



Ministero della Salute

Dipartimento della sanità pubblica veterinaria, della sicurezza alimentare
e degli organi collegiali per la tutela della salute
Direzione generale per l'igiene e la sicurezza degli alimenti e la nutrizione
Ufficio V

ALLERGIE ALIMENTARI E SICUREZZA DEL CONSUMATORE

Documento di indirizzo e stato dell'arte





Ministero della Salute

Dipartimento della sanità pubblica veterinaria, della sicurezza alimentare
e degli organi collegiali per la tutela della salute

Direzione generale per l'igiene e la sicurezza degli alimenti e la nutrizione
Ufficio V

ALLERGIE ALIMENTARI E SICUREZZA DEL CONSUMATORE

Documento di indirizzo e stato dell'arte





Nota redazionale

Il documento “Allergie alimentari e sicurezza del consumatore - documento di indirizzo e stato dell’arte” è stato elaborato con la collaborazione di un gruppo di esperti.

Trasmesso per l’acquisizione del parere di competenza al Comitato Nazionale per la Sicurezza Alimentare (CNSA), il documento ha avuto parere favorevole, in quanto ben definisce eziologia, sintomatologia, trattamento e prevenzione delle manifestazioni allergiche legate agli alimenti. Il CNSA ha suggerito di integrare il documento in relazione agli aspetti diagnostici, con una relazione dei Proff. G. Rondini, S. Caimmi, A.M. Castellazzi.

La presente redazione è costituita pertanto dal documento originale, all’interno del quale è stato inserito il contributo sugli aspetti diagnostici acquisito dal CNSA.

INDICE

<i>Introduzione</i>	7
A - Allergie alimentari: aspetti clinici ed epidemiologici	9
<i>A.1 Definizione e terminologia</i>	9
<i>A.2 Quadri clinici</i>	9
<i>A.3 Dati epidemiologici</i>	11
<i>A.4 Allergeni alimentari rilevanti negli adulti e nei bambini</i>	13
<i>A.5 Diagnostica delle allergie alimentari</i>	17
<i>A.6 Terapia e costi</i>	24
<i>A.7 Prevenzione delle allergie alimentari: allergeni occulti e norme di etichettatura</i>	26
B – Informazione e formazione: criticità	33
C – Metodi	36
<i>C.1 Metodi immunochimici e criticità</i>	36
<i>C.2 Metodi di biologia molecolare e criticità</i>	40
<i>C.3 Metodi cromatografici, spettrometria di massa e criticità</i>	47
<i>C.4 Criteri di validazione ed accettabilità delle metodiche analitiche</i>	49
<i>Bibliografia</i>	55





INTRODUZIONE

L'allergia alimentare (AA), reazione immunologica avversa al cibo, è una malattia con elevato impatto sulla qualità di vita dei soggetti che ne sono affetti e dei loro familiari, con costi sanitari rilevanti per l'individuo e per il Sistema Sanitario Nazionale.

La costante vigilanza richiesta per evitare l'alimento in causa, in particolare l'alimento nascosto o non segnalato ed il vivere con incertezza, ansietà, sono problematiche che turbano particolarmente i bambini, gli adolescenti e relative famiglie. Di fronte a questo problema spesso le famiglie si trovano isolate ed impotenti. È pertanto fortemente sentita l'esigenza di un documento di indirizzo nazionale per il management di questa malattia.

Nell'ottica di tutelare la sicurezza nutrizionale del consumatore allergico, si è inteso focalizzare l'attenzione sulle varie problematiche connesse all'AA con il documento *"Allergie alimentari e sicurezza del consumatore - documento di indirizzo e stato dell'arte"*. Questo si rivolge a tutti i settori coinvolti: addetti all'assistenza sanitaria, medici, ditte produttrici di alimenti e di pasti, ristoratori, associazioni di consumatori.

A tal fine, vengono definite le varie modalità di manifestazione, ovvero i quadri clinici delle reazioni avverse agli alimenti; vengono, inoltre, delineate le sostanze che possono scatenare dette reazioni (allergeni) e l'insicurezza attribuita ai prodotti derivanti dall'industria alimentare causa un aumento nell'opinione pubblica della quota di quanti attribuiscono all'allergia alimentare patologie per cui le evidenze sono scarse o nulle come colon irritabile, orticaria cronica, obesità. Ciò crea un'ulteriore difficoltà al paziente con allergia alimentare documentata per una distorta valutazione del rischio.

Ci sono stati, negli ultimi anni, grandi cambiamenti nella legislazione dell'etichettatura dei cibi e le informazioni per i consumatori con allergia alimentare crescono di conseguenza.

Non è stata però ancora raggiunta una semplificazione della possibilità di praticare una dieta di esclusione e con l'etichettatura *"precauzionale"* il carico della valutazione del rischio è stato ribaltato sul consumatore, creando insicurezza e frustrazione. D'altra parte va segnalato che, senza limiti di legge, le aziende si trovano in oggettiva difficoltà.

L'obiettivo da raggiungere, mediante l'azione congiunta delle associazioni di consumatori con allergia alimentare e delle società scientifiche specialistiche, è quello di ottenere dall'industria, etichette sempre più consone alle reali esigenze del consumatore, la cui lettura permetta di verificare con certezza la non allergenicità di un prodotto.

I consumatori allergici al cibo necessitano sempre più del consiglio dello specialista che insieme a loro deve essere in grado di leggere ed interpretare le informazioni presenti in etichetta.

Viene riportata una panoramica dell'epidemiologia, nazionale e internazionale, della malattia. Elementi cardine per affrontare tale patologia sono: la diagnosi posta correttamente, da specialisti in allergologia ed immunologia clinica, in base a metodiche validate, la costante vigilanza per evitare gli allergeni alimentari, la chiarezza dell'etichetta dei prodotti alimentari.

Attualmente la valutazione del rischio non è sistematica, ossia non viene attuata in modo adeguato e uniforme in tutto il territorio nazionale e, non di rado, la malattia è sottovalutata o non diagnosticata correttamente.

Vi sono eccezioni costituite da centri di allergologia ed immunologia clinica collegati in rete regionale. È auspicabile che questa realtà positiva possa ampliarsi e coinvolgere tutte le Regioni, il che consentirebbe di avere dati epidemiologici nazionali e, quindi, di affrontare meglio la malattia, di incrementare la sicurezza e migliorare l'assistenza del soggetto allergico riducendo i costi sanitari.

Altri aspetti rilevanti sono l'informazione e formazione degli addetti alla produzione/distribuzione di prodotti alimentari e pasti, la possibilità di individuare gli allergeni in etichetta al fine di consentire al soggetto allergico di consumare senza rischi prodotti alimentari, piatti pronti e pasti fuori casa.





Aspetti peculiari dell'AA sono rappresentati, tra l'altro, dalla necessità per il soggetto allergico di escludere in modo adeguato l'allergene (fatto non sempre semplice considerato che non è nota la dose soglia e che la gravità della reazione avversa all'ingestione può essere imprevedibile) e dalla scarsa reperibilità sul mercato di prodotti specifici dedicati (es. del latte idrolizzato per la prima infanzia).

Il documento affronta il tema delle metodiche analitiche che il settore della produzione alimentare ha a disposizione, segnalando le criticità ad esso connesse, al fine di fornire un indirizzo uniforme a livello nazionale e utile agli operatori alimentari.

La certezza da parte del consumatore di poter escludere l'allergene nei prodotti alimentari, piatti pronti e pasti fuori casa, comporterebbe vantaggi ai soggetti allergici, alle ditte produttrici, ai ristoratori e determinerebbe anche una riduzione dei costi dell'assistenza sanitaria, ad esempio, contenendo gli interventi d'urgenza ed i ricoveri. Attualmente, per l'assenza di un sistema di rilevazione dei dati a livello nazionale, non è ben definibile una stima dei costi che l'AA comporta per il SSN, ma, dai dati parziali a disposizione, si intuisce che sono di notevole entità.

Il documento "Allergie alimentari e sicurezza del consumatore - documento di indirizzo e stato dell'arte" è stato elaborato dall'ufficio V della Direzione Generale Igiene Sicurezza Alimenti e Nutrizione con la collaborazione di un gruppo di esperti nei vari ambiti (clinico, chimico, biotecnologico ecc.) della complessa tematica*.

**Per la composizione del gruppo di lavoro si rinvia all'ultima pagina.*

A

Allergie alimentari: aspetti clinici ed epidemiologici

A. 1 Definizione e terminologia

L'AA è una reazione immunologica avversa al cibo. È una vera e propria malattia con precise caratteristiche che riguarda singoli individui geneticamente predisposti. Pur non essendo trasmessa secondo le leggi mendeliane, l'AA presenta componenti genetiche che ne determinano la predisposizione.

Diversamente dalle sostanze tossiche o dagli agenti infettivi, che costituiscono un pericolo per la popolazione, nel caso dell'AA sono taluni costituenti alimentari, innocui per i più, in grado di determinare reazioni immediate o ritardate che possono raggiungere gradi elevati di gravità fino ad essere fatali.

Per chi è affetto da AA, in particolare nell'infanzia ed in alcune forme cliniche, la continua esposizione ad allergeni alimentari può aggravare il quadro clinico.

Non essendo ancora stata attuata una valutazione sistematica del rischio, l'inquadramento e le indicazioni terapeutiche nei singoli pazienti, spesso, sono non univoche e lasciate all'esperienza del sanitario.

Il paziente non sempre viene indirizzato correttamente al medico specialista in Allergologia ed Immunologia Clinica (referente per questa patologia) e ciò determina una carenza di dati epidemiologici e clinici, oltre a ripercuotersi negativamente sui tempi della diagnosi e sui costi sanitari diretti ed indiretti.

A differenza di altre patologie importanti (come ad es.: l'asma bronchiale allergico), l'AA anche in forma grave, non è individuata nell'elenco per le quali sono definiti livelli essenziali di assistenza (LEA).

L'AA è una malattia che si correla con la produzione di anticorpi, immunoglobuline E (IgE), o con risposte cellulo-mediate, nei confronti di proteine alimentari, da parte di soggetti geneticamente predisposti.

A. 2 Quadri clinici

La sintomatologia clinica può essere diversificata in base al coinvolgimento di anticorpi o altri mediatori cellulari.

Quadri clinici IgE mediati includono principalmente: shock anafilattico, orticaria-angioedema, manifestazioni allergiche (orticaria e anafilassi) associate all'esercizio fisico dopo consumo di un alimento (Food-associated exercise-induced anaphylaxis), disturbi respiratori (asma e rinite), sindrome orale allergica, disturbi gastroenterici. La caratteristica fondamentale è l'immediatezza della loro insorgenza: i sintomi insorgono a breve distanza dall'assunzione del cibo (1 - 2 ore) e sono tanto più gravi quanto più precocemente insorgono;

shock anafilattico

reazione sistemica a rapida insorgenza coinvolgente diversi organi ed apparati che può includere la perdita di conoscenza; è correlata con la liberazione immediata di mediatori vasoattivi, come l'istamina e può insorgere a qualsiasi età. Tutti gli alimenti possono indurre anafilassi, ma più frequentemente sono in causa alimenti come la frutta secca (arachidi, nocciole), i crostacei (gamberi), il pesce, il latte, le uova.

La diagnostica molecolare (Food Component Resolved Diagnosis) ha consentito di evidenziare che a causare tale reazione sono molecole allergeniche particolarmente potenti, non alterate dalla digestione peptica, né dal calore, né dalla lavorazione industriale. I quadri clinici gravi più spesso si correlano con la sensibilizzazione nei confronti delle Lipid Transfer Protein (LTP) e di altre molecole con tali caratteristiche;





orticaria – angioedema

manifestazioni cliniche, caratterizzate dalla comparsa di manifestazioni cutanee eritemato-pomfoidi di varia grandezza migranti e fugaci con prurito (orticaria), associate o meno all'edema delle mucose esterne (angioedema delle labbra, palpebre, genitali) o interne (glottide), possono verificarsi a qualsiasi età, sembrano più frequenti nell'età pediatrica; qualsiasi alimento può scatenare tali sintomi;

manifestazioni allergiche (orticaria e anafilassi) associate ad esercizio fisico dopo consumo di un alimento

si tratta di un'entità clinica, la cui insorgenza, spesso drammatica, consegue a due condizioni: l'assunzione di cibo verso il quale si è allergici, associata ad esercizio fisico di una determinata entità ed effettuato a breve distanza dall'assunzione del cibo stesso. La sintomatologia insorge in genere con sintomi prodromici, quali prurito agli arti, stanchezza e calo della prestazione, per manifestarsi poi con quadri anche drammatici. Si manifesta più spesso in soggetti giovani adulti, in condizioni di clima caldo-umido e può essere favorita anche dall'assunzione di farmaci della categoria dei FANS (antiinfiammatori non steroidei).

Pertanto, si consiglia di effettuare l'esercizio fisico dopo almeno 4-6 ore da qualsiasi pasto, evitando comunque gli alimenti verso i quali si è allergici.

Inoltre, si consiglia di effettuare sempre una forma di "riscaldamento" prima di iniziare l'attività fisica, di interromperla alla minima comparsa di sintomi e di iniziare subito il trattamento farmacologico;

disturbi respiratori

Le forme respiratorie, benché rare, sono più frequenti nell'età pediatrica e possono manifestarsi nei confronti dell'aerodispersione nell'ambiente di allergeni alimentari come le proteine del latte e dell'uovo.

La rinite e l'attacco asmatico possono preannunciare un quadro clinico sistemico, anche anafilattico; spesso si tratta di forme occupazionali, fra queste senz'altro la più frequente è l'asma del panificatore che si correla con allergia IgE mediata verso componenti del grano ed in particolare verso l'omega-5-gliadina. Può riscontrarsi sintomatologia respiratoria anche nei lavoratori dell'industria alimentare (latte, uovo, pesce); spesso la manifestazione respiratoria conseguente all'esposizione ad allergeni alimentari si riscontra in soggetti che hanno una condizione infiammatoria respiratoria allergica di base non sufficientemente controllata;

sindrome orale allergica (SOA) o Pollen – Food related

si caratterizza per l'insorgenza di prurito con edema limitato esclusivamente al cavo orale.

Si correla con la cross reattività fra pollini ed alimenti del mondo vegetale e quindi si rileva nei casi di sensibilizzazione a proteine condivise come le profiline e le PR-10; si tratta di molecole inattivate dalla digestione peptica, dalla temperatura e quindi dalla lavorazione industriale; la sintomatologia segue spesso l'andamento stagionale della pollinosi (ad es. allergia ai pollini di betulla ed in particolare *Bet v 1* e allergia alla mela con IgE verso la componente molecolare *Mal d 1*). Raramente evolve verso manifestazioni cliniche che superino il cavo orale (7% circa) o verso l'anafilassi (1-2%). Gli alimenti più frequentemente in causa sono mela, pera, pesca, carota, melone;

disturbi gastroenterici

l'allergia alimentare IgE mediata può determinare quadri intestinali sia con manifestazioni drammatiche (coliche addominali violente, diarrea, vomito) che rappresentano lo shock anafilattico addominale, sia con manifestazioni croniche correlate con la pluripositività verso allergeni alimentari che determinano un quadro infiammatorio eosinofilo (enterite eosinofila) nel quale può essere presente anche un meccanismo cellulo-mediato.



Quadri clinici misti IgE e cellulo-mediati: dermatite atopica, gastroenteropatie eosinofile.

dermatite atopica

è una sindrome caratterizzata da sintomi che possono coinvolgere variamente diverse fasce d'età e diversi apparati; nello stesso soggetto possono aversi negli anni sintomi a carico della cute (manifestazioni eczematose) con distribuzione diversa, dell'apparato respiratorio (l'asma bronchiale è frequente nell'adulto affetto da dermatite atopica, con manifestazioni cutanee prevalenti nell'età pediatrica), del tratto gastrointestinale.

Nell'età pediatrica l'associazione con la sensibilizzazione IgE mediata ad alimenti è nell'ordine di circa il 35%, e sono descritte anche cellule T alimento-specifiche; più frequentemente sono coinvolti uovo e latte; ma è fondamentale che venga correttamente accertato che ci sia un nesso di causalità con alimenti, che è molto meno frequente di quanto abitualmente si creda, per evitare diete inutili e, a volte, dannose;

gastroenteropatie eosinofile

la sintomatologia varia a seconda della sede del processo infiammatorio eosinofilo: può aversi a livello esofageo (disfagia e dolore) come a livello intestinale (diarrea, dolore addominale) ed anche generalizzata (ascite, perdita di peso, edema ed ostruzione intestinale).

Tutti gli alimenti possono essere in grado di determinare tale condizione in qualsiasi fascia d'età e spesso la condizione è persistente.

Quadri clinici cellulo mediati: enterocolite allergica da proteine alimentari, proctite da proteine alimentari.

enterocolite allergica da proteine alimentari (anche denominata food protein induced enterocolitis syndrome - FPIES) interessa sostanzialmente l'età pediatrica e di solito va incontro a risoluzione. L'esposizione continuativa alle proteine alimentari in causa comporta emesi, diarrea, letargia, scarsa crescita.

Gli alimenti più spesso coinvolti sono latte, soia, riso. La FPIES a volte si manifesta con vomito incoercibile e/o diarrea profusa con possibile progressione, in circa il 20% dei casi, verso la disidratazione e lo shock ipovolemico. I sintomi insorgono tipicamente dopo 2-3 ore dall'assunzione dell'alimento sospetto e regrediscono completamente dopo la sospensione dello stesso.

proctite da proteine alimentari

è tipica dell'infanzia, è correlata con infiammazione eosinofila localizzata ed è caratterizzata dalla comparsa di sanguinamento e mucillagini con le feci; si correla con latte vaccino.

A. 3 Dati epidemiologici

Studi recenti condotti soprattutto negli Stati Uniti rilevano che i disturbi indotti da AA interessano fino al 5% dei bambini di età inferiore a 3 anni e circa il 4% della popolazione adulta (Boyce et al. 2010). Una recente pubblicazione (Sicherer 2011) riferisce che la prevalenza complessiva dell'AA è del 3 – 6%, fino al 10% in alcune zone; varia con l'età, la zona geografica e talora con l'etnia.

La situazione in Europa

Tra il 20 ed il 25% della popolazione nei paesi industrializzati presenta condizioni allergiche del tratto respiratorio, e le stime di prevalenza (*life-time*) di queste sindromi nei Paesi europei in cui sono disponibili (Regno Unito, Germania, Svizzera, Finlandia) variano nell'ambito di un intervallo del 22-35% (Asher et al. 2006).



