2012; 129: 193.
12. Schoefer Y, Schafer T, Meisinger C, et al. Predictivity of allergic sensitization (RAST) for the onset of allergic diseases in adults. *Allergy* 2008; 63: 81.
13. Schäfer T, Hoelscher B, Adam H, et al. Hay fever and predictive value of prick test and specific IgE antibodies: a prospective study in children. *Pediatr Allergy Immunol* 2003; 14: 120.
14. Komarow HD, Metcalfe DD. Office-based management of urticaria. *Am J Med* 2008; 121: 379.
15. Greaves MW. Chronic urticaria. *N Engl J Med* 1995; 332: 1767.
16. Grattan CEH. The urticaria spectrum: recognition of clinical patterns can help management. *Clin Exp Dermatol* 2004; 29: 217.
17. Nino M, Ayala Fbz, Ayala F. Physical urticaria and common urticaria: a study of 91 cases. *Ann Ital Dermatol* 2002; 56: 138.
18. Lisi P. Drug-induced urticaria: prevalence and management. *Ann Ital Dermatol Allergol* 2004; 58: 81.
19. Blanca M, Mayorga C, Torres MJ, et al. Clinical evaluation of pharmacía CAP system RAST FEIA amoxicilloyl and benzylpenicilloyl in patients with penicillin allergy. *Allergy* 2001; 56: 862.
20. Fontaine C, Mayorga C, Bousquet PJ, et al. Relevance of the determination of serum-specific IgE antibodies in the diagnosis of immediate beta-lactam allergy. *Allergy* 2007; 62: 47.
21. Rance F. Food allergy and urticaria. *Ann Dermatol Venerol* 2001; 128: 1132.

22. Cianferoni A, Spergel JM. Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergol Int* 2009; 58: 457.
23. Eigenmann PA, Sampson HA. Interpreting skin prick tests in the evaluation of food allergy in children. *Pediatr Allergy Immunol* 1998; 9: 186.
24. Spergel JM, Beausoleil JL, Fiedler JM, et al. Correlation of initial food reactions to observed reactions on challenges. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; 92: 217.
25. Volcheck GW. Which diagnostic tests for common allergies? Where to start when you face an allergy puzzle. *Postgrad Med* 2001; 109: 71.
26. Yilmaz N, Bayraktaroglu Z, Özaslan J. Efficiency of some in vitro allergy tests for evaluating atopy in children and adults. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 981.
27. Liu AH, Jaramillo R, Sicherer SH, et al. National prevalence and risk factors for food allergy and relationship to asthma: results from the national health and nutrition examination survey 2005-2006. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 798.
28. Champion RH. Urticaria: then and now. *Br J Dermatol* 1988; 119: 427.
29. Darsow U, Wollenberg A, Simon D, et al. ETFAD/EADV eczema task force 2009 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis. *JEADV* 2010; 24: 317.
30. Reekers R, Busche M, Wittmann M, et al. Birch pollen-related foods trigger atopic dermatitis in patients with specific cutaneous T-cell responses to birch pollen antigens. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 466.
31. Breuer K, Wulf A, Constien A, et al. Birch pollen-related food as a provocation factor of allergic symptoms in children with atopic eczema/dermatitis syndrome. *Allergy* 2004; 59: 988.
32. Werfel T, Breuer K. Role of food allergy in atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4: 379.
33. Monti G, Muratore MC, Peltran A, et al. High incidence of adverse reactions to egg challenge on first known exposure in young atopic dermatitis children: predictive value of skin prick test and radioallergosorbent test to egg proteins. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1515.
34. Kalach N, Soulaïnes P, de Boissieu D, et al. A pilot study of the usefulness and safety of a ready-to-use atopy patch test (Diallertest) versus a comparator (Finn Chamber) during cow's milk allergy in children. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 1321.
35. Roehr C, Reibel S, Ziegert M, et al. Atopy patch tests, together with determination of specific IgE levels, reduce the need for oral food challenges in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 103: 548.

## Immunoblotting: laboratorio e applicazioni cliniche

Elisabetta Damiani, Anna Maria Aloia, Maria Giovanna Priore, Angela Pastore, Cristina Lippolis, Antonella Lovecchio, Luigi Macchia e Antonio Ferrannini

**Riassunto.** Gli alimenti sono causa frequente di reazioni allergiche. I loro allergeni mostrano grande variabilità, anche all'interno di una stessa specie. La caratterizzazione, l'identificazione, la purificazione e il sequencing degli allergeni alimentari è di grande importanza nel migliorare la comprensione dei meccanismi patogenetici e la qualità della diagnostica, consentendo l'allestimento di estratti più affidabili.

**Parole chiave:** proteine allergeniche, IgE specifiche, immunoblotting.

**Summary.** *Immunoblotting: laboratory and clinical applications.* Foods are a common cause of food allergy reactions. Furthermore, their allergens show great variability, also within the same kind of food. The characterization, identification, purification and sequencing of food allergens is of great importance in improving understanding of the pathogenetic mechanisms and for diagnosis of food allergy, with the development of more reliable diagnostic extracts.

**Key words:** allergenic proteins, specific IgE, immunoblotting.

### Introduzione

Gli alimenti sono frequentemente responsabili di reazioni avverse e si ritiene che qualunque alimento possa indurre una reazione allergica. L'allergenicità degli alimenti, tuttavia, può variare in funzione di diversi fattori: specie, varietà, modalità di coltivazione, di conservazione o di cottura. I diversi fattori possono generare differenze di immunoreattività, alterazioni denaturanti di proteine antigenicamente attive o determinare degradazioni, anche con possibile conseguente formazione di neoallergeni.

Gli allergeni alimentari sono molto variabili; la loro identificazione e la loro caratterizzazione sono molto importanti per migliorare la comprensione dei meccanismi patogenetici e l'attendibilità della diagnostica allergologica, consentendo l'allestimento di estratti più affidabili.

La qualità della composizione di un estratto allergenico dipende dalle caratteristiche e dalla composizione della materia prima, la quale deve essere necessariamente rappresentativa della fonte allergenica alla quale il soggetto sensibilizzato è esposto in natura<sup>1</sup>.

### Il laboratorio

#### *Estrazione delle proteine*

L'estrazione degli allergeni dalla fonte deve essere realizzata in modo da assicurarne un completo passaggio in soluzione, senza alterare il relativo rapporto tra le diverse componenti ed evitando la loro denaturazione o alterazione. Gli allergeni sono normalmente caratterizzati da una rapida solubilizzazione in solventi acquosi, che può essere ulteriormente facilitata da una preventiva triturazione e sgrassaggio. I tempi brevi di estrazione garantiscono un completo rilascio di allergeni da parte della materia prima, limitando la proliferazione microbica, la denaturazione e la degradazione delle proteine. Per gli allergeni alimentari le soluzioni estraenti più utilizzate sono PBS (phosphate buffered saline), Tris-HCl, Björkstén buffer.

La miscela, composta da materia prima e liquido estraente, viene poi centrifugata per eliminare il materiale insolubile sotto forma di sedimento e per trattenere il sovrantante, in cui vi si trovano disciolte le proteine da ricercare. Il sovrantante come tale è il primo estratto, definito grezzo, nel

Cattedra di Allergologia e Immunologia clinica, Dipartimento delle Emergenze e dei Trapianti d'organi, Università degli studi di Bari "Aldo Moro".  
Drsa Elisabetta Damiani, Sezione di Allergologia e Immunologia clinica, Policlinico, Piazza Giulio Cesare 11, 70124 Bari (e-mail: damiani@allergy.uniba.it).

Conflitto d'interesse: dichiarato assente dagli Autori.

Accettato per la pubblicazione il 25 giugno 2012.

quale sono presenti soluti che devono essere allontanati mediante una dialisi/filtrazione. Il nuovo estratto, pertanto, contiene le proteine la cui concentrazione viene determinata mediante metodo colorimetrico o spettrofotometrico. Previa liofilizzazione oppure congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , l'estratto può essere conservato a lungo.

### **Spettro proteico**

Per definizione è il risultato della migrazione elettroforetica delle proteine contenute nell'estratto. Le proteine sono definite dal peso molecolare (PM), dalla conformazione spaziale e dalla carica elettrica, tutti fattori che ne caratterizzano la mobilità elettroforetica. Per la verifica dello spettro proteico si esegue un'elettroforesi in gel di poliacrilamide in presenza del tensioattivo anionico sodio-dodecil-solfato (SDS-PAGE), il quale determina una variazione della conformazione spaziale delle proteine, formando complessi SDS-catena polipeptidica la cui carica elettrica e la dimensione spaziale sono proporzionali al PM. I gel di poliacrilamide possono avere una diversa porosità ed una diversa concentrazione di acrilamide; entrambi i fattori sono da considerare per ottenere una separazione ottimale delle proteine.

Per eseguire l'elettroforesi, all'estratto si aggiunge il "sample buffer" (tampone costituito da SDS-blu-bromofenolo e glicerolo) ed in alcuni casi, con lo scopo di rompere i ponti disolfuro tra i residui di cisteina, anche una sostanza riducente. Dopo, la miscela si riscalda a  $100^{\circ}\text{C}$  per circa 5 minuti. In parallelo si esegue la corsa con un mix di proteine a PM noto (standard di riferimento) per poter confrontare i PM delle proteine presenti nell'estratto. La corsa elettroforetica viene eseguita per circa 1 ora a 190 V in un'apposita camera elettroforetica con l'aggiunta di "running buffer". Al termine della corsa la posizione delle proteine può essere resa visibile mediante colorazione con blu Coomassie.

### **Trasferimento delle proteine**

La tecnica fin qui descritta separa soltanto le proteine presenti nell'estratto, senza differenziare in alcun modo quelle con caratteristiche allergeniche rispetto alle altre. L'identificazione delle proteine allergeniche sfrutta la capacità, di queste ultime, di legare IgE specifiche, presenti nel siero di soggetti clinicamente sensibilizzati. Le proteine, separate con la procedura descritta, vengono trasferite su una membrana porosa in nitrocellulosa da 0,2 a  $0,45\ \mu\text{m}$ , idonea ad essere

incubata con il siero. Questa tecnica è generalmente chiamata Western blotting. Per il trasferimento delle proteine ci si avvale di una camera per blotting e di un tampone di trasferimento. Il tempo impiegato per il trasferimento delle proteine è di circa 1 ora e mezza a 25V.

### **Interazione immunitaria**

Le membrane, con le proteine su esse adese, vengono saturate con tampone di saturazione e successivamente incubate per una notte con il siero del paziente sensibilizzato. Eliminato il siero, dopo lavaggi per allontanare le IgE in eccesso non legate, le membrane si lasciano interagire con anticorpi secondari (di capra) anti-immunoglobuline E umane, coniugate con perossidasi. L'avvenuto legame delle IgE specifiche alle proteine allergeniche sarà rivelato mediante una sostanza chemiluminescente (ad esempio, luminolo). La presenza e la posizione delle macchie così ottenute rappresentano lo spettro allergenico<sup>1</sup>.

### **Applicazioni cliniche**

L'immunoblotting è stato da noi utilizzato per spiegare alcuni casi suggestivi di reazioni da ipersensibilità immediata indotte da alimenti causa emergente di allergia oppure in tutti quei casi in cui la classica diagnostica non confermava l'ipotesi, nonostante la storia clinica significativa.

### **Allergia alla pitaya rossa**

La pitaya rossa (*Hylocereus undatus*) è un frutto appartenente alla famiglia delle *Cactaceae* come il fico d'India. La polpa di pitaya rossa viene comunemente consumata cruda oppure in succhi di frutta. Si conoscono due varietà di pitaya. La rossa originaria della Colombia e la gialla originaria del Vietnam.

Abbiamo studiato il caso clinico di una giovane donna (19 anni), non atopica, che riferiva orticaria dopo ingestione di una macedonia di frutta composta da pitaya rossa, kiwi, arancia, anguria e uva. La paziente accettò di sottoporsi a test epicutanei a lettura ritardata (serie standard SIDAPA) con esito negativo, prick test (PT) con inalanti e pollini risultando cutinegativi, PT con estratti commerciali di alimenti inclusi kiwi, arancia, uva e anguria, tutti cutinegativi. Inoltre, non disponendo di estratti commerciali per fico d'India e per pitaya rossa, fu eseguito un prick by prick con gli stessi, risultando positivo solo il

prick con pitaya. Le IgE specifiche sieriche per uva, anguria, kiwi e arancia risultarono assenti. Il prick by prick con polpa di pitaya rossa fu eseguito su 10 soggetti sani con esito negativo.

Per meglio spiegare la positività al test cutaneo con polpa di pitaya rossa nella nostra paziente si decise di allestire un estratto proteico dal frutto, con buon risultato in termini di concentrazione e di spettro elettroforetico, che permise di evidenziare una singola proteina di circa 10 kDa di PM. Sospettando un meccanismo d'ipersensibilità immediata, il siero della paziente fu utilizzato per l'immunoblotting che confermò la reattività verso la proteina di circa 10 kDa isolata dalla polpa del frutto allo stato nativo<sup>2</sup>.

#### Allergia ai bulbi di lampascione

“Lampascione” è il nome che viene comunemente dato al bulbo della pianta *Muscari (M) comosum* nativa del Mediterraneo, appartenete all'ordine *Asparagales*, famiglia *Hyacinthaceae*. I bulbi di *M comosum* si consumano cotti, dopo una cottura prolungata per eliminare il sapore amaro che il vegetale possiede.

Il caso clinico osservato riguardava una donna di 32 anni, affetta da eczema atopico delle mani e rinite allergica perenne. La paziente riferiva 3 episodi di reazione avversa al vegetale: il primo manifestatosi con orticaria e angioedema dopo ingestione di bulbi, il secondo con prurito in gola e sensazione di soffocamento dopo aver sostato in cucina, dove erano in cottura i bulbi; il terzo, sempre con orticaria, dopo aver adoperato una posata contaminata da olio in cui erano conservati i bulbi.

Furono allestiti estratti proteici da bulbi, sia bolliti che crudi, e fu evidenziata mediante SDS-PAGE, la presenza di proteine con PM compreso tra 14 e 30 kDa. Gli estratti allestiti per PT e adeguatamente diluiti (1:1000, 1:100 e 1:10) generarono nella paziente una cutipositività già alla diluizione 1:1000 per l'estratto crudo e a partire da 1:100 per quello bollito. La restante diagnostica confermò la rinite perenne con positività agli acari maggiori, mentre i PT con alimenti commerciali furono negativi; inoltre, non si dosarono IgE specifiche per gli altri vegetali appartenenti alla stessa famiglia del *M comosum*, quali aglio, cipolla e asparago. L'immunoblotting confermò il test *in vivo* rivelando immunoreattività verso la proteina di circa 29-30 kDa, presente sia nell'estratto di bulbi crudi che in quello di bulbi bolliti.

Il sospetto che i vapori di cottura potessero aver causato nella paziente la sintomatologia

sopra descritta, fu poi confermato dal fatto che fu possibile dimostrare la presenza di proteine, seppur in piccola concentrazione, anche nei vapori di cottura dei bulbi raccolti mediante apposite strumentazioni<sup>3</sup>.

#### Allergia al riccio di mare crudo

Il riccio di mare *Paracentrotus lividus* appartiene al *Phylum echinodermata*, classe *Echinoidea*. L'uso alimentare di questo animale è comune in Corea, Giappone, Spagna e Italia e nell'Italia meridionale si consuma generalmente crudo; inoltre la parte edibile è rappresentata dalle gonadi.

Il caso clinico da noi descritto riguardava una donna di 28 anni, con storia di rinite allergica perenne, che riferiva un primo episodio di orticaria dopo ingestione di ricci di mare crudi e bivalvi come ostriche e cozze. Il secondo e terzo episodio comparvero dopo ingestione di soli ricci di mare.

I ricci di mare furono utilizzati per allestire l'estratto proteico e definire il profilo proteico che rivelò la presenza di una proteina con PM di 118 kDa. La paziente fu sottoposta a PT con pollini ed inalanti (con cutipositività per acari maggiori, cipresso e graminacee), a PT con estratti commerciali di alimenti inclusi ostrica, cozza, vongola, gamberetto e *Anisakis simplex* (con cutipositività solo per *Anisakis*), a PT con estratti di riccio di mare diluiti 1:10, 1:100 e 1:1000 (con cutipositività alla diluizione 1:100 e 1:10). Assenti le IgE specifiche per cozza, vongola, ostrica e gamberetto.

Il siero della paziente fu utilizzato per confermare, mediante immunoblotting, la presenza di IgE specifiche immunoreattive verso la proteina di circa 118 kDa presente nel riccio di mare<sup>4</sup>.

#### Conclusioni

Tutti gli alimenti disponibili in natura, ad eccezione di quelli privi di proteine, possono essere sensibilizzanti ed allergizzanti, pertanto studiabili con questa metodica<sup>1</sup>.

#### Bibliografia

1. Damiani E, Aloia AM, Priore MG, et al. Nuove proteine allergeniche vegetali: rassegna della letteratura ed esperienze personali. *It J Allergy Clin Immunol* 2008; 18: 39.
2. Damiani E, Aloia AM, Priore MG, et al. Allergy to red pitaya. *Allergy* 2008; 63: 1252.
3. Foti C, Nettis E, Cassano N, et al. Allergy to *Muscari comosum* bulb. *Allergy* 2007; 62: 1217.
4. Damiani E, Nettis E, Priore MG, et al. *Paracentrotus lividus* raw and allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 101: 107.

## Diagnostica allergologica molecolare: microarray

Mauro Giani

**Riassunto.** L'identificazione delle molecole allergeniche ha consentito di "personalizzare" la diagnosi, identificando il profilo allergologico di ogni singolo paziente. Attualmente sono disponibili diversi sistemi *in vivo* e *in vitro* e, tra questi, è stato realizzato un nuovo sistema in multiplex che utilizza la tecnologia del microarray: il sistema ISAC (Immuno Solid-phase Allergen Chip). Tale sistema permette oggi di ricercare contemporaneamente le IgE specifiche dirette contro 112 molecole allergeniche.

**Parole chiave:** diagnostica allergologica, diagnostica allergologica molecolare, microarray.

**Summary.** *Molecular allergy diagnostics: microarray.* The identification of allergenic molecules made it possible to "personalize" the diagnosis, identifying the allergy profile of each individual patient. Currently, there are different systems *in vivo* and *in vitro*, and among these, a new system was created which uses multiplex microarray technology: the ISAC system (Immuno Solid-phase Allergen Chip). This system now enables to search simultaneously specific IgE directed against 112 allergenic molecules.

**Key words:** allergy diagnostics, molecular allergy diagnostics, microarray.

### Introduzione

Gerolamo Cardano, nato a Pavia il 24 settembre 1501 e morto a Roma il 21 settembre 1576, non fu solo un inventore (ancora oggi il giunto cardanico viene utilizzato nei veicoli), matematico ed astrologo, ma anche medico. Può essere considerato il primo allergologo della storia: egli infatti intuì che i sintomi respiratori (asma) di cui soffriva il cardinale Hamilton, in Scozia, dipendevano da fattori (acari? micofiti?) presenti nell'ambiente domestico, per cui attuando una bonifica ambientale risolse la sintomatologia del paziente.

Sin dagli inizi, il primo obiettivo dell'allergologo è quello di identificare la fonte allergenica (pollini, acari, alimenti, imenotteri, lattice, etc) alla quale il paziente è sensibilizzato e per far ciò si utilizzano, nella diagnostica allergologica tradizionale, i cosiddetti estratti diagnostici (*in vivo* e/o *in vitro*), costituiti da numerose componenti allergeniche e non allergeniche, in concentrazioni variabili e non note.

Le componenti allergeniche possono essere distinte in: proprie ("genuine"), cioè responsabili delle vere sensibilizzazioni; condivise da

altre fonti allergeniche ("panallergeni"), cioè responsabili dei fenomeni di reattività crociata e di "false" polisensibilizzazioni.

### Limiti della diagnostica allergologica tradizionale

L'uso della diagnostica allergologica tradizionale ha alcuni limiti. È impossibile infatti: a) identificare i "veri" polisensibili tra i pazienti risultati positivi ai test (*in vivo* o *in vitro*) a numerosi allergeni (inalanti o alimenti o altro); b) distinguere, tra i pazienti positivi ad un allergene importante (ad esempio, lattice), chi deve attuare le complicate e costose norme di profilassi, da chi invece non necessita di tali procedure; c) identificare, fra i pazienti sensibili ad un allergene ambientale, quelli che devono evitare l'ingestione di alimenti correlati (ad esempio, crostacei e lumache in pazienti sensibili agli acari); d) decidere, nei pazienti con anamnesi di reazione avversa e positività ad un alimento, quale tipo di prevenzione sia preferibile adottare (evitare l'alimento in tutte le sue forme, crudo, cotto, fresco o conservato, oppure evitarlo solo crudo, fresco o altro), stabilire il rischio che l'ingestione di un

determinato alimento potrebbe causare ed informare su quali altri alimenti, apparentemente non correlati, potrebbero causare sintomi.

È inoltre possibile ottenere falsi negativi in caso di sensibilizzazione verso una componente allergica assente o scarsamente rappresentata nell'estratto diagnostico.

## Diagnostica allergologica molecolare

### Molecole allergiche

Negli ultimi 15 anni sono state identificate le molecole allergiche, vere responsabili delle sensibilizzazioni allergiche, e ciò ha fornito un enorme aiuto sia nella ricerca sia nella pratica clinica.

Le molecole allergiche possono essere classificate in "famiglie", in base alla struttura ed alla funzione biologica, dalle quali deriva la diversa tipologia e gravità dei sintomi che possono causare. Tra le famiglie più importanti si segnalano: prolamine (LTP, albumine 2 S, conglutinine, prolamine dei cereali), cupine (viciline, leguminine), tropomiosine, profiline, Bet v 1-like, oleosine, parvalbumine, paramiosine, chitinasi, vitellogenine, glutenine, taumatine.

In una stessa fonte allergica possono coesistere molecole appartenenti a famiglie diverse per cui, ad esempio, nell'arachide possiamo avere: ara h 1 (vicilina), ara h 2 (conglutina), ara h 3 (glicinina), ara h 4 (glicinina), ara h 5 (profilina), ara h 6 (albumina 2 S), ara h 7 (conglutina), ara h 8 (Bet v 1-like), ara h 9 lipid transfer protein; LPT, ara h 10 (oleosina), ara h 11 (oleosina).

È di notevole importanza poter identificare verso quale molecola il paziente è sensibilizzato, perchè, ad esempio, un paziente sensibilizzato solo verso le profiline, proteine con peso molecolare (PM) 12-15 kDa (tabella I), termolabili e sensibili alla digestione pepsinica, presenti in pollini, alimenti vegetali e lattice, andrà informato che i cibi possono causare, di solito, solo sintomi modesti (sindrome orale allergica) solo quando crudi o freschi, mentre sono ben tollerati quando sono cotti. Al contrario, un paziente sensibilizzato verso LTP (proteine con PM di 9 kDa, termostabili e resistenti alla digestione pepsinica, presenti in pollini, alimenti e lattice) (tabella II) dovrà essere messo a conoscenza che gli alimenti che le contengono, sia crudi che cotti, freschi e/o conservati (succhi di frutta, frutta candita, marmellate, etc) possono causare sintomi sia lievi (sindrome

Tabella I - *Alimenti (ad oggi identificati) che possono contenere profiline.*

Ananas, anguria, anice, arachide, arancia, asparago, avocado, banana, carota, cetriolo, ciliegia, cipolla, coriandolo, cumino, fico, finocchio, fragola, gelso, jack fruit, kaki, kiwi, litchi, mandorla, mango, mela, melone, nocciola, noce, papavero, patata, peperone, pera, pesca, pisello, pomodoro, prezzemolo, prugna, riso, sedano, segale, sesamo, soia, spinacio, uva, zafferano, zucca, zuccina

Tabella II - *Alimenti (ad oggi identificati) che possono contenere "lipid transfer protein".*

Albicocca, arachide, arancia, asparago, banana, broccolo, carota, castagna, ciliegia, cipolla, colza, fagiolo, fragola, gelso, grano, kiwi, lampone, lattuga, lenticchia, limone, mais, mandarino, mandorla, mela, melograno, mirtillo, nocciola, noce, orzo, pera, pesca, pomodoro, prezzemolo, prugna, rapa rossa, riso, scalogno, sedano, semi di girasole, senape, sesamo, uva, zafferano

orale allergica) sia severi (orticaria-angioedema, anafilassi).

La diagnostica molecolare consente quindi di: a) "personalizzare" la diagnosi identificando le vere sensibilizzazioni e le false polisensibilizzazioni; b) consigliare se un alimento sarà da evitare e, nel caso, in quale forma; c) informare sulla gravità dei sintomi che potrebbero derivare dall'ingestione di un alimento e quali altri alimenti, apparentemente non correlati, potrebbero causare sintomi; d) prescrivere, ove necessario, farmaci di pronto soccorso (corticosteroidi, adrenalina autoiniezzabile); e) prescrivere con precisione, ove indicata, l'immunoterapia allergene-specifica.

Per scegliere il test più idoneo da utilizzare per la diagnostica molecolare sono necessarie alcune ulteriori considerazioni. È possibile utilizzare marker di famiglie di molecole? È sufficiente cioè testare una singola molecola per ogni famiglia di molecole? È una questione molto dibattuta, ma se si considera che l'omologia di sequenza fra le singole molecole di una stessa famiglia è parziale (tabella III), ne consegue che più molecole (anche della stessa famiglia) saranno indagate, migliore sarà la definizione diagnostica. Infatti, un paziente sensibile a LTP della pesca non necessariamente avrà sintomi dopo l'ingestione degli altri cibi che possono contenere LTP.

### Test diagnostici

Quale tipo di test è preferibile utilizzare? Test *in vivo* o *in vitro*?

Tra i test *in vivo* il prick test (PT) è il più utiliz-

Tabella III - Percentuale d'identità della sequenza fra alcune molecole LTP e Pru p 3 (LTP pesca).