In Europa la prevalenza sembra più elevata nel gruppo 18-34 anni e nel gruppo 35-49, con incidenza declinante dopo i 50 anni di età (Beasley et al. 2000).

In tutta l'Europa occidentale si osserva un incremento delle malattie allergiche nell'infanzia (Downs et al. 2001) e le allergie alimentari sono particolarmente rappresentate nell'età pediatrica.

L'1-2% degli adulti ed il 5-8% dei bambini sono interessati da allergie alimentari IgE mediate; tali dati si ritengono sottostimati in particolare per la mancanza di informazioni di buona qualità e per i differenti approcci diagnostici in vivo ed in vitro utilizzati nei vari studi.

Un'indagine telefonica, eseguita sulla popolazione adulta europea, per riconoscere la mera convinzione soggettiva di essere portatori di allergia alimentare, ha consentito di ottenere anche dei dati italiani che hanno riportato un'incidenza del 3,6% di allergia alimentare "self reported" nel nostro Paese (Steinke et al. 2006). Gli alimenti che venivano riferiti come più frequentemente responsabili dell'allergia alimentare erano in ordine di frequenza: la frutta (27,6%), i vegetali (20,7%), il latte vaccino (20%), i legumi (15,9%), il grano (14,5%), la frutta secca (9,7%), la carne (9%), i frutti di mare (9%), l'uovo (9%) e il pesce (7,6%).

In Europa sono stati condotti altri studi dai quali è possibile estrapolare alcune informazioni sulla possibile frequenza dell'anafilassi in età pediatrica, uno francese (Moneret-Vautrin et al. 2002) e uno svizzero (Helbling et al. 2004): da essi è possibile giungere alla conclusione che la prevalenza di anafilassi in età pediatrica potrebbe essere compresa circa tra l'1 ed il 3% dei casi di allergia alimentare.

La situazione in Italia

Esiste una vasta letteratura sull'argomento che non permette, tuttavia, allo stato attuale di dare una valutazione precisa a livello nazionale della prevalenza ed incidenza dell'allergia alimentare.

La *Situazione sanitaria del Paese*, nel 2004-2005, evidenzia che le malattie allergiche sono tra le patologie croniche più diffuse (10,7%): per la fascia di età 0-14 anni, la malattia allergica esclusa l'asma (9,6%) rappresenta la forma cronica più frequente, seguita dall'asma bronchiale (2,9%) (www.salute.gov.it).

Dati pubblicati dall'ISTAT nel 2008 indicano la percentuale di soggetti con malattia allergica nelle classi di età 0-14 e 15-24 anni (Tabella 1)

Tabella 1.
Percentuale di malattia allergica dichiarata ripartita per classe di età (anni) e sesso

Sesso	Età 0-14	Età 15-24
Maschi	10.9%	13.5%
Femmine	8.2%	12.8%
Maschi e femmine	9.6%	13.2%

Fonte: Condizioni di salute e ricorso ai servizi sanitari, ISTAT 2008

Sappiamo che le malattie allergiche respiratorie sono spesso, anche se non obbligatoriamente, precedute, nei primi anni di vita, dalla dermatite atopica e dall'allergia alimentare. Nella letteratura l'allergia alimentare si presenta con ampie differenze di prevalenza, che variano tra il 3,24% e 34,9% nella popolazione generale (Madsen 2005). Differenti criteri di inclusione, diverse definizioni di malattia e diversi punti di cut-off utilizzati nei test degli studi clinici condizionano l'interpretazione dei risultati; d'altra parte il confronto è reso difficile dalle differenze geografiche, genetiche, culturali e di abitudini alimentari (Schäfer et al. 2001).

Nonostante le difficoltà, la stima approssimativa dell'allergia alimentare è collocabile al 3% nella popolazione generale, in accordo con tre recenti studi europei sull'allergia alimentare percepita (Roehr et al. 2004) o confermata al test di provocazione orale con placebo (Osterballe et al. 2005). Va rilevato che i loro criteri di



inclusione per test positivi per allergia, per quanto simili, non sono identici.

Un'altra acquisizione condivisa è che la prevalenza dell'allergia alimentare sia più elevata nei primi anni di vita; l'incidenza viene stimata tra il 6 e l'8% nei primi 2 anni, mentre tende a diminuire con l'età. L'allergia alimentare in età pediatrica ha un valore medio di prevalenza del 5% (Sabra et al. 2003).

È noto che tali dati devono trovare conferma attraverso test diagnostici accurati ed il test di provocazione orale in doppio cieco contro placebo (DBPCFC) si pone come *"gold standard"* nella diagnosi di allergia alimentare. Ad esempio, per quanto concerne il grano, solo il 48% di adulti con sospetta allergia a tale alimento venivano confermati al DBPCFC (Scibilia et al. 2006).

La crescente immigrazione di bambini da altri Paesi ha determinato ulteriore incremento di patologia allergica pediatrica. Infatti, da un'indagine retrospettiva condotta in Italia in 23 Divisioni Pediatriche dal 1999 al 2001, anche i bambini di famiglie immigrate, che nascono nel nostro Paese o vi giungono col tempo, hanno un'incidenza globale di AA analoga ai nostri bambini (Cataldo et al. 2006)

I case-reports italiani sono numerosi, a riprova di un'elevata frequenza dell'AA, sia nell'età pediatrica che nell'adulto, con un tendenziale aumento negli ultimi anni soprattutto dei quadri clinici gravi. Si possono ottenere dei dati indirettamente dalle prescrizioni ospedaliere di auto-iniettori d'adrenalina per l'urgenza medica.

Dati più precisi riguardano l'anafilassi. L'incidenza delle reazioni anafilattiche, per quanto osservato nel pronto soccorso di un ospedale generale di Milano durante due anni di osservazione, era dello 0,4% e coinvolgeva indifferentemente maschi e femmine atopiche. La causa più frequente di reazione anafilattica era di origine alimentare, e in particolare risultavano responsabili della sintomatologia alcuni tipi di frutta e verdura (Pastorello et al. 2001).

Da uno studio, pubblicato nel 2009, sulla incidenza e sulle cause di AA in Italia dell'Associazione Allergologi Italiani Territoriali e Ospedalieri (AAITO) è risultato che gli allergici ad alimenti sono l'8 % di tutti gli allergici. Il 45 % presentava una allergia primaria (non collegata ai pollini) agli alimenti, gli altri una reazione crociata tra pollini e alimenti, mentre l'1% è risultato allergico ad alimenti per reazione crociata al latte.

Fra gli alimenti sono causa di allergia primaria i vegetali 72% (frutta, legumi, pomodoro, ecc), crostacei e molluschi 13%, pesci 4%, uova 3 %, latte 3 %, cereali 2%, carni 1%, anisakis e lumache < 1%. I quadri clinici più gravi sono causati da allergia primaria a crostacei e molluschi, cereali, uova e alimenti vegetali quali sesamo, spinaci, avocado, arachidi e semi. In età pediatrica latte vaccino, uova, grano, soia, pesce ed arachidi, sono responsabili di circa il 90% delle reazioni allergiche ad alimenti.

Le reazioni sistemiche per le allergie alimentari crociate con i pollini sono il 5%. La causa più frequente di allergia ai vegetali è rappresentata dalle proteine Lipid Transfer Protein (LTP) (20 % di tutte le AA e 60 % dei vegetali); le LTP sono contenute soprattutto nella pesca, mela, albicocca, ciliegia, nocciola, arachidi e noci.

In relazione all'incidenza di questa malattia nelle varie fasce d'età, gli studi necessari per la raccolta dei dati epidemiologici sono studi di coorte, cross-sezionali e *"community-server"*, con utilizzo di criteri clinici e diagnostici in vivo ed in vitro condivisi.

La mancanza di un'identificazione della patologia nell'ambito della classificazione delle patologie (ICD) e la mancanza di un registro nazionale delle reazioni gravi alimentari, attualmente in vigore solo in alcune regioni, impediscono una valutazione epidemiologica precisa.

A. 4 Allergeni alimentari rilevanti negli adulti e nei bambini

Gli alimenti responsabili della stragrande maggioranza delle RAA sono: latte, uova, arachidi, pesci, frutta secca, soia nei bambini e, negli adulti, arachidi, noci, pesci, crostacei, verdura e frutta.



Vengono di seguito considerati quelli inclusi nella sezione III Allergeni alimentari della legislazione vigente (art.27 della Legge 88/2009).

Allergeni vegetali

Gli allergeni di origine vegetale sono classificati sulla base delle rispettive proprietà strutturali e/o funzionali (Breiteneder and Radauer 2004) in quattro gruppi:

- 1) **cupine** includono proteine di riserva dei semi: viciline (globuline 7S) e legumine (globuline 11S);
- 2) **prolamine** comprendono
 - proteine di riserva dei semi appartenenti alle albumine 2S,
 - LTP (lipid transfer proteins) aspecifiche, tra cui gli allergeni più importanti della buccia dei frutti delle rosacee (mele, pesche, ecc.),
 - inibitori dell'alfa amilasi e delle proteasi, tra questi alcuni importanti allergeni dei cereali,
 - prolamine dei cereali, note per il loro coinvolgimento nella malattia celiaca;
- 3) **proteine di difesa delle piante** includono numerosissime componenti prodotte dalla pianta in risposta a stress, quali quelli determinati da patogeni (funghi, batteri e virus) o avverse condizioni ambientali;
- 4) **profiline** si trovano in tutte le cellule eucariotiche, spesso definite allergeni universali; appartengono a questo gruppo alcuni allergeni della betulla, del lattice e di molti frutti che cross-reagiscono con pollini (pesca, ciliegia, pera, nocciola, ecc.).

Cereali

L'allergia al frumento può realizzarsi per la produzione di IgE specifiche nei confronti di diverse classi di proteine, dalle gliadine all'alfa-amilasi; alcune di queste proteine risultano *stabili alla denaturazione termica*, quindi ancora "tossiche" dopo la cottura o i comuni trattamenti tecnologici.

Arachide (*Arachis hypogaea*)

L'arachide è spesso responsabile di fenomeni allergici anche gravi come lo shock anafilattico.

Gli allergeni dell'arachide sono codificati con le sigle *Ara h 1-8*, per definirne la successiva identificazione. *Ara h 1* (una vicilina) e *Ara h 2* (una proteina analoga all'inibitore della tripsina) sono considerati gli allergeni maggiori dell'arachide.

Ara h 3, ovvero una glicinina, è normalmente considerato un allergene minore, ma in un gruppo di bambini allergici reclutati in Italia è stato dimostrato che il 95% dei soggetti arruolati aveva IgE specifiche per questa proteina e che nel 31 % dei casi (5/16 bambini allergici all'arachide) *Ara h 3* era l'unico allergene coinvolto nella sintomatologia clinica (Restani et al. 2005).

Dal punto di vista della *stabilità*, il potenziale allergenico dell'arachide persiste ai comuni trattamenti tecnologici, ovvero tostatura e lavorazione che porta alla produzione di derivati (burro e farina di arachide). Risulterebbe invece tollerato dalla maggior parte dei soggetti allergici l'olio di arachide che è sottoposto a processi di rettifica, in grado di allontanare quasi totalmente la frazione proteica.

Sono noti casi di cross-reattività che si osservano maggiormente con la frutta a guscio (nocciola, mandorla, noce brasiliana), piuttosto che con altri legumi (fagioli, carrube, ecc).

Va comunque sottolineato che, sebbene si osservi frequentemente co-sensibilizzazione tra arachide ed altri legumi/frutta a guscio in test in vitro (RAST), questo raramente si traduce in reattività clinica (EC 1997), ad eccezione del lupino per cui si è osservata una percentuale di cross-reattività nel 20% dei soggetti allergici all'arachide.

L'allergene *Ara h 8* sembra responsabile della cross-reattività talora osservata con l'allergene inalatorio *Bet v 1* della betulla.



Soia (Glycine max)

Spesso utilizzata nelle formule destinate all'allattamento dei soggetti allergici al latte vaccino, la soia si è dimostrata a sua volta in grado di indurre sensibilizzazione.

È noto che il 14-35% dei soggetti allergici al latte vaccino diventa allergico anche alla soia. Gli allergeni, definiti *Gly m 1-4*, includono la profilina.

Relativamente alla *stabilità* ai trattamenti tecnologici, la soia come l'arachide mantiene il suo potenziale antigenico, ovvero la capacità di legare le IgE circolanti, anche dopo trattamenti termici a varie temperature e per tempi diversi.

L'olio di soia, in cui la rettifica determina l'allontanamento della frazione proteica, risulta tollerato dalla maggioranza dei soggetti allergici (EC 1997). Più a rischio di causare allergia, sia pur raramente, è la lecitina di soia.

Per quanto riguarda le preparazioni contenenti fitosteroli/stanoli ottenuti a partire dalla soia, l'EFSA ritiene che, in considerazione della natura della materia prima, che è un olio di soia raffinato, e dei successivi trattamenti produttivi impiegati per ottenere il prodotto finale, sia piuttosto improbabile che questi prodotti contengano residui di allergene in quantità tali da causare reazioni allergiche severe, nei soggetti allergici alla soia. (The EFSA Journal (2007) 571, 1-6; 486, 1-8)

Per quel che riguarda il fenomeno della *cross-reattività*, numerose sono le segnalazioni di co-sensibilizzazione tra soia e arachide/frutta a guscio anche se, come già descritto nel caso dell'arachide, la reattività riscontrata nei test in vitro non necessariamente risulta associata a sintomatologia clinica.

Frutta a guscio

I principali frutti a guscio coinvolti nelle reazioni allergiche sono la mandorla (*Amigdalus communis*), la nocciola (*Corylus avellana*), la noce (*Juglans regia*), l'anacardo o noce di Acajù (*Anacardium occidentale*), la noce di Pecan (*Carya illinoensis*), la noce del Brasile (*Bertholletia excelsa*), il pistacchio (*Pistachia vera*) e la noce del Queensland (*Macadamia ternifolia*). Non tutti questi frutti hanno elevata diffusione nel nostro Paese.

Tra gli allergeni della frutta a guscio troviamo componenti di tutte e quattro le categorie di allergeni vegetali descritte in precedenza. Sono proteine stabili non denaturate dai trattamenti termici a cui questi frutti vengono comunemente sottoposti prima della commercializzazione.

Esistono casi documentati di *cross-reattività* sia tra i diversi frutti a guscio, sia con legumi anche se, come già detto in precedenza, gli eventi clinici non sempre vanno in parallelo alla co-sensibilizzazione valutata con test in vitro.

Sedano, sesamo e senape

L'allergia al sedano (*Apium graveolens*) ha una certa diffusione in Italia, mentre la sensibilizzazione a sesamo (*Sesamum indicum*) e senape (*Sinapis alba*) presentava fino a qualche anno fa una rilevanza clinica trascurabile. Con l'avvento della cucina etnica e la diffusione del sesamo, quale ingrediente dei prodotti da forno (dolci e pane), il numero di soggetti allergici a questi due alimenti è andato aumentando progressivamente. Anche in questo caso gli allergeni appartengono ai quattro diversi gruppi di proteine vegetali descritti in precedenza.

Il sedano viene consumato sia crudo sia cotto ed in entrambi i casi sono stati registrati casi di reazioni cliniche; queste segnalazioni indicano che gli allergeni del sedano sono almeno parzialmente *termostabili* (Ballmer-Weber 2000).

Sono state identificate numerose proteine allergeniche del sedano in grado di indurre cross-reattività, tra queste particolarmente critica è *Api g 1*, responsabile di reazioni crociate con il polline della betulla (*Bet v 1*) e con altri vegetali (mela e carota). In soggetti altamente allergici sono stati descritti casi di reazioni anafilattiche anche a seguito del consumo di olio di semi di sesamo (Chiu e Haydik 1991).



Allergeni di origine animale

Latte e uova sono i principali responsabili di reazioni allergiche in età pediatrica, mentre i prodotti ittici (pesci, crostacei e molluschi) sono importanti allergeni dell'età adulta.

Latte

L'allergia al latte è sicuramente la più frequente e conosciuta allergia alimentare; la sua elevata prevalenza deriva dal fatto che i neonati che non possono essere allattati al seno, vengono alimentati con formule a base di latte vaccino.

L'imaturità funzionale dell'apparato gastro-intestinale e del sistema immunitario nei primi anni di vita, fanno sì che l'allergia al latte vaccino compaia in percentuali variabili tra il 2 e il 7% dei bambini. L'allergia al latte vaccino ha normalmente un'evoluzione favorevole con l'insorgenza della tolleranza nella grande maggioranza dei casi entro i tre anni di vita (Host e Halken 1990).

Le proteine del latte sono classificate in caseine e sieroproteine, che costituiscono l'80 e il 20%, rispettivamente, delle proteine totali del latte. Le caseine (che comprendono alfa₁, alfa₂, beta, kappa e gamma caseine) sono organizzate in strutture complesse chiamate micelle.

Le gamma-caseine sono frammenti della beta-caseina; poco abbondanti nel latte, si formano grazie ai processi proteolitici che avvengono durante la stagionatura dei formaggi.

Le sieroproteine sono la porzione proteica che rimane solubile dopo la cagliatura del latte richiesta dalla produzione del formaggio, includono alfa-lattoalbumina e beta-lattoglobulina, sintetizzate a livello della ghiandola mammaria, la sieralbumina e le immunoglobuline, di origine plasmatica, altre proteine minori, quali lattoferrina, lisozima, ecc.

Dal momento che la beta-lattoglobulina è assente nel latte di donna, si credeva in passato che questa proteina rappresentasse l'allergene maggiore del latte vaccino. Con il tempo si è invece evidenziato che anche le caseine sono allergeni maggiori e che spesso si verificano co-sensibilizzazioni. In pratica, molti soggetti allergici al latte vaccino risultano reattivi a più di una proteina.

Relativamente alla *stabilità* ai processi tecnologici:

- le caseine sono stabili a tutti i trattamenti termici, a cui viene comunemente sottoposto il latte vaccino (pastorizzazione, sterilizzazione, UHT),
- la beta-lattoglobulina e le altre proteine del siero vengono invece, almeno parzialmente, denaturate dai trattamenti termici.

È comunque da escludere, se non dopo comprovata somministrazione orale in ambiente clinico, la tolleranza del latte dopo trattamento termico da parte dei soggetti allergici.

Nettamente superiore è la tolleranza alle proteine del latte sottoposte a digestione enzimatica ed è proprio su questo principio che sono state ideate le formule a base di proteine idrolizzate, destinate all'allattamento dei neonati allergici al latte vaccino.

La *cross-reattività* è un argomento estremamente delicato per i soggetti allergici al latte, in quanto c'è molta confusione nel consumatore tra allergia vera e intolleranza al lattosio.

Si assiste spesso a messaggi pubblicitari confondenti che sostengono la tolleranza a latte di altra specie senza comprovata sperimentazione clinica (caso tipico è il latte di capra).

La "tossicità" e la tolleranza dei lattici di altre specie mammiere va valutata caso per caso e non si può generalizzare vista l'estrema complessità del problema.

Uova

Anche le uova sono frequentemente coinvolte nelle forme allergiche infantili e, come per il latte, si osserva una tendenza all'acquisizione della tolleranza nei primi anni di vita.



I principali allergeni dell'uovo sono tutte proteine dell'albume e di queste il lisozima sembrerebbe responsabile della sensibilizzazione solo in un limitato numero di soggetti. Anche nel tuorlo sono state descritte proteine allergeniche, anche se la reattività riscontrata nei test clinici può essere dovuta alle tracce di albume derivanti da una separazione incompleta delle due parti (è ben noto che la totale separazione dell'albume dal tuorlo è tecnicamente difficoltosa). Solo nel caso della livetina si può parlare di un allergene vero e proprio del tuorlo (Szepefalusi et al. 1994).

La *stabilità* degli allergeni dell'uovo è elevata e le reazioni cliniche si evidenziano nella maggioranza dei casi sia dopo il consumo di uovo crudo che di uovo cotto. Essendo l'uovo un ingrediente molto diffuso nel settore alimentare, la dieta dei soggetti portatori di questa allergia deve necessariamente avvalersi di un'attenta lettura delle etichette.

Pesci

I pesci rappresentano una complessa classe di alimenti, con relazioni filogenetiche molto diversificate. L'allergia al pesce è ben conosciuta e si manifesta principalmente in età adulta. Nonostante il numero molto elevato di pesci inclusi nella dieta mondiale, solo alcuni allergeni di origine ittica sono stati identificati dal punto di vista molecolare; tra questi, quello meglio caratterizzato è la parvalbumina del merluzzo, nota come Allergene M. Anche nel caso del salmone la proteina coinvolta nella sintomatologia allergica è la parvalbumina.

L'Allergene M è stabile al calore e alla digestione; un caso di anafilassi è stato registrato in seguito al consumo di patatine fritte in un olio usato in precedenza per friggere merluzzo (Yunginger et al. 1988). La *cross-reattività*, pur frequentemente osservata nei test in vitro, trova solo parziale riscontro nella co-sensibilizzazione in vivo.

Crostacei e molluschi

Anche crostacei e molluschi includono un elevato numero di specie, più o meno vicine dal punto di vista filogenetico. Tra le diverse specie sicuramente il gambero è quello più frequentemente responsabile di reazioni cliniche negli adulti. Anche in questo caso solo pochi allergeni sono stati studiati dal punto di vista molecolare e tra questi, la tropomiosina è l'allergene più conosciuto.

La tropomiosina è *stabile* al calore e quindi può determinare reazioni cliniche dopo il consumo di crostacei (e molluschi) sia crudi che cotti. Fenomeni di *cross-reattività* sono stati osservati non solo tra i diversi crostacei (aragosta, granchio, ecc.) e molluschi (seppie, ecc), ma anche con aracnidi (acari della polvere) ed alcuni insetti (scarafaggi) (Besler et al 2001).

A. 5 Diagnostica delle allergie alimentari

L'allergia alimentare può manifestarsi con quadri clinici diversi e i test diagnostici più comunemente utilizzati (cutanei e/o sierologici) non hanno sensibilità e specificità tali da affermare o escludere in modo definitivo la diagnosi; possono infatti risultare positivi in soggetti che tollerano bene l'alimento o, al contrario, almeno alcuni di essi possono risultare negativi in soggetti affetti da allergia non IgE-mediata. Ciò può accadere in particolare in pazienti che presentino sintomi gastroenterici. Il test di scatenamento orale in doppio cieco con placebo (DBPC) rappresenta ancora il test d'elezione per dimostrare il reale risvolto clinico di una sensibilizzazione.

Anamnesi

È la base di ogni procedura diagnostica.

La raccolta di un'accurata anamnesi costituisce, infatti, il primo approccio diagnostico all'allergia alimentare, ed è spesso sufficiente ad individuare l'alimento (o gli alimenti) incriminati, soprattutto nel caso di allergie IgE-mediate, nelle quali le manifestazioni cliniche seguono immediatamente l'ingestione dell'alimento.



Bisogna indagare soprattutto:

- i sintomi che vengono riferiti dal paziente
- quando è avvenuta l'ultima reazione e quanto tempo è passato dalla precedente
- quale potrebbe essere l'allergene in questione
- la quantità che provoca la reazione
- il tempo che intercorre tra l'ingestione e la manifestazione clinica
- se ci sono stati segni o sintomi analoghi in altre situazioni
- se sono necessari (o presumibili) altri fattori, oltre all'ingestione dell'alimento, perché la reazione si verifichi (come nel caso dell'assunzione di certi farmaci o di attività fisica intensa).

Nell'indagine anamnestica nel caso di allergia alimentare non vanno trascurati gli eventuali allergeni occulti. Il fenomeno degli allergeni occulti è legato alla presenza in modo non evidente di un allergene in un alimento, come per esempio la presenza, in un dolce, di gelatina di pesce come semplice guarnizione.

La confezione industriale dei cibi ha enormemente amplificato la possibilità di reperire, in modo del tutto inaspettato, allergeni occulti (es: latte o soia nei salumi, caseina nel vino, etc.) con lo scatenamento di reazioni verso cibi ritenuti totalmente innocui.

L'attuale legislazione relativa all'etichettatura dei prodotti alimentari mira a consentire l'esatta conoscenza degli ingredienti, compresi quelli minori.

Skin Prick Test

Questo test cutaneo, *in vivo*, rappresenta spesso la prima tappa nella diagnostica allergologica: è infatti sicuro, veloce, economico e di semplice esecuzione anche se di complessa interpretazione.

Rileva un'ipersensibilità IgE-mediata a livello cutaneo. Consiste nel mettere a contatto i mastociti dermici con l'allergene, sotto forma di estratto commerciale, pungendo la cute sulla superficie volare dell'avambraccio dove viene posata una goccia di estratto. I mastociti, nei soggetti sensibilizzati, liberano i loro mediatori; tale processo si rifletterà sul piano clinico cutaneo con la triade clinica di Lewis: edema, eritema, prurito.

Se un prick test risulta negativo si esclude (con un valore predittivo negativo > 90%) la sensibilizzazione del paziente verso l'allergene, e quindi l'allergia IgE- mediata nei confronti di quell'alimento.

Il risultato positivo, invece, indica una sensibilizzazione a livello immunologico, che però non sempre si associa a una reattività clinica: il test è quindi altamente sensibile ma poco specifico (Sicherer et al. 2010).

Occorre ricordare che, come per ogni test, è necessario inserire il controllo positivo (istamina) ed il controllo negativo (soluzione glicerinata).

Molti studi sono stati eseguiti sull'interpretazione della grandezza del pomfo (misurato in mm) fornito dal prick test, con la conclusione che l'aumentare del diametro del pomfo è correlato ad un'aumentata probabilità di allergia clinica (Knight AK et al. 2006); tuttavia, i tentativi finora effettuati di proporre "valori soglia" specifici per ogni alimento, oltre i quali considerare la diagnosi estremamente probabile, non hanno mostrato risultati concordanti.

Uno studio recente che ha utilizzato la tecnica dell'end-point (SPT con diluizioni seriali dell'estratto) ha permesso di individuare, con elevata sensibilità e specificità, i bambini con sospetta allergia IgE-mediata all'uovo che hanno avuto una risposta positiva al test di provocazione orale (TPO) con uovo crudo (Tripodi S, Businco AD, Alessandri C, Panetta V, Restani P, Matricardi PM. Predicting the outcome of oral food challenges with hen's egg through skin test end-point titration. Clin Exp Allergy. 2009 Aug;39(8):1225-33). Se tale metodica verrà confermata e se sarà possibile estenderla ad altri alimenti, consentirà di limitare la necessità dei TPO.

In definitiva, lo SPT è considerato sufficientemente valido nell'escludere una condizione allergica IgE mediata.



Prick by prick

Questo test è analogo al prick test, ma anziché un estratto commerciale viene usato l'alimento fresco. Il test si effettua principalmente per gli alimenti vegetali, le cui proteine sono labili e possono essere alterate dalla preparazione industriale dell'estratto commerciale, dando risultati falsamente negativi. Ciò comporta che spesso i prick by prick danno positività cutanee molto evidenti, negli stessi pazienti in cui l'estratto ha dato un risultato negativo: il valore predittivo negativo di questa tecnica è pertanto eccellente, tanto che in caso di esito negativo si può escludere l'allergia alimentare.

Il prick test ed il prick by prick con alimenti freschi seguono precise regole di interpretazione e rappresentano per l'allergologo il primo test da effettuare in termini diagnostici; non si esegue in corso di terapia con antistaminici, cortisonici per via sistemica o in età avanzata, situazioni queste che rendono il test meno sensibile (D.Macchia et al, Position Statement: diagnostica in vivo ed in vitro nell'adulto delle allergie IgE mediate SIAC-IFIACI, It J Allergy Clin Immunol 2011; 21:57-72).

Atopy Patch Test (ATP)

Anche questo test cutaneo indaga la presenza di un'ipersensibilità, ma di tipo ritardato, indotta dal contatto prolungato della pelle con l'allergene. La reazione immunologica che ne sta alla base è sostenuta dai linfociti T, che vengono attivati dal contatto dell'allergene. Si può quindi utilizzare nell'ambito di situazioni cliniche nelle quali il sospetto è per reazioni cellulo-mediate o miste (anticorpi e cellulo-mediate).

Questa metodica descritta da Isolauri nel 1996 (Isolauri et al. 1996), è stata introdotta recentemente nella diagnostica pediatrica dell'AA, e rappresenta uno strumento *in vivo* di facile realizzazione, ma di scarsa riproducibilità.

In campo di allergia alimentare è usato soprattutto nei soggetti in età pediatrica, epoca della vita in cui sono più frequenti le reazioni alimentari di tipo ritardato.

Attraverso il supporto di un cerotto (di polietilene, carta o seta) le sostanze allergeniche sono disposte su dischetti di cellulosa e applicate sulla cute del dorso del soggetto. I cerotti vengono lasciati a contatto della pelle per 48 ore, poi rimossi, valutando la possibile reazione cutanea a 48 e 72 ore dall'applicazione dell'allergene. In letteratura vi è discordanza circa l'uso diagnostico del patch test, in quanto è ancora da dimostrare il suo valore scientifico (Boyce J. et al. 2011) e risulta anche una certa difficoltà nell'interpretazione dei risultati (Asero R. et al. 2007).

Resta comunque il test più utile nei casi di reazione non IgE mediata, in cui la positività a questo test, associata alla storia clinica, potrebbe indirizzare la diagnosi (Roehr CC. et al. 2001).

Allorché risulta positivo, è importante nella diagnosi di allergia alle proteine del latte vaccino, di tipo ritardato.

IgE specifiche

Questo test si esegue su siero attraverso un metodo immunofluoroenzimatico.

Il test valuta in che quantità le IgE sieriche (sIgE) del soggetto in esame si legano agli estratti allergenici. Viene tuttora chiamato "RAST", termine impreciso in quanto si riferiva ad un dosaggio di IgE effettuato con un metodo radioimmunologico, oggi non più usato (Hamilton RG et al. 2001).

Il test, rispetto allo Skin Prick Test (SPT), vanta lo stesso valore predittivo negativo, ma un minore valore predittivo positivo (Asero R. et al. 2007), a causa dei falsi positivi, cioè soggetti portatori di sensibilizzazione sierica, ma non allergici. Offre comunque il vantaggio di una valutazione quantitativa importante: concentrazioni elevate di IgE correlano con un'alta probabilità di reattività clinica (Sicherer SH et al. 2009, Benhamou AH et al. 2008). A tal fine sono stati proposti vari cut-off, ma sono tutti influenzati da vari fattori e specialmente dalla prevalenza della malattia allergica nella popolazione sottoposta al test.

La positività, sia dei test cutanei che sierici di laboratorio, indica semplicemente la presenza di sensibilizzazione



e non obbligatoriamente quella di allergia clinicamente evidente.

Benché test negativi escludano virtualmente un'allergia IgE-mediata, solo il 25-30% dei pazienti con SPT positivi sviluppano una reazione immediata quando sottoposti al test di provocazione orale (TPO) che quindi è indispensabile per il completamento diagnostico.

I test cutanei ed *in vitro* possono permanere positivi anche dopo l'acquisizione di tolleranza all'alimento specifico. Per questo, l'interpretazione dei dati ottenuti dai test, sia in vivo che in vitro, è da *affidare allo specialista allergologo-immunologo clinico*.

Test di provocazione labiale

Il test utilizza le caratteristiche anatomiche delle labbra: l'importante vascolarizzazione e l'abbondanza di mastociti. L'allergene viene tenuto in contatto con la mucosa per un tempo variabile da 10 sec a 2 min; dopo 15 minuti si effettua la lettura classificando un'eventuale risposta positiva in un ventaglio di 5 stadi, dall'edema locale ad una complessa reazione clinica, sia pur rara.

Se da un lato ha il vantaggio di essere economico, abbastanza sicuro, di semplice esecuzione, dall'altro presenta una scarsa sensibilità, per cui una risposta positiva di basso grado, può costituire un'indicazione a proseguire gli accertamenti mediante l'esecuzione di un test di provocazione orale (TPO).

Test di Provocazione Orale (TPO)

Il test di provocazione orale corrisponde alla somministrazione orale dell'allergene sospetto al paziente, che deve essere eseguita secondo modalità e quantità standardizzate, in un ambiente protetto e sotto controllo medico (Rona RJ et al. 2007), perché può indurre reazioni allergiche anche gravi.

Questo test è oggi il GOLD STANDARD per la diagnosi di allergia alimentare, sia di tipo IgE-mediato che cellulo-mediato.

Possono essere sottoposti alla procedura:

- a) soggetti con un'anamnesi di probabile allergia alimentare, sia a scopo diagnostico, che per valutare se il paziente riesce a tollerare le tracce di alimento o anche per verificare l'acquisizione della tolleranza;
- b) soggetti con anamnesi non indicativa o pazienti che siano da tempo sottoposti a dieta di eliminazione;
- c) soggetti che siano sensibilizzati ad un alimento mai assunto, o anche solo nel sospetto medico.

I TPO dovrebbero essere eseguiti sempre per la conferma diagnostica dopo una preliminare osservazione di SPT e/o test sierologici immuno-fluorimetrici o altri esami sierologici positivi per uno o più alimenti e, inoltre, tutte le volte che si sospetta una reazione allergica ritardata e i test sierologici sono risultati negativi.

Il test TPO va eseguito in day hospital o in regime di ricovero. Il soggetto inizia ad assumere piccolissime dosi di alimento che andranno aumentando ad intervalli di 15-20 minuti, fino a raggiungere una quantità assimilabile a quella mediamente assumibile in un pasto secondo le sue abitudini. Il paziente resta in osservazione per 2-3 ore dalla fine del test per escludere l'insorgenza di reazioni immediate. Le reazioni ritardate vengono escluse o affermate a distanza di 48 ore dall'assunzione dell'alimento.

Il test può essere condotto in tre differenti modalità:

- *in aperto*, di più semplice ed economica esecuzione, nella quale il medico e il paziente sono a conoscenza dell'alimento che viene somministrato: è quella, in Italia, di più frequente utilizzo (Bert I et al. 2010);
- *in doppio cieco (DBPCFC)*, né il medico, né il paziente sanno se il paziente stia assumendo il placebo o l'allergene (*verum*), per eliminare eventuali falsi positivi, legati a reazioni cutanee da stress, o reazioni vagali, che possano insorgere durante la procedura. È la modalità indicata dalla letteratura come la più importante; purtroppo implica una serie di difficoltà sia di ordine economico che organizzativo;
- *in singolo cieco*, in cui solo il paziente non conosce se venga somministrato l'allergene o un placebo; è il metodo meno usato.



Ciascuno di questi tre test è in grado, da solo, di svelare le reazioni allergiche immediate (IgE mediate) e tardive (non IgE mediate) agli alimenti. Il documento dell'European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) stabilisce i criteri di inclusione dei bambini per l'esecuzione dei TPO e puntualizza le indicazioni per i singoli tipi di TPO, come riportato in **Tabella 2**.

Tabella 2.

Criteri di inclusione dei bambini per l'esecuzione del TPO e relative indicazioni

Candidati ad eseguire TPO: bambini con anamnesi positiva per reazione avversa ad alimento

per stabilire o escludere la diagnosi di allergia/intolleranza alimentare

per ragioni scientifiche nei trials clinici

per determinare il valore soglia per l'alimento testato

per saggiare l'avvenuta tolleranza nel tempo dopo la diagnosi di allergia alimentare

Candidati ad eseguire TPO: bambini con anamnesi negativa per reazione avversa ad alimento, se

i segni clinici, con andamento cronico, sono sospettati essere alimento-correlati

sta seguendo un'incongrua dieta di eliminazione, ma ci sono ragioni per sospettare la possibilità di una reazione avversa alla reintroduzione

è stata posta diagnosi di sensibilizzazione ad un alimento, ma la tolleranza non è nota (per alimenti cross-reattivi non ancora introdotti nella dieta)

Indicazioni al TPO in doppio cieco

la procedura generalmente raccomandata, specialmente se si può prevedere un TPO positivo

il metodo di scelta per i protocolli scientifici

il metodo di scelta quando si devono studiare reazioni ritardate con segni clinici ad andamento cronico

il solo modo per studiare convenientemente sintomi clinici soggettivi

Indicazioni al TPO in aperto

dovrebbe seguire DBPCFC negativo

può essere sufficiente se si manifestano segni immediati IgE mediati

deve essere il primo approccio quando è elevata la probabilità di un TPO negativo

bambini con età > 3 anni, è spesso sufficiente se si attendono reazioni di tipo immediato

Infine, secondo l'European Academy of Allergy and Clinical Immunology, il TPO non va effettuato nei casi di:

- Anafilassi o shock dopo l'assunzione di un alimento ben identificato con skin prick test e test sierologici IgE specifiche, se si è verificata a meno di un anno di distanza.
- Sindrome orale allergica in un soggetto con allergia a inalanti (mela-betulla; composite-sedano; lattice-frutti).