Cor a 8	(nocciola)	56%
Hev b 12	(latice)	55%
Ara h 9	(arachide)	53%
Lyc e 3	(pomodoro)	55%
Zea m 14	(mais)	50%
Tri a 14	(grano)	40%

zato, ma bisogna ricordare che attualmente sono disponibili poche molecole e che i PT possono essere influenzati da fattori legati ai pazienti (quali terapie farmacologiche, patologie cutanee concomitanti) e agli operatori (come eccessiva o scarsa pressione esercitata sulla lancetta, esecuzione di test troppo ravvicinati, tipo di strumento utilizzato per il test).

Tra i test *in vitro*, negli ultimi anni sono stati prodotti numerosi allergeni molecolari per il dosaggio delle immunoglobuline E specifiche (IgEs) ma, dovendo testare un numero cospicuo di molecole (pazienti polisensibilizzati), bisogna considerare i volumi di siero necessari (circa 50  $\mu$ l per ogni determinazione) ed i relativi costi e, quindi, per identificare le IgEs dirette contro un gran numero di singole molecole allergeniche, è stato realizzato un nuovo sistema *in vitro* che utilizza la tecnologia del microarray: il sistema ISAC (Immuno Solid-phase Allergen Chip).

La tecnologia del microarray (figura 1) si basa su substrati planari con superficie chimicamente modificata per immobilizzare molecole (proteine) sotto forma di spot separati, disposti regolarmente.

Ogni vetrino ha 4 siti individuali di reazione e su ogni sito si possono immobilizzare fino a 150 molecole (naturali o ricombinanti), ognuna

in triplicato.

Per l'analisi sono sufficienti 20  $\mu$ l di siero. Dopo un periodo di incubazione di 120 minuti, le IgEs sono rilevate mediante aggiunta di anticorpi anti-IgE marcati con fluorescina. L'analisi computerizzata delle immagini ottenute mediante scansione consente la distribuzione in classi ISAC®.

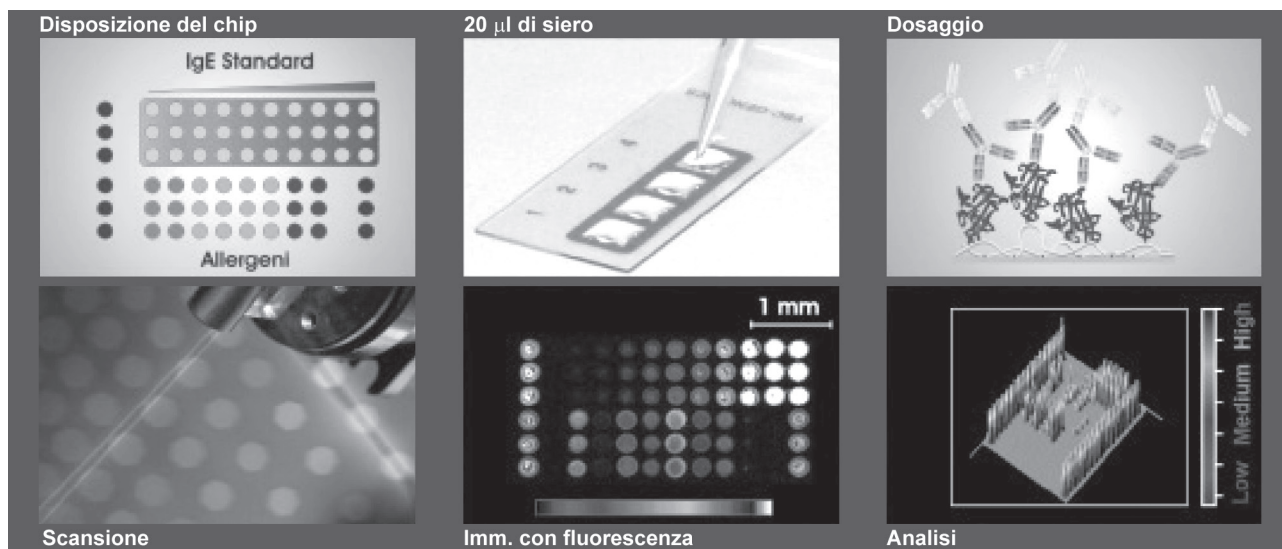
## Conclusioni

In caso di esecuzione di indagini molecolari, che consentono di "personalizzare" la diagnosi identificando il profilo allergologico di ogni singolo paziente, bisogna sempre ricordare che, per quante molecole si possano testare (attualmente 112), non sono tutte, per cui, per evitare falsi negativi, è opportuno affiancare, quando necessario, la diagnostica tradizionale, *in vivo* o *in vitro*, in base al sospetto diagnostico. Inoltre è doveroso informare con chiarezza i pazienti sull'esito dei test, sottolineando che la positività verso una molecola non implica necessariamente una reattività clinica in atto. Pertanto, compito del clinico, per formulare diagnosi precise, sarà quello di correlare con attenzione l'esito dei test all'anamnesi e all'esame obiettivo.

## Bibliografia

1. Shreffler WG. Microarrayed recombinant allergens for diagnostic testing. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 843.
2. Sanz ML, Blazquez AB, Garcia BE. Microarray of allergenic component-based diagnosis in food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011; 11: 204.

Figura 1 - Tecnologia del microarray.



## Microarray: applicazioni cliniche

Paolo Daniele Pigatto e Samuele Burastero

**Riassunto.** Il microarray ISAC® è l'acronimo per "Immuno Sorbent Allergo Chip". Questo test determina simultaneamente, in una sola seduta analitica, la presenza di IgE per un pannello di 103 allergeni sia respiratori che alimentari, che copre la quasi totalità delle allergie d'interesse clinico, incluse quelle meno frequenti. Il microarray ha inoltre il vantaggio qualitativo, rispetto ai test tradizionali, di utilizzare singole componenti allergeniche (ricombinanti o native) permettendo la distinzione delle positività multiple dovute a reattività crociata rispetto ad autentiche polisensibilizzazioni a più fonti allergeniche. Identifica e distingue positività IgE-mediate per allergeni alimentari potenzialmente correlate con reazioni sistemiche anche gravi da quelle abitualmente associate a sintomi locali minori.

**Parole chiave:** dosaggio IgE specifiche, microarray, allergeni ricombinanti.

**Summary.** *Microarray: clinical applications.* The ISAC® microarray is an acronym for "Immuno Sorbent Allergo Chip". This test doses simultaneously, in a single analytical run, the presence of IgE to a panel of 103 respiratory and food allergens which cover almost all allergens of clinical interest, including those less frequent. Microarray has another advantage compared to traditional tests: it uses a single allergen component (native or recombinant), allowing the distinction between multiple positive reactions due to cross-reactivity from genuine multiple sensitivity due to several allergenic sources. It identifies and distinguishes IgE-mediated positivities to food allergens potentially related to severe systemic reactions from those usually associated with less severe symptoms.

**Key words:** specific IgE, microarray, recombinant allergens.

### Introduzione

La prevalenza delle malattie allergiche nei paesi industrializzati è andata aumentando negli ultimi 20 anni ed è oggi vicina a una proporzione che in alcuni paesi appare stabile e prossima al 20%. La maggior parte delle reazioni allergiche clinicamente rilevanti è correlata alla presenza, nei liquidi biologici dei soggetti affetti, di anticorpi di isotipo IgE specifici (IgEs) per proteine riconosciute dal sistema immune (antigeni) definite, per il loro ruolo, allergeni. La presenza di IgEs indica uno stato immune particolare, definito "sensibilizzazione", in forza del quale il soggetto reagisce agli allergeni come se si trattasse di agenti infettivi (in particolare parassiti), nei riguardi dei quali deve sviluppare una reattività infiammatoria con finalità protettive. In realtà gli allergeni sono componenti proteiche

o glicoproteiche di svariata origine (pollini, muffe, acari della polvere domestica, proteine di animali) del tutto innocue per il nostro organismo e l'allergia rappresenta una risposta inadeguata del sistema immune nei riguardi di tali proteine.

Il dosaggio delle IgEs è preliminare ad ogni intervento terapeutico, sia puramente sintomatico sia finalizzato a modificare il decorso della malattia (tramite immunoterapia desensibilizzante specifica). Occorre infatti accertare la natura allergica di disturbi come rinite, congiuntivite, asma od orticaria, suggestivi per patogenesi allergica, prima di curarli con farmaci anche solo sintomatici, adeguati a contrastare selettivamente l'infiammazione IgE-mediata (ad esempio, antistaminici, anti-leucotrienici).

I kit standard attualmente disponibili per i test allergodiagnostici *in vivo* sono costituiti

da estratti di allergeni preparati con materiale biologico grezzo. Si tratta, frequentemente, di cocktail naturali di molecole allergeniche e non-allergeniche, standardizzati da ogni produttore con criteri non omogenei per quanto riguarda il contenuto di componenti allergeniche maggiori e minori, importanti sia per la diagnosi che per la corretta impostazione della terapia immune<sup>1</sup>.

A causa dei limiti della diagnostica per estratti, molti pazienti vengono impropriamente definiti come polisensibilizzati o pluri allergici. Infatti numerose fonti biologiche contengono componenti allergeniche ad elevato grado di reattività crociata, ad esempio la profilina, che si trova in un'ampia gamma di pollini e di alimenti di origine vegetale. Una sensibilizzazione verso questo tipo di pan-allergene dà risultati positivi a diversi estratti allergenici.

A maggior ragione occorre misurare le IgEs per attuare le misure fondamentali che possono influenzare il decorso stesso della malattia allergica, ovvero la riduzione dell'esposizione all'allergene (quando possibile) e soprattutto l'immunoterapia (o vaccinazione), che è basata sulla somministrazione degli stessi allergeni sensibilizzanti<sup>2,4</sup>.

Il dosaggio delle IgEs si deve confrontare con due problemi biologici: il fatto che il titolo delle IgE nel siero (ove vengono abitualmente misurate) è da diecimila a un milione di volte inferiore rispetto a quello di altri isotipi (ad esempio, IgG) e il fatto che l'allergene presente nell'ambiente (fonte allergenica) è una miscela antigenica complessa, composta da molteplici proteine ciascuna delle quali variabilmente specifica di quella data fonte, variabilmente immunogenica e variabilmente riconosciuta dalla popolazione (in termini di proporzione di soggetti sensibilizzati).

La combinazione di questi aspetti rende ardua la standardizzazione dei test tradizionali disponibili a causa di alcune criticità, quali<sup>5</sup>:

a) l'utilizzo degli estratti antigenici genera problemi di consistenza da lotto a lotto e di rappresentatività della sorgente allergenica delle diverse realtà ambientali, ad esempio nord versus sud Europa;

b) la rappresentatività, all'interno dell'estratto, delle singole componenti allergeniche, non consente di valutare tutta la popolazione con la stessa performance. Infatti

alcune componenti, in quanto presenti in un determinato estratto solo in minima proporzione, rendono questo ultimo ovviamente inadeguato ad identificare soggetti che, per quanto infrequenti, hanno IgE che per tale componente (detta "allergene minore") sono specifiche. D'altro canto è largamente dimostrato che esistono persone sensibilizzate prevalentemente o esclusivamente ad allergeni minori<sup>6</sup>;

c) l'uso degli estratti allergenici nei test per la determinazione delle IgEs non consente di discriminare, nei polisensibilizzati (circa il 75% della popolazione allergica) le sensibilizzazioni multiple da false positività dovute alla presenza di IgE per componenti allergeniche assai omogenee sul piano antigenico, presenti in fonti allergeniche diverse. Queste ultime sono i cosiddetti pan-allergeni, quali le profiline e le calcium binding proteins o policalcine delle graminacee e delle betulacee, che causano reattività crociata nella diagnostica basata sugli estratti. A causa di tale reattività la diagnostica per estratti non consente di discriminare soggetti veramente sensibilizzati a ciascuna delle due fonti allergeniche dai soggetti che sono in realtà sensibilizzati ad una di esse<sup>7,8</sup>;

d) l'uso degli estratti non consente di discriminare, soprattutto ma non solo nelle allergie alimentari, le sensibilizzazioni potenzialmente associate a sintomi clinici severi da quelle a decorso più benigno. Ad esempio la presenza di IgE per l'estratto di noce, a qualunque titolo, non discrimina soggetti che non hanno alcun sintomo all'assunzione di questo frutto, o al più lamentano disturbi allergici localizzati alla mucosa della bocca (sindrome orale allergica), da soggetti potenzialmente a rischio per reazioni allergiche sistemiche (orticaria, shock anafilattico). Questo perché nell'estratto allergenico sono presenti sia componenti termo- e acido-labili tra noce e alcuni pollini (tipicamente, betulacee), sia componenti termo- e acido-stabili, che sono specifiche della sorgente allergenica in parola. A causa di questa situazione, la maggior parte delle numerose persone allergiche a piante ad alto fusto (betulacee) hanno IgE per l'estratto di noce, ma non possono essere distinte su questa sola base dalle persone con "vera" allergia alimentare a noce<sup>9,10</sup>.

In questo scenario, l'era dell'allergologia molecolare, iniziata nei primi anni '90 con il

clonaggio dei geni codificanti per gli allergeni più comuni, ha rivoluzionato la diagnostica allergologica. Infatti, la disponibilità, all'interno di ciascuna sorgente allergenica, delle sue componenti, singolarmente clonate tramite ingegneria genetica o comunque isolate dall'estratto di partenza (cosiddette "componenti allergeniche native"), consente di diffezionare la reattività IgE-mediata di ogni paziente, ovviando a tutte le criticità sopraelencate. La disponibilità della diagnostica molecolare si è realizzata inizialmente (poco più di 10 anni orsono) nel contesto metodologico tradizionale (test immunoenzimatico fluorimetrico con allergene adsorbito su fase solida ad elevata efficienza di coating), con le caratteristiche di un evento in qualche modo sperimentale e additivo rispetto alla diagnostica con estratti. Negli ultimi anni si è affacciato nel panorama della diagnostica allergologica molecolare un nuovo test basato sulla metodica microarray applicata agli allergeni e si è reso disponibile un prodotto per la routine (ImmunoCAP ISAC<sup>®</sup>, prodotto da Thermo Fisher Scientific - Rodano, Milano - già Phadia). Il microarray rappresenta un'evoluzione rilevante della diagnostica molecolare con test immunoenzimatico fluorimetrico.

### Test ISAC<sup>®</sup>

#### *Punti di forza*

A differenza dei test convenzionali con estratti allergenici, il test ISAC<sup>®</sup> consente di interpretare false positività multiple dovute a reattività crociata, nonché di distinguere positività potenzialmente correlate con gravi reazioni allergiche da altre abitualmente associate a sintomi minori. In particolare, l'esecuzione del test ISAC<sup>®</sup> permette di: discriminare, con la maggiore accuratezza oggi disponibile, l'allergene che causa la sintomatologia; allestire estratti antigenici per immunoterapia estremamente mirati; aumentare significativamente l'efficacia dell'immunoterapia specifica e fornire consigli adeguati a soggetti con allergie alimentari. In sintesi questo test offre la possibilità di migliorare in modo significativo la qualità della vita del paziente allergico<sup>11</sup>.

#### *Potenziati punti di debolezza*

La scelta degli allergeni da testare non può

prescindere dalla storia clinica, dall'esame fisico, dagli eventuali risultati di test precedenti e da altri fattori come età, area geografica e reale esposizione. I risultati dei test *in vitro* devono essere sempre valutati insieme con la storia clinica, perché la sensibilizzazione allergenica non implica necessariamente una reazione clinica. In questo scenario, l'utilizzo di componenti allergeniche definite dal produttore in numero elevato nei sistemi microarray, da una parte facilita questo compito (il medico non deve scegliere le componenti allergeniche da valutare, come nell'approccio tradizionale, grazie al fatto che il microarray è una metodica "all inclusive"), dall'altra rende non facile l'interpretazione del test stesso. Di fatto, la possibilità di studiare anticorpi IgEs contro i ricombinanti o le componenti allergeniche native ha determinato nuove difficoltà per i professionisti nell'interpretazione corretta dei risultati dei test, una situazione che ai meno giovani può ricordare i problemi legati all'interpretazione delle prime TAC.

Pur con questi distinguo, il microarray appare come uno strumento di efficace supporto per il raggiungimento di scelte cliniche appropriate e tempestive per i pazienti. Per varie ragioni che includono, oltre alle caratteristiche soprariportate, il costo e la non rimborsabilità da parte del servizio sanitario nazionale nella maggior parte delle regioni italiane, il microarray al momento può collocarsi come test allergologico di terzo livello, dopo il prick test e dopo il RAST per la determinazione delle IgEs. Nonostante che gli attuali microarray siano in grado di rilevare un centinaio di diverse molecole allergeniche, in un prossimo futuro ancora più molecole saranno disponibili.

### Conclusioni

Il microarray è uno strumento potenzialmente utile in diagnostica allergologica, anche se fino ad ora la sua introduzione nella routine è stata ostacolata dai suoi alti costi e dalla relativa mancanza di flessibilità. Infatti, si è costretti a testare gli allergeni scelti dal produttore del kit, che non sono necessariamente rappresentativi del pannello più utile per le tipologie di pazienti che s'incontrano nella pratica clinica in una certa area geografica. E' ben vero che si tratta di un "work in pro-

gress” e che il nuovo kit a 112 allergeni, appena prodotto da Thermo Fisher Scientific, ha significativamente migliorato alcuni limiti del kit precedente a 103 allergeni. Tuttavia, dato che questo produttore opera praticamente in regime di monopolio, è particolarmente importante che la comunità scientifica mantenga su di esso una forte pressione per indirizzare le scelte relative agli allergeni inclusi verso ulteriori modifiche che possano risultare di effettivo beneficio per il corretto inquadramento diagnostico dei pazienti.

In questo contesto, considerando gli alti costi, attualmente molti professionisti preferiscono le tradizionali determinazioni di IgEs per singole componenti allerginiche, favorendo quelle di maggior interesse. Ad esempio, lo studio delle IgEs per profiline e proteine leganti calcio (procalcine) spesso basta a ridurre il rischio di confusione e fraintendimenti nella definizione del profilo di sensibilizzazione di un paziente.

## Bibliografia

1. Cretich M, Breda D, Damin F, et al. Allergen microarrays on high-sensitivity silicon slides. *Anal Bioanal Chem* 2010; 398: 1723.
2. Gadisseur R, Chapelle JP, Cavalier E. A new tool in the field of in vitro diagnosis of allergy: preliminary results in the comparison of ImmunoCAP® 250 with the ImmunoCAP® ISAC. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49: 277.
3. Hochwallner H, Schulmeister U, Swoboda I, et al. Microarray and allergenic activity assessment of milk allergens. *Clin Exp Allergy* 2010; 40: 1809.
4. Sastre J. Molecular diagnosis in allergy. *Clin Exp Allergy* 2010; 40: 1442.
5. De Knop KJ, Bridts CH, Verweij MM, et al. Component-resolved allergy diagnosis by microarray: potential, pitfalls, and prospects. *Adv Clin Chem* 2010; 50: 87.
6. Ott H, Schröder C, Raulf-Heimsoth M, et al. Microarrays of recombinant *Hevea brasiliensis* proteins: a novel tool for the component-resolved diagnosis of natural rubber latex allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010; 20: 129.
7. Lucas JM. Microarrays: molecular allergology and nanotechnology for personalised medicine (I). *Allergol Immunopathol (Madr)* 2010; 38: 153.
8. Ott H, Fölster-Holst R, Merk HF, et al. Allergen microarrays: a novel tool for high-resolution IgE profiling in adults with atopic dermatitis. *Eur J Dermatol* 2010; 20: 54.
9. Ebo DG, Bridts CH, Verweij MM, et al. Sensitization profiles in birch pollen-allergic patients with and without oral allergy syndrome to apple: lessons from multiplexed component-resolved allergy diagnosis. *Clin Exp Allergy* 2010; 40: 339.
10. Scala E, Alessandri C, Bernardi ML, et al. Cross-sectional survey on immunoglobulin E reactivity in 23,077 subjects using an allergenic molecule-based microarray detection system. *Clin Exp Allergy* 2010; 40: 911.
11. Melioli G, Bonifazi F, Bonini S, et al. The ImmunoCAP ISAC molecular allergology approach in adult multisensitized Italian patients with respiratory symptoms. *Clin Biochem* 2011; 44: 1005.

## Test diagnostici nelle reazioni da ipersensibilità immediata a farmaci: il test di attivazione dei basofili

Gennaro Maietta

**Riassunto.** Le reazioni avverse a farmaci (RAF) sono quadri clinici di frequente osservazione nella comune pratica clinica. Nell'ambito di esse, una percentuale pari al 2,5-3% è legata a reazioni immunologicamente mediate nei confronti di apteni presenti nella preparazione farmaceutica. La diagnosi delle reazioni da ipersensibilità immediata rappresenta a tutt'oggi un serio problema, sia per la scarsa disponibilità di allergeni standardizzati da utilizzare nell'esecuzione dei test cutanei *in vivo* o dei test sierologici *in vitro*, sia per la scarsa significatività dei risultati che emergono da tali indagini. Al momento attuale, il gold standard nella diagnostica delle RAF è rappresentato dai test di scatenamento, che richiedono molto tempo per la loro esecuzione e comportano rischi per il paziente. In tale ottica, da circa 20 anni i ricercatori hanno messo a punto il test di attivazione dei basofili (TAB), un test *in vitro* potenzialmente in grado di simulare la reazione del sistema immunitario al farmaco sospetto, senza rischi per il paziente. Nel presente lavoro vengono riportati i dati della letteratura attualmente disponibili relativi all'applicazione di TAB nelle reazioni da ipersensibilità immediata a differenti farmaci di uso comune.

**Parole chiave:** reazioni avverse a farmaci, reazioni da ipersensibilità immediate a farmaci, test di attivazione dei basofili, diagnosi.

**Summary.** *Diagnostic tests in immediate hypersensitivity drug reactions: basophil activation test.* Adverse drug reaction (ADR) are frequently observed in daily clinical practice. Among them, a percentage of 2.5-3% is linked with immunological mediated mechanisms. The diagnosis of immediate hypersensitivity drug reactions is still an important question, because of the lack availability of standardized allergens to use in performing skin tests or specific IgE determination and because of the poor sensitivity and specificity of the available tests. At the moment, the challenge test represents the gold standard in the diagnosis of ADR, but it is time consuming and it is potentially dangerous for the patient's safety. For this reasons 20 years ago, scientists developed the basophil activation test (BAT), which is able to simulate *in vitro* the immune reaction to the culprit drug, without risks for the patient. In this paper we report the data currently available about the application of BAT in the diagnosis of immediate hypersensitivity reactions to drugs commonly used in clinical practice.

**Key words:** adverse drug reaction, immediate hypersensitivity drug reactions, basophil activation test, diagnosis.

### Introduzione

La diagnostica delle reazioni da ipersensibilità immediata ai farmaci viene attuata, come nel caso di altre reazioni di tipo immediato, attraverso una accurata anamnesi clinica e, quando possibile, l'esecuzione di test diagnostici *in vivo*.

L'anamnesi clinica deve essere fondamentalmente mirata a discriminare il tempo di insorgenza della reazione rispetto all'assunzione del farmaco (inferiore a 2 ore, nelle reazioni immediate; maggiore di 2 ore in quelle ritardate), la presenza di precedenti assunzioni

del farmaco e la tipologia del quadro clinico indotto dalla reazione. Nell'ambito di questo primo approccio al paziente, saremo quindi in grado di discriminare reazioni da ipersensibilità di tipo immediato (come orticaria/angioedema, broncospasmo, anafilassi) da reazioni di tipo ritardato prevalentemente cutanee (quali esantema maculo-papulare, sindrome di Stevens-Johnson, necrolisi epidermica tossica, pustolosi esantematica acuta generalizzata).

La raccolta di questi importanti dati anamnestici deve guidare il successivo iter diagnostico.

La diagnostica delle forme immediate in-

Unità di Immunologia cellulare, Laboratorio Pignatelli, Lecce.

Dr. Gennaro Maietta, Unità di Immunologia cellulare, Laboratorio Pignatelli, Via Martiri D'Otranto 2, 73100 Lecce (e-mail: gmaietta2001@yahoo.it).

Conflitto d'interesse: dichiarato assente dall'Autore.

Accettato per la pubblicazione il 25 giugno 2012.

fatti prevede, ove possibile, l'esecuzione di test cutanei a lettura immediata (prick test e test intradermici) da effettuarsi con diluizioni scalari del farmaco, come previsto dalle linee guida EAACI (European Academy of Allergy and Clinical Immunology).

Un attento esame della letteratura scientifica ci permette di affermare che, nel caso delle reazioni immediate a  $\beta$ -lattamici, i test cutanei evidenziano una sensibilità pari al 70%, se vengono testate più molecole (benzilpenicilloid poli-L-lisina o PPL, mix di determinanti minori o MDM, amoxicillina, ampicillina) con una specificità del 97-99%. Nel caso delle reazioni da ipersensibilità immediata a miorilassanti, i test cutanei evidenziano una sensibilità ed una specificità pari al 97%.

A queste indagini di primo livello, si possono affiancare altre indagini di laboratorio di secondo livello che prevedono la determinazione della triptasi sierica, entro 4 ore dalla sospetta reazione allergica, e il dosaggio delle IgE specifiche (IgEs), ove siano disponibili le molecole e la procedura sia già standardizzata. In quest'ultimo caso, la ricerca delle IgEs per miorilassanti ha evidenziato una sensibilità pari all'88% con una specificità del 100%, mentre nel caso dei  $\beta$ -lattamici la sensibilità scende al 38-55% con una specificità dell'87-100%.

### **Il test di attivazione dei basofili**

La difficoltà a porre una diagnosi eziologica di reazione allergica a farmaci è legata alla differente tipologia dei meccanismi responsabili della reazione immunologica. In particolare, sappiamo che in alcuni casi, il farmaco è in grado di indurre un'attivazione e degranolazione di mastociti e basofili senza l'intermediazione delle IgEs, ma per meccanismi mediati dalle anafilotossine C5a e C3a e da meccanismi di liberazione diretta di amine vasoattive.