TEST UTILI IN SPECIFICHE CONDIZIONI DIAGNOSTICHE

Component-Resolved Diagnosis

L'analisi molecolare degli estratti allergenici utilizzati per test allergologici in vitro e in vivo ha dimostrato che tali estratti sono formati da una miscela di proteine e glicoproteine, e che solo una minoranza di queste rappresenta gli allergeni specifici in grado di indurre un quadro clinico nel paziente sensibilizzato. In questo test non viene utilizzato un estratto allergenico, ma solo l'allergene "nativo" altamente purificato o ricombinante che ha il vantaggio di permettere una migliore standardizzazione, di rendere la diagnostica più accurata, ovvero di stabilire quantitativamente un profilo specifico di reattività di un soggetto per le singole componenti allergiche, aumentandone la specificità, concetto che è stato definito *Component-Resolved Diagnosis*.

È pertanto un test di seconda istanza, da tenere in considerazione nella diagnostica dell'allergia alimentare, ma da riservare allo specialista.



Il limite di questi test, come anche quelli tradizionali come “RAST” e SPT, è che ci possono dare indicazioni solo sulla sensibilizzazione del paziente, ma non consentono di individuare il vero allergico. La CRD consente di conoscere meglio le molecole responsabili e la loro possibile cross-reattività legata ad omologia di struttura. Esistono più test di laboratorio che supportano questa diagnostica molecolare in vitro. Ne è un esempio il dosaggio immunoenzimatico (immunoCAP), che utilizza come immunoadsorbente una molecola ricombinante altamente purificata. In questo caso solo le IgE specifiche presenti nel siero del paziente per questa componente potranno legarsi e dare un risultato positivo (Figura 1).

Un secondo approccio è quello rappresentato dall’ISAC (Immuno Sorbent Allergen Chip) che, nella configurazione attuale, è costituita da 112 differenti allergeni ricombinanti o purificati. L’ImmunoCAP-ISAC® consiste in un supporto solido in vetro con quattro siti di reazione, ciascuno circondato da una maschera protettiva ed idrofoba di teflon. La superficie di vetro nei quattro siti è studiata, dal punto di vista chimico, in modo tale da permettere un fissaggio ottimale delle proteine che scatenano le allergie senza che per questo venga alterata la loro funzionalità biologica.

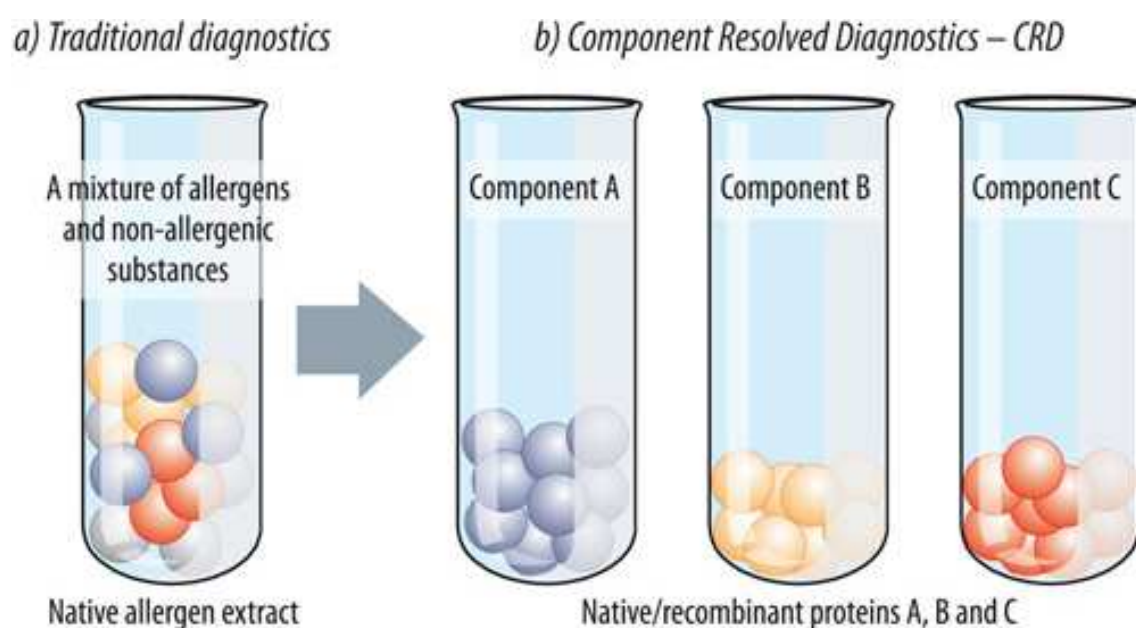
Sul chip, ogni allergene è fissato tre volte in ogni sito di reazione. Il legame delle IgE specifiche viene rilevato mediante anticorpi coniugati a fluorocromo eccitato da un laser e quantificato con l’ausilio di un software dedicato (Berti I et al. 2010, Jahn-Schmid B et al. 2003).

Un limite dell’ISAC è quello di avere delle risposte positive inattese (per es. paziente testato per allergia respiratoria e che risulta positivo all’LTP, ma senza alcuna sintomatologia riferita) che comporta dei problemi di gestione anche medico-legali.

In entrambi i casi l’analisi può essere eseguita con quantità estremamente esigue di sangue (il che, in ambito pediatrico, o in soggetti defedati, può costituire un grande vantaggio) (Mari A et al. 2010). Le prestazioni di questo test sembrano ampiamente comparabili con le metodiche tradizionali (Ott H. et al. 2008).

In conclusione, il Component-Resolved Diagnosis risulta essere **un test diagnostico molto valido, più sensibile del test immunofluoroenzimatico (RAST)**, ma piuttosto costoso e va riservato allo specialista che ne conosca tutti i possibili vantaggi, ma anche i limiti.

Figura 1 . La CRD, ovvero la ricerca di IgE per componenti specifiche, permette di determinare il profilo di reattività individuale

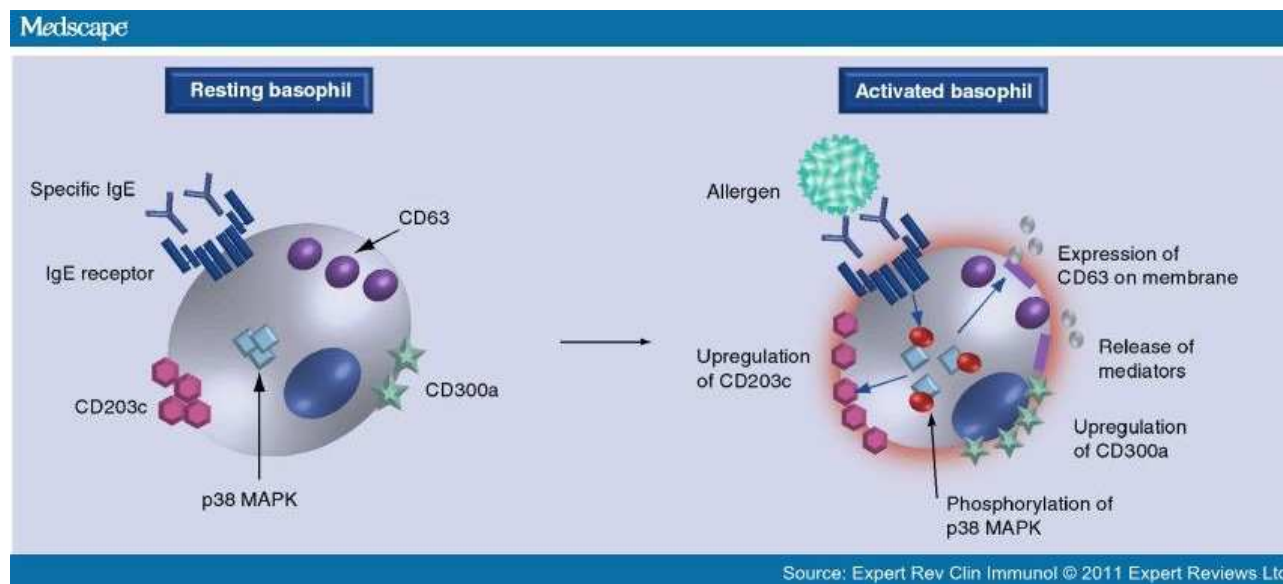


Basophil Activation Test

Questo test si basa sull'esistenza di alcuni marker di attivazione dei basofili, come la CD63, la CD 203c.

La prima appartiene alla famiglia delle tetraspanine, proteine conosciute anche come Gp53 o LAMP-3 (lysosomal-associated membrane glycoprotein-3), le quali sono molto poco espresse sulla superficie dei basofili quiescenti, essendo prevalentemente presenti nei granuli intracellulari. In concomitanza di un'attivazione della cellula, i granuli vengono esposti in superficie e con loro la CD63. Il risultato dell'attivazione dei basofili è l'aumento di questo marker che viene espresso come percentuale di basofili CD63+ (**Figura 2**).

Figura 2 . Test di attivazione dei basofili



L'uso di questo test nella diagnostica delle allergie alimentari sta muovendo i primi promettenti passi: uno studio belga (Ocmant A. et al. 2009) ha dimostrato come il test di attivazione basofilica (BAT) sia in grado di discriminare tra pazienti allergici, sensibilizzati all'uovo o pazienti-controllo, mentre uno studio francese (Rubio A et al. 2011) ha recentemente sostenuto l'utilità del BAT nel decidere quando reintrodurre il latte vaccino in una popolazione di bambini allergici.

È importante riconoscere che la negatività di questo test, anche se non determinante, consente di sottoporre i pazienti a test di provocazione, con un minimo rischio di reazione.

È tuttavia una metodica di laboratorio non ancora largamente diffusa e disponibile.

Dieta di eliminazione

Di fronte a pazienti con storia clinica evocatrice di allergia alimentare, con test diagnostici precedentemente descritti negativi e con sintomi non immediati, che vanno a interessare l'apparato gastroenterico e/o la cute e che, nel paziente pediatrico, si possono anche manifestare con scarsa crescita, è ragionevole proporre una dieta di eliminazione a scopo diagnostico. Durante tale periodo, della durata di 2-4 settimane, sarebbe opportuno utilizzare un diario alimentare.

Successivamente il paziente reintrodurrà l'alimento sospetto e, se vi è evidenza clinica di ripresa dei sintomi, si può porre diagnosi di allergia all'alimento.

È un test che, pur non avvalendosi di metodologie scientifiche, può dare risposte diagnostiche da tenere in considerazione.



Endoscopia e biopsia

Esistono condizioni patologiche ad eziopatogenesi immuno-allergica in cui non si riesce a comprendere la causa di malattia, nonostante test allergologici e tentativi dietetici. Per tale motivo l'endoscopia con le biopsie multiple a carico di esofago, stomaco o intestino, effettuate a seconda delle alterazioni macroscopiche riscontrate durante l'esame, rappresenta l'unico metodo attendibile di valutazione della malattia, sia nella diagnosi che nel follow up. Ne è un esempio l'esofagite eosinofila in cui tramite endoscopia si valutano eventuali alterazioni macroscopiche e si procede con lo studio istologico e con la conta degli eosinofili, nonché con la valutazione del grado dell'infiammazione.

La biopsia è l'esame definitivo per la diagnosi, pur restando un test invasivo.

A. 6 Terapia e costi

Terapia

I tentativi di modificare la storia naturale dell'AA possono da un lato prevenirne lo sviluppo nell'infanzia, dall'altro intervenire con il trattamento quando il bambino è allergico ad alimenti. Comunque va eliminato l'allergene o almeno vanno evitate quantità elevate.

La prevenzione dell'AA esclude o riduce la sensibilizzazione mediante la diminuzione delle cellule produttrici di IgE specifiche per quell'alimento, mentre col trattamento si tende a determinare l'apoptosi delle cellule specifiche.

Oltre alla dietoterapia di eliminazione dell'allergene alimentare offendentente, negli ultimi anni è stata proposta un'altra strategia per indurre tolleranza verso le proteine del latte vaccino (PLV) e verso le proteine dell'uovo (Longo et al. 2008). Tale terapia consiste nel tentativo di desensibilizzazione attraverso la somministrazione quotidiana di dosi crescenti di tali proteine per cercare di indurre tolleranza.

L'acquisizione della tolleranza verso un allergene alimentare è però condizionata da diversi fattori tra cui la severità della sintomatologia scatenata dalla sua ingestione (James 1992), l'età della diagnosi (Eggleston 1987), il livello di IgE specifiche e le loro variazioni (Garcia-Ara et al. 2004).

Tutti questi parametri condizionano l'esistenza di fenotipi diversi di allergia alimentare che differenzialmente si comportano nel tempo. Molti sono però ancora i dubbi.

Un dubbio riguarda la correlazione tra sintomi più gravi e acquisizione più tardiva della tolleranza; si sospetta fortemente tale correlazione, dal momento che entrambi i fenomeni (sintomatologia e tolleranza) sono correlati con il livello delle IgE. Altro aspetto da chiarire è se la frequenza dei sintomi sia associata a sintomatologia persistente o se questa sia dovuta alle frequenti infrazioni dietetiche. Non sappiamo se l'introduzione di alimenti in bambini ad essi allergici (ad esempio con piccoli errori dietetici) abbia una qualche influenza sulla storia naturale della loro allergia, ma questa evenienza è temuta e sappiamo con certezza che anche piccole dosi possono scatenare sintomi.

Eseguito una valutazione complessiva delle osservazioni fino ad ora condotte nell'ambito della desensibilizzazione per alimento, i vari autori hanno sostanzialmente osservato 3 fenotipi di risposta alla terapia desensibilizzante:

- molti bambini, un tempo allergici gravi con reazioni generalizzate severe per contatti minimi con l'alimento e, quindi a rischio di vita, hanno riacquisito la capacità di assumere liberamente l'alimento senza manifestare reazioni avverse,
- altri sono riusciti a tollerare nella dieta quantità limitate di proteine dell'alimento non tollerato precedentemente,
- alcuni invece, pur tentando la desensibilizzazione, non sono riusciti a tollerare neppure piccole dosi di proteine, a seguito di reazioni ricorrenti dopo l'esposizione all'alimento indice.



È probabile che ogni fenotipo di risposta corrisponda a caratteristiche cliniche di laboratorio per ora non ancora identificate.

Il punto chiave della terapia delle allergie alimentari è, quindi, evitare i cibi di cui è nota o sospetta la responsabilità causale nel determinare una reazione avversa ad alimenti.

A differenza di quanto avvenuto per gli aero-allergeni, l'individuazione e la caratterizzazione degli allergeni alimentari non ha comportato la sintesi di estratti utili per la immunoterapia specifica.

Recentemente sono stati condotti, con esito positivo, dei trial con LTP somministrato per via sublinguale, nella desensibilizzazione di pazienti allergici alla pesca (Fernández-Rivas M, Garrido Fernández S, Nadal JA, Díaz de Durana MD, García BE, González-Mancebo E, Martín S, Barber D, Rico P, Tabar AI. Randomized double-blind, placebo-controlled trial of sublingual immunotherapy with a Pru p 3 quantified peach extract. *Allergy*. 2009 Jun;64(6):876-83.).

Nell'allergia alimentare, pur essendo possibile una diagnosi eziologica corretta, non è possibile istituire una terapia farmacologica o desensibilizzante mirata.

La farmacoterapia delle allergie alimentari si risolve nel trattamento di emergenza per i pazienti inavvertitamente esposti all'allergene alimentare già causa nota di reazione allergica.

Il trattamento di scelta per l'anafilassi, in particolare quella da cibo, è l'adrenalina per via iniettabile (Sampson et al.1992).

I soggetti con allergia alimentare devono fare il massimo sforzo per evitare il cibo per il quale hanno già avuto una reazione.

La dieta di eliminazione, se non correttamente effettuata, può causare malnutrizione o seri effetti psicopatologici, pertanto è opportuno che il soggetto affetto da AA venga seguito da un team di specialisti (allergologo, dietologo), eventualmente supportato dallo psicologo.

Costi

Una recente pubblicazione (Sicherer) afferma che l'AA ha un significativo impatto sulla qualità di salute della vita ed i costi (aspetti non ben studiati) e che sono in corso studi clinici per migliorare diagnosi, prevenzione e trattamento.

Tramite questionari inviati ai genitori di bambini (età 5-18 anni) affetti da AA (allergici ad uno o due alimenti il 68%, a più di due alimenti il rimanente), è stata valutata la percezione dei genitori. L'AA ha un significativo impatto emotivo sulla percezione di salute generale del genitore e sulla limitazione delle attività di famiglia, particolarmente quando associate a malattie atopiche ed in relazione al numero di alimenti che deve essere evitato.

Uno studio pilota condotto in Olanda e Regno Unito (Fox e al. 2006), per valutare i costi sociali delle AA, tramite questionari inviati alla popolazione generale (con e senza AA), suggerisce dai primi risultati un aumento dei costi di vita e di costi sanitari.

Spesso il peso che una famiglia deve sopportare non è quello di una sola, ma di due malattie allergiche: l'asma e l'eczema (E. O'Connell, editor della rivista americana *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*). Se non adeguatamente controllate, queste condizioni influenzano la qualità della vita, a causa del sonno disturbato, della resa scolastica meno brillante, della limitazione nelle comuni attività (es. sport).

È soprattutto l'eczema che toglie il sonno alle famiglie ed ai bambini, generando stress che non fa che aumentare il prurito in un circolo vizioso senza fine. Questi bambini hanno difficoltà a frequentare le piscine, a mettere certi vestiti e si trovano brutti guardandosi allo specchio.

L'impatto dell'eczema sulla vita delle famiglie è stato valutato addirittura superiore a quello del diabete. La spesa nazionale per l'eczema è stata calcolata in 364 milioni di dollari negli USA e 700 milioni di dollari in Gran Bretagna. Non sono al momento disponibili dati relativi ai costi dell'AA nel nostro Paese.



A. 7 Prevenzione delle allergie alimentari: allergeni occulti e norme di etichettatura

Prevenzione

Nell'attesa di poter influenzare l'andamento della malattia allergica con mezzi farmacologici od immunologici, l'attenzione dei ricercatori è a tutt'oggi rivolta alla prevenzione dietetica. Infatti quello dietetico è il principale fattore ambientale di rischio per la sensibilizzazione allergica alimentare, oltre che la via pressoché esclusiva di scatenamento dei sintomi.

Si distinguono diversi livelli di prevenzione:

- prevenzione primaria: evitare la sensibilizzazione allergica è certamente il campo più esplorato. Poiché l'identificazione dei candidati a rischio è piuttosto incerta, gli studi in questo campo sono stati condotti in popolazioni assai selezionate, ad alto rischio (Kjellman et al. 1999);
- prevenzione secondaria: deterrenza dell'espressione della malattia nonostante una sensibilizzazione IgE già avvenuta. Richiederebbe un largo screening di massa per poter identificare la popolazione a rischio;
- prevenzione terziaria: minimizzazione della sintomatologia per coloro che già hanno la malattia in atto. Può efficacemente essere ottenuta evitando gli allergeni, attraverso un approccio detto "*proibizionista*", ed in questo caso si identifica con la terapia della allergia alimentare (Boner et al. 1998).

È necessario premettere che la prevenzione primaria si sta arricchendo delle possibilità suggerite dagli studi epidemiologici, che hanno rimarcato il ruolo della flora intestinale nella genesi della allergia (Matricardi et al. 2000).

Diverse voci si sono infatti levate a sottolineare la possibilità di influire sullo sviluppo di allergia mediante l'uso di fattori "di successo", piuttosto che con l'esclusione di fattori di rischio. Obiettivo di queste strategie è quello di modulare il sistema immune del lattante e, addirittura, della gestante, in modo da ottenere una *downregulation* della risposta TH2 od una *upregulation* della risposta TH1 (Warner et al. 2000).

Questo rappresenta un approccio alternativo alla prevenzione primaria alimentare basata sull'esclusione degli allergeni alimentari.

L'approccio "*proibizionista*", più conosciuto, e quello "*promozionista*" pongono l'accento su aspetti diversi della fisiologia del sistema immune.

L'approccio *proibizionista* evita gli allergeni alimentari in gravidanza ed allattamento e ritarda la introduzione di alimenti "allergizzanti" (latte vaccino, uovo ecc) dopo il sesto mese di vita.

Si propone di ridurre la frequenza di sensibilizzazione eliminando il contatto con gli allergeni o con i fattori adiuvanti, basandosi su una serie di studi prospettici che hanno identificato molti possibili fattori favorevoli allo sviluppo di una allergia alimentare. Possiamo dividerli in studi "non interventistici" (studi puramente epidemiologici) e studi "interventistici".

Dagli studi non interventistici sappiamo che, con qualche dubbio legato alla impossibilità di eseguire studi randomizzati su popolazioni alimentate al seno o no, l'allattamento materno ha un ruolo protettivo nei confronti del rischio di allergia alimentare (Høst et al. 1999) e che l'introduzione di latte in formula nei primi giorni di vita, in attesa della montata latte (Saarinen et al. 1999), è associata con lo sviluppo di allergia alle proteine del latte, come confermato da uno studio osservazionale che ha coinvolto diverse migliaia di bambini. Sappiamo anche che l'introduzione di cibi solidi prima del 4° mese di vita si associa con un elevato rischio di dermatite atopica fino all'età di 10 anni.

Studi interventistici sono stati eseguiti, peraltro, nel tentativo di ridurre la sensibilizzazione ad alimenti del bambino. Si è tentato di ottenere questo risultato mediante l'esclusione di alimenti potenzialmente allergenici dalla dieta materna durante la gravidanza, ma questi provvedimenti non si sono dimostrati in grado di sortire



alcun effetto sullo sviluppo di allergia alimentare nel bambino. Incidentalmente, quindi, l'unica proibizione sensata in gravidanza resta l'evitare il fumo (Asher et al. 2000).

Una recente Cochrane (revisione sistematica sull'efficacia) ha solo ipotizzato che l'impiego di una dieta oligoantigenica alle donne atopiche durante l'allattamento potrebbe ridurre il rischio di sviluppare dermatite atopica nel figlio allattato al seno (Kramer 2007).

L'età dello svezzamento è confermata al sesto mese, ma mancano osservazioni epidemiologiche longitudinali in grado di confermare l'effetto protettivo di una ritardata introduzione degli alimenti più allergizzanti (Fiocchi et al. 2006).

Approccio *promozionista*: promozione dell'allattamento al seno, probiotici, latte idrolizzato.

Misure di promozione della immunità del bambino sono in un certo senso patrimonio acquisito della prevenzione allergologica. La più ovvia è la promozione dell'allattamento materno esclusivo prolungato, che è una misura efficace sia nel neonato a termine che nel pre-termine.

È stato postulato che l'allattamento materno agisca diminuendo l'assorbimento di macromolecole allergeniche sia per il suo contenuto in fattori protettivi che per una più veloce maturazione della barriera intestinale. Tale idea trova conferme nella osservazione secondo cui un basso contenuto di IgA nel latte materno può condurre ad una difettiva esclusione di antigeni alimentari, predisponendo il bambino alle future allergie alimentari (Jarvinen et al. 2000).

Alcuni autori hanno sostenuto che la durata dell'allattamento materno è un fattore di rischio per dermatite atopica (Bergmann et al. 2002). Osservazioni come questa sono però gravate dall'effetto della causalità riversa. In poche parole il motivo per cui i bambini allattati al seno più prolungatamente avevano una maggiore probabilità di sviluppare la dermatite atopica non era indotto dall'allattamento al seno, ma dal fatto che le madri con familiarità atopica erano più motivate a prolungare l'allattamento al seno come fattore protettivo. La frequenza maggiore di dermatite atopica dipendeva dalla loro spiccata familiarità atopica e non dall'allattamento al seno. Subito dopo non sono mancate osservazioni che hanno rimarcato tale errore procedurale (Laubereau et al. 2004).

Da quando le ricerche epidemiologiche hanno puntualizzato che lo stile di vita "occidentale" è associato con l'aumento della allergia nelle ultime decadi, nuove strade si sono intraviste per la prevenzione della allergia alimentare.

Sulla base della durata e della intensità dello stimolo batterico, infatti, è stato ipotizzato che la flora intestinale rappresenti un fattore modulatore chiave per l'immunità contro l'atopia e lo sviluppo di malattia allergica e che la pressione antigenica persistentemente esercitata dai batteri che colonizzano il tratto gastrointestinale possa prevenire lo sviluppo di malattia allergica.

Peraltro una recente Cochrane ha puntualizzato che ci sono insufficienti evidenze per raccomandare l'uso dei probiotici nella prevenzione delle allergie alimentari (Osborn 2007).

Per quanto concerne l'utilizzo di formule estensivamente idrolizzate è stata confermata l'efficacia preventiva di tali formule in caso di mancanza o carenza del latte materno (von Berg et al. 2003) fino all'età di 6 anni.

Ovviamente, tutte le volte che si opterà per l'utilizzo, a scopo preventivo, di una formula estensivamente idrolizzata si dovrà tener conto dei costi, della palatabilità (l'idrolisi spinta porta infatti a modificazioni strutturali della componente proteica, con comparsa di aromi/sapori differenti, a volte percepiti come sgradevoli) e del vantaggio protettivo ottenibile, probabilmente, solo in un piccolo novero di bambini.

Dopo che è stata confermata la diagnosi, l'unica forma comprovata ed attualmente disponibile di trattamento profilattico è evitare del tutto l'alimento coinvolto (Taylor et al 1999).

I dati della letteratura internazionale evidenziano come la maggior parte delle reazioni anafilattiche ad alimenti avvengano in soggetti consapevoli della loro sensibilizzazione e rendono evidente la difficoltà di



attenersi a questa, solo in apparenza semplice, norma preventiva. Il cibo, infatti, presenta anche valenze legate all'affettività, alla vita sociale, lavorativa e ricreativa, e alla vita familiare dell'individuo che rendono complessa l'applicazione di rigide norme preventive. L'uso frequente di prodotti confezionati, di cibi esotici o comunque provenienti da altri Paesi aumenta il rischio di esposizione ad allergeni nascosti e non usuali.

Le peculiarità immunologiche e chimico-fisiche degli allergeni alimentari, come la loro maggiore o minore resistenza a calore e digestione, la cross reattività e/o il cross riconoscimento di strutture lineari o conformazionali, dovuto alla presenza di proteine omologhe in fonti diverse, rappresentano un rischio di esposizione inaspettata ad allergeni alimentari (Taylor et al. 2000).

I pazienti allergici al latte, che per il 50% presentano sensibilizzazioni alimentari dovute a cross reattività legate alla presenza di chitinasi di classe I, sono a particolare rischio di anafilassi da cibo per ingestione degli alimenti come banana, avocado, kiwi, castagna o altri.

Il rischio di contaminazione nella processazione degli alimenti in filiere commerciali, nel confezionamento e nella distribuzione di cibo nella ristorazione collettiva, ma a volte anche quella casalinga, è una delle sfide affrontate da chi soffre di allergia alimentare (Taylor et al. 2005).

La mancanza di consenso sulla dose soglia di allergene alimentare necessaria allo scatenamento della reazione, dovuta alla variabilità da cibo a cibo e da soggetto a soggetto, impone alla produzione industriale l'applicazione del principio di precauzione e quindi la riduzione della presenza di allergeni ai livelli più bassi tecnologicamente possibili.

Devono essere prese in considerazione anche situazioni particolari di rischio in cui inalazione e contatto con l'allergene alimentare o la presenza di patologie concomitanti, rappresentano un motivo di esposizione se non ad un allergene occulto, quantomeno ad un allergene alimentare inaspettato. È necessario, quindi, evitare anche le vie di esposizione diverse dalla ingestione.

I soggetti allergici all'uovo, oppure a pesci o molluschi possono reagire alle proteine aerosolizzate di questi cibi durante la cottura; gli allergici alle arachidi possono avere reazioni alla semplice apertura di una confezione. Le reazioni possono essere gravi ed addirittura fatali.

Sempre in soggetti particolarmente sensibili, sono state segnalate reazioni dovute al contatto con allergeni alimentari con il bacio e attraverso il liquido seminale. In questi casi è necessario evitare i luoghi a rischio, la mensa aziendale o scolastica, le case altrui, alcuni ristoranti ed osservare norme precauzionali severe e limitanti la vita di relazione.

Casi sporadici, ma non per questo meno gravi, sono stati segnalati nell'ambito di altre patologie: il ricevente di un trapianto allografico può acquisire specifiche sensibilizzazioni ad alimenti dal donatore d'organo. Sono state riportate reazioni anafilattiche a noccioline e noci in trapiantati di fegato, senza precedenti sensibilizzazioni ad alimenti. Con il trapianto di midollo osseo si possono acquisire allergie alimentari, inaspettate, del donatore.

La strategia vincente per evitare l'esposizione è basata su:

- identificazione precisa per ciascun paziente dell'alimento che ha causato la reazione
- riconoscimento degli allergeni cross-reattivi presenti in altri cibi
- educazione del paziente e dei caregivers sulle misure precauzionali necessarie ad evitare la esposizione ad allergeni nascosti
- educazione alla lettura delle etichette
- attenzione nel mangiare fuori casa.

L'ingestione di allergeni alimentari nascosti costituisce una delle più grandi sfide e pericoli con cui devono confrontarsi il paziente con allergia alimentare, il medico ed il dietista.

La lettura delle etichette, per quanto cruciale, si è dimostrata ancora recentemente non ottimale da parte del paziente e dei caregivers.



Allergeni occulti

Il fenomeno degli allergeni occulti è legato alla presenza in modo non esplicito di un allergene in un alimento, apparentemente non correlato al cibo verso cui è presente allergia; un esempio classico è rappresentato dalle guarnizioni di un dolce con gelatina di pesce (che a sua volta, potrebbe contenere tracce di proteine di altri animali).

La confezione industriale dei cibi ha enormemente amplificato la possibilità di reperire, in modo del tutto inaspettato, allergeni occulti (es: latte o soia nei salumi, caseina nel vino...) con lo scatenamento di reazioni verso cibi totalmente estranei ed apparentemente innocui rispetto alle sensibilizzazioni note. Inoltre, alcune pratiche tecnologiche tradizionali ammesse, come l'utilizzo di chiarificanti di origine animale per la preparazione di bevande alcoliche (vino e birra), hanno recentemente stimolato ricerche ed investigazioni scientifiche funzionali a definire se le proteine allergizzanti possano – o meno – residuare nel prodotto finito, e risultare – o meno - pericolose per gli individui allergici. Anche in questo caso, si parla di allergeni occulti o “nascosti”.

Il miglior modo di affrontare il problema degli allergeni occulti è il rispetto della legislazione armonizzata sulle procedure di etichettatura che mira a consentire l'esatta conoscenza degli ingredienti, compresi quelli minori. L'accuratezza di quanto dichiarato in etichetta è essenziale per il successo delle diete di eliminazione. Da indagini svolte su soggetti con allergia alimentare, emerge che la lettura delle etichette è considerata un problema serio, o molto serio, da una larga quota degli intervistati, che segnalano la frequente necessità di contattare direttamente le ditte produttrici per avere chiarimenti.

In particolare la mancanza di corretta indicazione sulla fonte di “spezie ed aromi”, l'aggiunta di nuovi ingredienti a prodotti già utilizzati non adeguatamente segnalata, la scritta in caratteri piccoli ed in diverse lingue sono stati fra i maggiori problemi segnalati dai pazienti.

L'allergene nascosto può essere presente in un cibo confezionato per molteplici ragioni, come errori di formulazione, errori di confezionamento, uso non dichiarato di basi pre-lavorate o riutilizzo di rimanenze, presenza di ingredienti provenienti da fonti dirette allergeniche, possibile carry over da additivi, coadiuvanti tecnologici e aromi (questi ultimi possono essere supportati su matrici di origine vegetale) ma in seguito anche a fenomeni di contaminazione accidentale a livello industriale, legati all'uso di filiere di produzione e/o confezionamento non separate adeguatamente.

La presenza di allergene “nascosto” determina, quando rilevata, il ritiro dal mercato del lotto del prodotto interessato; inoltre, l'utilizzazione non dichiarata di basi pre-lavorate provenienti da fonti allergeniche è già considerata una violazione delle norme vigenti.

Le domande chiave a cui bisogna ancora dare risposta per garantire la sicurezza alimentare sono:

- esiste una dose soglia di scatenamento per l'alimento allergenico o per gli ingredienti da esso derivati?
- l'esposizione a “basse dosi”, all'alimento o alle proteine allergeniche da esso derivate, può provocare una reazione allergica?
- tutti gli ingredienti provenienti da quell'alimento rappresentano un rischio per la vita di individui sensibilizzati?
- ci sono altre fonti nascoste di allergeni?

I livelli soglia non sono stati ancora determinati per la maggior parte degli allergeni alimentari, e quelli conosciuti, uovo, arachide e latte, possono variare, da individuo ad individuo, da pochi milligrammi a qualche grammo. Proprio per questa variabilità, al momento non è possibile basare su questo parametro le regole di etichettatura. Soltanto per l'anidride solforosa e i solfiti è indicato dalle disposizioni vigenti il limite di 10 mg/kg o 10 mg/l espressi come SO₂, il cui superamento implica l'obbligo di segnalazione in etichetta.

Il livello di rischio posto da ingredienti derivati da fonti allergeniche è legato alla quantità di proteine



allergeniche presenti nell'ingrediente stesso, alla natura della proteina ed al livello di uso dell'ingrediente nella formulazione dell'alimento. Gli oli altamente raffinati, anche se provenienti da fonti allergeniche come soia ed arachide, non rappresentano un rischio per la maggioranza dei soggetti allergici a soia ed arachide, in quanto contengono minimi livelli residui di proteina.

Alcuni prodotti contengono proteine idrolizzate.

Le proteine altamente idrolizzate sono significativamente sicure per la maggioranza dei consumatori allergici, mentre le proteine parzialmente idrolizzate, come è noto dall'esperienza dei latti per l'infanzia, possono rappresentare un problema. Il fatto che alcuni bimbi reagiscano anche a latti altamente idrolizzati sottolinea la significativa variabilità individuale.

È anche importante valutare il livello di utilizzazione: diversa è la situazione quando l'alimento è l'unica fonte di sostentamento, come nella prima infanzia, da quando è utilizzato in quantità minime come ingrediente aggiuntivo.

L'amido di grano e il lattosio sono ingredienti provenienti da fonti allergeniche, ma non sembra esservi un reale rischio per il consumatore. Non vi sono però sufficienti studi condotti in sottogruppi di pazienti con elevata sensibilizzazione che confermino la non nocività.

Regolamentazione della etichettatura nei vari Paesi

L'Europa e gli Stati Uniti hanno recepito negli ultimi anni le istanze delle associazioni di consumatori con AA e delle società scientifiche, promulgando leggi e regolamenti concernenti la etichettatura degli alimenti.

In Europa, la normativa riguardante gli allergeni alimentari è stata pubblicata nel 2003 (Direttiva 2003/89/CE di modifica alla Dir. 2000/13/CE relativa all'etichettatura, presentazione e pubblicità degli alimenti). È stata abolita la "regola del 25%", che esentava dalla segnalazione in etichetta i componenti di un ingrediente complesso (spezie, amidi, oli, ecc.) che non superasse il 25% della formulazione. In particolare tale Direttiva riporta nell'Annex IIIa una lista di ingredienti da indicare obbligatoriamente in etichetta, che sono: latte, uova, pesce, crostacei, arachidi, soia, frutta a guscio (mandorle, nocciole, noci comuni, anacardi, noci di pecan, noci del Brasile, pistacchi, noci del Queensland) e prodotti derivati sedano, senape, e sesamo. Molluschi e lupini sono stati aggiunti successivamente con la Dir. 2006/142/CE.

In seguito, nella Direttiva 2007/68/CE (recepita nell'ordinamento nazionale con l'articolo 27 della legge 88/2009) sono riportate le esenzioni dall'etichettatura per una serie di prodotti: sciroppi di glucosio a base di grano e di orzo; malto destrine a base di grano; cereali utilizzati per la fabbricazione di distillati o di alcol etilico di origine agricola per liquori ed altre bevande alcoliche; gelatina di pesce utilizzata come supporto per preparati di vitamine o carotenoidi; gelatina o colla di pesce utilizzata come chiarificante nella birra e nel vino; olio e grasso di soia raffinato; tocoferoli misti naturali (E 306); alpha-d-tocoferolo naturale anche a base di soia; tocoferolo acetato e succinato; fitosteroli e fitosteroli esteri derivati da oli vegetali a base di soia; estere di stanolo vegetale prodotto da steroli vegetali a base di soia; siero di latte e frutta a guscio utilizzati per la fabbricazione di distillati o di alcol etilico di origine agricola per liquori ed altre bevande alcoliche; lattitolo.