In altri casi, il farmaco agisce sul sistema immune come profarmaco, necessita cioè nei momenti successivi all'assorbimento, di un processo di elaborazione cellulare al termine del quale si forma l'antigene responsabile della reazione allergica. E' palese che in questo caso né i test cutanei, né tantomeno la ricerca delle IgEs può essere d'aiuto nella diagnostica della reazione. Non sono poi da escludere casi in cui esistono IgEs per il farmaco che, tutta-

via, non esplicano alcun valore funzionale. In questo caso una positività al test cutaneo o al test *in vitro* non è correlata ad una particolare situazione clinica.

Da tutte queste discrepanze, nasce la necessità di disporre di un test *in vitro* che sia in grado di simulare, il più possibile, quello che accade nel nostro organismo quando un farmaco si rende responsabile dell'insorgenza di una reazione da ipersensibilità immediata. La citometria a flusso rappresenta un sistema molto utile per l'analisi di differenti popolazioni cellulari e può essere utilizzata anche per la valutazione dei basofili che normalmente rappresentano meno dell'1% dei leucociti circolanti.

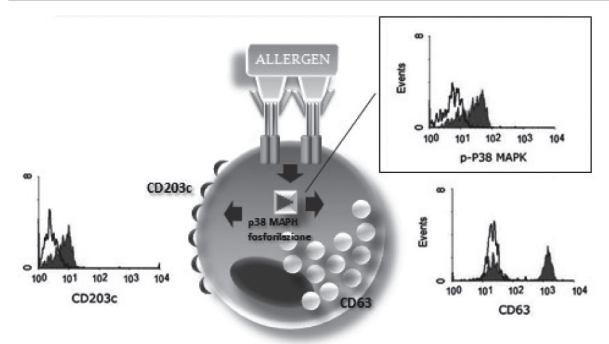
La citometria a flusso permette lo studio funzionale dei basofili utilizzando contemporaneamente marcatori di identificazione e marcatori di attivazione presenti sulla membrana cellulare o nel citoplasma. I marcatori di identificazione maggiormente utilizzati sono CCR3 (recettore per la chemochina RANTES), CD123 (recettore per la catena  $\alpha$  dell'IL-3) e CD203c (pirofosfatasi/fosfodiesterasi, metalloenzima transmembrana di tipo II, costitutivamente espresso dai basofili). L'utilizzazione di anticorpi monoclonali legati a fluorocromi e diretti verso tali antigeni permette una agevole identificazione dei basofili nel pool leucocitario mediante citometria a flusso.

I marcatori di attivazione più utilizzati al momento sono invece CD63 (glicoproteina presente sui granuli intracitoplasmatici, espressa sulla superficie cellulare quando i granuli si fondono con la membrana per il rilascio delle amine vasoattive) e CD203c (la cui espressione costitutiva sulla membrana viene aumentata di circa il 350% nel giro di pochi minuti a seguito dell'attivazione cellulare). L'attivazione dei basofili può essere misurata anche mediante lo studio di molecole intracellulari, quali p38 MAPK fosforilata o CD300a. Nella figura 1 è riportato un esempio di test d'attivazione dei basofili (TAB) in citometria a flusso con una metodica della Buhlmann che utilizza anticorpi anti-CCR3 e anti-CD63.

### **Test d'attivazione dei basofili e reazioni da ipersensibilità immediata a farmaci**

La scarsità di informazioni ottenute dall'esecuzione dei test cutanei a farmaci ed

Figura 1 - Esempio di test d'attivazione dei basofili.



i problemi deontologici legati all'esecuzione di test di scatenamento orale, ha spinto molti ricercatori a verificare la reale utilità di TAB nei soggetti con riferita reazione da ipersensibilità immediata a molecole farmacologiche.

I numerosi lavori eseguiti nell'ultimo decennio da importanti gruppi di ricerca hanno permesso di evidenziare come, nel caso delle diagnosi di allergia a farmaci, TAB possa essere validato per miorilassanti,  $\beta$ -lattamici ed acido clavulanico, mezzi di contrasto iodati, clorexidina, plasma-expander e carbossimetilcellulosa. Nella tabella I sono indicate le percentuali di sensibilità e specificità del test per categorie di farmaci studiati e i relativi lavori scientifici di riferimento.

## Conclusioni

Da quanto esposto, è possibile affermare che TAB rappresenta un test particolarmente

utile nella diagnosi delle reazioni da ipersensibilità immediata a farmaci.

La sensibilità e la specificità del test è, però, legata ad alcuni fattori fondamentali, quali esperienza dell'operatore che esegue il test, uso di molecole farmacologiche pure (non associate ad additivi o conservanti che potrebbero avere un'attività citotossica o attivante aspecifica sui basofili), esecuzione del test entro un intervallo temporale non superiore a 12 mesi dall'evento avverso, trattamento del campione entro le 24 ore dal prelievo, uso di cut-off e concentrazioni dell'allergene riportate in letteratura o dalla casa produttrice degli allergeni.

## Bibliografia

1. Abuaf N, Rajoely B, Ghazouani E, et al. Validation of a flow cytometric assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of muscle relaxant allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 411.
2. Monneret G, Benoit Y, Debard AL, et al. Monitoring of basophil activation using CD63 and CCR3 in allergy to muscle relaxant drugs. *Clin Immunol* 2002; 102: 192.
3. Sudheer PS, Hall JE, Read GF, et al. Flow cytometric investigation of peri-anaesthetic anaphylaxis using CD63 and CD203c. *Anaesthesia* 2005; 60: 251.
4. Kvedariene V, Kamey S, Ryckwaert Y, et al. Diagnosis of neuromuscular blocking agent hypersensitivity reactions using cytofluorimetric analysis of basophils. *Allergy* 2006; 61: 311.
5. Sainte-Laudy J, Orsel I. Interest of a new flow cytometric protocol applied to diagnosis and prevention of per anaesthetic accidents induced by neuromuscular blockers. *Rev Franc Allergol Immunol Clin* 2008; 48: 470.
6. Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM, et al. Flow-assisted diagnostic management of anaphylaxis from rocuronium bromide. *Allergy* 2006; 61: 935.
7. Sanz ML, Gamboa PM, Antepará I, et al. Flow cytometric

Tabella I- Sensibilità e specificità del test d'attivazione dei basofili per miorilassanti, beta-lattamici e farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS).

Allergeni	Test di riferimento	Sensibilità (%)	Specificità (%)	Voci bibliografiche
Miorilassanti	A	64	93	1
	A+TC	54	100	2
	A	79	100	3
	A+TC	36-86	93	4
	A+TC+IgE	68	100	5
Rocuronium	A+TC	92	100	6
Beta-lattamici	A+TC	50	93	7
	A+TC+IgE+TS	50	93	8
	A+TC	49	91	9
Metamizolo	A+TS	42	100	10
ASA e FANS	A+TS	15-55	74-100	11
FANS	A	43	100	12

A=anamnesi; TC=test cutanei; TS=test di scatenamento

- basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to betalactam antibiotics. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 277.
8. Torres MJ, Padial A, Mayorga C, et al. The diagnostic interpretation of basophil activation test in immediate allergic reactions to betalactams. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1768.
  9. Abuaf N, Rostane H, Rajoely B, et al. Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in the diagnosis of amoxicillin allergy. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 921.
  10. Gamboa PM, Sanz ML, Caballero MR, et al. Use of CD63 expression as a marker of in vitro basophil activation and leukotriene determination in metamizol allergic patients. *Allergy* 2003; 58: 312.
  11. Gamboa P, Sanz ML, Caballero MR, et al. The flow-cytometric determination of basophil activation induced by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is useful for in vitro diagnosis of the NSAID hypersensitivity syndrome. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1448.
  12. Rodriguez-Trabado A, Camara-Hijon C, Ramos-Cantarino A, et al. Basophil activation test for the in vitro diagnosis of nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity. *Allergy Asthma Proc* 2008; 29: 241.

## Reazioni di ipersensibilità immediata: test di esposizione orale nell'allergia alimentare

Francesca Giusti

**Riassunto.** Il test di provocazione orale con alimenti in doppio cieco contro placebo è considerato lo standard di riferimento per l'identificazione dell'ipersensibilità immediata agli alimenti. L'alimento, mascherato in modo tale da non poter essere riconosciuto né dal paziente né dal medico, viene somministrato a digiuno, raddoppiando la dose ogni 15-30 minuti. L'aspetto, il gusto, la quantità del cibo indagato e del placebo devono essere simili. È un esame indaginoso e laborioso e può elicitarne reazioni cutanee, gastrointestinali e respiratorie anche gravi, che non possono essere previste sulla base dei risultati dei test allergodiagnostici, per cui richiede la permanenza in ambiente ospedaliero. Nella pratica clinica esso è spesso sostituito dal test di provocazione alimentare in aperto.

**Parole chiave:** allergia alimentare, test di esposizione orale in doppio cieco controllato con placebo, test di esposizione orale in aperto.

**Summary.** *Immediate reactions: oral challenge in food allergy.* Oral food challenges are conducted to confirm whether an allergy to food exists or to monitor for resolution of a food allergy. Several techniques (double blinded, single blinded, open challenge) exist with which clinicians can challenge patients. Double-blind placebo-controlled food challenge is still the gold standard for diagnosing food allergy, especially in research. However it is time-consuming, expensive and troublesome for physician and patients. It requires a vehicle to ensure that the food is truly camouflaged. Use of capsules as a vehicle has fallen out of favor except for limited use in patients with suspected dye/additive allergy. Capsules prolong digestion time, require use of dehydrated or powdered foods, and limit assessment for oral symptoms given that digestion of the capsule starts in the stomach. Increments of food and placebo are given every 15 to 30 min until the cumulative target dose is met. The choice of a starting dose depends on the patient's history and official guidelines. One additional limitation of the double-blind placebo-controlled food challenge to consider is timing. Although some centers will perform active and placebo challenges in different sessions on the same day, they should ideally be separated by at least 24 hours. Although numerous efforts have been made to standardize the procedure, there is a need for improvement. Single blind challenge carries the same difficulties for masking foods as for the double blind challenge and the results are biased by the subjectivity of the observer. Therefore it is not recommended. Open challenges do not use a placebo, which can lead to subjective symptom development and a biased procedure. However, a clearly negative open challenge is generally confirmatory, and in certain cases (infants and young children, objective reactions to food) a clearly positive challenge may be as well. The benefits of the open challenge are that no complex food preparation is required, and that it is logistically easy for office medical staff to perform. Irrespective of the setting or type of challenge, staff should be familiar with assessing signs and symptoms of a potential reaction and must be prepared to treat anaphylaxis. The purpose of this manuscript is to review the current status of the indication and performance of oral food challenges in patients with suspected food-related symptoms. It covers aspects of indications and contraindications, blinding, procedures before the test, the technical performance, the handling of medication, the interpretation of the results, suitable locations for testing, and safety considerations.

**Key words:** food allergy, double blind placebo controlled food challenge, open food challenge.

### Introduzione

Il test di esposizione orale in doppio cieco controllato con placebo ("Double-Blind Place-

bo-Controlled oral Food Challenge", DBPCFC) rimane il gold standard per la diagnosi di allergia alimentare<sup>1,2</sup>. La complessità di tale prova tuttavia lo rende d'interesse limitato

Clinica dermatologica, Azienda ospedaliero-universitaria di Modena.

Dr.ssa Francesca Giusti, Clinica dermatologica, Azienda ospedaliero-universitaria di Modena, Via del Pozzo 71, 41124 Modena (e-mail: francesca.giusti0505@gmail.com).

Conflitto d'interesse: dichiarato assente dall'Autore.

Accettato per la pubblicazione il 25 giugno 2012.

nella routine clinica e ne limita l'impiego per lo più in pochi centri specializzati.

In numerosi casi può essere sostituito dal test di esposizione orale (TEO) in aperto. In particolare nei bambini piccoli, in cui l'ipotesi di simulazione di risposta positiva è molto ridotta, e in tutti i casi in cui s'indaga una reazione immediata con sintomi oggettivi si può partire dal TEO in aperto. Anche quando la probabilità di esito negativo del test è alta, è consigliabile ricorrere al challenge in aperto.

Rimane obbligatorio il DBPCFC nei protocolli scientifici. Tutte le volte che si indaga una reazione ad alimenti con sintomi soggettivi (cefalea, dolori articolari, sindrome da fatica cronica, sensibilità chimica multipla) si consiglia il ricorso al placebo.

Il TEO in singolo cieco controllato con placebo è di scarso interesse poiché la fase sicuramente più difficile del test è il mascheramento dell'alimento così da renderlo indistinguibile dal placebo, mentre aggiungere un operatore in cieco garantisce una migliore accuratezza del test senza incrementarne di molto la complessità.

### **Criteri di inclusione ed esclusione**

Il TEO può essere eseguito nei pazienti con anamnesi positiva per reazione avversa ad alimento sia per confermare sia per escludere la diagnosi di allergia alimentare, per determinare la soglia di sensibilità all'alimento incriminato o per valutare l'avvenuta tolleranza (ad esempio a latte e uovo in età pediatrica). E' inoltre obbligatorio per ragioni scientifiche in tutti gli studi condotti nell'ambito dell'allergia alimentare.

Nei pazienti con anamnesi negativa per allergia alimentare si deve ricorrere al TEO tutte le volte che il quadro clinico abbia un andamento cronico e possa avere genesi alimentare o in caso di diagnosi di sensibilizzazione a un alimento per cui non è nota la tolleranza (ad esempio in caso di sensibilizzazione ad alimenti cross-reattivi che il paziente non ha consumato dopo la reazione immediata per cui è indagato). Se il paziente segue un'incongrua dieta di eliminazione, può essere utile far precedere la reintroduzione dell'alimento da un TEO se esiste il dubbio di una possibile reazione avversa.

Costituisce un importante criterio di esclusione al TEO l'anamnesi per reazione anafilattica o grave reazione sistemica a singolo alimento, tranne casi selezionati in cui sia passato un congruo periodo di tempo e previa accurata verifica dei test allergodiagnostici. Solo nel caso la reazione anafilattica o la grave reazione sistemica si sia verificata dopo ingestione di più alimenti, può essere necessario ricorrere al TEO dopo attenta valutazione dei rischi.

Per alcuni alimenti (latte, uovo, arachidi, soia) esistono dati di letteratura che supportano la possibilità di evitare il TEO nel caso in cui i risultati dei test allergologici siano altamente predittivi di esito positivo del challenge<sup>3</sup>.

Costituiscono criteri di esclusione all'esecuzione del TEO alimentare la gravidanza, le patologie acute sistemiche come infezioni, febbre, angina instabile, vomito e diarrea, asma e rinite allergica stagionale nel periodo implicato. Non possono essere testati pazienti che assumono farmaci che aumentano, mascherano e riducono la risposta al challenge, se non dopo congruo periodo di sospensione. Tra i farmaci implicati ci sono antistaminici, steroidi sistemici (<5mg/dì), acidoacetilsalicilico e farmaci antinfiammatori non steroidei, beta-bloccanti, inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina. Corticosteroidi topici e inalatori e beta2agonisti a breve durata d'azione possono essere assunti in corso di test di esposizione orale, ma a dosaggio fisso.

### **La procedura**

Il TEO deve essere eseguito da personale medico addestrato all'emergenza e in ambiente idoneo e adeguatamente attrezzato nel caso si verifichi una reazione immediata grave.

Prima di essere sottoposto al test, il paziente deve essere adeguatamente informato sui rischi e i vantaggi della procedura e deve avere firmato apposito modulo di consenso informato. L'accesso endovenoso deve essere disponibile. In caso si sospetti una reazione associata a esercizio fisico o all'assunzione di farmaci il test di esposizione orale deve essere eseguito prima senza fattori facilitatori e, solo se negativo, con l'alimento abbinato all'esercizio fisico o al farmaco in questione.

Prima di essere sottoposto a challenge orale, il paziente deve eliminare per 2 settimane dalla dieta l'alimento in esame. La dose di partenza del challenge, cioè la quantità di alimento da somministrare come prima dose, deve essere valutata in base alla storia del paziente e ai dati di letteratura disponibili. Per la frutta secca è consigliabile usare basse dosi (circa 0,1 mg), mentre per uovo e soia possono essere utilizzate quantità 10 volte superiori e ancora di più per i cereali.

E' in genere consigliabile partire con una dose inferiore alla dose soglia per valutare la reattività del paziente. Non esiste correlazione tra la reattività clinica del singolo paziente e la dimensione del pomfo del prick test e/o la dose di IgE specifiche nel siero.

Poiché la maggior parte delle reazioni immediate agli alimenti si verifica tra 3 e 15 minuti dall'ingestione, un intervallo di 15-30 minuti tra una dose e l'altra in corso di challenge è considerato ottimale. Nel caso si usino delle capsule nella procedura del DBPCFC l'intervallo di somministrazione delle dosi deve essere adeguatamente incrementato.

Ogni 15-30 minuti la dose di partenza è raddoppiata fino alla comparsa di una reazione o al raggiungimento della dose finale. Si intende per dose finale del TEO la quantità di alimento corrispondente ad una porzione normale dello stesso, aggiustata in funzione dell'età.

L'incremento tra una dose e l'altra può anche avvenire su scala logaritmica (1, 3, 10, 30, etc). Non esistono studi di comparazione tra i due protocolli.

In caso di risposta negativa al challenge, il paziente deve rimanere in osservazione per almeno 2 ore; poi può essere dimesso con adeguate istruzioni circa la possibilità di una reazione tardiva e sui farmaci da assumere e medici da contattare, etc.

Se si verifica una reazione al test di esposizione, il paziente deve essere trattato in funzione della gravità della stessa e monitorato fino a completa risoluzione.

Nel DBPCFC il test con placebo e con l'alimento dovrebbero essere separati di almeno 24 ore. In caso di reazione immediata con sintomi oggettivi, le risposte al placebo sono molto rare per cui è sufficiente usare un placebo e un verum, mentre in caso di sintomi soggettivi è meglio usare challenge ripetuti. I modelli che utilizzano sequenze di 3+3 o 3+2 riducono al

5% la possibilità del paziente di indovinare a caso quale sia il placebo e quale il verum.

La fase più difficile della procedura del DBPCFC è sicuramente la preparazione dell'alimento e del placebo, in modo da renderli indistinguibili per colore, gusto, odore, consistenza, palatabilità e quantità. A tal fine è utile avvalersi di un consulente dietologo e consultare i libri di testo e i siti dedicati all'argomento.

L'alimento deve essere somministrato nella forma in cui il paziente lo consuma abitualmente poiché i vari procedimenti a carico dello stesso (cottura, liofilizzazione, etc) ne alterano il potenziale allergizzante. Il ricorso alle capsule facilita notevolmente la preparazione del placebo, ma è sconsigliato, poiché consente solo la somministrazione di quantità ridotte di cibo e nei pazienti in grado di deglutire le capsule. Inoltre, il salto della mucosa-orofaringea rende impossibile la diagnosi di sindrome orale allergica e per di più ritarda la procedura, essendo necessario aumentare l'intervallo tra le singole dosi. L'utilizzo di capsule, tuttavia, rimane indispensabile nel caso di TEO con additivi.

### La valutazione della risposta

Il TEO viene eseguito per ottenere una chiara risposta circa il fatto che un certo alimento debba essere o meno eliminato dalla dieta. In caso di DBPCFC, se il test con l'alimento come tale risulta negativo non è necessario mettere a dieta il paziente potendo escludere un'allergia alimentare. Questa ultima viene diagnosticata se solo il verum è positivo (tabella I), mentre il test deve essere ripetuto in caso di positività sia del verum che del placebo.

La valutazione della risposta al TEO non è tuttavia non semplice come si potrebbe pensare, poiché molto spesso si incorre nel rischio di interrompere il test troppo precocemente per non mettere a rischio il paziente di gravi reazioni sistemiche. In un'interessante review,

Tabella I - Valutazione del test di esposizione orale ad alimenti.

Verum	Placebo	Valutazione
Positivo	Positivo	Ripetere test di esposizione
Positivo	Negativo	Dieta senza alimento
Negativo	Negativo	Nessuna dieta
Negativo	Positivo	Nessuna dieta

Niggemann<sup>4</sup> propone alcuni criteri da seguire per decidere quando interrompere un TEO e dichiararlo positivo o negativo. Si consiglia di proseguire il test fino alla comparsa di chiari sintomi oggettivi senza tuttavia mettere a rischio il paziente per raggiungere la massima risposta. I sintomi clinici devono essere oggettivi e/o *a)* gravi, *b)* riproducibili, *c)* persistenti.

Più precoci sono i sintomi e più organi sono coinvolti, tanto è più probabile che si tratti di una reazione positiva. Nei bambini un repentino cambio di comportamento è un parametro molto sensibile di iniziale risposta positiva al TEO. Nel caso di sintomi soggettivi è consigliabile aumentare le dosi di placebo e, in corso di test, di fronte ad una reazione dubbia procedere ripetendo la stessa dose o aumentando il tempo di osservazione tra una dose e l'altra.

Nella valutazione del TEO a un alimento

occorre sempre ricordare la possibilità di falsi positivi e negativi<sup>5</sup>. In particolare, sia durante il test che nella vita quotidiana la presenza o assenza di fattori facilitatori (esercizio fisico, farmaci, alcol, fattori ormonali, stress, etc) influenzano la riproducibilità della risposta ad un alimento.

## **Bibliografia**

1. Bindslev-Jensen C, Ballmer-Weber BK, Bengtsson U, et al. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods-position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 2004; 59: 690.
2. Nowak-Wegrzyn A, Assa'ad AH, Bahna SL, et al. Work Group report: oral food challenge testing. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 365.
3. Niggemann B. Controlled oral challenges in children-when indicated, when superfluous? *Allergy* 2005; 60: 865.
4. Niggemann B. When is an oral challenge positive? *Allergy* 2010; 65: 2.
5. Niggemann B, Beyer K. Pitfalls in double-blind, placebo-controlled oral food challenges. 2007; 62: 729.

## Test diagnostici nell'allergia ad imenotteri

Fabrizio Guarneri

**Riassunto.** L'allergia al veleno di imenotteri costituisce un argomento di notevole interesse in ambito dermoallergologico, sia per la sua incidenza che per l'elevata frequenza di reazioni cutanee e sistemiche gravi. La corretta identificazione del veleno responsabile della reazione avversa è fondamentale per la definizione della diagnosi eziologica e della conseguente terapia iposensibilizzante specifica, che, unita alla prevenzione, riduce notevolmente il numero di eventi fatali. Grazie all'evoluzione delle tecnologie di purificazione del veleno di imenotteri, la precisione dei test diagnostici è significativamente aumentata negli ultimi anni. Ciononostante, persistono difficoltà diagnostiche, legate anche alle molteplici reattività crociate, che determinano il riscontro di positività multiple di dubbio significato clinico. Viene presentato lo stato dell'arte della conoscenza e della diagnostica *in vivo* e *in vitro* dell'allergia a veleno di imenotteri, nonché le prospettive a breve termine, in particolare l'uso di allergeni ricombinanti, in grado auspicabilmente di garantire il superamento dei limiti di precisione attuali.

**Parole chiave:** imenotteri, diagnostica *in vivo*, diagnostica *in vitro*, reattività crociata, allergeni ricombinanti.

**Summary.** *Diagnostic tests in Hymenoptera venom allergy.* Adverse reactions to venom of Hymenoptera are a significant issue in dermoallergology, not only for their incidence, but also for the high frequency of severe cutaneous and/or systemic manifestations. Epidemiologic data suggest a prevalence of about 1.5% in the general population; systemic reactions are 0.3-8.9% of total, and anaphylaxis represents 0.3-42.8% of them. Hymenoptera stings are the cause of 1.5-34.1% of all cases of anaphylaxis, and about 20% of fatal ones, often unpredictably. The order Hymenoptera includes more than 32,000 insects; the few species of allergologic interest belong to the families Apidae (genera *Apis* and *Bombus*), Vespidae (genera *Vespa*, *Dolichovespula*, *Vespula* and *Polistes*), Formicidae (genus *Formica*), and Myrmecidae (genera *Solenopsis* and *Pogonomyrmex*). Progress in molecular biology techniques has recently made it possible to identify, and in many cases fully characterize and reproduce in recombinant form, the single allergenic proteins of each venom, thus allowing a better definition of similarities, differences and cross-reactivity among the above species. Allergenic components of Hymenoptera venoms are most frequently glycoproteins with a molecular weight of 10-50 kDa, with enzymatic functions; among them, phospholipases and hyaluronidases are the major allergens. Amino acid sequencing homologies between allergens of different species are rather frequent and highly significant within the same taxonomic family, but also exist, although to a lesser extent, between different families, and are the cause of the cross-reactions frequently observed in clinical practice; the most important cross-reactive venom allergens between different families are hyaluronidases. Diagnosis of Hymenoptera allergy is often a long and complicated process, also because of the lack of a completely reliable test, able to predict future risks, and the high frequency of polysensitizations and cross-reactions, that are not easy to differentiate with the currently available methods. First, clinical history should be investigated with particular care, including specific questions on the most recent and possible previous reactions (type, severity, causative insect, treatments, etc.), work/hobby and related risk factors, other allergies. On the basis of clinical history, one or more of the available *in vivo* and/or *in vitro* tests can be performed: prick test, intradermal test, search for allergen-specific IgE or IgG antibodies in serum, determination of baseline serum tryptase, sting challenge test. Other methods, such as basophil histamine release test, immunoblotting, basophil activation test and leukotriene release test are still experimental. To date, no combination of clinical data, exams and markers can exactly predict type or severity of clinical evolution in a given patient: for example, 25-84% of subjects with positive history of allergic reaction and positive skin tests do not react to a subsequent sting of the same insect, while 0-22% of those with positive history and negative tests develop a systemic reaction when stung again. Multiple positive results to different venoms are common in clinical practice, but only in some cases they are a sign of actual polysensitization: many of them are caused by cross-reactivity, not always of clinical relevance and consequently misleading. Future perspectives are mainly linked to the use of recombinant allergens, which should allow to obtain a better determination of the clinical relevance of each individual allergen, to further clarify the various aspects of cross-reactivity and to identify species-specific allergens.

**Key words:** hymenoptera, *in vivo* diagnostic tests, *in vitro* diagnostic tests, cross-reactivity, recombinant allergens.

## Introduzione

Le reazioni avverse a veleno di imenotteri rappresentano un problema sanitario di notevole frequenza e rilevanza clinica, in significativo aumento nel corso degli ultimi anni. Lo studio *Alergológica*, realizzato in Spagna per definire i fattori epidemiologici, clinici e socioeconomici delle malattie allergiche, riportava nella sua prima edizione, pubblicata nel 1995, una prevalenza dello 0,7% dell'allergia ad imenotteri in un campione di 3.905 pazienti<sup>1</sup>; lo stesso studio, ripetuto a circa 10 anni di distanza su un campione ancor più ampio (4.991 pazienti), ha evidenziato una frequenza del fenomeno pari all'1,5%, ossia più che raddoppiata rispetto alla precedente rilevazione<sup>2</sup>.

In ordine crescente di gravità, la classificazione delle manifestazioni cliniche di natura allergica include reazioni locali, "large local reactions" (reazioni locali estese, ossia di diametro superiore a 10 cm e di durata superiore a 24 ore) ed anafilassi sistemica; le due tipologie più gravi sono quelle più ricorrenti nelle casistiche cliniche<sup>3</sup>. Sono anche possibili, da sole o in sovrapposizione alle precedenti, reazioni tossiche sistemiche al veleno<sup>3</sup> e reazioni inusuali quali malattia da siero<sup>4</sup>, neuropatie periferiche<sup>5</sup>, encefalomielite acuta disseminata<sup>6</sup>.

Secondo i diversi lavori presenti in letteratura, la prevalenza delle reazioni locali estese oscilla dal 2,4% al 26,4% del totale delle reazioni a puntura di insetto<sup>3,7,8</sup>, con un picco del 38% fra gli apicoltori<sup>9,10</sup>; rilevante anche la frequenza nei bambini, segnalata da Novembre *et al* al 19%<sup>11</sup>. Le reazioni allergiche sistemiche rappresentano invece lo 0,3-8,9% del totale<sup>12</sup> (14-43% fra gli apicoltori<sup>10,13</sup>, 0,15-0,3% fra i bambini<sup>11,14</sup>), e l'anafilassi oscilla, secondo diverse fonti, fra lo 0,3% e il 42,8% di esse<sup>12</sup>. Le punture di insetti sono responsabili di una quota fra l'1,5% e il 34,1% di tutti i casi di anafilassi, e di circa il 20% di quelli che hanno esito fatale<sup>12</sup>. Gli eventi fatali sono, nel caso di veleno di insetti, spesso imprevedibili: le statistiche, seppure non recenti, mostrano che fra il 40%<sup>15</sup> e l'85%<sup>16</sup> dei soggetti deceduti per tale causa non aveva, al momento della puntura, una storia clinica documentata di reazioni anafilattiche.

Alla luce di tali dati, emerge chiara l'attuale necessità di una corretta diagnostica dell'al-

lergia ad imenotteri, primo e fondamentale passo nella gestione del paziente, sia dal punto di vista terapeutico che preventivo. L'intenso lavoro di ricerca clinica svolto a livello mondiale, particolarmente nell'ultimo decennio, ha consentito significativi progressi in questo campo e la definizione di linee guida ufficiali da parte di organismi internazionali quali l'EAACI (European Academy of Allergy and Clinical Immunology); tuttavia, per svariati motivi di ordine biologico e tecnico, l'auspicata precisione risulta ancora, in molti casi, non del tutto realizzata.

## Tassonomia degli imenotteri

Alla data del 26 Dicembre 2011, secondo il database Taxonomy NCBI (National Center for Biotechnology Information)<sup>17,18</sup>, risultano far parte dell'ordine *Hymenoptera* esattamente 32.500 specie viventi, di cui 14.344 non ancora inquadrate dal punto di vista classificativo.

Gli imenotteri di interesse allergologico, con la relativa classificazione tassonomica, sono elencati in tabella I. La differenziazione entomologica viene effettuata su base anatomica: le api, ad esempio, hanno il corpo marrone e moderatamente peloso, mentre i bombi presentano strisce gialle o bianche sull'addome, un corpo molto più peloso e dimensioni maggiori delle api. Nell'ambito della famiglia delle *Vespidae*, le *Vespinae* hanno una giunzione piuttosto tronca fra torace e addome, un corpo quasi privo di peli e l'addome a strisce nere e gialle, mentre le *Polistinae* sono riconoscibili per la forma più tendente all'ovale. In Europa, il genere *Vespula* è il più rappresentato fra quelli delle *Vespinae*, soprattutto con le specie *Vespula germanica* e *Vespula vulgaris*; nell'ambito degli imenotteri del genere *Dolichovespula*, le specie più comuni a livello europeo sono *Dolichovespula media*, *Dolichovespula saxonica* e *Dolichovespula sylvestris*, mentre nel genere *Vespa* la specie prevalente è *Vespa crabro*. La famiglia delle *Polistinae* è anch'essa molto diffusa nel Vecchio Continente, e le specie *Polistes dominulus*, *Polistes gallicus* e *Polistes nympha* sono quelle di più frequente riscontro, specialmente nelle aree mediterranee<sup>3,19</sup>.

Anche imenotteri della superfamiglia *Scolioidea*, e segnatamente quelli appartenenti alle famiglie *Formicidae* e *Myrmicidae*, possono

Tabella I - Imenotteri di interesse allergologico.

Superfamiglie	Famiglie	Sottofamiglie	Generi	Specie
Apoidea	Apidae	Apinae	<i>Apis</i>	<i>Apis mellifera</i>
		Bombinae	<i>Bombus</i>	<i>Bombus terrestris</i> <i>Bombus medius</i> <i>Bombus agrorum</i> Altri
Vespoidea	Vespidae	Vespinae	<i>Vespa</i>	<i>Vespa crabro</i> <i>Vespa orientalis</i>
			<i>Dolichovespula</i>	<i>Dolichovespula media</i> <i>Dolichovespula saxonica</i> <i>Dolichovespula arenaria</i> <i>Dolichovespula maculata</i>
			<i>Vespula</i>	<i>Vespula germanica</i> <i>Vespula vulgaris</i> <i>Vespula maculifrons</i> <i>Vespula rufa</i> Altri
			<i>Polistinae</i>	<i>Polistes</i> <i>Polistes dominulus</i> <i>Polistes gallicus</i> <i>Polistes nymphe</i> <i>Polistes exclamans</i> Altri
Scolioidea	<i>Formicidae</i>	<i>Formicinae</i>	<i>Formica</i>	<i>Formica rufa</i> <i>Formica polyctena</i>
	<i>Myrmicidae</i>	<i>Myrmicinae</i>	<i>Solenopsis</i>	<i>Solenopsis invicta</i> <i>Solenopsis richteri</i>
			<i>Pogonomyrmex</i>	<i>Pogonomyrmex occidentalis</i> <i>Pogonomyrmex rugosus</i> <i>Pogonomyrmex barbatus</i>

essere causa di reazioni allergiche nell'uomo per iniezione di veleno tramite puntura; tali casi appaiono, tuttavia, di solito clinicamente meno rilevanti, o, comunque, meno frequentemente segnalati rispetto a quelli dovuti ai già menzionati imenotteri delle superfamiglie *Apoidea* e *Vespoidea*.

### Allergeni del veleno di imenotteri

Al di là dell'interesse meramente tassonomico, la classificazione degli imenotteri consente una migliore e più agevole comprensione di diversi aspetti dell'allergia a tali insetti, con particolare riferimento al grado e alla frequenza di reattività crociata fra le diverse specie. Un significativo progresso in questo campo è stato recentemente fornito dalle tecniche di biologia molecolare, attraverso le quali sono stati identificati un gran numero di componenti allergenici dei veleni, definendone la natura biochimica, la sequenza aminoacidica e, in alcuni casi, anche la struttura tridimensionale: come facilmente intuibile, ciò ha enormemente accelerato e agevolato l'analisi

e il confronto, nonché la ricerca degli epitopi, anche attraverso l'impiego di strumenti bioinformatici.

Un elenco degli allergeni noti del veleno dei principali imenotteri è riportato nella tabella II. Nella maggior parte dei casi si tratta di glicoproteine con peso molecolare fra 10 e 50 kDa, la cui catena aminoacidica comprende da 100 a 400 aminoacidi. In analogia a quanto osservato in altri ambiti, anche questi allergeni rientrano in ben definite categorie strutturali e/o funzionali: fosfolipasi, ialuronidasi, serina proteasi, dipeptidilpeptidasi e, nell'ambito delle *Vespinae*, il cosiddetto "antigene 5".

Le fosfolipasi sono allergeni maggiori, sia dal punto di vista quantitativo (12-15% del peso secco del veleno di ape<sup>20</sup> e 6-14% di quello del veleno dei vespidi<sup>21</sup>) che da quello della capacità di suscitare reazioni allergiche; inoltre, il loro effetto nocivo si esplica anche attraverso la loro azione citotossica e, per via indiretta, citolitica<sup>22</sup>.

Le ialuronidasi, oltre ad essere anch'esse allergeni maggiori, hanno una struttura altamente conservata nelle diverse famiglie di imenotteri. In particolare, le ialuronidasi di

Tabella II - Proteine allergeniche del veleno dei principali imenotteri.

Famiglie	Specie	Allergeni	Nomi comuni	Peso molecolare (kDa)		
<i>Apidae</i>	<i>Apis mellifera</i>	Api m 1	Fosfolipasi A2	16		
		Api m 2	Ialuronidasi	39		
		Api m 3	Fosfatasi acida	43		
		Api m 4	Melittina	3		
		Api m 5	Dipeptidilpeptidasi IV	100		
		Api m 6	---	8		
		Api m 7	CUB serina proteasi	39		
		Api m 8	Carbossilesterasi	70		
		Api m 9	Serina carbossipeptidasi	60		
		Api m 10	Icarapin variant 2, carbohydrate-rich protein	---		
		Api m 11	Major royal jelly protein	50		
<i>Bombus terrestris</i>		Bom t 1	Fosfolipasi A2	16		
		Bom t 4	Proteasi	27		
<i>Vespidae</i>	<i>Vespa crabro</i>	Vesp p 1	Fosfolipasi A1B	34		
		Vesp p 5	Antigene 5	23		
	<i>Dolichovespula arenaria</i>		Dol a 5	Antigene 5	23	
			<i>Dolichovespula maculata</i>	Dol m 1	Fosfolipasi A1B	34
				Dol m 2	Ialuronidasi	42
			Dol m 5	Antigene 5	23	
			<i>Vespula germanica</i>	Ves g 5	Antigene 5	23
	<i>Vespula vulgaris</i>		Ves v 1	Fosfolipasi A1B	34	
			Ves v 2	Ialuronidasi	38	
			Ves v 3	Dipeptidilpeptidasi IV	100	
			Ves v 5	Antigene 5	23	
			<i>Vespula maculifrons</i>	Ves m 1	Fosfolipasi A1B	34
	Ves m 2	Ialuronidasi		46		
			Ves m 5	Antigene 5	23	
			<i>Polistes dominulus</i>	Pol d 1	Fosfolipasi A1	34
				Pol d 4	Serina proteasi	33
			Pol d 5	Antigene 5	23	
			<i>Polistes gallicus</i>	Pol g 1	Fosfolipasi A1	---
				Pol g 5	Antigene 5	24
	<i>Polistes exclamans</i>		Pol e 1	Fosfolipasi A1	34	
			Pol e 4	Serina proteasi	33	
			Pol e 5	Antigene 5	23	
	<i>Formicidae</i>	<i>Solenopsis invicta</i>	Sol i 1	Fosfolipasi A1B	18	
Sol i 2			---	14		
Sol i 3			---	26		
Sol i 4			---	12		
<i>Solenopsis richteri</i>		Sol r 2	---	13		
		Sol r 3	---	24		

ape e vespidi presentano circa il 50% di aminoacidi identici e circa il 67% di omologia di sequenza complessiva (aminoacidi identici + simili): in virtù di tale caratteristica, esse costituiscono gli allergeni con reattività crociata più importante dei veleni di *Apidae* e *Vespidae*<sup>23</sup>. A titolo esemplificativo, il confronto fra le sequenze aminoacidiche delle ialuronidasi di *Vespula vulgaris* (allergene Ves v 2) e *Apis mellifera* (allergene Api m 2), ottenuto con il software BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool") è illustrato in Figura 1.

Fra gli allergeni specifici del veleno di ape, è degna di nota la melittina (Api m 4), quantitativamente molto rilevante (circa il 50% del peso secco del veleno), ma responsabile di reazioni allergiche con frequenza inferiore ad altri, seppur elevata (28% dei casi<sup>24</sup>).

Per quanto riguarda le *Formicidae*, i pochi dati disponibili sugli allergeni di *Solenopsis invicta* evidenziano alcune omologie con quelli dei vespidi: di grado elevato (50% di aminoacidi identici) fra Sol i 3 ed antigene 5, decisamente inferiore fra Sol i 1 e fosfolipasi A<sup>13</sup>.

### Iter diagnostico dell'allergia ad imenotteri

La diagnostica dell'allergia ad imenotteri è un processo spesso lungo e laborioso, che, in aggiunta alle usuali problematiche di ambito dermoallergologico, presenta difficoltà legate essenzialmente alla mancanza di un test completamente affidabile e predittivo dei rischi futuri, nonché all'alta frequenza di polisensibilizzazioni e reazioni crociate, di non agevole

Figura 1 - Omologia di sequenza aminoacidica fra le ialuronidasi di *Vespa vulgaris* (Ves v 2) e *Apis mellifera* (Api m 2).

Ves v 2	6	RVFN IYWNVPTFMCHQYDLYFDEV TN-FNIKRNSKDDFQGDKIAIFYDPGEFP	57
Api m 2	9	R FN+YWNVPTFMCH+Y L F+EV+ + I +N D F+G++IAI YDPG FP	61
Ves v 2	58	ALLSLKDGKYYKRNNGGVPQEGNIT IHLQKF IENLDKIYPNRNFSGIGVIDFER	110
Api m 2	62	ALL KDPNGNVVARNGGVPQLGNLTKHLQVFRDHLINQIPDKSFPGVGVDFES	114
Ves v 2	111	WRP IFRQNWGNMKIHKNF SIDLVRNEHPTWNKKMIELEASKRFEKYARFFMEE	163
Api m 2	115	WRP IFRQNW +++ +K S+++VR EHP W+ + +E EA +RFEKY + FMEE	167
Ves v 2	164	TLKLAKKTRKQADWGYGYPCFNMSPNLVPEDVTAMHENDKMSWLFNNQN	216
Api m 2	168	TLK AK+ R A+WGY YPYC+N+++PN +C+ T M ENDKMSWLF +++	220
Ves v 2	217	VLLPSVYVRQELTPDQRIGLVQGRVKEAVRISNNLKHS-PKVLSYWWYVYQDE	268
Api m 2	221	VLLPSVY+R LT +R+GLV GRVKEA+RI+ + S KVL Y+WY YQD	273
Ves v 2	269	TNTFLTETDVKKTQEI VINGGDGII IWGSSSDVNSLSKCKRLQDYLLTVLGP	321
Api m 2	274	+T L+ D++ T ++I G DG IIWSS D+N+ +KC + ++YL LGP	326
Ves v 2	322	----IAIN	325
Api m 2	327	IA+N AVKRIALN	334

Aminoacidi identici: 177/326 (54%)

Aminoacidi simili: 236/326 (72%)

E = 2 x 10<sup>-133</sup>

differenziazione con le metodiche attualmente disponibili.

L'essenziale punto di partenza dell'iter diagnostico, pertanto, è un'anamnesi molto attenta e approfondita, supportata da alcune nozioni entomologiche di base relative a struttura anatomica e comportamento dei diversi imenotteri. In particolare, occorre indagare accuratamente su numero e data delle reazioni alla puntura, tipo e gravità dei sintomi e segni clinici relativi, sede della puntura, tipo di insetto da cui il paziente è stato punto, trattamento praticato, ambiente e attività di lavoro e/o svago, presenza di fattori di rischio, punture subite in passato non accompagnate da manifestazioni cliniche, presenza di eventuali allergie.

Il numero di punture per anno è correlato con il rischio di reazioni sistemiche, sia pure in maniera non lineare: infatti, il 45% dei soggetti che vengono punti meno di 25 volte all'anno manifesta tali reazioni, mentre esse non si presentano in soggetti con una frequenza molto maggiore di punture, superiore a 200 per anno<sup>9,25</sup>. Anche la distanza temporale fra le punture è importante in tal senso, poiché il rischio di reazioni sistemiche si incrementa in caso di intervallo breve e decresce pro-

gressivamente all'aumentare di quest'ultimo, rimanendo tuttavia intorno al 20-30% a 10 anni dall'ultima puntura subita<sup>26,27</sup>.

Una storia clinica positiva per pregressa reazione grave è un importante fattore prognostico negativo in caso di nuova puntura: la frequenza del ripetersi di una tale manifestazione oscilla fra il 57% e il 75%, secondo le diverse casistiche<sup>26,28,29</sup>. La puntura successiva ad una reazione sistemica da veleno di imenotteri determina una ulteriore reazione sistemica nel 40% dei bambini e nel 74% degli adulti, solitamente di entità simile alla precedente, ma più grave nel 10% circa dei casi<sup>30</sup>. Una reazione locale estesa è associata ad un rischio di reazione sistemica nel 5-15% in occasione dell'eventuale puntura successiva<sup>31</sup>.

L'identificazione del tipo di insetto risulta spesso difficile, soprattutto per mancata osservazione da parte del paziente delle caratteristiche anatomiche identificative delle diverse specie. In tale ambito, l'indicazione che i pazienti più frequentemente riescono a fornire è quella relativa alla presenza del pungiglione dell'insetto in sede di puntura: com'è noto, esso rimane infisso nella cute nel caso delle api, mentre ciò non avviene nel caso dei vespidi, che sono quindi capaci di molteplici

punture. I rischi per il paziente variano in funzione del tipo di insetto: le reazioni sistemiche sono più frequenti in seguito a puntura di ape che di vespidi<sup>32</sup>, ma le reazioni pericolose per la sopravvivenza del paziente sono dovute a veleno di *Vespa crabro* 3 volte più frequentemente che a veleno di ape<sup>33</sup>. Al termine dell'anamnesi ed in funzione di essa, è possibile pianificare l'esecuzione di uno o più dei test diagnostici *in vivo* e/o *in vitro* disponibili: prick test, test intradermico, dosaggio di IgE specifiche, IgG specifiche e triptasi sierica basale, sting challenge test; ulteriori test di laboratorio sono per ora utilizzati solo a fini di ricerca.

### **Prick test**

Viene effettuato analogamente a quello per i comuni aero- e trofoallergeni, tramite puntura superficiale sulla faccia volare dell'avambraccio attraverso una goccia di estratto allergenico. Nel caso degli imenotteri viene testato il veleno a dosi incrementali, da 0,01 a 100 µg/ml, interrompendo la progressione alla comparsa di una chiara reazione positiva<sup>34</sup>.

Il test non deve essere effettuato nelle 2 settimane successive alla puntura dell'insetto, periodo refrattario nel quale è elevata la possibilità di falsi negativi. Data l'ampia variabilità della estensione di tale periodo, la negatività di un test eseguito ad oltre 2 settimane dalla puntura non deve essere considerata definitiva se la storia clinica è quella di una reazione sistemica, e il test va quindi ripetuto a distanza di 1-2 mesi<sup>3</sup>.

La sensibilità del prick test non è particolarmente elevata, anche con il dosaggio massimo, e pertanto è sempre opportuno, in caso di risultato negativo, valutare alla luce dell'anamnesi l'opportunità di un test intradermico. La specificità è di difficile definizione, specie in pazienti professionalmente esposti a punture di imenottero frequenti e ripetute nel tempo.

### **Test intradermico**

Viene eseguito mediante iniezione intradermica, nella faccia volare dell'avambraccio, di 0,02 ml di soluzioni a concentrazione progressivamente crescente di veleno di imenottero (da 0,001 a 1 µg/ml), interrompendo anche in questo caso la sequenza alla prima dose capace di indurre reazione allergica<sup>34</sup>. Le considerazioni sulla tempistica di esecuzione in relazione al

periodo refrattario successivo a puntura, così come quelle relative alla specificità, sono sovrapponibili a quelle illustrate per il prick test.

Il test intradermico ha sensibilità superiore a quella del prick test, raggiungendo il 90% e oltre alla concentrazione di 1 µg/ml, ma presenta rischi superiori, e viene di solito impiegato in caso di pazienti con prick test negativo, ma storia clinica positiva per reazione sistemica<sup>3</sup>.

### **Dosaggio delle IgE specifiche**

Può essere effettuato con diverse tecniche, dal classico RAST (Radio Allergo Sorbent Test) a quelle di più moderna concezione e maggiore sensibilità. Gli anticorpi IgE si incrementano in un periodo oscillante da alcuni giorni ad alcune settimane dopo la puntura dell'imenottero, per poi ridursi lentamente, in un tempo anch'esso estremamente variabile da individuo a individuo. Per tali motivi, similmente a quanto già discusso per i test cutanei, un basso livello di IgE specifiche al primo controllo necessita sempre di verifica attraverso ripetizione del dosaggio a distanza di alcune settimane<sup>35</sup>. La sensibilità in soggetti con pregressa reazione sistemica è inferiore a quella dei test intradermici, mentre per la specificità i dati sono del tutto sovrapponibili<sup>3</sup>.

### **Dosaggio delle IgG specifiche**

Il test permette di evidenziare l'avvenuta esposizione all'antigene, in quanto le IgG aumentano dopo puntura, indipendentemente dall'eventuale reazione allergica, e decrescono rapidamente. In soggetti esposti per motivi lavorativi, quali gli apicoltori, il livello sierico di IgG correla direttamente col numero di anni di lavoro e di punture annue. Tale test non ha attualmente alcun ruolo nella diagnostica standard dell'allergia ad imenotteri<sup>3</sup>.

### **Triptasi sierica basale**

I livelli di questo enzima, se elevati, costituiscono fattore di rischio per lo sviluppo di reazioni di shock fatali o, comunque, gravi. Il dosaggio andrebbe, pertanto, valutato in caso di anamnesi positiva per reazioni di grave entità<sup>36,37</sup>.

### **Altri test *in vitro***

Sono stati proposti e sperimentati test *in vitro* quali immunoblotting, test di rilascio di istamina dai basofili (basophil histamine

release test), test di attivazione dei basofili (basophil activation test), test di rilascio dei leucotrieni (leukotriene release test). L'impiego di tali test è attualmente limitato, per molteplici motivi, solo ad attività di ricerca. Un primo ostacolo al loro impiego routinario è il costo, legato alla disponibilità di operatori specializzati e di apparecchiature disponibili solamente in laboratori selezionati. L'applicazione su scala ridotta fa sì, inoltre, che non esista una standardizzazione di tali procedure, e, di conseguenza, non sia possibile effettuare una comparazione fra risultati di laboratori diversi. Da ultimo, ma non meno importante clinicamente, esistono pochi dati sulla sensibilità e specificità, specialmente per quanto riguarda la reazione alla riesposizione al veleno<sup>3</sup>.

### *Sting challenge test*

Consiste nel far pungere il paziente, in condizioni controllate, dall'imenottero responsabile della pregressa allergia. Si tratta, com'è intuibile, di un test particolarmente rischioso, da effettuarsi con estrema prudenza, solo in strutture ospedaliere e con personale adeguatamente preparato alla gestione delle eventuali emergenze. Attualmente viene utilizzato per verificare se i pazienti sottoposti a immunoterapia specifica per veleno di imenottero, giunti alla dose di mantenimento, siano adeguatamente protetti da nuove reazioni allergiche. Qualora il paziente manifesti reazione allo sting challenge test, l'innalzamento della dose di mantenimento permette spesso di raggiungere la protezione desiderata<sup>38</sup>.

L'impiego del test come mezzo per l'identificazione di soggetti bisognosi di immunoterapia, in uso fino ad alcuni anni addietro, è stato abbandonato per via della pericolosità associata ad una predittività non assoluta; analogamente, per via dei rischi, ne è sconsigliata l'esecuzione ad oltre un anno di distanza dal termine dell'immunoterapia, quale pratica routinaria per valutare la persistenza della protezione nel tempo<sup>3</sup>.

### **I risultati dei test: significato clinico e insidie diagnostiche**

La regola dell'integrazione fra clinica e risultati dei test diagnostici, valida in ogni set-

tore della medicina, diventa particolarmente importante nel caso dell'allergia a veleno di imenotteri, in considerazione delle conoscenze ancora incomplete in materia e dei già menzionati limiti dei test attualmente disponibili.

Secondo quanto riportato dalle linee guida EAACI<sup>3</sup>, la sensibilizzazione a veleno di imenottero viene definita da una storia clinica di reazione avversa associata a un test cutaneo positivo o a elevati livelli sierici di IgE specifiche: si tratta, al momento, dell'unica conclusione certa a cui è possibile giungere in questo campo. Non esistono, infatti, esami o marcatori certamente predittivi dell'evoluzione futura nel singolo paziente: secondo le diverse casistiche, una quota oscillante tra il 25% e l'84% dei soggetti positivi ai test cutanei non manifesta reazioni in occasione di una successiva puntura dello stesso imenottero, e, al contrario, fino al 22% dei soggetti negativi ai test può sviluppare una reazione sistemica alla puntura<sup>39-41</sup>. Riguardo a questi ultimi, è da osservare che non sempre la negatività è dovuta ad esecuzione dei test in periodi inadeguati (nel periodo refrattario o ad eccessiva distanza temporale dalla puntura) o a scarsa sensibilità dei metodi diagnostici *in vivo* e/o *in vitro* utilizzati: uno studio condotto con un RAST ad elevata sensibilità suggerisce che, in alcuni casi, anche quantità di IgE estremamente piccole (<1 ng/ml) possono essere sufficienti ad innescare reazioni sistemiche gravi<sup>41</sup>.