Il regolamento UE 1169/2011 del Parlamento Europeo e del Consiglio relativo alla fornitura di informazione sui prodotti alimentari ai consumatori (che sostituirà gradualmente le norme di etichettatura del DL 109/1992), prevede disposizioni importanti per quanto riguarda gli allergeni. In particolare stabilisce l'obbligo di evidenziare nella lista degli ingredienti gli allergeni presenti nei prodotti alimentari e rende obbligatoria la segnalazione della presenza dell'allergene nei prodotti non preimballati.

Negli USA la legislazione sull'etichettatura degli alimenti è in vigore dal gennaio 2006. Il Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act (FALCPA) ha reso obbligatorio dichiarare la fonte degli ingredienti derivati dagli allergeni alimentari più comuni (latte, uovo, pesce, crostacei e molluschi, soia, arachide, noci, farina).



La presenza in etichetta di una fonte allergenica deve essere sempre indicata nella lista degli ingredienti e nel caso di incertezze deve essere specificato in dettaglio l'alimento allergenico tra parentesi. Di seguito vengono riportati alcuni esempi di ingredienti non immediatamente riconoscibili e quindi corredati di una indicazione tra parentesi: caseinati (latte), lecitina (soia o uovo), sieroproteine (latte), ecc..

La formulazione dettagliata consente di guidare i consumatori e prevenire gli eventi avversi, ma può creare problemi di acquisto, in quanto alcune sostanze segnalate sono presenti in quantità non significative, come ad esempio, lecitina di soia ed amido di grano utilizzati nei processi di lavorazione industriale presenti solo in tracce e gelatina di pesce. Per quest'ultima, che contiene solo collagene, non parvalbumina, il rischio allergenico è diversamente valutato (teoricamente dovrebbe essere segnalato il nome del pesce da cui è estratta, creando inutile allarme del consumatore) (Hansen 2004 - Kuehn 2009).

Resta aperta la questione fondamentale che la regolamentazione riguarda solo gli ingredienti aggiunti intenzionalmente e resta comunque aperto il problema della presenza inaspettata di allergene alimentare, dovuta a contaminazione. Da controlli effettuati dalla FDA (Food and Drug Administration) in grandi stabilimenti di produzione alimentare è risultato che nel 25% dei casi esisteva la possibilità di una contaminazione allergenica, sebbene tutte le ditte fossero formalmente dotate di un programma di autocontrollo. Proprio per il timore della presenza di allergeni nascosti negli alimenti confezionati, un numero sempre maggiore di consumatori con allergia alimentare e le loro associazioni hanno richiesto informazioni concernenti le modalità di produzione.

In risposta, l'industria alimentare ha iniziato in maniera volontaria a segnalare in etichetta, oltre alla lista degli ingredienti obbligatori, informazioni sulla modalità di produzione. In alcuni casi la segnalazione rispecchia una vera attenzione al problema da parte della ditta ed è rispondente al vero, ma, purtroppo, nella maggioranza dei casi è utilizzata dai produttori per evitare sequele legali e non è rispondente alla reale presenza di allergeni alimentari.

Le diciture possono essere diverse: ad esempio nel Regno Unito la dicitura è *"da non utilizzare in soggetti allergici a ... (allergene)"*; in Canada *"può contenere...(allergene)"*. In Europa e negli USA vi sono tre varianti principali:

- può contenere...(allergene),
- prodotto in stabilimenti in cui viene utilizzato...(allergene),
- prodotto in filiere alimentari non separate, in cui viene processato anche...(allergene).

Queste segnalazioni precauzionali, aumentate sia in Europa che negli USA, invece di andare incontro alle esigenze dei consumatori hanno ribaltato il carico della responsabilità sull'acquirente del prodotto. Ciò ha creato una crescente frustrazione nei consumatori che si sono visti ulteriormente limitati ed in maniera inadeguata nella loro possibilità di acquistare e consumare alimenti sicuri.

Anche nella ristorazione collettiva, ad esempio quella scolastica, fascia d'età in cui la frequenza di allergia alimentare è maggiore, si è creata la necessità di verificare più del 50% dei prodotti normalmente in uso per la comparsa sulle confezioni di diciture precauzionali.

L'insicurezza attribuita ai prodotti derivanti dall'industria alimentare causa un aumento nell'opinione pubblica della quota di quanti attribuiscono all'allergia alimentare patologie per cui le evidenze sono scarse o nulle come colon irritabile, orticaria cronica, obesità. Ciò crea un'ulteriore difficoltà al paziente con allergia alimentare documentata per una distorta valutazione del rischio.

Ci sono stati, negli ultimi anni, grandi cambiamenti nella legislazione dell'etichettatura dei cibi e le informazioni per i consumatori con allergia alimentare crescono di conseguenza.

Non è stata però ancora raggiunta una semplificazione della possibilità di praticare una dieta di esclusione e con l'etichettatura *"precauzionale"* il carico della valutazione del rischio è stato ribaltato sul consumatore, creando insicurezza e frustrazione. D'altra parte va segnalato che, senza limiti di legge, le aziende si trovano



in oggettiva difficoltà.

L'obiettivo da raggiungere, mediante l'azione congiunta delle associazioni di consumatori con allergia alimentare e delle società scientifiche specialistiche, è quello di ottenere dal legislatore e dall'industria, etichette più consone alle reali esigenze del consumatore, la cui lettura permetta di verificare con certezza la non allergenicità di un prodotto.

L'EFSA (European Food Safety Authority) e altre organizzazioni scientifiche (ILSI Europe) stanno valutando i dati riportati in letteratura per arrivare a proporre soluzioni adeguate in merito alla dose minima o sul livello soglia in grado di scatenare una reazione negli individui più sensibili.

Informazione e formazione

L'AA per le sue manifestazioni peculiari, immediatezza ed imprevedibilità, necessita di una corretta informazione di tutta la popolazione per diffondere la consapevolezza delle problematiche connesse alla patologia e promuovere la formazione di coloro che operano nei vari ambiti in cui le reazioni allergiche si possono verificare, allo scopo di prevenirle e curarle.

- L'informazione, indirizzata alla popolazione generale, ha i seguenti punti chiave:
 - il corretto inquadramento dell'AA e la sua distinzione dall'intolleranza alimentare al fine di evitare paure infondate, ricorso a diagnostiche alternative non validate e sottovalutazione del rischio di anafilassi nei soggetti allergici
 - le dosi in grado di scatenare le reazioni allergiche possono essere anche di pochi microgrammi ed esiste una variabilità legata a fattori individuali o all'allergenicità dell'alimento
 - le reazioni allergiche si verificano più frequentemente quando i pasti vengono consumati fuori casa (scuola, pubblici esercizi)
 - la terapia delle AA è legata alla necessità di evitare l'ingestione dell'alimento allergenico
 - l'AA lede profondamente la qualità della vita del paziente
 - attualmente l'AA non ha alcun riconoscimento che tuteli almeno parzialmente il paziente.

A riguardo, sono auspicabili campagne informative mirate, con l'ausilio dei media, di società scientifiche, istituzioni e di associazioni di pazienti.
- L'informazione dei soggetti allergici, familiari/conviventi e la formazione delle persone addette all'assistenza domiciliare e sanitaria hanno come punti fondamentali:
 - consapevolezza della patologia e riconoscimento dell'alimento allergenico,
 - saper leggere ed interpretare correttamente un'etichetta dei prodotti alimentari
 - aderenza alla prescrizione della dietoterapia
 - conoscere le possibili cross reattività e la possibilità della contaminazione
 - conoscenza della terapia di emergenza, farmaci salvavita, in particolare dell'uso di auto-iniettori di adrenalina.

L'attuazione di quanto sopra è agevolata dal contatto facilitato con associazioni di pazienti.

- La formazione del personale dell'industria alimentare o della ristorazione collettiva dovrebbe riguardare non solo i principi di sicurezza alimentare e nutrizionale, ma anche quelli relativi alle problematiche connesse all'AA. Il personale deve divenire consapevole che la presenza, anche in piccole quantità, di un allergene nel cibo può determinare problemi anche gravi, persino fatali, quando ingerito da persona allergica a quella sostanza.

La formazione dovrebbe essere attuata da specialisti allergologi, o personale qualificato e con esperienza specifica; può iniziare già durante i corsi professionali, in particolare nella scuola alberghiera e deve comprendere, oltre alle nozioni generali, quelle necessarie per evitare la somministrazione di alimenti responsabili di reazioni, per fornire alternative mirate a ridurre limitazioni alla vita di relazione dei soggetti allergici e ai rischi connessi con il processo di produzione e distribuzione degli alimenti.





In particolare, nell'ambito dell'industria alimentare la formazione riguarda:

- la produzione, con norme di buona pratica per evitare la presenza di allergeni nascosti (per contaminazione, cross reattività o per errori grossolani)
- interventi mirati a sviluppare metodiche che portino a prodotti sicuri e facilmente riconoscibili da parte dei consumatori, ad evitare etichettatura precauzionale ("può contenere ..."), con vantaggio anche per la ditta produttrice.

A livello della ristorazione, il personale di cucina e di sala deve essere formato in merito al riconoscimento dei soggetti a rischio, alle metodiche per evitare la somministrazione del cibo allergenico utilizzando uno specifico piano d'azione e materiale informativo scritto.

Sarebbe opportuno divenissero requisiti cogenti la formazione degli addetti alla ristorazione sulle problematiche correlate agli allergeni alimentari e l'attuazione di verifiche, nell'ambito del piano di autocontrollo, per evitare la presenza di allergeni alimentari.

Un certificato di avvenuta formazione garantirebbe sia il ristoratore che l'utente da potenziali rischi.

Analogamente, un'adeguata formazione degli addetti alla distribuzione degli alimenti sfusi (supermercati, alimentari, bar, gelaterie...) sugli alimenti allergenici più rilevanti e sulle manifestazioni cliniche dell'AA, unitamente all'esposizione di liste degli ingredienti presenti negli alimenti distribuiti, contribuirebbero a migliorare la qualità di vita del soggetto allergico.

La partecipazione delle associazioni di categoria può portare allo sviluppo di modalità di buona pratica nella etichettatura e migliorare il rapporto con il consumatore.

L'ambito scolastico è uno dei più sensibili per l'AA; infatti la maggiore prevalenza della patologia nell'età infantile e la possibilità di ingerire un alimento allergenico durante la refezione scolastica determinano l'elevata frequenza di reazioni a scuola.

Un'adeguata formazione va rivolta a tutti gli operatori della ristorazione scolastica che devono conoscere gli allergeni alimentari, valutare l'etichettatura dei cibi ed attuare protocolli che consentano di evitare l'alimento allergenico (www.salute.gov.it *Linee di indirizzo nazionale per la ristorazione scolastica*). Devono essere fornite nozioni sul riconoscimento delle AA, deve essere stilato un piano di azione che preveda il riconoscimento dei soggetti a rischio, le norme preventive, procedure e terapia d'urgenza. Vanno individuati i soggetti in grado di somministrare i farmaci salvavita necessari alla risoluzione di eventuali reazioni, con specifica formazione sull'argomento.

A tale proposito sono già state sviluppate in vari Paesi europei linee guida per affrontare l'AA a scuola.

- Formazione del personale medico e paramedico: l'insegnamento di nozioni fondamentali sulle manifestazioni allergiche ed in particolare sulla anafilassi deve avvenire durante il corso di studio.

Ulteriore specifica formazione, attuata da specialisti allergologi e dietologi, o personale individuato qualificato e con esperienza specifica, deve essere indirizzata a tutti gli operatori coinvolti nella ristorazione ospedaliera e assistenziale. Particolare attenzione deve essere posta nella prenotazione, preparazione e distribuzione della dieta idonea per prevenire il rischio di somministrare un alimento allergenico, oltre agli interventi di emergenza in caso di ingestione casuale.

Il personale delle strutture dedicate alla medicina di urgenza, ospedaliera e territoriale, deve avere anche nozioni indispensabili per il riconoscimento e il trattamento delle gravi reazioni di AA.

Criticità

Oltre alle già citate difficoltà ad ottenere dati scientifici validati sulla dose soglia e alla presenza di allergeni occulti, o a fenomeni di contaminazione, si segnala una scarsa consapevolezza da parte del consumatore della funzione fondamentale dell'etichetta, spesso dovuta a difficoltà di lettura, etichetta multilingue e informazioni

riportate con caratteri di stampa piccoli.

Il Regolamento 1169/2011/CE relativo all'informazione dei consumatori introduce requisiti minimi di altezza dei caratteri tipografici e di visibilità delle diciture ai fini di una migliore comprensione da parte dei consumatori. I media ed internet sono mezzi di diffusione dei messaggi molto efficaci: la creazione di siti pubblici dedicati, ove sia reperibile la legislazione attuale e da dove sia possibile scaricare materiale informativo "*validato*", permetterebbe di controbilanciare messaggi non corretti e potenzialmente dannosi sull'argomento.

Il Ministero della Salute, attento alle esigenze dei cittadini, intende coordinare ed armonizzare gli interventi relativi non solo alla formazione nei vari ambiti, ma anche al miglioramento della qualità dei prodotti alimentari. L'intento è anche quello di pervenire ad una maggiore "*visibilità*" delle etichette con la collaborazione dell'industria alimentare, le società scientifiche di allergologia e immunologia clinica, gli istituti di ricerca, le associazioni dei pazienti e dei consumatori.





C

Metodi

C. 1 Metodi immunochimici e criticità

Attualmente vi sono diverse possibilità tecniche per la rivelazione di potenziali allergeni nei prodotti alimentari. I metodi impiegati hanno come target l'allergene vero e proprio (proteina) oppure un marker che indica la presenza dell'alimento allergizzante. Come markers sono utilizzati proteine specifiche o frammenti di DNA. I metodi basati sull'analisi delle proteine, solitamente, prevedono dei protocolli di rivelazione immunochimici quali radio-allergosorbent test (RAST), enzyme allergosorbent test (EAST), e enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Metodiche non usate di routine sono la rocket immuno-electrophoresis (RIE) e l'immunoblotting. Mentre RIE e immunoblotting forniscono solamente risultati qualitativi o semi-quantitativi, RAST, EAST e ELISA sono utilizzabili come metodi quantitativi (Poms et al. 2004; van Henghel 2007).

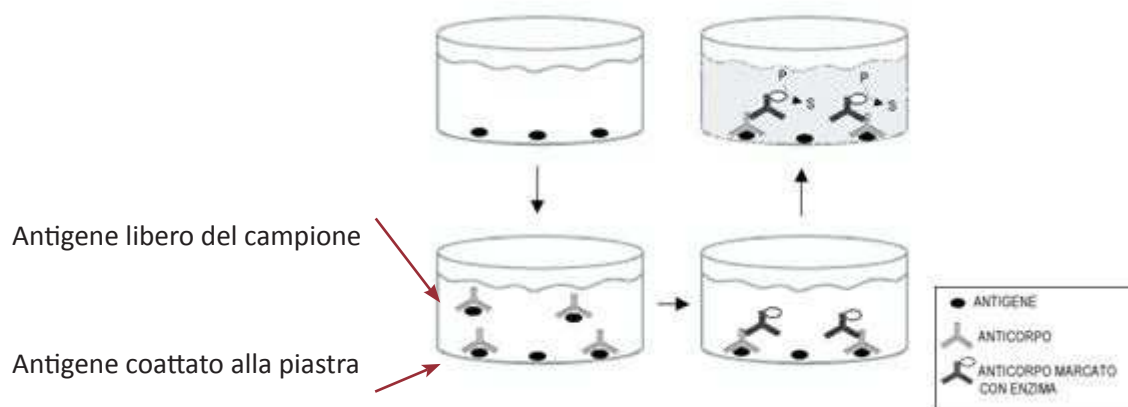
Attualmente la tecnica ELISA è il metodo più comunemente utilizzato nell'analisi di routine degli alimenti da parte dell'industria alimentare e dei laboratori coinvolti nel controllo ufficiale. Numerosi metodi ELISA sono stati sviluppati per la rivelazione di diversi allergeni alimentari e numerosi kit commerciali sono diventati disponibili nel corso degli ultimi anni (Schubert-Ulrich et al. 2009).

Nei test ELISA la presenza di allergeni o delle proteine marker specifiche (antigeni) viene rilevata mediante la formazione di un complesso con uno specifico anticorpo. La concentrazione del complesso antigene-anticorpo viene quindi determinata misurando l'assorbanza di un prodotto colorato generato dalla reazione di un secondo anticorpo, marcato con un enzima in grado di reagire con uno specifico substrato, e stimata utilizzando una curva di calibrazione generata con standard di riferimento purificati.

Sono disponibili due diversi approcci ELISA: competitivo e sandwich, con rivelazione diretta o indiretta.

I test ELISA competitivi utilizzano prevalentemente la rivelazione indiretta (**Figura 3**): l'antigene purificato legato in fase solida e l'antigene presente nell'estratto del campione da analizzare competono tra di loro per il legame con un anticorpo specifico; la quantità del complesso che si forma tra l'antigene legato e l'anticorpo specifico, sarà inversamente proporzionale alla quantità di antigeni presente nel campione; la rivelazione del complesso antigene-anticorpo formatosi viene effettuata mediante l'aggiunta di un anticorpo secondario, coniugato con l'enzima.