Il riscontro di positività multiple ai test è evenienza comune nella pratica clinica. Solo in una quota di casi, tuttavia, tale riscontro è indicativo di un'effettiva polisensibilizzazione, mentre in altri casi il fenomeno è dovuto alle multiple reattività crociate, di cui già si è accennato, sia fra imenotteri appartenenti alla stessa famiglia, sia fra quelli di famiglie differenti<sup>3</sup>. Le reattività crociate possono essere causate da epitopi condivisi, o comunque simili, composti esclusivamente da aminoacidi oppure contenenti anche carboidrati: mentre i primi sono di accertata rilevanza, come nel caso della ialuronidasi, il significato clinico dei secondi appare pressochè nullo, ed essi costituiscono quindi elemento di "disturbo" nel dosaggio delle IgE sieriche specifiche e nel test di attivazione dei basofili, riducendone significativamente l'utilità a fini pratici<sup>42,43</sup>. La distinzione fra polisensibilizzazioni e reazioni crociate è di fondamentale importanza

nella programmazione dell'immunoterapia specifica, trattamento dimostratosi di ottima efficacia protettiva se correttamente eseguito ed associato all'educazione del paziente alla puntuale attuazione delle opportune norme di prevenzione e di gestione delle eventuali emergenze.

### Conclusioni e prospettive future

La ricerca clinica e di base in tema di allergia a veleno di imenotteri ha compiuto negli ultimi anni notevoli progressi, tradotti spesso in cambiamenti, anche sostanziali, di taluni aspetti dell'approccio diagnostico e, conseguentemente, terapeutico, con indubbi benefici per il paziente. Ulteriori, ampi margini di miglioramento sono possibili, soprattutto in ambito diagnostico, dove il prossimo futuro è già in parte presente: in particolare, le prospettive più promettenti sono quelle legate all'impiego degli allergeni ricombinanti, per lungo tempo rimasti confinati all'ambito strettamente sperimentale ma di recente, grazie ai progressi della biologia molecolare, divenuti disponibili in quantità sufficiente ed a costi accettabili per l'impiego nella pratica clinica. Forme ricombinanti di numerose proteine allergeniche dei diversi veleni (fra cui la maggior parte di quelle indicate in tabella II) sono state sintetizzate e impiegate con successo, garantendo un'elevata affidabilità diagnostica e l'assenza dei contaminanti presenti, sia pure in tracce, negli estratti allergenici prodotti a partire dal veleno dell'insetto<sup>44</sup>. Alcuni autori hanno anche suggerito la possibilità di realizzare estratti allergenici miscelando opportunamente diversi allergeni ricombinanti, al fine di ottenere una riproduzione del veleno dell'imenottero priva di contaminanti e di allergeni inducenti reattività crociate di nessun interesse clinico<sup>45</sup>. Inoltre, la disponibilità dei singoli allergeni ricombinanti ha permesso, e sempre più permetterà in futuro, la valutazione dell'effettiva rilevanza clinica di ciascuno di essi, nonché lo studio delle reattività crociate. Significativo è, in tal senso, il contributo di due recenti lavori, che hanno identificato alcuni allergeni specie-specifici e hanno dimostrato la possibilità del loro impiego per la distinzione, con precisione superiore a quella dei test attuali, fra pazienti allergici a veleno di ape e allergici a veleno di

vespa<sup>46</sup>, nonché fra casi di doppia sensibilizzazione e casi di reattività crociata<sup>47</sup>.

### Bibliografia

1. Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica & Alergia e Inmunología Abelló SA (ed). *Alergológica. Factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas*. Madrid: NILO Industria gráfica, 1995.
2. Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica & Schering-Plough (ed). *Alergológica-2005. Factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España en 2005*. Madrid: Egraf SA, 2006.
3. Biló BM, Rueff F, Mosbech H, et al. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy* 2005; 60: 1339.
4. De Bandt M, Atassi-Dumont M, Kahn MF, et al. Serum sickness after wasp venom immunotherapy: clinical and biological study. *J Rheumatol* 1997; 24: 1195.
5. Creange A, Saint-Val C, Guillevin L, et al. Peripheral neuropathies after arthropod stings not due to Lyme disease: a report of five and review of the literature. *Neurology* 1993; 43: 1483.
6. Boz C, Velioglu S, Ozmenoglu M. Acute disseminated encephalomyelitis after bee sting. *Neurol Sci* 2003; 23: 313.
7. Incorvaia C, Mauro M, Pastorello EA. Hymenoptera stings in conscripts. *Allergy* 1997; 52: 680.
8. Fernandez J, Blanca M, Soriano J, et al. Epidemiological study of the prevalence of allergic reactions to Hymenoptera in a rural population in the Mediterranean area. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 1069.
9. de la Torre-Morin F, Garcia-Robaina JC, Vazquez-Moncholi C, et al. Epidemiology of allergic reactions in beekeepers: a lower prevalence in subjects with more than 5 years exposure. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1995; 23: 127.
10. Annala IT, Karjalainen ES, Annala PA, et al. Bee and wasp sting reactions in current beekeepers. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996; 77: 423.
11. Novembre E, Cianferoni A, Bernardini RA, et al. Epidemiology of insect venom sensitivity in children and its correlation to clinical and atopic features. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 834.
12. Biló MB. Anaphylaxis caused by Hymenoptera stings: from epidemiology to treatment. *Allergy* 2011; 66 (suppl 95): 35.
13. Bousquet J, Menardo JL, Aznar R, et al. Clinical and immunological survey in beekeepers in relation to their sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73: 332.
14. Settipane GA, Boyd GK. Prevalence of bee sting allergy in 4992 boy scouts. *Acta Allergol* 1970; 25: 286.
15. Mosbech H. Death caused by wasp and bee stings in Denmark 1960-1980. *Allergy* 1983; 38: 195.
16. Sasvari T, Müller U. Fatalities from insect stings in Switzerland 1978 to 1987. *Schweiz Med Wochenschr* 1994; 124: 1887.
17. Sayers EW, Barrett T, Benson DA, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 2009; 37 (Database issue): D5.
18. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res* 2009; 37 (Database issue): D26.
19. Sánchez F, Blanca M, Fernández J, et al. Comparative study between European and American species of *Polistes* using sera from European sensitised subjects. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 281.
20. Habermann E. Bee and wasp venoms. *Science* 1972; 177: 314.
21. King TP, Alagon AC, Kuan J, et al. Immunochemical studies of yellow jacket venom proteins. *Mol Immunol* 1983; 20: 297.
22. Owen MD, Pfaff LA, Reisman RE, et al. Phospholipase A2

- in venom extracts from honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages. *Toxicon* 1990; 28: 813.
23. Reisman RE, Wypych JI, Lazell MI. Further studies in patients with both honeybee- and yellow-jacket venom-specific IgE. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 82: 190.
  24. Paull BR, Yunginger JW, Gleich GJ. Melittin: an allergen of honeybee venom. *J Allergy Clin Immunol* 1977; 59: 334.
  25. Abrishami MH, Boyd GK, Settupane GA. Prevalence of bee sting allergy in 2010 girl scouts. *Acta Allergol* 1971; 26: 117.
  26. Pucci S, Antonicelli L, Biló MB, et al. The short interval between two stings as a risk factor for developing Hymenoptera venom allergy. *Allergy* 1994; 49: 894.
  27. Golden DBK, Marsh DG, Freidhoff LR, et al. Natural history of Hymenoptera venom sensitivity in adults. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 760.
  28. Müller U, Thurnheer U, Patrizzi R, et al. Immunotherapy in bee sting hypersensitivity: bee venom versus wholebody extract. *Allergy* 1979; 34: 369.
  29. Brown S, Wiese M, Blackman K, et al. Ant venom immunotherapy: a double blind, placebo-controlled cross-over trial. *Lancet* 2003; 361: 1001.
  30. Reisman RE. Natural history of insect sting allergy: relationship of severity of symptoms of initial sting anaphylaxis to re-sting reactions. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 335.
  31. Mauriello PM, Barde SH, Georgitis JW, et al. Natural history of large local reactions from stinging insects. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 74: 494.
  32. Blaauw PJ, Smithuis LO. The evaluation of the common diagnostic methods of hypersensitivity for bee and yellow jacket venom by means of an in-hospital insect sting. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75: 556.
  33. Antonicelli L, Biló MB, Napoli G, et al. European hornet (*Vespa crabro*) sting: a new risk factor for life-threatening reaction in Hymenoptera allergic patients? *Allerg Immunol (Paris)* 2003; 35: 199.
  34. The European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Position paper: Allergen standardisation and skin tests. *Allergy* 1993; 48 (suppl 14): 48.
  35. Goldberg A, Confino-Cohen R. Timing of venom skin tests and IgE determinations after insect sting anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 182.
  36. Ludolph-Hauser D, Ruëff F, Fries C, et al. Constitutively raised serum concentrations of mast-cell tryptase and severe anaphylactic reactions to Hymenoptera stings. *Lancet* 2001; 357: 361.
  37. Haeberli G, Bronnimann M, Hunziker T, et al. Elevated basal serum tryptase and Hymenoptera venom allergy: relation to severity of sting reactions and to safety and efficacy of venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1216.
  38. Ruëff F, Wenderoth A, Przybilla B. Patients still reacting to a sting challenge while receiving Hymenoptera venom immunotherapy are protected by increased venom doses. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 1027.
  39. Parker JL, Santrach PJ, Dahlberg MJE, et al. Evaluation of Hymenoptera-sting sensitivity with deliberate sting challenges: inadequacy of present diagnostic methods. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 96: 200.
  40. van der Linden PW, Hack CE, Struyvenberg A, et al. Insect-sting challenge in 324 subjects with a previous anaphylactic reaction: current criteria for insect-venom hypersensitivity do not predict the occurrence and the severity of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 151.
  41. Golden DBK, Kagey-Sobotka A, Norman PS, et al. Insect sting allergy with negative venom skin test responses. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 897.
  42. Carballada FJ, González-Quintela A, Núñez-Orjales R, et al. Double (honeybee and wasp) immunoglobulin E reactivity in patients allergic to Hymenoptera venom: the role of cross-reactive carbohydrates and alcohol consumption. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2010; 20: 484.
  43. Mertens M, Amler S, Moerschbacher BM, et al. Cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the results of the basophil activation test in hymenoptera-venom allergy. *Clin Exp Allergy* 2010; 40: 1333.
  44. Müller U, Fricker M, Wymann D, et al. Increased specificity of diagnostic tests with recombinant major bee venom allergen phospholipase A2. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 915.
  45. Müller U, Soldatova L, Weber M. Bee venom allergy: comparison of IgE-binding capacity of purified natural and recombinant-synthetic venom allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 33.
  46. Mittermann I, Zidarn M, Silar M, et al. Recombinant allergen-based IgE testing to distinguish bee and wasp allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 1300.
  47. Hofmann SC, Pfender N, Weckesser S, et al. Added value of IgE detection to rApi m 1 and rVes v 5 in patients with Hymenoptera venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 265.

## Dermatite allergica da contatto da corticosteroidi: procedimento diagnostico

Luca Stingeni

**Riassunto.** E' ben noto che i corticosteroidi topici (CT), composti dotati di spiccate proprietà antinfiammatorie, immunosoppressive e antiproliferative, sono in grado di indurre dermatite allergica da contatto. La prevalenza è molto variabile, essendo stimata tra lo 0,2% e il 5% in soggetti consecutivi sottoposti a patch test. L'inquadramento clinico non è sempre agevole; tale aspetto, insieme al rischio di reazioni avverse dopo somministrazione sistemica a tali composti in soggetti sensibilizzati a uno o più CT e la necessità di individuare composti alternativi, rende indispensabile l'adozione di un protocollo diagnostico. Questo prevede l'esecuzione sequenziale di patch test e, se negativo, prick test e, quando negativo anche questo ultimo, di test intradermico con il farmaco in causa e con una serie di CT strutturalmente diversificati al fine di individuare le possibili reazioni crociate. La scelta del veicolo ottimale per il patch non è sempre agevole: oltre a vaselina, ottimale per budesonide e per la maggior parte dei CT, etanolo è il veicolo di scelta per alcuni CT, quale idrocortisone 17-butirrato. La concentrazione impiegata influenza con modalità inversamente proporzionale la valenza diagnostica del test: se troppo elevata, è alto il rischio di reazioni falsamente negative perché prevale l'effetto antinfiammatorio. Questo ultimo influenza in modo rilevante la lettura dei test, che deve essere protratta al 6°-7° giorno anche per evitare lo "skin blanching" e l'"edge effects", tipici delle letture in 1°-2° giornata. Il prick test e il test intradermico assicurano maggiore biodisponibilità del farmaco ma non sono scevri di effetti collaterali. Il test intradermico, inoltre, è allestibile solo per composti idrosolubili. In caso di negatività a tali test, è auspicabile l'esecuzione di ROAT (Repeated Open Application Test). L'Autore discute i vantaggi e i limiti delle singole metodiche diagnostiche, precisandone concentrazione, veicoli ottimali e modalità di valutazione dei risultati.

**Parole chiave:** corticosteroidi topici, dermatite allergica da contatto, patch test, prick test, test intradermico, ROAT.

**Summary.** *Contact allergy to corticosteroids: diagnostic procedure.* It's well known that topical corticosteroids (TC), compounds equipped with marked anti-inflammatory, immunosuppressive and antiproliferative effects, are able to induce allergic contact dermatitis (ACD). Its prevalence is very variable, being estimated between 0.2% and 5% in consecutive patch-tested subjects for contact dermatitis. Clinical diagnosis is not always easy; this aspect, together with the risk of adverse reactions following systemic administration to such compounds in individuals sensitized to one or more CT and the need to identify alternative compounds, makes necessary the adoption of a diagnostic tool. This provides for the sequential performance of patch test and, if negative, prick test, and when also the latter is negative, intradermal test with the suspected CT and a series of structurally diverse CT in order to identify possible cross-reactions. The choice of the optimal vehicle for patch testing is not always easy. Vaseline is the optimal vehicle for budesonide and for most of the CT, while ethanol is the choice vehicle for some CT, such as hydrocortisone 17-butyrate. Use concentration acts in a manner inversely proportional to the diagnostic value of patch test: there is a high risk of false negative reactions if concentration is too high. In this case the anti-inflammatory effect is prevalent. This anti-inflammatory action significantly influences the time reading of patch test. For this reason it is essential that the patch test readings are carried out until the seventh day, also to avoid the "skin blanching" and "edge effects", typical of the readings done in the first-second day. Skin prick test and intradermal test ensure greater bioavailability of the drug but they can cause local and systemic side effects. Moreover, intradermal test can be set-up and done only if CT is water-soluble. In case of negative results of patch, prick and intradermal test, it is advisable to perform ROAT (Repeated Open Application Test). The author discusses the advantages and limits of these diagnostic tools, specifying optimal concentration and vehicles for epicutaneous tests and stating methods to evaluate the results.

**Key words:** topical corticosteroids, allergic contact dermatitis, patch test, prick test, intradermal test, ROAT.

Sezione di Dermatologia clinica, allergologica e venereologica, Dipartimento di Specialità medico-chirurgiche e Sanità pubblica, Università di Perugia.

Prof. Luca Stingeni, Sezione di Dermatologia clinica, allergologica e venereologica, Polo ospedaliero-universitario Santa Maria della Misericordia, Sant'Andrea delle Fratte, 06156 Perugia (e-mail: luca.stingeni@med.unipg.it).

Conflitto d'interesse: dichiarato assente dall'Autore.

Accettato per la pubblicazione il 25 giugno 2012.

## Introduzione

Correva il lontano 1952 quando il primo corticosteroide topico (CT) è stato impiegato nella pratica clinica<sup>1</sup>; da tale epoca in poi l'utilizzo di questi composti si è rapidamente diffuso per la loro spiccata azione antinfiammatoria, immunosoppressiva e antipruriginosa, tanto che ancora oggi essi rappresentano i farmaci topici più frequentemente utilizzati in Dermatologia.

Gli effetti collaterali da CT (quali atrofia cutanea, teleagectasie, fragilità vasale, porpora, *striae cutis distensae*, dermatite periorale, rosacea, ipertricosi, alterazioni della pigmentazione, ritardo della cicatrizzazione, suscettibilità alle infezioni) sono ben noti da tempo. La sensibilizzazione cellulomediata da essi indotta è stata sospettata per la prima volta nel 1959 in 2 casi nei quali il composto incriminato era idrocortisone<sup>2,3</sup>. Essa è stata oggetto di numerose segnalazioni in letteratura nel corso degli ultimi 20 anni ma, nonostante ciò, questo a dir poco paradossale fenomeno allergologico solleva numerose problematiche, relative sia all'inquadramento clinico che al procedimento diagnostico da adottare.

La reale prevalenza della dermatite allergica da contatto (DAC) da CT non è facilmente desumibile dai dati della letteratura, oscillando tra lo 0,2% e il 5,9% dei soggetti consecutivi sottoposti a patch test<sup>4</sup>. E' verosimile che tale ampia variabilità sia condizionata dai CT testati e dalle diverse serie di CT utilizzate in paesi diversi. Tra i fattori in grado di influenzare la DAC da CT sono determinanti le abitudini prescrittive dei medici, la tipologia dei CT disponibili in commercio, l'educazione sanitaria in merito, la modalità di selezione dei campioni studiati, la concentrazione e il tipo di veicolo impiegati per l'esecuzione dei test cutanei allergodiagnostici (TCA) e i tempi di lettura degli stessi.

In uno studio multicentrico SIDAPA (Società Italiana di Dermatologia Allergologica, Professionale e Ambientale)<sup>5</sup> la prevalenza è risultata pari allo 0,98%, ben inferiore a quella riscontrata in una contemporanea indagine multicentrica europea (2,0%)<sup>6</sup>; tale discrepanza sembrerebbe essere in relazione soprattutto ad un minor impiego clinico dei CT e al loro uso qualitativamente diverso piuttosto che alla diversificazione degli allergeni testati. La miscela di CT utilizzata in Italia era costituita

da idrocortisone acetato, budesonide, desossimetasone e idrocortisone 17-butilirato; quella impiegata in ambito europeo conteneva tixocortolo pivalato (non in commercio in Italia), budesonide e idrocortisone 17-butilirato. A prescindere dalla diversa composizione dei mix, tuttavia, la testificazione dei singoli componenti della miscela evidenziava che la maggior parte delle reazioni positive erano riscontrate, in Italia e in Europa, a budesonide (48,1% e 41,8%, rispettivamente) e idrocortisone 17-butilirato (29,6% e 21,7%, rispettivamente).

## Procedimento diagnostico

### Parametri clinici

Nel sospetto di DAC da CT, i parametri clinici da prendere in considerazione si differenziano rispetto a quelli documentabili in corso di DAC causata da altri medicinali per uso topico<sup>7</sup>. Essi sono rappresentati da:

a) non risposta clinica al trattamento in una dermopatia corticosteroide-sensibile. Tale criterio, ovviamente, deve essere preso in considerazione quando vi è certezza che il paziente si sia medicato correttamente e in assenza di fattori in grado di interferire con la buona riuscita del trattamento, come le sovrainfezioni batteriche. Tale parametro clinico è valido sia negli adulti<sup>8</sup> che nei bambini<sup>9</sup>; in questi ultimi è stato prospettato che nel 25% di soggetti pediatrici affetti da dermatite atopica e non responsivi alla terapia con CT si possa sospettare una DAC da CT;

b) peggioramento dell'obbiettività cutanea. In questo caso è presente accentuazione dell'eritema e dell'edema, mentre la franca essudazione è di rara osservazione<sup>10</sup>;

c) comparsa di un'eruzione secondaria che può essere isomorfa (e pertanto eczematosa), esantematiforme (per lo più morbilliforme e scarlattiniforme)<sup>11</sup> e polimorfosimile. In questo ultimo caso è soprattutto budesonide il CT più frequentemente segnalato<sup>12</sup>;

d) dermatite da contatto sistemica (DCS). Tale entità clinica si realizza per impiego sistemico (orale, intramuscolare, endovenoso, inalatorio, intralesionale e intrarticolare) di un composto che ha precedentemente indotto una DAC o di un composto ad esso chimicamente correlato. Al pari dell'eruzione secondaria, la DCS da corticosteroidi può estrinsecarsi con

aspetto eczematiforme, esantematiforme e polimorfosimile, a lenta evoluzione<sup>10</sup>. L'eruzione polimorfosimile da triamcinolone acetone in soggetto con allegata DAC da budesonide topico ne rappresenta un esempio<sup>13</sup>: i 2 composti, infatti, presentano evidenti analogie molecolari.

Oltre a criteri clinici, il sospetto di DAC da CT non può prescindere dal criterio topografico. Le sedi di localizzazione più frequenti di DAC da CT sembrerebbero essere soprattutto gli arti inferiori, specie per patologie su base vascolare (ulcere venose e dermatite da stasi)<sup>14</sup>; seguirebbero il distretto ano-genitale (prurigo), i piedi (disidrosi), le mani (dermatite da contatto, dermatite atopica) e il volto (dermatite atopica).

### *Test cutanei allergodiagnostici*

I TCA impiegati sono: patch test, prick test, test intradermico, ROAT (Repeated Open Application Test)<sup>13</sup>.

#### *Patch test*

Rappresenta il test cutaneo più idoneo e senza dubbio meno rischioso per la diagnosi di DAC da CT. E' stato recentemente appurato che il patch test con budesonide e tixocortolo pivalato consente di individuare l'88,5% delle DAC da CS; tale percentuale sale al 92,5% quando ai 2 precedenti composti si aggiunge idrocortisone 17-butilirato<sup>15</sup>. Il valore diagnostico del patch test, tuttavia, è fortemente condizionato da fattori in parte dipendenti dagli effetti farmacologici di tali composti (vasocostrizione, vasodilatazione, attività antinfiammatoria), in parte dal loro scarso assorbimento attraverso la cute indenne. Il rischio di reazioni falsamente negative, infatti, è alto se sono impiegati veicoli e concentrazioni non adeguati e se i tempi di lettura del test non sono sufficientemente prolungati. È altresì buona regola non eseguire il patch test con le preparazioni del commercio per la bassa concentrazione del principio attivo in essi contenuto che esporrebbe a rischio di reazioni falsamente negative. Al pari, l'impiego di concentrazioni troppo elevate è sconsigliabile per il rischio di reazioni falsamente negative per l'effetto antinfiammatorio e vasocostrittore di tali composti<sup>8</sup>.

Relativamente alla concentrazione, per la maggior parte dei CT è impiegata quella

dell'1%; l'eccezione è rappresentata da budesonide, per il quale è preferibile lo 0,01%<sup>6</sup>.

Per quanto concerne la veicolazione dei CT, è preferibile l'impiego di vaselina per tixocortolo pivalato, budesonide e desossimesone, mentre per idrocortisone 17-butilirato è più idoneo utilizzare etanolo<sup>10</sup>. Nella serie standard SIDAPA 2012 sono presenti 2 CT: budesonide 0,01% e idrocortisone 21-acetato 1%, entrambi veicolati in vaselina.

Etanolo è sicuramente preferibile rispetto a vaselina perché offre assorbimento discreto e buona biodisponibilità del composto, consentendone di ridurre la concentrazione e la durata dei tempi di lettura. Tuttavia tale veicolazione ha scarsa stabilità a causa della volatilità e raramente è causa di sensibilizzazione<sup>10</sup>. Un nostro recente lavoro ha dimostrato l'utilità d'impiego di etossidiglicole come veicolo per idrocortisone 17-butilirato; esso fra l'altro ha consentito di ridurre la concentrazione del CT allo 0,1%, con ottimi risultati di solubilizzazione e in assenza di reazioni falsamente negative<sup>16</sup>.

La stabilità degli allergeni rappresenta un ulteriore fattore in grado di condizionare le reazioni falsamente negative al patch test con CT. E' raccomandabile la conservazione in frigo (6-8°C) e il confezionamento in contenitori con tappo; è pure auspicabile il loro rinnovo ogni 3 mesi<sup>17</sup>.

E' d'obbligo la lettura ritardata del patch test fino alla 5<sup>a</sup>-7<sup>a</sup> giornata dalla rimozione dell'apparato testante; quando si effettua la lettura solo in seconda giornata, si perdono fino al 30% delle reazioni positive<sup>14</sup>.

In merito alla valutazione del patch test, merita di essere sottolineato che, al pari delle manifestazioni cliniche, è rara l'osservazione di reazioni francamente eczematose. Più frequenti sono quelle eritemato-desquamative e/o eritemato-papulo-pomfoidi, in assenza di franca vescicolazione<sup>10</sup>. Nella valutazione del patch test si deve tener conto di: a) "edge effect", caratterizzato da sbiancamento dell'area centrale della sede di applicazione del patch test, per maggiore concentrazione in tale area del CT che determina vasocostrizione, e da eritema ed edema periferici; b) "skin blanching", ovvero sbiancamento diffuso dell'area di testatura per vasocostrizione seguito da vasodilatazione massiva, con rischio di reazioni falsamente positive<sup>18</sup>.

*Prick test e test intradermico*

E' oramai assodato che il rischio di reazioni falsamente negative al patch test con CT è dovuto per lo più al loro scarso assorbimento attraverso la cute integra. Per tale ragione quando i dati clinico-anamnestici sono fortemente deponenti per DAC da CT e il patch test ha dato esito negativo è necessario eseguire il prick test e, se negativo, il test intradermico<sup>13,19</sup>. La valenza diagnostica di entrambi i test, che assicurano una buona biodisponibilità del farmaco, è dimostrata sia nella sensibilizzazione di IV tipo che in quelle di I e III tipo. In queste ultime la lettura dei test deve essere immediata (20 min dalla loro esecuzione) e la reazione positiva è per lo più di tipo eritemato-edematoso. Nella sensibilizzazione cellulomediata la lettura dei 2 test deve essere ritardata (fino alla 5<sup>a</sup>-7<sup>a</sup> giornata); le reazioni positive si estrinsecano con morfologia eritemato-edemato-papulosa, raramente eczematosa, al pari di quanto si osserva nel patch test.

I rischi connessi all'esecuzione del prick test e, soprattutto, del test intradermico sono rappresentati da: atrofia cutanea, reazioni locali bollose, eruzione cutanee "seconde", reazioni sistemiche<sup>13</sup>.

Il prick test è eseguito alla stessa concentrazione del patch test impiegando come veicolo una soluzione idroalcolica (50%). Il test intradermico è effettuato alla concentrazione 10 volte inferiore rispetto ai precedenti test (0,1%) utilizzando come veicolo la soluzione fisiologica; pertanto il suo allestimento è possibile solo per composti idrosolubili. E' stato recentemente dimostrato che esso è superiore al patch test nell'individuare sensibilizzazione cellulomediata a CT<sup>18</sup>; tuttavia non può essere utilizzato routinariamente per la maggiore frequenza dei sopracitati effetti collaterali rispetto agli altri test in vivo.

Sia per il prick test che per il test intradermico è consigliabile l'esecuzione di un test di controllo negativo (soluzione fisiologica per entrambi) e di uno positivo (istamina di cloridrato: 10 mg/ml per il primo, 0,1 mg/ml per il secondo).

Al pari del patch test, le soluzioni per prick test e test intradermico devono essere conservate in frigorifero (6-8°C) e confezionate in contenitori con tappo; il loro rinnovo deve essere effettuato settimanalmente.

*Repeated Open Application Test (ROAT)*

ROAT rappresenta la metodica che completa il pannello diagnostico in caso di negatività dei TCA sopracitati<sup>20</sup>. Al pari del patch test, non è scevro di reazioni falsamente negative per lo scarso assorbimento dei CT attraverso la cute sana. Al contrario, la sua esecuzione su cute lesa o pretrattata con sostanze in grado di alterare la barriera cutanea (quale sodio laurilsolfato) e pertanto di favorirne l'assorbimento, espone a rischio di reazioni falsamente positive. In ogni caso è indispensabile che l'esecuzione del test sia protratta fino alla 7<sup>a</sup> giornata; l'eventuale reazione positiva, al pari dei TCA, è solo raramente di tipo eczematoso, essendo rappresentata per lo più da reazioni di tipo eritemato-edematoso, a volte papuloso, non infrequentemente con aspetto a tipo "edge effect", al pari di quanto osservabile al patch test<sup>10</sup>.

In letteratura sono descritti casi di DAC da CT diagnosticati dalla positività del solo ROAT<sup>21</sup>.

**Quali corticosteroidi testare?**

Nella serie standard SIDAPA 2012 sono attualmente presenti 2 allergeni corticosteroidi come marker di sensibilizzazione cellulomediata ai CT: budesonide 0,01% e idrocortisone 21-acetato 1% (entrambi in vaselina). Nel sospetto di DAC da CT, tuttavia, noi eseguiamo i TCA con la serie "Corticosteroidi topici" riportata nella tabella I. Il patch test con il prodotto del commercio, come precedentemente detto, risulta spesso negativo per la bassa concentrazione del principio attivo; pertanto esso non può essere considerato un idoneo strumento diagnostico.

In considerazione del frequente riscontro di reazioni crociate a corticosteroidi sistemici (CS) in soggetti sensibilizzati a CT, è a nostro modo di vedere deontologicamente corretto eseguire in questi ultimi TCA con i CS riportati nella tabella II. Ciò al fine di individuare in questi pazienti CS alternativi, da confermare successivamente con l'esecuzione di test di scatenamento.

**Reazioni positive multiple ai corticosteroidi**

In soggetti con sensibilizzazione ai CT non è

Tabella I - Test cutanei allergodiagnostici: serie "corticosteroidi topici".

Corticosteroidi topici	Patch test* (%)	Prick test§ (%)	Test intradermico° (%)
Betametasone 17-valerato	1	1	0,1
Budesonide	0,01	0,01	NE
Desossimetasone	1	1	NE
Difluocortolone pivalato	1	1	0,1
Fludrocortisone	1	1	NE
Fluocinolone acetone	1	1	NE
Fluocortolone	1	1	NE
Fluocortolone caproato	1	1	0,1
Fluorometolone	1	1	NE
Fluradrenolone	1	1	NE
Idrocortisone 21-acetato	1	1	NE
Idrocortisone 17-butirrato	1	1	0,1
Triamcinolone acetone	1	1	0,1

\* tutti in vaselina, fatta eccezione per idrocortisone 17-butirrato (etanolo); § in soluzione idroalcolica; ° in soluzione fisiologica; NE: non effettuabile per insolubilità in acqua del principio attivo

Tabella II - Test cutanei allergodiagnostici: serie "corticosteroidi sistemici".

Corticosteroidi sistemici	Patch test* (%)	Prick test§ (%)	Test intradermico° (%)
Betametasone sodio fosfato	1	1	0,1
Desametasone	1	1	NE
Desametasone disodio-21-fosfato	1	1	0,1
Idrocortisone sodio succinato	1	1	0,1
Metilprednisone	1	1	NE
Metilprednisolone sodio succinato	1	1	0,1
Prednisone	1	1	NE
Triamcinolone	1	1	NE
Triamcinolone acetone	1	1	NE

\* in etanolo; § in soluzione idroalcolica; ° in soluzione fisiologica; NE: non effettuabile per insolubilità in acqua del principio attivo

infrequente l'osservazione di reazioni positive multiple ai TCA. E' arduo precisare se tale evento sia espressione di polisensibilizzazione o di sensibilizzazione crociata, specie in soggetti con patologie corticosteroidi-sensibili croniche, per le quali è difficile precisare se un composto risultato positivo al patch test sia stato utilizzato nel passato<sup>10</sup>. Tale problematica ha stimolato la formulazioni d'ipotesi interpretative sulla base della struttura molecolare, brevemente riportate di seguito.

#### Classificazione di Coopman et al<sup>22</sup> (1989)

**Classe A:** assenza di catene esterificate in C16-C17; prototipo: tixocortolo pivalato (idrocortisone 21-acetato, metilprednisolone, prednisolone, prednisone);

**Classe B:** presenza di radicale cis-diol in C16-C16; prototipo: triamcinolone acetone (alcinonide, budesonide, desonide, fluocinolone acetone);

**Classe C:** presenza di gruppo CH<sub>3</sub> in posizione C16; prototipo betametasone (desametasone, desossimetasone, fluocortolone);

**Classe D:** presenza di catene esterificate in C16-C17; prototipo: idrocortisone 17-butirrato (beclometasone, betametasone sali, clobetasolo, clobetasone, difluocortolone, fluocortolone sali).

In base a tale ipotesi classificativa, le reazioni crociate si realizzerebbero, oltre che tra composti appartenenti alla stessa classe, tra CT di gruppo B e D; meno frequenti quelle tra CT di gruppo A e D e di gruppo A e B; rare quelle tra CT di classe C e altre classi.

Nel 2000<sup>23</sup> la classe D è stata suddivisa in:

**Classe D1:** con metil-sostituzione in C16 e/o alogenazione; prototipo betametasone dipropionato. Il rischio di reazioni crociate è medio-basso.

**Classe D2:** senza metil-sostituzione in C16 e/o alogenazione; prototipo metilprednisolone acetone. Il rischio di reazioni crociate è medio-alto.

#### Classificazione di Wilkinson et al<sup>24</sup> (2000)

**Classe 1:** assenza di radicali in C6 e C9: idrocortisone 21-acetato, budesonide, idrocortisone

17-butirrato. Il rischio di reazioni crociate è alto;

*Classe 2:* radicali in C6: metilprednisolone, flurandrenolone, fluocortolone, fluocortolone caproato. Il rischio di reazioni crociate è medio-alto;

*Classe 3:* radicali in C9: triamcinolone acetone, fludrocortisone, desossimetasone, betametasona 17-valerato. Il rischio di reazioni crociate è medio;

*Classe 4:* radicali in C6 e C9: fluorometolone, fluocinolone acetone, difluocortolone pivalato. Il rischio di reazioni crociate è basso.

*Classificazione di Baeck et al*<sup>25</sup> (2011)

*Cluster I* (gruppo A + gruppo D2 + budesonide): molecole non C6-metilate e spesso non alogenate: budesonide, idrocortisone aceponato, idrocortisone 17-butirrato, metilprednisolone aceponato, prednicarbato, fluocortolone pivalato, triamcinolone. Il rischio di reazioni crociate è alto;

*Cluster II* (gruppo B): molecole alogenate con struttura chetale/diolica in C16-C17: amcinonide, desonide, fluocinonide, alcinonide. Il rischio di reazioni crociate è medio-alto;

*Cluster III* (gruppo C + gruppo D1): molecole alogenate e C16 metilate: beclometasone dipropionato, betametasona 17-valerato, clobetasolo propionato, desossimetasone, difluocortolone valerato, fluocortolone pivalato, fluticasone propionato, mometasone furoato. Il rischio di reazioni crociate è basso.

## Bibliografia

- Sulzberger MB, Witten VH. The effect of typically applied compound F in selected dermatoses. *J Invest Dermatol* 1952; 19: 101.
- Burckhardt W. Kontaktezem durch Hydrocortison. *Hautarzt* 1959; 10: 42.
- Kooij R. Hypersensitivity to hydrocortisone. *Br J Dermatol* 1959; 71: 392.
- Isaksson M, Bruze M. Corticosteroids. *Dermatitis* 2005; 16: 3.
- Lisi P, Stingeni L, Angelini G, et al. A new mix for screening contact allergy to corticosteroids. *Ann Ital Dermatol Allergol Clin Sper* 2000; 54: 77.
- Isaksson M, Andersen KE, Brandão FM, et al. Patch testing with budesonide in serial dilutions: a multicentre study of the EECDRG. *Contact Dermatitis* 2000; 42: 352.
- Lisi P, Stingeni L. Problematiche clinico-diagnostiche in tema di sensibilizzazione ai corticosteroidi topici. *Ann Ital Dermatol Clin Sper* 1996; 50: 111.
- Gönül M, Gül U. Detection of contact hypersensitivity to corticosteroids in allergic contact dermatitis patients who do not respond to topical corticosteroids. *Contact Dermatitis* 2005; 53: 67.
- Foti C, Bonifazi E, Casulli C, et al. Contact allergy to topical corticosteroids in children with atopic dermatitis. *Contact Dermatitis* 2005; 52: 162.
- Lisi P, Stingeni L. I corticosteroidi. In Pigatto P, Zerboni R (ed): *Dermatiti da contatto da cosmetici e farmaci topici*. Pavia: Selecta Medica, 2004: 81.
- Stingeni L, Hansel K, Lisi P. Morbilliform erythema-multiforme-like eruption from desoxymethasone. *Contact Dermatitis* 1996; 35: 363.
- Stingeni L, Caraffini S, Assalve D, et al. Erythema-multiforme-like contact dermatitis from budesonide. *Contact Dermatitis* 1996; 34: 154.
- Lisi P, Stingeni L. Protocollo diagnostico per la dermatite da contatto da corticosteroidi. *Ann Ital Dermatol Clin Sper* 1997; 51: 8.
- Browne F, Wilkinson SM. Effective prescribing in steroid allergy: controversies and cross-reactions. *Clin Dermatol* 2011; 29: 287.
- Baeck M, Chemelle JA, Terreux R, et al. Delayed hypersensitivity to corticosteroids in a series of 315 patients: clinical data and patch test results. *Contact Dermatitis* 2009; 61: 163.
- Foti C, Rigano L, Lionetti N, et al. Investigation of new vehicles to patch test corticosteroids: our experience with ethoxydiglycol to detect contact allergy to hydrocortisone butyrate. *J Biol Regul Homeost Agents* 2011; 25: 683.
- Isaksson M, Gruvberger B, Persson L, et al. Stability of corticosteroid patch test preparations. *Contact Dermatitis* 2000; 42: 144.
- Soria A, Baeck M, Goossens A, et al. Patch, prick or intradermal tests to detect delayed hypersensitivity to corticosteroids? *Contact Dermatitis* 2011; 64: 313.
- Wilkinson SM, Heagerty AHM, English JSC. A prospective study into the value of patch and intradermal test in identifying topical corticosteroid allergy. *Br J Dermatol* 1992; 127: 22.
- Chang Y-C, Clarke GF, Maibach HI. The provocative use test (PUT) (repeated open application test - ROAT) in topical corticosteroid allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 1997; 37: 309.
- Weber F, Barbaud A, Reichert-Penetrat S, et al. Unusual clinical presentation in a case of contact dermatitis due to corticosteroids diagnosed by ROAT. *Contact Dermatitis* 2001; 44: 105.
- Dooms-Goossens A, Andersen KE, Burrows D, et al. A survey of the results of patch tests with tixocortol pivalate. *Contact Dermatitis* 1989; 20: 158.
- Matura M, Goossens A. Contact allergy to corticosteroids. *Allergy* 2000; 55: 698.
- Wilkinson SM. Corticosteroid cross-reactions: an alternative view. *Contact Dermatitis* 2000; 42: 59.
- Baeck M, Chemelle JA, Goossens A, et al. Corticosteroid cross-reactivity: clinical and molecular modelling tools. *Allergy* 2011; 66: 1367.

## Dermatite allergica da contatto da colliri: procedimento diagnostico

Monica Corazza e Alessandro Borghi

**Riassunto.** La diagnosi della dermatite allergica da contatto (DAC) da prodotti topici oftalmici è frequentemente problematica poiché i patch test eseguiti con metodica convenzionale risultano spesso negativi. Solo il 19-23% dei pazienti fortemente sospetti di avere una DAC da prodotti oftalmici mostra positività ai patch test convenzionali con i propri prodotti d'uso. Sono pertanto state studiate alcune metodiche alternative da utilizzare nella testificazione dei prodotti oftalmici, allo scopo di aumentare la sensibilità del test. L'utilizzo di Large Finn Chambers (diametro 12 mm) consente di disporre di una maggior superficie di contatto dell'allergene; ciò può essere utile nella testificazione di deboli allergeni. L'utilizzo di stripping o scratching della cute sulla quale viene posizionato il test, può aumentare l'assorbimento e favorire la penetrazione percutanea degli allergeni. Entrambe queste tecniche sono state impiegate nella testificazione di colliri con elicitazione di risposte positive. Il pre-trattamento della cute con sodio lauril solfato (SLS), tensioattivo anionico in grado di danneggiare la barriera cutanea, ha mostrato di incrementare la sensibilità del test ed aumentare l'intensità della risposta, agevolando la lettura e l'interpretazione delle risposte più deboli. Nella pratica quotidiana, testare inizialmente i prodotti oftalmici utilizzando Large Finn Chambers può essere più pratico. Successivamente, in caso di negatività, può essere consigliabile ricorrere a procedure più complesse come il pre-trattamento della cute con SLS o, seppur minimamente, più invasive come stripping e scratching.

**Parole chiave:** colliri, farmaci oftalmici, patch test, dermatite allergica da contatto, metodi alternativi.

**Summary.** *Allergic contact dermatitis to ophthalmic products: diagnostic procedure.* The diagnosis of allergic contact dermatitis from ophthalmic products is often discouraging as patch tests with patients' own products are often negative. In fact, only 19-23% of patients strongly suspected of having allergic contact dermatitis from ophthalmic products are positive to their own products tested in the classical way. Alternative procedures of performing patch tests with topical ophthalmic medicaments have been proposed with the aim of increasing the sensitivity of the test. The enlargement of the patch test area provides more positive patch tests results when testing particular standardized allergens and detects weak sensitizations. Stripping and scratching, damaging the cutaneous barrier may lead to an increased absorption of the allergen enhancing its percutaneous penetration. Both these techniques have been successfully experimented with ophthalmic products. Sodium lauryl sulphate (SLS) is an anionic surface-active agent capable of damaging the cutaneous barrier. Pre-treatment of the skin with SLS has been shown to increase the sensitivity of patch tests and to reveal more positive responses in comparison with the conventional patch tests. In conclusion, all these procedures increase patch test sensitivity and may enhance intensity of responses making evaluation and scoring of the reactions easier. In everyday practice, directly testing patients' own products with Large Finn Chamber could be more practical. Only afterwards, in negative patients, we advise performing time consuming procedures (like SLS pre-treatment) and slightly invasive methods (such as scratching and stripping) as a second step in the management of allergic contact dermatitis from ophthalmic products.

**Key words:** eyedrops, ophthalmic drugs, patch test, allergic contact dermatitis, alternative methods.

### Introduzione

Nei soggetti affetti da dermatite palpebrale la prevalenza di sensibilizzazione è riferita variare tra il 24% e il 72% dei casi<sup>1-3</sup>. In corso di dermatite palpebrale la diagnosi più fre-

quente è rappresentata dalla dermatite allergica da contatto (DAC) (45-65%), seguita dalla dermatite da contatto irritante (DCI) (15-21%), dalla dermatite atopica (10-23%) e dalla dermatite seborroica (3-4%)<sup>1-3</sup>. I dati italiani sono

Sezione di Dermatologia, Dipartimento di Medicina clinica e sperimentale, Università degli studi di Ferrara.

Dr.ssa Monica Corazza, Sezione di Dermatologia, Dipartimento di Medicina clinica e sperimentale, Via Savonarola 9, 44121 Ferrara (e-mail: czm@unife.it).

Conflitto d'interesse: dichiarato assente dagli Autori.

Accettato per la pubblicazione il 25 giugno 2012.

sostanzialmente in linea con quelli riportati<sup>4</sup>. Pertanto, poiché la DAC è la causa più comune di eczema palpebrale (figura 1), i patch test rappresentano un procedimento diagnostico fondamentale al fine di individuare il possibile allergene causale.



Figura 1 - Dermatite allergica da contatto da colliri.

Le batterie da testare sono la serie standard SIDAPA (Società Italiana Dermatologia Allergologica Professionale e Ambientale) e, in base al quadro clinico e all'anamnesi, che evidenzia spesso l'applicazione di cosmetici e topici oftalmici, le serie integrative Conservanti, Profumi, Emulsionanti e i principi attivi farmaceutici. Tuttavia, nel 12,5% dei pazienti in cui è stata formulata la diagnosi di DAC periorbitale, la sensibilizzazione è riscontrabile soltanto attraverso l'esecuzione del patch test con il prodotto d'uso. Di conseguenza, in caso di sospetta DAC in soggetto con eczema palpebrale, è sempre opportuno testare anche il prodotto d'uso (figura 2)<sup>5</sup>.

In base a quanto riportato in letteratura e alla nostra esperienza, in pazienti con sospetta DAC da prodotti oftalmici, i patch test convenzionali con i prodotti d'uso risultano positivi in una percentuale sorprendentemente bassa di casi, mediamente compresa tra 19% e 23%<sup>6</sup>. Si verifica pertanto una incongruenza tra storia clinica riferita dai pazienti e risultato dei patch test; in pazienti in cui anamnesi e clinica sono fortemente suggestivi di DAC da colliri, talora con esito positivo del test di arresto-ripresa con il prodotto topico sospetto, il patch test eseguito in modo convenzionale risulta negativo.



Figura 2 - Reazione positiva a patch test con prodotto d'uso (collirio).

### Cause di false reazioni negative al patch test

La complessità della diagnosi eziologica di DAC da colliri può essere ricondotta fondamentalmente a diverse cause. La prima è relativa alla struttura anatomica della cute palpebrale. In sede palpebrale la cute è sottile, avendo uno spessore di circa 0,55 mm, molto più esile se confrontata con i 2 mm di altre aree corporee. Queste caratteristiche strutturali della cute palpebrale potrebbero determinare una soglia di elicitazione dell'allergia da contatto sensibilmente più alta rispetto alla cute spessa del dorso, dove sono solitamente eseguiti i patch test. D'altro canto, la bassa concentrazione dell'allergene contenuto nel prodotto topico commerciale potrebbe non essere sufficiente per elicitare una reazione allergica sul dorso, contrariamente a quanto può verificarsi a livello palpebrale. Inoltre, la scarsa biodisponibilità dell'allergene, spesso idrosolubile nel prodotto commerciale, potrebbe rappresentare un'ulteriore spiegazione dell'incongruente risultato dei patch test con il prodotto d'uso.

Per ovviare a queste difficoltà sono state proposte in letteratura diverse procedure che hanno cercato, modificando la metodica standard dei patch test, di aumentare la sensibilità diagnostica dei test.

### Aumento della concentrazione dell'allergene

In letteratura esistono alcuni lavori in cui è stata dimostrata la sensibilizzazione a principi attivi farmaceutici in pazienti in cui il test

con il principio attivo a basse concentrazioni non aveva evidenziato la positività<sup>7</sup>. Avendo a disposizione il principio attivo del farmaco, un primo tentativo può essere rappresentato dall'utilizzo di concentrazioni decisamente più alte di quelle presenti nel prodotto farmaceutico. Per esempio, se i principi attivi sono presenti nel collirio alla concentrazione dello 0,5-1 %, i test, negativi alle stesse concentrazioni, possono diventare positivi aumentando di 10-20 volte la loro concentrazione. Questa metodica è stata applicata a test con prodotti oftalmici contenenti beta-bloccanti, apraclo-nidina e fenilefrina.

### Utilizzo di Large Finn Chamber

L'impiego di Large Finn Chamber su cerotto Scampor (Alpharma AS, Oslo, Norway), supporti per apteni di diametro superiore (12 mm) rispetto a quelle utilizzate nella pratica clinica quotidiana (8 mm), implica applicazioni di maggiori quantità di allergene distribuite su una superficie più ampia. Questa tecnica si è dimostrata utile nella testificazione di allergeni la cui risposta è scarsamente riproducibile (Kathon CG®, lanolina, formaldeide, profumi mix) e può essere applicata anche nel caso si decida di testare prodotti oftalmici<sup>8</sup>.

### Stripping

La metodica del pre-trattamento della cute con stripping con cerotto ha lo scopo di rimuovere lo strato corneo per aumentare la penetrazione dell'aptene. Il danno alla barriera cutanea aumenta la biodisponibilità dell'aptene negli strati più profondi e pertanto la penetrazione dell'allergene. Questa tecnica è stata utilizzata soprattutto con allergeni ad alto peso molecolare come eparina.

Si è osservato che applicando 12-15 strip si ottiene una riduzione dello strato corneo del 50%, mentre 60-120 strips portano ad una rimozione completa dello strato corneo<sup>9</sup>. Sede e tipo di cerotto, invece, non sembrano influenzare la quantità del corneo rimosso, ma influenzano la perdita trans epidermica d'acqua, evidenziando una diversa capacità di rimozione dei componenti della barriera cutanea (ceramidi, acidi grassi liberi, lipidi).

In conclusione, sembra utile effettuare lo stripping prima del patch test, utilizzando un cerotto acrilico per 10-15 volte. Il cerotto deve essere applicato verticalmente e parallelamente alla colonna vertebrale, deve essere effettuata una leggera pressione per 2 secondi seguita dalla rimozione veloce con un unico movimento, mantenendo un angolo di 45 gradi<sup>9</sup>.

### Scratching

Questa tecnica consiste nell'eseguire una scarificazione con lancetta sterile (senza indurre sanguinamento) e nella successiva esecuzione di un classico patch test in occlusione, con le medesime modalità di lettura del patch test. Le letture vanno eseguite a 20 minuti, a 1, 48 e 72 ore. L'insulto meccanico alla cute ha lo scopo di ledere lo strato corneo ed aumentare la penetrazione degli allergeni, specie di quelli che hanno un elevato peso molecolare e una bassa capacità di penetrazione (ad esempio, farmaci come eparina e valaciclovir).

### Pre-trattamento della cute con sodio lauril solfato

Sodio lauril solfato (SLS) è un tensioattivo anionico in grado di alterare lo strato corneo disorganizzando i bilayer lipidici ed agevolando la penetrazione degli allergeni. Alcuni studi hanno dimostrato, sia clinicamente che ecograficamente, che il pretrattamento della cute con SLS agevola la valutazione e lo scoring delle positività più deboli.

In un lavoro sperimentale abbiamo applicato questo protocollo nella testificazione di prodotti oftalmici<sup>10</sup>. Il pre-trattamento della cute con SLS soluzione acquosa allo 0,5% per 24 ore prima di eseguire il patch test convenzionale si è rivelato una metodica promettente nella diagnosi di DAC da prodotti oftalmici, evidenziando nuove positività e inducendo risposte positive di maggiore intensità. Questa tecnica può quindi affiancarsi alle metodiche precedentemente descritte essendo relativamente semplice e non costosa.

Successivi lavori di confronto tra le varie metodiche di testificazione negli stessi pazienti, selezionati attentamente per aspetti clinici, anamnesi altamente suggestiva di DAC da col-

liri o con test arresto-ripresa positivo, hanno permesso di concludere che tutte le tecniche portano a una maggiore sensibilità del test rispetto al test convenzionale. Tutti, infatti, rivelano un numero di positività maggiore rispetto al patch test in occlusione, infatti, eseguito con tecnica convenzionale (figura 3)<sup>11</sup>.

## Conclusioni

Negli eczemi palpebrali l'iter diagnostico è spesso complesso, dispendioso da un punto di vista temporale e talora poco gratificante, specie quando si sospettano i prodotti oftalmici come agenti causali. Risulta di grande importanza eseguire i test con i prodotti d'uso del paziente, nella fattispecie i prodotti oftalmici. Tuttavia, essendo noto che, per motivi vari, i test risultano spesso negativi, è consigliabile ricorrere a tecniche che ci permettano di rivelare positività difficili da evidenziare, dunque evitare falsi negativi.

Esistono varie metodiche di cui ci si può avvalere per aumentare la sensibilità diagnostica. La procedura più pratica, pertanto raccomandabile come prima istanza, sembra essere l'utilizzo di Large Finn Chamber. Il ricorso a metodiche più complesse o invasive (come stripping, scratching e pre-trattamento con SLS) può essere utile in caso di negatività, in seconda istanza. Deve comunque essere sottolineato come l'esecuzione di patch test con prodotti d'uso debba essere riservato a personale con specifiche competenze dermato-allergologiche in quanto, nonostante l'apparente semplicità, è possibile il verificarsi di risposte falsamente positive e falsamente

negative.

Porre diagnosi definitiva di DAC da colliri e riuscire ad identificare l'allergene causale in pazienti con eczema palpebrale assume particolare importanza quando i trattamenti oftalmici vengono prescritti per patologie croniche, come il glaucoma, che richiedono necessariamente trattamenti topici prolungati.