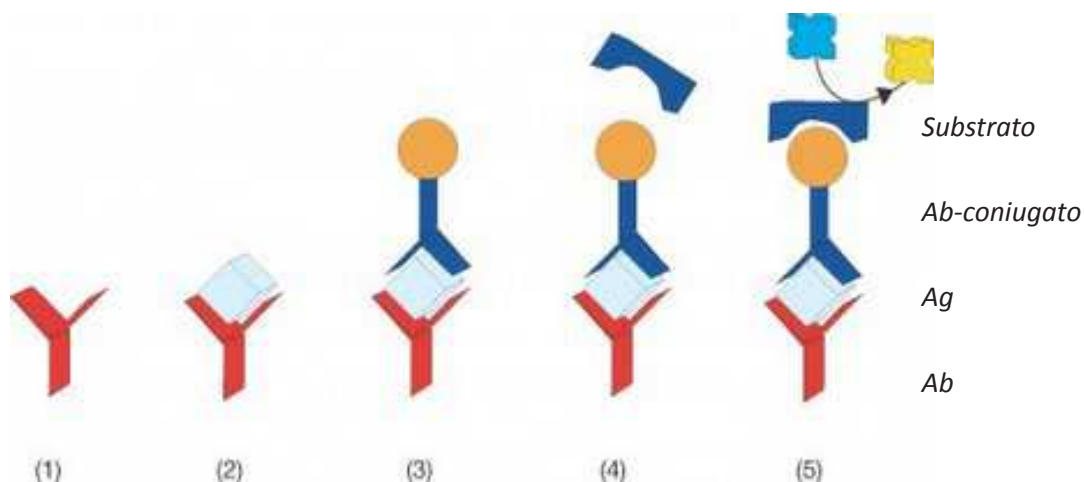
Figura 3 – Rappresentazione schematica del Test ELISA competitivo indiretto





I test ELISA sandwich utilizzano prevalentemente la rivelazione diretta (**Figura 4**): l'antigene di interesse presente nell'estratto del campione viene catturato da uno specifico anticorpo legato in fase solida; la quantità del complesso che si forma tra l'antigene e l'anticorpo legato, sarà direttamente proporzionale alla quantità di antigene presente nel campione; la rivelazione del complesso antigene-anticorpo formatosi viene effettuata mediante l'aggiunta di un secondo anticorpo specifico nei confronti dell'antigene, coniugato con l'enzima (Schubert-Ullrich et al. 2009).

Figura 4 – Protocollo sperimentale per la ricerca degli allergeni mediante metodo ELISA sandwich



1. Anticorpo (Ab) per lo specifico antigene ricercato (Ag) coattato nella piastra
2. Aggiunta del campione e formazione del legame Antigene-Anticorpo
3. Aggiunta del secondo anticorpo specifico per altra porzione dell'antigene, coniugato con enzima
4. Aggiunta del substrato
5. Trasformazione del substrato con cambio di colore

I kit commercialmente disponibili per la determinazione degli allergeni utilizzano prevalentemente la tecnica sandwich con rivelazione diretta.

I metodi ELISA presentano diversi vantaggi tra cui la relativa semplicità d'uso, tempi brevi di analisi e alta sensibilità. Inoltre, nella maggior parte dei casi, i risultati ottenuti con lo stesso estratto del campione in esame e lo stesso kit presentano una buona riproducibilità. Quando invece con kit diversi si analizza lo stesso campione, i risultati possono essere molto dissimili. Questa difformità è legata a diversi fattori critici.

Estrazione

La procedura di estrazione dovrebbe essere in grado di consentire una estrazione efficiente delle proteine target (allergeniche o marker) da tutti gli alimenti che le possono contenere, minimizzando al contempo l'estrazione di altri componenti della matrice che possano interferire con il saggio. Dovrebbe inoltre essere applicabile sia all'alimento tal quale, che al prodotto alimentare sottoposto a trattamenti tecnologici, che possano eventualmente modificare le caratteristiche delle proteine target.

La solubilità delle proteine nei tamponi di estrazione può infatti modificarsi in seguito ai diversi trattamenti tecnologici cui può essere sottoposto l'alimento, quali trattamenti termici, idrolisi, fermentazione ecc. A causa della diversità strutturale delle varie proteine target, sia native che modificate, soluzioni di estrazione con uno specifico pH e forza ionica ad una data temperatura saranno più efficienti nell'estrazione di un tipo di proteine



piuttosto che di un altro. Studi condotti sull'argomento evidenziano come diversi tamponi di estrazione possano non solo influire sulla quantità ma anche sulla qualità delle proteine estratte, soprattutto nel caso di alimenti sottoposti a trattamenti tecnologici (Westphal et al. 2004; Poms et al. 2004).

Infine, data l'estrema complessità delle matrici alimentari, possono essere presenti nell'alimento alcune sostanze in grado di influire negativamente sull'estrazione delle proteine target dal campione (Taylor 2009).

Al momento attuale non esiste alcun tampone di estrazione universale e quindi è necessario effettuare una valutazione caso per caso. Recentemente è stato proposto l'uso di tamponi contenenti sodiododecilsolfato (SDS) e mercaptoetanolo per estrarre le proteine modificate dal trattamento termico e dalle alte pressioni per diversi tipi di allergeni (latte, uovo, frumento, grano saraceno, arachide, soia e crostacei) in differenti matrici alimentari (Matsuda et al. 2009).

Una procedura di estrazione non adeguata può determinare la comparsa di falsi positivi (estrazione di componenti della matrice in grado di causare interferenze nel dosaggio immunochimico), ma più frequentemente di falsi negativi dovuti ad una estrazione insufficiente delle proteine target, soprattutto nel caso di alimenti processati.

Specificità anticorpi

I test ELISA utilizzano, per la rivelazione della presenza degli allergeni, anticorpi mono o policlonali il cui target può essere una singola proteina o proteine multiple. Gli anticorpi sono in grado di riconoscere l'allergene legandosi a specifici siti della molecola (epitopi) (Hefle et al. 2006). Tuttavia nel caso di modificazioni della struttura delle proteine l'affinità di legame può ridursi ed è quindi importante verificare se l'anticorpo sia in grado di riconoscere le proteine modificate per evitare una elevata incidenza di falsi negativi.

Va inoltre considerato che gli anticorpi utilizzati nel test possono dar luogo a reazioni crociate con altri componenti della matrice alimentare o con proteine con caratteristiche simili, dando luogo a falsi positivi (van Henghel 2007).

Gli anticorpi policlonali solitamente riconoscono epitopi multipli e essendo più tolleranti a piccole variazioni della struttura dell'antigene, possono essere preferibili quando l'antigene è modificato, come nei trattamenti tecnologici. Gli anticorpi monoclonali legano un solo epitopo dell'antigene e quindi sono raramente responsabili di reazioni crociate, viceversa risentono notevolmente di eventuali modifiche del sito di legame dovuto ai trattamenti tecnologici (Taylor 2009; Hefle et al. 2006).

Va comunque evidenziato che le alterazioni delle proteine allergeniche dovute ai trattamenti tecnologici non ne riducono necessariamente il potenziale allergenico. Infatti alcuni trattamenti possono alterare la struttura tridimensionale delle proteine esponendo epitopi nascosti o portare alla modificazione di proteine e peptidi con formazione di nuove strutture dotate di attività allergenica.

Standard di calibrazione e materiali di riferimento

I risultati dei test ELISA sono influenzati dalla natura degli standard utilizzati per costruire le curve di calibrazione. È quindi necessario conoscere con precisione le caratteristiche degli standard utilizzati nel saggio, come sono stati ottenuti, se derivano da materiali grezzi o processati e come sono stati estratti o purificati. È inoltre molto importante identificare come vengono espresse le concentrazioni degli standard di calibrazione, cioè se le unità si riferiscono all'alimento intero o al contenuto proteico o a singole frazioni proteiche.

È anche indispensabile conoscere con chiarezza come è stata elaborata la curva di calibrazione. Infatti poiché la curva di calibrazione ottenibile con i test ELISA è solitamente di tipo sigmoidale e poiché questo tipo di curva fornisce risultati affidabili solo nel tratto lineare, sono stati proposti diversi tipi di elaborazioni matematiche



(Immer 2006).

Poiché i vari saggi ELISA disponibili utilizzano spesso materiali di calibrazione diversi, di fondamentale importanza risulta la disponibilità di idonei materiali di riferimento certificati che possano essere utilizzati per preparare o confrontare tra loro gli standard di calibrazione e per effettuare la fortificazione di campioni per le prove di recupero (Poms 2006).

Al momento attuale c'è una carenza generale di materiali di riferimento idonei, i pochi disponibili sono rappresentati dal Materiale IRMM – 481 Peanut Test Material Kit, costituito da diverse varietà di arachidi tal quali o sottoposte a diversi trattamenti tecnologici e da alcuni materiali di riferimento NIST per l'uovo, il latte e l'arachide. La polvere d'uovo (NIST RM 8445) è il primo materiale di riferimento NIST prodotto specificamente per la determinazione degli allergeni alimentari. Per l'arachide il materiale suggerito è il burro di arachide (NIST RM 2387) in sospensione. Sebbene questi materiali non siano stati prodotti specificamente per essere usati in metodi per la determinazione degli allergeni, sembrano aver prodotto risultati soddisfacenti in diversi studi di validazione (Abbott et al. 2010).

Limite di rivelazione (LOD) e di quantificazione (LOQ)

La maggior parte dei saggi ELISA è in grado di evidenziare la presenza di allergeni anche a livelli molto bassi. Ciò non rappresenta sempre un vantaggio: dal punto di vista della tutela dei consumatori allergici, la sensibilità dei test ELISA dovrebbe essere basata sulle dosi soglia stabilite per l'alimento allergizzante. Non c'è infatti necessità di spingere la sensibilità oltre i limiti necessari ad assicurare la salute dei consumatori allergici, altrimenti si potrebbe verificare una eccessiva riduzione del numero di prodotti alimentari ritenuti sicuri per il consumatore, riducendone la qualità della vita senza alcun vantaggio per la salute (Taylor 2009).

I valori di LOD e LOQ riportati nei vari test ELISA non sono in alcuni casi definiti in modo chiaro cioè, se sono stati ottenuti a partire dai dati di assorbanza dei tamponi di diluizione, da estratti di matrici esenti dall'analita ecc, nè quale è stata la procedura per il calcolo. Molto spesso il LOQ corrisponde semplicemente alla concentrazione dello standard più diluito della curva di calibrazione.

Recupero

Per valutare l'esattezza del dato fornito dai test quantitativi è necessario effettuare studi di recupero utilizzando matrici alimentari fortificate con l'allergene e testando numerose matrici alimentari differenti, sulla base degli usi noti dell'allergene stesso.

Idealmente per questo tipo di verifica dovrebbero essere utilizzati esclusivamente i cosiddetti "incurred sample", cioè campioni in cui una quantità nota di allergene viene incorporata nel prodotto durante la preparazione tecnologica, mimando quanto più possibile le condizioni reali della produzione. Sfortunatamente, questo tipo di campioni non è semplice da ottenere e presenta anche costi più elevati, di conseguenza molto più frequentemente vengono utilizzati gli "spiked samples" in cui l'allergene alimentare viene aggiunto alla matrice di interesse dopo la preparazione.

Questo tipo di campioni può dar luogo a recuperi artificialmente elevati in quanto non tiene conto delle eventuali modifiche subite dalle proteine sottoposte a trattamento (Taylor 2009; Abbott et al. 2010). Di conseguenza alcuni organismi di controllo sono restii ad approvare validazioni in cui non siano inclusi dati generati con incurred samples preparati con l'aggiunta di quantità note e controllate di materiali di riferimento per l'allergene target. Ad ogni modo sia l'AOAC che gli esperti del Allergen Working Group del network MoniQA hanno ritenuto accettabile l'utilizzo degli spiked samples, anche se sono i meno rappresentativi della situazione reale (Abbott et al. 2010).



Espressione dei risultati

I risultati ottenuti con i test ELISA possono essere espressi come alimento intero, come proteine totali o solubili o come proteina specifica. Ad esempio nel caso dell'arachide i risultati vengono solitamente espressi come arachide, come proteine totali o solubili o come specifica proteina allergizzante (es. *Ara h1*) ; nel caso del latte come latte in polvere scremato o come beta-lattoglobulina o caseina. Ovviamente il risultato espresso secondo una di queste basi differirà notevolmente dagli altri. Dal punto di vista della tutela della salute pubblica l'espressione dei risultati come mg di alimento allergizzante per kg di derrata alimentare è probabilmente il più appropriato, in quanto i valori soglia sono solitamente studiati come quantità di alimento tollerabile.

La Norma Europea UNI EN 15633-1 dell'aprile 2009, relativa alla ricerca di allergeni alimentari mediante metodi immunologici, stabilisce che i risultati debbano essere espressi in termini di quantità totale di alimento allergenico (mg/kg) o in termini di proteina, con un idoneo fattore di conversione che ne consenta la trasformazione in peso totale di alimento allergenico (Norma Europea UNI EN 15633-1. 2009).

Talvolta l'individuazione di un appropriato fattore di conversione è ragionevolmente semplice: è questo il caso di alimenti il cui contenuto proteico è sufficientemente definito e con una variabilità contenuta. Per altri alimenti il contenuto proteico è definito meno bene e risulta anche molto variabile all'interno delle diverse varietà, di conseguenza determinare un idoneo fattore di conversione può essere più difficile (es. semi di senape o farina di senape o proteine solubili della senape). Nel caso in cui i risultati siano espressi in termini di una specifica proteina (es. *Ara h 1*) il problema può risultare ancora più complesso per mancanza di dati al riguardo (Taylor 2009).

Un altro problema connesso all'uso di fattori di conversione, evidenziato in alcuni studi, è che il rapporto tra proteine immunochimicamente stabili e alimento allergenico può essere alterato dai trattamenti tecnologici soprattutto nei prodotti altamente processati (Westphal 2004).

C. 2 Metodi di biologia molecolare e criticità

Metodi molecolari PCR-based e criticità

La tecnica di amplificazione del DNA genomico totale di un alimento attraverso la reazione a catena della polimerasi (PCR) permette di ottenere marcatori molecolari specifici funzionali non all'identificazione "diretta" dell'allergene (come nel caso dell'ELISA e della tecniche di massa), ma piuttosto all'identificazione dei geni che codificano per lo stesso (o di altri geni marker che permettono di dimostrare la presenza specifica degli organismi che potenzialmente apportano il rischio). Si tratta quindi di un approccio *indiretto*. La PCR, ideata da K. Mullis, premio Nobel nel 1993, permette di ottenere *in vitro* in tempi brevi la sintesi di uno specifico frammento di DNA a doppia elica, definito amplicone. La PCR, attraverso reazioni enzimatiche controllate a differente temperatura, consente tre fasi:

1. apertura della doppia elica del DNA template,
2. riconoscimento e attacco dei primer (sequenze di innesco) sugli specifici siti complementari (fase di annealing),
3. estensione dei primer per opera di una DNA polimerasi termoresistente.

L'enzima agisce in presenza di nucleotidi utilizzati per sintetizzare ex novo una copia del frammento compreso fra i siti di annealing dei primer stessi, portando alla produzione di un amplicone specifico per quella entità biologica. La reazione viene quindi ripetuta ciclicamente, consentendo un'amplificazione esponenziale del numero dei frammenti prodotti nel tempo (Mullis et al. 1992). Il numero dei cicli di amplificazione



(generalmente compreso tra 30 e 40) porta l'amplificazione alla saturazione, con una cinetica tipica per ogni reazione di amplificazione e dipendente dai parametri di reazione. Non è quindi strategico prolungare la reazione oltre i 40-45 cicli per aumentare la resa di amplificazione; conviene piuttosto ottimizzarne i parametri (concentrazione DNA template e suo grado di purezza; concentrazione di nucleotidi e di magnesio cloruro o di altri adiuvanti specifici; scelta della DNA polimerasi più performante per il sistema, etc) (Saunders & Parkes 1999).

La tecnica di amplificazione del DNA applicata all'identificazione di ingredienti allergenici può essere usata nelle sue principali varianti:

- End point PCR (o PCR qualitativa) permette di identificare la presenza di un organismo (anche in traccia o come ingrediente nascosto) ma non la sua quantificazione;
- Real time PCR (PCR quantitativa o qPCR) permette la detection in tempo reale del DNA amplificato ed anche la sua quantificazione, utilizzando un sistema di riferimento per la costruzione di una retta di taratura, attraverso l'uso di DNA genomico purificato (o meglio di plasmidi appositamente modificati inserendo le stesse sequenze target riconosciute dai primer). Questi materiali dovrebbero essere utilizzati come standard di riferimento, risultando fondamentali ai fini della qualità e dell'accettabilità del risultato. La Real time PCR sfrutta la capacità di una sonda a DNA marcata di riconoscere una specifica sequenza genica sonda ad ogni ciclo di amplificazione, permettendo, inoltre, di raggiungere una sensibilità significativamente migliore rispetto alla End point PCR.
- Esistono diverse tipologie di sonde marcate, ma la chimica più comune resta ad oggi il sistema che sfrutta una sonda in grado di riconoscere e legarsi alla sequenza genomica compresa fra i siti di annealing della coppia di primer utilizzati (detti forward e reverse) (chimica TaqMan®), nonché un sistema di rilevamento del segnale di fluorescenza emesso dalla stessa quando viene allontanata dal complesso molecolare formatosi (indicando quindi la produzione di un amplicone).

L'uso di sistemi "semplificati" di marcatura, come la tecnica basata sull'uso dell'intercalante SYBR Green®, applicabile quando la specificità della reazione è certa ed è possibile riconoscere l'amplicone specifico mediante la temperatura di melting, seppure non comune, permette di ridurre sensibilmente i costi e la complessità della tecnica, eliminando la necessità della sonda (D'Andrea et al. 2009; Pafundo et al. 2009). La PCR, in un'altra variante, può essere utilizzata per identificare nella stessa reazione più target contemporaneamente, situati sullo stesso genoma/organismo (linked multiplex PCR) o su genomi/organismi diversi (not linked multiplex PCR). L'applicazione di un protocollo multiplex PCR può risolversi in un risparmio sia temporale che economico, permettendo di razionalizzare l'uso delle componenti necessarie alla reazione (risparmio di DNA polimerasi e di nucleotidi). La multiplex PCR richiede l'uso di due o più coppie di primer compatibili fra loro (principalmente non in grado di creare dimeri riconoscendosi a vicenda, o strutture secondarie particolari in grado di limitare o annullare l'annealing). Il primer design è fondamentale in tutte le applicazioni della PCR, ma in particolar modo nella multiplex PCR (Altshuler 2006). I protocolli di amplificazione "multiplex" per la detection di organismi allergenici in letteratura non sono molti, in particolare quelli basati sulla multiplex Real time PCR. L'amplificazione di una specifica sequenza singola, sia in End point PCR che in Real time PCR, sono preferibili per la maggior specificità e sensibilità (Schoringhumer et al. 2009). Nel caso delle reazioni *multiplexed*, quindi, diventa fondamentale il "bilanciamento" delle componenti di reazione (in particolare delle coppie di primer, spesso caratterizzate da rese di amplificazione diverse) per evitare la competizione nell'uso dei nucleotidi e bilanciare la resa. Nel caso della multiplex Real time PCR, si utilizzano sonde marcate con fluorocromi diversi, identificabili simultaneamente dal sistema di rilevamento.