## Bibliografia

1. Nethercott JR, Nield G, Holness DL. A review of 79 cases of eyelid dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1989; 21: 223.
2. Valsecchi R, Imberti G, Martino D, et al. Eyelid dermatitis: an evaluation of 150 patients. *Contact Dermatitis* 1992; 27: 143.
3. Ockenfels HM, Seemann U, Goos M. Contact allergy in patients with periorbital eczema: an analysis of allergens. Data recorded by the Information Network of the Departments of Dermatology. *Dermatology* 1997; 195: 119.
4. Ayala F, Fabbrocini G, Bacchilega R et al. Eyelid dermatitis: an evaluation of 447 patients. *Am J Contact Dermat* 2003; 14: 69.
5. Feser A, Plaza T, Vogelgsang L, et al. Periorbital dermatitis - a recalcitrant disease: causes and differential diagnoses. *Br J Dermatol* 2008; 159: 858.
6. Corazza M, Masieri LT, Virgili A. Doubtful value of patch testing for suspected contact allergy to ophthalmic products. *Acta Derm Venereol* 2005; 85: 70.
7. Statham BN. Failure of patch testing with levobunolol eyedrops to detect contact allergy. *Contact Dermatitis* 2000; 43: 365.
8. Brasch J, Szliska C, Grabbe J. More positive patch test reactions with larger test chambers? *Contact Dermatitis* 1997; 37: 118.
9. Bashir SJ, Chew AL, Anogbogu A, et al. Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping. *Skin Res Technol* 2001; 7: 40.
10. Corazza M, Virgili A. Allergic contact dermatitis from ophthalmic products: can pre-treatment with sodium lauryl sulphate increase patch test sensitivity? *Contact Dermatitis* 2005; 52: 1.
11. Corazza M, Baldo F, Lauriola MM, et al. Dermatite allergica da contatto da prodotti oftalmici: metodiche diagnostiche a confronto. *Ann Ital Dermatol Allergol Clin Sper* 2008; 62: 60.

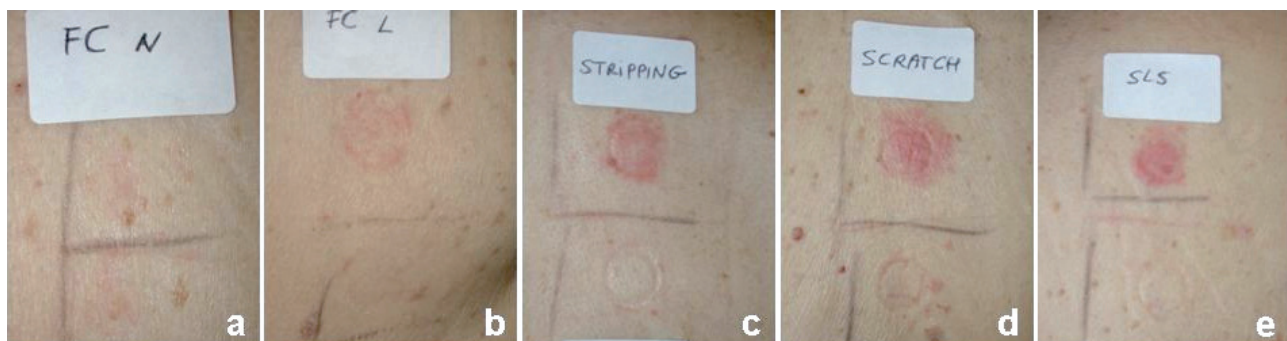


Figura 3 - Confronto di reazioni a patch test effettuato con medesimo collirio, utilizzando diverse metodiche: a) patch test negativo con metodica convenzionale, b) patch test positivo utilizzando Large Finn Chamber, c) patch test positivo dopo stripping della cute, d) patch test positivo dopo scratching, e) patch test positivo dopo pre-trattamento con SLS.

## Dermatite da contatto con piante: procedimento diagnostico

Domenico Bonamonte

**Riassunto.** Le reazioni cutanee da piante comprendono vari quadri clinici con meccanismi patogenetici diversi: irritazione e allergia da contatto, fotoirritazione e fotoallergia da contatto, orticaria da contatto immunitaria e non, reazioni granulomatose ed ipercromie primitive. Per ciascuna di queste manifestazioni cliniche vengono considerate le possibilità di diagnosi differenziale. Quando si sospetta una pianta come causa della dermatite, bisogna provvedere innanzitutto alla identificazione della stessa, poi procedere con i test cutanei allergodiagnostici. I campioni per i test devono essere ottenuti da tutte le porzioni delle piante (fiori, foglie, steli, radici, frutti), incluse quelle considerate "selvagge". Ogni campione deve essere suddiviso in tre parti, una per l'identificazione, una per l'estrazione dell'antigene e l'altra per ulteriori eventuali studi chimici. Una volta identificata la pianta, bisogna consultare la letteratura per le notizie sugli antigeni, comprese le loro diluizioni e i veicoli di estrazione. Il dermatologo può quindi testare il paziente con ogni singola porzione della pianta come tale o con gli estratti opportunamente preparati. Non è necessario testare le piante notoriamente irritanti. E' obbligatorio testare con ogni parte della pianta 20 soggetti sani di controllo, allo scopo di evidenziare eventuali reazioni di tipo irritante.

**Parole chiave:** dermatite da contatto da piante, fitodermatite da contatto, piante, estratti di piante, identificazione botanica.

**Summary.** *Contact dermatitis from plants: diagnostic procedure.* Cutaneous reactions to plant material include various types of contact reaction, such as irritant and allergic contact dermatitis, airborne toxic and allergic contact dermatitis, phototoxic and photoallergic reactions, immunologic and non immunologic contact urticaria, granulomatous reactions, and primitive hyperchromic pictures. For each one of these clinical patterns, the various differential diagnostic features are considered. When a plant has been suspected in causing contact dermatitis, it is necessary to proceed, obviously before testing the patient, to the botanical investigation (sources: botanists of herbariums, Universities, Department of Agriculture). Samples must be obtained of all the portions of the plant (flowers, leaves, stems, roots, and fruits) to which the exposure may have occurred, including those considered "weeds". Each sample must be divided into three parts, one used for identification, one for making extract dilutions and another one preserved in a freezer for chemical study. After the identification of the plant and the information on its antigens, the dermatologist may proceed to test the patient with the various portions of plant itself or with the extracts, properly prepared. It is useless to patch test with irritant plants. It is mandatory to test with the various parts of the plant 20 control individuals in order to identify eventual irritant reactions.

**Key words:** contact dermatitis from plants, phytocontact dermatitis, plants, plant extracts, botanical identification.

### Introduzione

Delle 300.000 specie di piante ad oggi isolate e classificate, molte sono in grado di indurre vari quadri patologici cutanei a diverso meccanismo patogenetico (tabella I)<sup>1-8</sup>.

Lo studio delle fitodermatiti da contatto (FDC) è piuttosto complesso a causa di numerose problematiche inerenti il loro deter-

minismo, fra cui l'enorme numero di specie, l'enorme numero di sostanze in esse contenute (peraltro diverse da porzione a porzione della pianta), la presenza di derivati delle piante in prodotti industriali e cosmetici, l'intervento di fattori fisici ambientali (clima, ventilazione, radiazioni UV, umidità) e costituzionali (sudorazione).

La diagnosi delle FDC si avvale di criteri

Dipartimento di Scienze biomediche ed Oncologia umana, Sezione di Dermatologia, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro".  
Prof. Domenico Bonamonte, Sezione di Dermatologia, Università di Bari, Policlinico, Piazza Giulio Cesare 11, 70124 Bari (e-mail: d.bonamonte@dermatologia.uniba.it).  
Conflitto d'interesse: dichiarato assente dall'Autore.  
Accettato per la pubblicazione il 25 giugno 2012.

Tabella I - Quadri clinico-patogenetici di fitodermatiti da contatto.

---

Dermatite da contatto irritante
Dermatite allergica da contatto
Fotodermatite da contatto irritante
Fotodermatite allergica da contatto
Dermatite da contatto irritante aerotrasmissa
Dermatite allergica da contatto aerotrasmissa
Orticaria da contatto
Ipercromie primitive
Reazioni granulomatoze
Acne da cosmetici (estratti di piante)
Reazione persistente alla luce (post-fitofotodermatite)

---

clinico-morfologici<sup>7-13</sup> e presidi clinico-laboratoristici. In presenza di anamnesi positiva per contatto con piante è necessario, innanzitutto, escludere l'evenienza di pseudofitodermatosi: le piante, infatti, potrebbero essere infestate da miceti, acari e processionarie, oppure potrebbero essere contaminate da erbicidi, pesticidi, acceleranti della crescita, a loro volta causa di specifici quadri dermatologici.

### Diagnosi eziologica

Per quel che riguarda lo studio eziologico delle FDC, si consiglia il seguente procedimento<sup>8</sup>.

#### Raccolta dei campioni

È necessario: a) raccogliere campioni di tutte le piante con le quali c'è stato il possibile contatto, comprese le "erbacce"; b) campionare la pianta intera, ove possibile, o le sue varie porzioni (foglie, petali, rami, radici, frutti), poiché gli antigeni possono differire da porzione a porzione; c) raccogliere, per ogni specie, 3 campioni, da conservare in freezer (uno per l'identificazione, uno per i test cutanei, uno da conservare per eventuali test chimici); d) annotare data (stagione) e area geografica di prelievo dei campioni.

#### Identificazione della specie

Prima di procedere con i test cutanei allergodiagnostici è necessario identificare la specie. Al riguardo, i nomi colloquiali o vernacolari delle piante non sono utili.

Per l'identificazione delle piante rivolgersi a giardini botanici, botanici e tassonomisti di università, ministero dell'Agricoltura, addetti ad erbari.

### Dati della letteratura

Dopo l'identificazione, consultare la letteratura circa gli antigeni (nomi, formule chimiche, potenziali poteri irritante e/o allergizzante, concentrazioni e veicoli di impiego per i test cutanei) che la specie contiene nelle sue varie porzioni.

#### Reperimento degli apteni

Consultare gli appositi cataloghi di apteni già pronti in commercio, quali quelli di F.I.R.M.A. (Firenze), Chemotechnique Diagent (Vellinge, Svezia), Trolab (Milano), Lofarma (Milano). Qualora le sostanze non fossero già pronte in commercio per i test cutanei, bisogna consultare i cataloghi per materie prime "pure" (per esesempio, Fluka, Milano).

#### Preparazione delle piante da testare

In assenza di apteni del commercio, si consiglia di procedere come segue con le piante come tali: a) non è necessario testare piante "notoriamente" irritanti; b) testare separatamente le diverse parti della pianta; c) utilizzare piante "mature", potenzialmente più allergeniche delle "immature"; d) utilizzare piante "fresche", in quanto con l'età si riduce il potere sensibilizzante; e) è obbligatorio eseguire gli stessi test in 20 controlli, al fine di escludere risposte di tipo irritativo, che si avrebbero anche nei controlli ("un paziente è allergico solo quando i controlli sono negativi!").

Ove possibile, impiegare per i test oli essenziali, da diluire opportunamente (vedi letteratura al riguardo). Altrimenti, si può procedere come segue: a) petali e foglioline: si schiacciano delicatamente; b) foglie e rametti: si sminuzzano con le forbici; c) bulbi: si sminuzzano dopo rimozione degli strati secchi esterni; d) oggetti di legno: si ricava materiale mediante shaving; e) legni: si usano le polveri.

Per l'estrazione degli antigeni dai suddetti campioni si deve: a) immergere il campione (trattato come sopra detto) per 60-90 secondi in etere; b) lasciare seccare per evaporazione; c) risospendere l'estratto secco in etere/acetone/etanolo/vaselina in concentrazioni da 1% a 10%.

È opportuno ricordare che ogni autore ha il proprio metodo, anche circa i veicoli di estrazione e la successiva diluizione. Quanto sopra detto, comunque, va bene per la gran parte degli antigeni. E' bene tuttavia riferirsi alla

letteratura per notizie su particolari apteni, per i quali la concentrazione d'impiego può essere inferiore all'1%.

Nel caso delle più comuni piante di *Compositae*, la rispettiva porzione, una volta trattata come sopra riportato, può essere testata direttamente, in quanto l'antigene usualmente si trova in superficie nei tricomi.

#### ***Test cutanei allergodiagnostici con alimenti***

Possono essere utilizzati:

"Rub test", strofinando gentilmente sulla cute della faccia flessoria dell'avambraccio un pezzetto di alimento crudo. In caso di orticaria da contatto la lettura è immediata dopo 20 minuti. Le forme mediate da immunoglobuline E sono da confermare mediante test immunitari in vitro.

"Scratch chamber test", che può essere eseguito in caso di negatività del precedente. L'alimento (se secco, bagnarlo con carta bibula umida) viene applicato su cute scarificata (uno scratch da 5 mm) e coperto. La lettura si esegue dopo 20 minuti per eventuali reazioni immediate; la sede del test viene quindi ricoperta con lettura a 1, 2 e 4 giorni per le reazioni ritardate.

#### ***Esecuzione e interpretazione dei test cutanei allergodiagnostici***

Per le modalità di esecuzione, lettura e interpretazione delle risposte positive ai

test cutanei allergodiagnostici si rimanda alle linee guida SIDAPA (Società Italiana di Dermatologia Allergologica Professionale e Ambientale) su Dermatite da contatto<sup>14</sup>.

#### **Bibliografia**

1. Lampe KF, Fagerström R. Plant toxicity and dermatitis: a manual for physicians. Baltimore, USA: The Williams and Wilkins Company, 1968.
2. Woods B, Calnan CD. Toxic woods. *Br J Dermatol* 1976; 94 (suppl 13): 1.
3. Mitchell J, Rook A. Botanical dermatology. Vancouver: Greengrass, 1979.
4. Hausen B. Woods injuries to human health: a manual. Berlin: Walter de Gruyter, 1981.
5. Benezra C, Ducombs G, Sell Y, et al. Plant contact dermatitis. Toronto: BC Decker Inc., 1985.
6. Lovell CR. Plants and the skin. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1993.
7. Angelini G, Vena GA. Dermatologia professionale e ambientale. Brescia: ISED, 1999.
8. Bonamonte D, Foti C, Angelini G. Fitodermatiti da contatto: rilievi diagnostici. *Ann Ital Dermatol Allergol* 2011; 65: 9.
9. Oleffe J, Dedeken H, Sporco G, et al. Dermatoses professionnelles provoquées par le bois tropicaux en Belgique. *Arch Belg Derm* 1974; 30: 75.
10. Angelini G, Vena GA. Airborne contact dermatitis. *Clin Dermatol* 1992; 10: 123.
11. Bonamonte D, Foti C, Angelini G. Hyperpigmentation and contact dermatitis due to *Juglans regia*. *Contact Dermatitis* 2001; 44: 101.
12. Bonamonte D, Filotico R, Mastrandrea V, et al. Erythema multiforme-like contact dermatitis from primin. *Contact Dermatitis* 2008; 59: 174.
13. Bonamonte D, Foti C, Lionetti N, et al. Photoallergic contact dermatitis to 8-methoxypsoralen in *Ficus carica*. *Contact Dermatitis* 2010; 62: 343.
14. Angelini G, Bonamonte D, Cristaudo A, et al. Linee guida SIDAPA su dermatite da contatto. *Ann Ital Dermatol Allergol* 2009; 63: 43.

## Patch test con materiali forniti dal paziente

Katharina Hansel

**Riassunto.** L'esecuzione del patch test con gli allergeni della serie standard e/o delle serie integrative permette di individuare le sostanze responsabili della dermatite allergica da contatto nel 40-50% dei pazienti. Questa percentuale può essere incrementata eseguendo patch test con i materiali forniti dai pazienti saggiandoli come tali o in vario modo trattati. La metodica non è priva di difficoltà esecutive ed è possibile osservare reazioni falsamente positive o negative, così come induzione di nuove sensibilizzazioni. È necessario, quindi, standardizzare quanto più possibile la metodica.

**Parole chiave:** dermatite allergica da contatto, materiali forniti dal paziente, patch test.

**Summary.** *Patch testing with patient's own products.* Patch testing with standard series and/or additional series allows the identification of the substances responsible for allergic contact dermatitis in 40-50% of patients. This percentage can be increased by performing patch tests with materials supplied by the patient as such or treated in various ways. The method is not without difficulties and it is possible to observe falsely positive or negative reactions, and the ability to induce new sensitizations. It's necessary to standardize as much as possible the method of the test.

**Key words:** allergic contact dermatitis, patient's own material, patch test.

### Introduzione

L'esecuzione del patch test con gli allergeni della serie standard e/o delle serie integrative permette d'individuare le sostanze responsabili della dermatite allergica da contatto (DAC) nel 40-50% dei pazienti<sup>1</sup>. Ne consegue che può essere utile eseguire il patch test con il/i materiali portati dal paziente quando il patch test "tradizionale" non ha consentito d'identificare l'agente causale della dermatite da contatto (DC) o quando è difficile o addirittura impossibile attribuire una rilevanza clinica attuale alle positività osservate<sup>2</sup>. L'integrazione degli allergeni testati con i materiali forniti dal paziente permette di precisare l'eziologia in un ulteriore 10% di pazienti con DC<sup>3</sup>. La metodica di testatura, tuttavia, non è priva di difficoltà esecutive ed è possibile osservare reazioni falsamente positive o negative.

A tal proposito meritano di essere ricordate

la compound allergy e il fenomeno paradosso<sup>3</sup>. Nella prima il materiale fornito dal paziente risulta positivo al patch test a differenza dei suoi componenti che sono negativi. La reazione di ciò è da ricercare in una migliore penetrazione da correlare al tipo del veicolo (per esempio, creme), nella somministrazione di più reazioni allergiche subcliniche, nella presenza di sostanze inquinanti, o di prodotti di degradazione, nella formazione di un nuovo allergene<sup>4</sup>. Nel fenomeno paradosso, invece, il materiale fornito dal paziente risulta negativo, mentre i suoi componenti sono positivi. Questa evenienza, che in genere si verifica quando sono testati farmaci per uso topico, cosmetici, collanti, oli da taglio e liquidi lubrificanti, può dipendere dalla concentrazione troppo bassa dell'allergene, dalla presenza di sostanze che sopprimono la reazione ai componenti aptenici (per esempio medicinali per uso topico contenenti corticosteroidi), dal veicolo

Sezione di Dermatologia clinica, allergologica e venereologica, Dipartimento di Specialità medico-chirurgiche e Sanità pubblica, Università di Perugia.

Dr. Katharina Hansel, Sezione di Dermatologia clinica, allergologica e venereologica, Polo ospedaliero-universitario Santa Maria della Misericordia, Sant'Andrea delle Fratte, 06156 Perugia (e-mail: katharina.hansel@med.unipg.it).

Conflitto d'interesse: dichiarato assente dall'Autore.

Accettato per la pubblicazione il 25 giugno 2012.

non adeguato o dallo spessore della cute del dorso.

Non è da sottovalutare, inoltre, il fatto che il patch test con il materiale fornito dal paziente può indurre nuove sensibilizzazioni. Per tale motivo è necessario standardizzare il più possibile la metodica.

### **Patch test con cosmetici e farmaci per uso topico**

I cosmetici "leave-on" e la maggior parte dei medicinali per uso topico possono essere saggiati come tali<sup>1,5</sup>. Relativamente ai primi, è importante ricordare di fare seccare nella celletta mascara e smalti per unghie (questi ultimi per evitare l'effetto irritante dei distillati del petrolio in essi contenuti). I cosmetici in polvere (come fard, cipria e ombretto), invece, devono essere miscelati con una piccola quantità di vaselina, in modo da favorire un'omogenea dispersione e una più adeguata adesione alla cute<sup>1,5</sup>. Tra i medicinali per uso topico, cheratolitici, retinoidi, citostatici e riducenti devono essere testati all'1% in vaselina.

I cosmetici "rinse-off" e i prodotti per i capelli non possono essere saggiati come tali<sup>5,6</sup>. Nella tabella I sono riportati concentrazioni e veicoli ottimali per la testatura. Per quanto riguarda i profumi, questi possono essere applicati come tali, in quanto già diluiti nei prodotti del commercio; la loro ulteriore diluizione è da prevedere solo nei soggetti con cute sensibile.

### **Patch test nella dermatite da contatto professionale**

Nell'ambito delle DC professionali è molto importante la scelta del materiale da testare. A tal proposito è necessario che il paziente fornisca una lista dettagliata delle sostanze presenti nell'ambiente lavorativo e, possibilmente, le loro schede informative; in queste sono segnalati tutti i composti a concentrazione superiore allo 0,1%. I materiali "incriminati" dovrebbero essere interi e non diluiti, e separati, e quindi non prodotti miscelati con altri. Se si tratta di materiali fluidi, è importante che questi vengano conservati in modo idoneo in vetro o polipropilene. Quando i componenti chimici

Tabella I - *Concentrazioni e veicoli di riferimento per i cosmetici.*

Cosmetici	Concentrazioni (%)	Veicoli
Shampoo	1-4	Vaselina
Saponi e detergenti	2-10	Acqua, vaselina, tampone
Profumi	5-10	Etanolo
Coloranti per capelli	2-10	Vaselina, acqua
Decoloranti per capelli	10	Vaselina
Soluzioni per permanenti	5-10	Tampone
Lacche per capelli	10	Acqua
Depilatori	10	Vaselina

del prodotto sono noti, si può fare riferimento alle concentrazioni e ai veicoli segnalati in letteratura<sup>7</sup>.

In realtà, nella maggioranza dei casi, non sono disponibili schede informative esaustive (anche per non violare il segreto industriale), per cui è possibile prendere visione delle schede di sicurezza che contengono informazioni sulle proprietà fisico-chimico, tossicologiche e di pericolosità per l'ambiente, al fine di assicurare una corretta e sicura manipolazione delle sostanze e miscele. In tal caso può essere utile l'analisi chimica mediante le tecniche elencate nella tabella II. In caso di presenza di sostanze ad alta tossicità non si procede all'esecuzione del patch test con il prodotto del paziente, anche se molto diluito.

Al pari, le sostanze fortemente acide o alcaline non possono essere testate come tali, in quanto è necessario modificare il loro pH, che dovrà essere tra 4 e 9. Pertanto, se si tratta di prodotti acidi (pH < 4) è necessario aggiungere un tampone alcalino e, viceversa, un tampone acido se si sospetta essere in causa di un prodotto alcalino (pH > 9), al fine di raggiungere il pH ideale (tabella III)<sup>1</sup>.

Quando invece la composizione del materiale non è nota o lo è solo parzialmente ma sono conosciute la sua natura chimica e la finalità d'uso<sup>8</sup> (per esempio oli da taglio utilizzati normalmente dai metalmeccanici a mani nudi senza dispositivi di protezione individuale), si può procedere alla testificazione utilizzando il

Tabella II - *Metodi di analisi chimica.*

Metodi di analisi chimica
Cromatografia su strato sottile
Gas-cromatografia
Spettrofotometria ad assorbimento atomico, a ultravioletto visibile, a infrarossi
Spettrometria di massa
Spettroscopia a risonanza magnetica nucleare

Tabella III - Composizione della soluzione tampone acida e di quella alcalina.

Soluzioni tamponi	Concentrazioni	Volume %
Soluzione tampone alcalina (pH 9,9)		
Carbonato di sodio, anidro	0,1 M (10,6 g $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ /l acqua)	50
Bicarbonato di sodio	0,1 M (8,4 g $\text{NaHCO}_3$ /l acqua)	50
Soluzione tampone acida (pH 4,7)		
Acetato di sodio	0,1 M (8,2 g $\text{CH}_3\text{COONa}$ /l acqua)	50
Acetato acetico	0,1 M (6,0 g $\text{CH}_3\text{COOH}$ /l acqua)	50

test delle diluizioni<sup>9</sup>. Questo consiste nell'applicazione del materiale a diluizioni crescenti in tempi successivi; applicando inizialmente il materiale allo 0,01% e poi, se il patch test è risultato negativo, allo 0,1% e infine all'1%. Nel test delle diluizioni è importante applicare il patch test in una zona facilmente raggiungibile dal paziente, come la regione deltoidea, in modo agevolare l'autorimozione dell'apparato testante in caso di comparsa di bruciore/cociore intenso<sup>2</sup>.

Materiali solidi, come plastica, legno, cuoio e tessuti, possono essere testati come tali o utilizzando frammenti ottenuti dalla raschiatura degli stessi. Le reazioni falsamente negativi, tuttavia, sono frequenti, a causa della concentrazione troppo bassa o della mancata liberazione dell'allergene. In questi casi si rende necessaria l'estrazione con etanolo, acetone o acqua. Nella tabella IV sono indicati i solventi più adeguati<sup>10</sup>. Normalmente si lascia un pezzo del materiale (per esempio 1 cm<sup>2</sup>) per 24 ore in 1 ml di solvente; poi, si eseguono patch test con un pezzo del materiale "trattato" e il solvente<sup>10</sup>.

I veicoli preferibili per le sostanze idrosolubili sono vaselina bianca e acqua distillata, mentre per le sostanze insolubili acetone, etanolo, olio d'oliva o altri oli vegetali<sup>2</sup>.

In caso di reazione positiva è necessario effettuare il test in almeno 20 soggetti di controllo, non esposti alla sostanza oggetto di studio<sup>2</sup>.

Tabella IV - Solventi da utilizzare per l'estrazione dell'allergene da alcuni materiali.

Materiali	Solventi
Carta	Etanolo
Piante e segature di legni	Acetone, etere, etanolo, acqua
Plastica	Acetone
Gomma	Acetone, acqua
Tessuti	Etanolo

## Bibliografia

1. D'Agliano S, Sertoli A, Francalanci S, et al. Esecuzione di patch test con sostanze, materiali e prodotti forniti dal paziente o dal datore di lavoro. *Ann Ital Dermatol Allergol* 2002; 56: 36.
2. Angelini G, Bonamonte D, Cristaudo A, et al. Linee guida SIDAPA su dermatite da contatto. *Ann Ital Dermatol Allergol* 2009; 63: 45.
3. Sertoli A, Acciai MC, Vanni E, et al. Patch test: considerazioni pratiche. *Ann Ital Dermatol Allergol* 2008; 62: 52.
4. Bashir SJ, Maibach HI. Compound allergy: an overview. *Contact Dermatitis* 1997; 36: 179.
5. Pascoe D, Moreau L, Sasseville D. Emergent and unusual allergens in cosmetics. *Dermatitis* 2010; 21: 127.
6. Foti C, Mastrandrea V, Conserva A, et al. Dermatite da detergenti. *Ann Ital Dermatol Allergol* 2003; 57: 1.
7. De Groot AC. Test concentration and vehicles for 4350 chemicals: patch testing. Wapserveen: acdegroot publishing, 2008.
8. Geier J, Lessmann H, Schnuch A, et al. Skin problems caused by metalworking fluids: a review. *Ann Ital Dermatol Allergol* 2006; 60: 81.
9. Slodownik D, Williams J, Frowen K, et al. The additive value of patch testing with patients' own products at an occupational dermatology clinic. *Contact Dermatitis* 2009; 61: 231.
10. Niklasson BJ. Mixing your own antigens. In: Guin JD (ed). *Practical contact dermatitis*. New York: McGraw-Hill Inc, 1995; 692.

## Atopy patch test

Francesca Giusti

**Riassunto.** Da circa 30 anni, l'esecuzione degli atopy patch test con materiale alimentare viene attuata per testare l'allergia alimentare nella dermatite atopica. In particolare tale metodica risulta un utile strumento per identificare quei pazienti atopici che mostrano risposte di tipo eczematoso all'ingestione di alimenti. Anche la rilevanza della risposta agli atopy patch test, analogamente a quella dei prick test, deve sempre essere verificata attraverso la dieta diagnostica e i test di esposizione. Nel caso degli alimenti, il materiale allergenico viene quotidianamente preparato dal personale addetto alla testificazione utilizzando alimenti freschi o in polvere, con conseguente ridotta standardizzazione della metodica e ampia variabilità dei risultati a seconda delle diverse casistiche. Solo recentemente sono stati introdotti sul mercato alcuni preparati alimentari commerciali per patch test. Le controindicazioni a tale metodica sono le stesse dei patch test con serie standard di allergeni da contatto.

**Parole chiave:** atopy patch test, dermatite atopica, allergia alimentare.

**Summary.** *Atopy patch test.* Approximately 30 years ago, atopic dermatitis (AD) patients were patch tested with aeroallergens, in order to experimentally reproduce the normal way of exposure of atopic skin to environmental allergens. This procedure was later called "atopy patch test" (APT). So far, many authors have performed APTs with house dust mites, pollen and animal dander in AD patients, obtaining different positivity rates (15-100%) according to patch test materials and modalities. Positive skin prick tests (SPTs) and/or high level of specific immunoglobulin E (IgE) in serum are not a prerequisite for a positive APT response. APTs have been demonstrated to improve the accuracy of skin testing in the diagnosis of allergy in AD patients; whereas immediate-type reactions proved to be associated with SPT positivity, APT reactivity is more frequently observed in patients with delayed responses. Combined prick and patch testing proved to enhance identification of food allergy in AD patients and to help in prescribing elimination diets. APTs are believed to be a useful diagnostic procedure also in patients with digestive symptoms (diarrhea, gastro esophageal reflux, constipation, colics, and eosinophilic esophagitis) or respiratory symptoms (rhinitis and asthma). Positive APT responses were observed also in healthy subjects. This finding may indicate an atopic diathesis and identify patients predisposed to develop dermatitis on allergen exposure. About 20  $\mu$ g of patch test material are applied to the back with Large Finn Chambers on Scampor tape for 48-72 hours. Readings are performed according to ETFAD (European Task Force on Atopic Dermatitis) guidelines, taking into account erythema, infiltration, number of papules and presence of vesicles. As regards food, APTs can be carried out with self-made fresh food material, prepared each day before patch testing or, recently with commercial food extracts. The methodology of food APTs is not standardized so far: great variations in the allergenic content of food materials from different sources may be expected, and this may influence the results and give rise to a poor reproducibility. Moreover, relevance of positive and negative APT responses should be assessed by food challenge results, as for SPT responses. Pretreatment with tacrolimus ointment does not inhibit the APT reaction in patients with DA, whereas antihistamines, systemic and topical steroids should be discontinued before patch testing. APTs should not be performed in pregnant women, in tanned subjects and in AD patients with diffuse and and/or acute eczema. Adverse side-effects were reported, described as local eczema flares, contact urticaria, irritation caused by adhesives, and itching in test sites. Severe adverse effects from APTs are very rare.

**Key words:** atopy patch test, atopic dermatitis, food allergy.

### Introduzione

Circa 30 anni fa, Mitchell *et al*<sup>1</sup> hanno sottoposto a patch test con aeroallergeni pazienti

con dermatite atopica (DA) per riprodurre sperimentalmente la normale via d'esposizione della cute atopica agli allergeni ambientali. Questa metodica, denominata "atopy patch

Clinica dermatologica, Azienda ospedaliero-universitaria di Modena.

Dr.ssa Francesca Giusti, Clinica dermatologica, Azienda ospedaliero-universitaria di Modena, Via del Pozzo 71, 41124 Modena (e-mail: francesca.giusti0505@gmail.com).

Conflitto d'interesse: dichiarato assente dall'Autore.

Accettato per la pubblicazione il 25 giugno 2012

test" (APT) da Ring *et al*<sup>2</sup>, è stata in seguito studiata con vari allergeni di tipo inalatorio (quali acari, pollini, muffe ed epiteli animali), nei pazienti atopici da numerosi autori: le percentuali di positività riscontrate sono molto diverse (15-100%), in quanto condizionate da modalità di testificazione e materiale antigenico usato.

### Basi biologiche

Negli individui atopici con dermatite, sia in atto che pregressa, si è osservato che l'APT può indurre una risposta eczematosa di tipo ritardato, nel cui sviluppo le immunoglobuline E (IgE) giocano un ruolo di rilievo. Per giustificare, infatti, come individui con IgE specifiche (IgEs) e quindi con risposte di tipo immediato agli allergeni possano reagire anche con risposte ritardate agli stessi, si è ipotizzato che gli aeroallergeni, una volta penetrati nella cute, si leghino alle IgE presenti sulla superficie delle cellule di Langerhans. Queste ultime presentano efficacemente tali antigeni a cellule T helper (Th), attivandole a produrre citochine proinfiammatorie di derivazione Th2 nella prima fase della risposta al patch test e, in seguito, prevalentemente di tipo Th1. Il fatto che anche i pazienti negativi al prick test (PT) possano rispondere al patch test con aeroallergeni suggerisce, tuttavia, che nello sviluppo dell'ipersensibilità ritardata possa intervenire anche un meccanismo non IgE-mediato.

### Applicazioni cliniche

Gli APT rappresentano un ottimo modello *in vivo* per studiare l'infiammazione allergica nella DA<sup>3-6</sup>. In un recente studio multicentrico europeo, condotto su 314 pazienti atopici con reazioni positive ad allergeni sia inalatori che alimentari, l'APT è risultato un test diagnostico utile per identificare quei soggetti che sviluppano eczema per esposizione a tali allergeni, mostrando rispetto al PT un'elevata specificità sulla base dell'anamnesi<sup>3</sup>. Inoltre l'APT è in grado d'identificare quei soggetti con DA definita intrinseca sulla base della negatività delle IgEs *in vivo* e *in vitro* e che tuttavia riferiscono esacerbazione del quadro clinico per esposizione ad allergeni inalatori e/o alimentari. In seguito

sia la Task Force europea sulla DA (ETFAD; European Task Force on Atopic Dermatitis)<sup>5</sup> e EAACI (European Academy of Allergology and Clinical Immunology)<sup>4</sup> hanno preso posizione circa l'utilità dell'APT nella diagnostica allergologica del paziente con DA. In particolare, l'APT rappresenta un valido strumento per identificare quei pazienti con DA che mostrano risposte di tipo eczematoso all'esposizione agli allergeni. Diversi Autori hanno dimostrato che esiste una correlazione tra il tipo di reattività cutanea al PT e al patch test e l'intervallo intercorrente fra il test di esposizione con latte vaccino e altri alimenti (uovo, soia, grano, arachidi) e la comparsa dei sintomi<sup>7</sup>. La positività dei PT correla con la comparsa di reazioni immediate, mentre l'APT presenta elevata specificità e sensibilità per le risposte a comparsa tardiva. Tuttavia la positività degli APT, analogamente a quella dei PT, deve sempre essere confermata dai test di esposizione per la diagnosi certa di allergia alimentare.

Risposte positive agli APT si osservano anche in individui sani, ma con intensità e frequenza significativamente inferiori ai pazienti con DA. Occorre, peraltro, considerare che le risposte immuni della cute sono modulate da molteplici fattori, quali la soglia di sensibilizzazione, la penetrazione percutanea e l'efficacia dei meccanismi effettori specifici e aspecifici, che scatenano e intensificano la risposta infiammatoria. Pertanto, indipendentemente dalla soglia di sensibilizzazione, nei soggetti con "cute atopica", iperreattiva e con barriera deficitaria, una risposta cutanea si verifica con maggiore frequenza e intensità.

Ulteriore campo di applicazione degli APT è la diagnostica delle reazioni ad allergeni alimentari con sintomi gastro-intestinali (dolore addominale, stipsi cronica, esofagite eosinofila, vomito, diarrea, gastrite, reflusso gastro-esofageo, etc). Diversi lavori pubblicati dimostrano in tale ambito il ruolo delle reazioni di tipo ritardato, nella cui identificazione gli APT presentano elevata sensibilità e specificità. Anche in pazienti con sintomi respiratori da acari quali asma e rinite gli APT si sono rilevati d'interesse diagnostico.

### Modalità di esecuzione

La procedura del test è ormai standardizza-

ta per quanto riguarda gli allergeni inalatori, mentre nel caso degli alimenti non esiste ancora consenso circa la preparazione del materiale antigenico. Gli alimenti da applicare possono essere usati come tali o diluiti in fisiologica in rapporto di 1 g/10 ml o veicolati in vaselina. Il materiale alimentare viene quotidianamente preparato dal personale addetto alla certificazione utilizzando alimenti freschi o in polvere, con conseguente ridotta standardizzazione della metodica e ampia variabilità dei risultati a seconda delle diverse casistiche. Solo recentemente sono stati introdotti nel mercato alcuni preparati alimentari commerciali per patch test, che si propongono di semplificare l'esecuzione dei test e di garantire un'adeguata standardizzazione della metodica. Gli svantaggi di questi ultimi sono sicuramente il costo più elevato e una loro presunta minore accuratezza diagnostica.

Con gli allergeni alimentari sia freschi che del commercio, tuttavia la riproducibilità dell'APT non è ancora soddisfacente per quanto emerge dai pochi lavori pubblicati sull'argomento, mentre relativamente agli aeroallergeni la riproducibilità è sostanzialmente analoga a quella dei test epicutanei standard<sup>8</sup>.

L'APT consiste nell'applicazione di circa 20 mg di materiale antigenico sulla cute sana del dorso, per mezzo di un adeguato apparato di supporto (Finn Chamber larghe su cerotti Scanpor), capace di garantire una perfetta adesione. L'apparato testante viene rimosso dopo 48-72 ore; la positività del test si basa sulla comparsa di una reazione cutanea di tipo eczematoso in corrispondenza dell'area testata. La lettura viene eseguita secondo le linee guida ETFAD (tabella I).

Gli APT possono essere applicati in età pediatrica senza limiti di età. In un recente lavoro su neonati prematuri con sintomi digestivi da latte vaccino l'applicazione degli APT già nei primi giorni di vita ha identificato la causa alimentare del quadro clinico in assenza di IgE specifiche per il latte<sup>9</sup>.

Costituiscono una controindicazione all'applicazione degli APT, analogamente a quanto succede per i patch test eseguiti con serie standard di allergeni da contatto, la gravidanza,

Tabella I - *Linee guida ETFAD per la lettura degli Atopy Patch Test.*

Score	Espressioni cliniche
?	Eritema
+	Eritema, edema
++	Eritema, edema, poche papule
+++	Eritema, edema, molte papule
++++	Eritema, vescicole

l'abbronzatura e la DA diffusa e/o in fase acuta.

L'assunzione di farmaci immunosoppressori e antistaminici deve essere sospesa con congruo anticipo prima dell'applicazione degli APT. L'applicazione di tacrolimus unguento nella sede del patch test non influenza la risposta al test, diversamente da quanto succede per i corticosteroidi topici.

Dall'analisi dei dati della letteratura per quanto riguarda i rischi di tale metodica, emerge che il rischio di sensibilizzazione attiva è trascurabile, così come quello di reazione sistemica severa. La maggior parte degli autori riporta, come possibili eventi avversi associati all'APT, peggioramento dell'eczema, orticaria, prurito e irritazione da cerotto.

## Bibliografia

- Mitchell EB, Crow J, Chapman MD, et al. Basophils in allergen induced patch test sites in atopic dermatitis. *Lancet* 1982; 1: 127.
- Ring J, Kunz B, Bieber T, et al. The "atopy patch test" with aeroallergens in atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 82: 195.
- Darsow U, Laifaoui J, Kerschenlohr K et al. The prevalence of positive reactions in the APT with aeroallergens and food allergens in subjects with atopic eczema: European multicenter study. *Allergy* 2004; 59:1318.
- Turjanmaa K, Darsow U, Niggemann B, et al. EAACI/GA'LEN position paper: present status of the APT. *Allergy* 2006; 61: 1377.
- Darsow U, Wollenberg A, Simon D, et al. ETFAD/EADV eczema task force 2009 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010; 24: 317.
- Nosbaum A, Hennino A, Berard F, et al. Patch testing in atopic dermatitis patients. *Eur J Dermatol* 2010; 20: 563.
- Isolauri E, Turjanmaa K. Combined skin prick and patch testing enhances identification of food allergy in infants with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 9.
- Jesenak M, Banovcin P, Rennerova Z, et al. Reproducibility of food atopy patch tests over time in the general child population. *Int J Dermatol.* 2009; 48: 941.
- Dupont C, Soulaïnes P, Lapillonne A, et al. Atopy patch test for early diagnosis of cow's milk allergy in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010; 50: 463.

## Congressi

### 6 ottobre 2012

*Il dermatologo, l'allergologo ed il pediatra:  
3 esperienze a confronto*  
Bari, Villa Romanazzi  
*Presidente:* Caterina Foti  
*Segreteria organizzativa:* Quality Congress srl  
Via Garibaldi 62, 00153 Roma  
tel/fax: 0666514670; fax: 0623326977  
www.qualitycongress.it

### 21-24 novembre 2012

*87° Congresso Nazionale della Società Italiana di  
Dermatologia medica, chirurgica, estetica e delle  
Malattie Sessualmente Trasmesse (SIDeMaST)*  
Roma, Palazzo dei Congressi  
*Presidenti:* Ketty Peris, Pasquale Frascione  
*Segreteria organizzativa:* Triumph Congressi  
Via Lucilio 60, 00136 Roma  
tel: 06355301; fax: 0635530250  
e-mail: dermatologia2012@triumphgroup.it  
www.triumphgroup.it

### 27-30 novembre 2012

*15° Corso pratico finalizzato allo sviluppo continuo  
professionale di allergologia clinica per medici e  
infermieri (DAM 2012)*  
Milano, AO Ospedale Niguarda Cà Granda  
*Presidente:* Elide Pastorello  
*Segreteria organizzativa:* iDea congress,  
Via della Farnesina 224, 00135 Roma  
tel: 0636381573; fax 0636307682  
www.ideacpa.com

### 6-7 dicembre 2012

*Corso di Dermatologia – Cute e clima*  
Napoli, Centro Congressi Federico II  
*Presidenti:* Nicola Balato, Cataldo Patruno  
*Segreteria organizzativa:* SGC Congressi,  
Via Salvo d'Acquisto 73, 81031 Aversa (CE)  
tel: 0818154619; fax: 0815044177  
e-mail: info@sgccongressi.it  
www.cuteeclima.it

### 24-26 gennaio 2013

*XIX Giornate di Dermatologia Clinica*  
Roma, Aurelia Convention Center  
*Presidente:* Stefano Calvieri  
*Segreteria organizzativa:* XS events S.r.l.  
Via dell'Astronomia 18, 00144 Roma  
tel: 0645555591; fax: 0645555156  
e-mail: congressi@xsevents.it  
www.dermatologiaclinica.it

### 1-5 marzo 2013

*71° Annual Meeting of  
American Academy of Dermatology  
Miami Beach Convention Center (USA)*  
*Presidente:* Daniel M Siegel  
tel: +1 847 240-1280; fax: +1 847 240-1859  
e-mail: registration@aad.org  
www.aad.org/meetings-and-events/2013-annual-  
meeting

## Norme per gli autori

La rivista quadrimestrale Annali italiani di Dermatologia allergologica, clinica e sperimentale pubblica, in lingua italiana o inglese, **Editoriali, Rassegne, Articoli originali, Casi clinici e comunicazioni in breve, Proposte terapeutiche, Rubriche, Lettere alla direzione**, su argomenti di dermatologia allergologica, sia clinica che sperimentale, specie se correlati con l'attività lavorativa e/o con l'ambiente.

I lavori devono essere inviati ai Direttori della rivista:

**Prof. Paolo Lisi, Prof. Luca Stingeni**  
**Annali italiani di Dermatologia allergologica, clinica e sperimentale**  
**Sezione di Dermatologia clinica, allergologica e venereologica,**  
Polo ospedaliero-universitario Santa Maria della Misericordia,  
Sant'Andrea delle Fratte, 06156 Perugia  
(tel.: 075.5783881; fax: 075.5783452)

o tramite posta o via e-mail ([dermalam@unipg.it](mailto:dermalam@unipg.it)).

Nel caso di invio on line, si prega di salvare il testo in rich text format (rtf) (usare la funzione salva con nome e selezionare il file rich text format).

La pubblicazione degli articoli è subordinata al giudizio del Comitato editoriale che ha facoltà di chiedere agli Autori eventuali modifiche. Non saranno comunque presi in considerazione gli articoli non uniformi alle norme editoriali e quelli non accompagnati dalla dichiarazione degli Autori in cui si precisa che il lavoro è inedito, che non è stato inviato ad altra rivista e che, se accettato, la sua proprietà sarà ceduta alla Casa editrice. Tale dichiarazione dovrà essere firmata da tutti gli Autori del lavoro e trasmessa tramite fax alla Direzione della rivista. I lavori vengono pubblicati gratuitamente; sono previsti n. 20 estratti gratuiti per articolo.

**Rassegne, Articoli originali, Proposte terapeutiche e Rubriche** devono essere contenuti entro 20 cartelle. Gli **articoli originali** e le **proposte terapeutiche** devono comprendere: 1) riassunto in italiano e in inglese; 2) introduzione; 3) materiali e metodi; 4) risultati; 5) discussione; 6) conclusioni. I riferimenti bibliografici non devono superare le 40 citazioni, salvo nelle rassegne per le quali sono ammesse fino a 100 voci.

**Casi clinici e comunicazioni in breve** non devono superare le 4 cartelle dattiloscritte, riassunti e bibliografia (10 voci) inclusi; figure o tabelle sono ammesse nel numero massimo di 3.

Gli **Editoriali** debbono essere contenuti in non più di 5 cartelle dattiloscritte; per la bibliografia, non più di 15 voci.

Le **Rubriche**, gestite da alcuni esperti, prevedono articoli di aggiornamento su argomenti emergenti o a carattere eminentemente pratico; sono previsti il solo riassunto in inglese e l'inserimento di voci bibliografiche fino a 15. Le **Lettere alla direzione** (2 cartelle dattiloscritte) dovrebbero contenere preferibilmente interventi su argomenti trattati nella Rivista; è consentita la citazione di 5 voci bibliografiche.

### Manoscritti

I manoscritti dovranno essere redatti con interlinea doppia e con margini di almeno 2,5 cm, su foglio di formato ISOA4.

Se inviati tramite posta, oltre alla copia cartacea, dovrà essere allegata quella su compact disc o floppy disk da 3.5"; dove possibile, sono preferibili floppy disk high density o double sided. I file possono essere redatti in Word, Winword, Wordstar, Word Perfect ed Open Office. Il dischetto deve essere etichettato con: nome degli Autori, titolo dell'articolo, word-processor utilizzato (e relativa versione).

Nella prima pagina debbono essere indicati: il titolo (in italiano e in inglese), il nome (per esteso) e il cognome degli Autori, la struttura e l'ente di appartenenza, il titolo corrente (massimo 40 caratteri), l'indicazione di eventuali congressi ai quali il lavoro sia stato presentato, l'indirizzo dell'Autore (anche elettronico) al quale inviare comunicazioni, bozze ed estratti.

Nella seconda pagina indicare il solo titolo, in modo tale che la rimozione della prima pagina consenta la revisione del manoscritto in anonimo.

Le abbreviazioni, i simboli e le unità di misura sono quelli adottati per convenzione internazionale (Sistema Internazionale).

Le sigle utilizzate debbono essere precedute dalla denominazione per intero la prima volta che appaiono nel testo.

Eventuali finanziamenti, contratti di ricerca e ringraziamenti saranno posti alla fine dell'articolo, prima della bibliografia.

### Riassunti

In essi è necessario sintetizzare accuratamente gli **scopi del lavoro**, i **materiali e metodi**, i **risultati** e le **conclusioni**. Il riassunto in italiano non

dovrà superare le 150 parole, mentre quello in inglese dovrà essere molto più ampio (non meno di 400 parole); per i **Casi clinici e comunicazioni in breve**, tuttavia, non possono essere utilizzate più di 100 parole. Per gli editoriali e le lettere non è previsto il riassunto.

Al termine dei riassunti devono essere riportate le parole chiave: al massimo 5.

### Tabelle e figure

Tabelle e figure, in duplice copia, devono essere realizzate tenendo conto del formato della Rivista. Le tabelle, dattiloscritte su pagine separate, debbono essere numerate progressivamente con i numeri romani ed essere correlate da un titolo esaurientemente esplicativo in corsivo. È necessario citarle nel testo senza abbreviazioni e con numeri romani (es.: tabella I). Tutte le illustrazioni (grafici, disegni, schemi e fotografie) sono considerate figure e devono essere contraddistinte progressivamente con numeri arabi (es.: figura 1). Le dimensioni consigliate sono: cm 8 (base) x 5 o 10 (altezza); dimensioni diverse vanno calcolate in proporzione. Sul retro di ciascuna figura devono essere indicati, oltre il numero progressivo, il cognome del primo Autore, il titolo dell'articolo, il lato alto. Ogni figura deve essere corredata da una didascalia. Le figure vanno separate dal testo e le didascalie riportate su un foglio a parte. Nelle didascalie delle foto istologiche, indicare metodo di colorazione e ingrandimenti.

### Disegni e fotografie

Disegni e fotografie devono essere inviati tramite compact disc in formato JPEG. Eventuali didascalie interne devono avere dimensioni compatibili con l'eventuale riduzione proporzionale dell'intera figura. In mancanza di tali requisiti, i disegni saranno rielaborati e le spese relative saranno addebitate agli Autori. Le figure a colori saranno accettate solo se utili in modo significativo. Il costo delle figure a colori verrà preventivamente comunicato agli Autori. Le fotografie che consentono l'identificazione di pazienti devono essere evitate: in taluni casi potrà essere utilizzata una mascherina nera che copra gli occhi del soggetto.

### Bibliografia

Le voci bibliografiche devono essere citate nel testo con numerazione araba, ad apice, senza parentesi. Le stesse devono essere elencate nella sezione Bibliografia nell'ordine con cui sono state riportate nel testo, con numerazione araba, seguita da un punto. In caso di citazioni bibliografiche multiple nello stesso punto del testo, queste devono comparire in ordine crescente di anno e, in caso di più citazioni dello stesso anno, in ordine alfabetico. La bibliografia deve essere redatta secondo le regole dell'Index Medicus, a cui occorre atterrarsi anche per le abbreviazioni del titolo delle Riviste (cfr. List of Journals Indexed in Index Medicus, aggiornata ogni anno).

È consentito richiamare osservazioni inedite e comunicazioni personali. Gli articoli accettati per la pubblicazione, ma non ancora editi, possono essere citati aggiungendo la dizione "in stampa".

Seguono alcuni esempi delle diverse modalità di citare le voci bibliografiche. Si notino le caratteristiche: a) iniziale del nome senza il punto; b) abbreviazione del titolo della rivista senza il punto; c) assenza del carattere corsivo; d) iniziale maiuscola solo per la prima parola del titolo dell'articolo; e) il numero della sola pagina iniziale. Gli Autori vanno citati tutti fino al terzo; se più, si aggiungerà et al.

Esempi:

Thyssen JP, Johansen JD, Menné T. Contact allergy epidemics and their controls. *Contact Dermatitis* 2007; 56: 185.

Bonamonte D, Foti C, Mundo L, et al. La rilevanza clinica nella dermatite allergica da contatto: proposta di scoring. *Ann Ital Dermatol Allergol* 2006; 60: 41.

Ayala F, Lisi P, Monfrecola G. Malattie cutanee e veneree. Padova: Piccin Nuova Libreria, 2007; 313.

Lisi P, Stingeni L. I corticosteroidi. In: Pigatto P, Zerboni R (ed). *Dermatiti da contatto da cosmetici e farmaci topici*. Pavia: Selecta Medica, 2004; 81.

### Comunicazione

Si raccomanda agli Autori la **precisa osservanza delle norme** nella preparazione dei manoscritti, al fine di alleggerire il lavoro redazionale e di ottenere e mantenere la qualità e la puntualità di pubblicazione, necessarie per l'inserimento della Rivista nei giornali di recensione internazionale.



# Specialità Same in Dermatologia



Laboratori Farmaceutici  
Savoma Medicinali S.p.A. - Parma

**clindamicina same** 1% gel

ATC D10AF01  
**clindamicina**  
tubo 30 g

**metronidazolo same** 1% gel

ATC D06BX01  
**metronidazolo**  
tubo 30 g

**tretinoina same** 0,05% crema

ATC D10AD01  
**tretinoina**  
tubo 20 g