La sensibilità dei termociclatori è correlata all'uso di tecniche di rilevamento diverse (laser, diodi); alcune varianti tecnologiche hanno permesso di velocizzare la PCR, sfruttando l'uso di capillari in vetro in luogo dei microtubi di plastica. In genere, in un tempo compreso fra una e due ore è possibile ottenere il risultato



dell'analisi, sia in End point che in Real time PCR.

Una bassa resa di amplificazione è correlabile a diversi fattori, in particolare a:

- diversa facilità dei primer di identificare una sequenza singola o sequenze genomiche ripetute (es. amplificazione del DNA ribosomale, ripetuto a "cluster" nel genoma);
- scarsa qualità e purezza del DNA genomico estratto;
- presenza di inibitori della DNA polimerasi, es. polifenoli, lipidi...).

Nel caso di bassa resa di amplificazione nell'approccio qualitativo, può essere utilizzata la "nested PCR", che consiste nel ri-amplificare l'amplicone in traccia ottenuto da una reazione PCR utilizzando una seconda coppia di primer, disegnati per amplificare una regione interna a quella identificata dalla prima coppia. Si migliora così la resa di amplificazione, rendendo "visibile" l'amplicone (Saunders & Parkes 1999; Altshuler 2006).

Il miglioramento della sensibilità della End point PCR qualitativa può anche essere ottenuto attraverso l'uso della tecnologia Lab-on-chip® (microelettroforesi in fase liquida in chip), alternativamente alla corsa elettroforetica su gel di agarosio; con lo stesso approccio si ottimizza la ripetibilità delle corse elettroforetiche, seppure a fronte di un aumento dei costi (Coisson et al. 2010). Questo approccio permette un dosaggio semi-quantitativo delle bande, ed è particolarmente utile nella detection di profili multibanda, semplificando la comparazione fra profili (campioni) diversi, nonché permettendo di stabilire un valore soglia di rilevabilità. Per facilitare l'identificazione via PCR del DNA di un organismo che potenzialmente (e non necessariamente) "veicola" gli allergeni, può essere strategico utilizzare come target sequenze ripetute nel genoma (Dovicovicova et al. 2004), facilitando inoltre l'incremento della resa di amplificazione. Anche in questo caso, la condizione *sine qua non* resta la specificità dell'amplicone per il riconoscimento dell'organismo, magari anche mediante polimorfismo di taglia. L'amplificazione di geni diversi codificanti diversi allergeni caratteristici di uno stesso organismo (es. Cor a 1, Cor a 8, Cor a 14 per nocciola) può portare a rese di amplificazione diverse, rendendo fondamentale la fase di disegno sperimentale e la selezione delle sequenze marker (D'Andrea et al. 2010).

Seppure l'ELISA sia, per industria ed Enti preposti ai controlli istituzionali, la tecnica più comunemente utilizzata nel controllo degli alimenti, sono numerosi i protocolli PCR che permettono la rivelazione di ingredienti allergenici. Gli organismi più frequentemente studiati negli ultimi anni sono stati il frumento, l'arachide e la nocciola, seguiti - a buona distanza - da sesamo e soia. Tutte le specie ed i gruppi di alimenti riportati nelle norme vigenti sono rappresentati in letteratura. Nel caso delle specie più studiate sono state numerose le sequenze target sfruttate per l'identificazione specie-specifica; non necessariamente le sequenze di annealing dei primer sono allocate sui geni codificanti per gli allergeni (maggiori o minori).

La PCR, nonostante i vantaggi caratteristici (in particolare la specificità di reazione) presenta, come l'ELISA, alcune criticità: la scarsa riproducibilità inter-kit ottenibile da kit pre-allestiti diversi, la complessità richiesta nella fase di estrazione, spesso condizione necessaria per allontanare - in modo specifico per ogni matrice alimentare - gli inibitori di reazione presenti nelle matrici complesse e termizzate.

Estrazione

La procedura di estrazione e purificazione del DNA genomico totale dagli alimenti è critica per la buona riuscita dell'amplificazione PCR. Purtroppo non esiste un metodo universale applicabile alle diverse matrici alimentari. Composizione chimica, tecnologie di trasformazione e stabilizzazione degli alimenti (alte pressioni, alte temperature) possono risultare critiche rendendo difficile l'amplificazione.

L'impatto della temperatura può portare alla neoformazione di sostanze con capacità inibente, es. melanoidine per lo sviluppo delle reazioni di Maillard; il DNA genomico può essere degradato termicamente, fatto per cui è sempre conveniente il controllo della sua integrità mediante pre-amplificazione di una sequenza universale (ad esempio i geni ribosomali, che possono anche essere utilizzati come controllo positivo interno di amplificazione



per il controllo dei falsi negativi) (Coisson et al. Food Res. Int. 2010). Questo approccio è richiesto anche nella norma UNI dedicata, come si riporta di seguito. Protocolli di estrazione diversi (tamponi di estrazione con composizione diversa, sistemi di clean-up del DNA genomico) portano a risultati diversi sia in quantità che in purezza (Di Bernardo et al. *Biotechnology Progress*. 2007). Anche la consistenza delle matrici può influenzare la resa di estrazione. Pur non essendo possibile indicare un protocollo universale, il protocollo di estrazione generico può essere ricondotto all'uso di:

- una fase di omogeneizzazione e riduzione del campione, meglio previo congelamento in azoto liquido,
- un sistema di estrazione del DNA genomico in un tampone, generalmente contenente un tensioattivo per disgregare le membrane cellulari,
- un sistema di purificazione basato su tecniche cromatografiche in microtubo e/o sistemi a microsfera per l'adsorbimento di sostanze estranee o dello stesso DNA genomico, seguito da
- precipitazione selettiva del DNA genomico totale con alcoli (isopropanolo assoluto a freddo).

L'ormai "classico" protocollo di estrazione basato sulle miscele fenolo-cloroformio oggi tende ad essere abbandonato e sostituito con altri sistemi di estrazione, principalmente a causa della tossicità delle componenti utilizzate nel protocollo classico. Il protocollo generico descritto - in particolare la composizione del tampone di estrazione - può essere modificato a seconda della "difficoltà" della matrice, anche utilizzando ausiliari di estrazione per eliminare le componenti in grado di inibire la PCR (es. il polivinilpirrolidone, PVP, funzionale all'eliminazione dei polifenoli dalle matrici complesse). Altre strategie, come l'uso di sostanze riducenti che bloccano la polimerizzazione ossidativa dei fenoli durante l'estrazione, possono essere importanti nella fase di ottimizzazione dell'estrazione. Molti dei protocolli per l'estrazione del DNA da matrici vegetali considerate "difficili" prevedono l'uso di tamponi TRIS-EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) modificati con CTAB (cetiltrimetilammonio bromuro). Una procedura di estrazione non adeguata ed il mancato controllo della qualità del DNA genomico totale estratto può portare alla comparsa di falsi negativi, come già evidenziato per i saggi ELISA.

Questo fatto è critico in particolare nel caso di alimenti processati cotti e soggetti a trattamenti ad alta temperatura (es. roasting), sia per la degradazione del DNA che per la sua insolubilizzazione, oltre che per la formazione di inibitori di reazione (Stephan & Vieths 2004). Un ulteriore problema è poi da identificarsi nell'estrema rarità del DNA in alcune matrici alimentari, fatto che comporta una concentrazione estrema del campione. È il caso del DNA che residua nel vino, dopo chiarificazione e filtrazioni. L'uso di coadiuvanti tecnologici ed additivi di origine animale (colle di pesce, gelatine animali, proteine di uovo...) potrebbe comportare la potenziale presenza residua in traccia di allergeni nascosti nel vino. Tale problematica, attuale e oggetto di vari studi (Weber et al. 2010), comporta la necessità di ottimizzare i protocolli di estrazione, concentrazione ed amplificazione del DNA residuo, non ancora disponibili né commercializzati alla data della stesura di questo documento.

Specificità

I metodi basati sull'amplificazione del DNA via PCR sono ritenuti *specifici*, fornendo uno strumento sensibile per l'identificazione di ingredienti allergenici in traccia come ingredienti "nascosti" negli alimenti. Trattandosi tuttavia di metodi indiretti, essi non permettono l'identificazione della presenza della proteina allergenica. Le metodiche PCR, quindi potrebbero essere più propriamente suggerite come tecnica di screening pre-ELISA. Nonostante l'alto grado di specificità, anche la PCR, al contrario di quanto comunemente ritenuto, è a volte soggetta a fenomeni in grado di annullare la sua versatilità. La maggior termoresistenza del DNA genomico nei confronti delle proteine (più facilmente denaturabili) in genere (ma non sempre!) porta a considerare i test PCR più robusti. La termodegradazione del DNA o la sua complessazione ad altre macromolecole che lo



rendono non estraibile, quindi, sono fattori da considerare soprattutto nelle matrici cotte, fritte o arrostiti ad alta temperatura (es. roasting di frutta a guscio e secca come nocciole ed arachidi). Questo può comportare una sottostima del valore reale nella quantificazione (Scaravelli et al. 2008). L'identificazione del DNA non è comunque direttamente correlabile con la presenza né con l'attività degli allergeni eventualmente presenti nella matrice alimentare: il DNA può essere degradato o non amplificabile (risposta PCR negativa) e gli allergeni no (risposta ELISA positiva), come pure il contrario. I risultati delle metodiche PCR ed ELISA, quindi, non sono direttamente confrontabili fra loro.

La scelta della sequenza target e la fase di disegno dei primer sul DNA genomico sono fondamentali per un esito positivo e per la specificità di reazione. Esistono particolari linee guida per la scrittura di primer e sonde per Real time PCR efficienti, come pure software utilizzabili liberamente sul web, utili per selezionare i primer su specifiche sequenze di DNA fornite dall'operatore, ottenute da banche dati pubbliche o da esperimenti di sequenziamento del DNA (es. <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). La specificità a diversi livelli (genere, specie, sub-specie) dipende dalle regioni genomiche considerate e dal primer design, ed è conseguenza della naturale biodiversità in natura. Variazioni della temperatura di annealing dei primer, così come della concentrazione dell'adiuvante di amplificazione, cloruro di magnesio, possono influenzare la specificità della reazione (oltre che la sensibilità), portando alla comparsa di falsi positivi o negativi. È quindi fondamentale l'uso di controlli positivi e negativi per valutare la specificità, prima di effettuare la validazione del metodo ed analisi. La comparsa di falsi positivi in PCR può essere anche correlata a cross-contaminazione durante l'allestimento delle analisi, anche se questo fatto dovrebbe essere eliminabile e rientrare nel normale controllo qualità delle operazioni analitiche.

Il prodotto di amplificazione (End point PCR) è generalmente analizzato attraverso elettroforesi su gel di agarosio, evidenziando le bande di DNA a doppia elica con coloranti intercalanti (es. etidio bromuro; sono attualmente disponibili altri traccianti del DNA, performanti e non tossici). In questa fase è importante disporre di un sistema che permetta la più alta risoluzione di immagine possibile, per non scambiare come negativo un segnale di bassa intensità. Una fase fondamentale è la verifica del prodotto di PCR, poiché la banda ottenuta e corrispondente all'altezza attesa non significa necessariamente che il DNA "target" sia stato amplificato. In fase di sviluppo di metodo si può verificare la significatività dell'amplicone usando:

- la digestione con enzimi di restrizione noti (endonucleasi), nel caso in cui il prodotto presenti siti di taglio specifici;
- l'ibridazione con sonde specifiche per una sequenza interna a quella amplificata;
- a ri-amplificazione del prodotto utilizzato come template in una reazione denominata "nested PCR" e, ovviamente, il sequenziamento dell'amplicone.

Un sistema per aumentare il grado di specificità di reazione è l'uso della tecnica Real time: tale metodica permette l'individuazione in "tempo reale" del prodotto PCR senza ricorrere ad elettroforesi (rilevamento secondario), fornendo un dato quantitativo, poiché all'aumentare del segnale emesso durante la reazione (e registrato in continuo dallo strumento) corrisponde una determinata quantità di DNA template, riferita ad una curva standard. Questa tecnica, seppur più costosa della PCR classica, aumenta significativamente la sensibilità. Il grado di specificità della PCR, quindi, è potenzialmente significativo, ma affetto (come per altre tecniche descritte) da numerosi fattori di incertezza che necessariamente devono essere considerati, sia nella fase di messa a punto del metodo, sia nella fase di validazione.

Più recentemente la PCR è stata anche utilizzata in combinazione con l'ELISA in tecnica "mista", permettendo di ottenere dati semi-quantitativi. In questo approccio, un frammento specifico di DNA è amplificato, mentre in una fase post-PCR l'amplicone viene legato alla superficie di una piastra tipo ELISA. In seguito a denaturazione, una sonda a DNA sequenza-specifica viene fatta ibridare all'amplicone a singolo filamento. La sonda viene poi individuata in una reazione tipo-ELISA (utilizzando un sistema di anticorpi primari e secondari marcati per lo



sviluppo del segnale di rilevamento). Sono pochi i riferimenti pubblicati in letteratura caratterizzati da questo approccio (Holzhauser et al. 2002).

La degradazione del DNA genomico in seguito all'impatto tecnologico è particolarmente influente nelle analisi quantitative, mentre se ci si riferisce solo alla presenza o all'assenza di segnale anche un DNA fortemente degradato e/o contaminato può fornire un risultato positivo.

In relazione alle problematiche esposte, sembra importante affermare che l'analisi del DNA può essere considerata un valido complemento alla ricerca diretta dell'allergene mediante ELISA, non sostituendo in ogni caso l'approccio diretto. Alcuni esperti suggeriscono l'uso della tecnica PCR come screening iniziale, per poi ricercare eventualmente le proteine allergeniche mediante ELISA solo nel caso di positivi alla "speciazione via DNA". L'approccio più significativo scientificamente, comunque, considerando le diverse problematiche delle due tecniche, dovrebbe quindi essere l'uso parallelo combinato, eventualmente completato da un controllo di "secondo livello" attraverso analisi di massa per la ricerca e la caratterizzazione delle diverse proteine allergeniche.

Standard di calibrazione e materiali di riferimento

Il risultato "quantitativo" della PCR è influenzato dalla natura degli standard utilizzati per costruire le curve di calibrazione. Questo problema, in particolare, influenza la cosiddetta quantificazione "assoluta", cioè ottenuta mediante l'interpolazione dei cicli di amplificazione soglia del DNA target con la curva creata dai cicli soglia relativi a delle diluizioni note standard del DNA genomico di riferimento. Oltre alla minimizzazione degli errori analitici (parametro affrontato nel paragrafo relativo alla validazione di metodo riportato di seguito), la qualità e la natura stessa del "sistema di riferimento" è quindi fondamentale per la significatività dell'analisi. Purtroppo per molti geni utilizzati come marcatori e sfruttati per la rivelazione di ingredienti allergenici negli alimenti, non esistono sufficienti dati in relazione alla loro potenziale ripetizione sul genoma. Le amplificazioni *single locus*, inoltre, possono essere affette da più problemi di scarsa resa di amplificazione rispetto a quelle ripetute più volte su un genoma o su diversi genomi.

Nel caso si intenda utilizzare DNA genomico come riferimento per la quantificazione, essendo questo potenzialmente degradabile dalle alte temperature, ed essendo la fase di estrazione critica per il clean-up dello stesso, è necessario conoscere bene la matrice di partenza utilizzata per applicare il sistema di estrazione più appropriato.

Inoltre, non è semplice concludere se l'estrazione del DNA (nella preparazione di uno standard, come pure nei campioni in analisi) sia stata esaustiva o no.

In considerazione di questo, anche nei kit pre-allestiti commerciali, per costruire le rette di calibrazione si utilizzano spesso plasmidi modificati, che portano al loro interno le stesse sequenze riconosciute dai primer sul genoma dell'organismo da identificare. È fondamentale determinare l'intervallo di linearità ottenibile con lo "standard" utilizzato, e per questo controllo possono essere utilizzati diversi approcci matematici e statistici. Al momento della stesura del presente documento non sono disponibili né commercializzati *reference standard* certificati che possano essere utilizzati per la comparazione degli standard di calibrazione e per allestire le prove di recupero, fortificando i campioni ed omettendo il problema dell'estrazione non esaustiva del DNA. Al momento, sono pochi i materiali di riferimento commercializzati (NIST; IRMM); nessuno di questi è certificato e suggerito per la analisi del DNA via PCR per la detection di allergeni, seppure siano stati utilizzati a volte con successo.



PCR e sensibilità: limite di rivelazione (LOD), limite di quantificazione (LOQ) e recuperi

Sono numerosi i parametri che possono inficiare la resa di amplificazione (e quindi la sensibilità di detection). La determinazione dei limiti di rivelazione (LOD) e di quantificazione (LOQ) è dunque fondamentale per la validazione del metodo. In alcuni kit commerciali, i protocolli di validazione e le modalità di attribuzione di LOD e LOQ sono chiari, in altri vengono omessi (come pure in alcuni casi le sequenze primer ed i target amplificati). Come nel caso dei kit ELISA, molto spesso il valore di LOQ corrisponde alla concentrazione di standard più diluito ottenibile dalla curva di calibrazione. Similmente, sono pochi i lavori pubblicati in letteratura che riportano la definizione di LOD e LOQ. Non essendo possibile rapportare in modo diretto la quantificazione dell'ingrediente allergenico con la presenza reale di un allergene proteico, non si può usare la PCR nella valutazione del rischio, nonostante le potenzialità e la sensibilità mostrata in molti casi.

Come per ogni altro approccio analitico, al fine di valutare l'esattezza del dato analitico, anche nel caso della PCR quantitativa applicata all'analisi di un alimento multi-ingrediente complesso, è necessario effettuare studi di recupero, sfruttando il concetto della fortificazione delle matrici utilizzando non tanto l'allergene (come nel caso dell'ELISA), ma l'ingrediente stesso, testando inoltre matrici alimentari differenti per valutare, di caso in caso, la funzionalità del sistema di estrazione scelto. Sono pochi i lavori di letteratura che descrivono questo approccio, in particolare il già citato "incurred sample", cioè l'aggiunta dell'ingrediente prima della preparazione tecnologica della matrice complessa, mimando le condizioni reali di processing industriale. I lavori scientifici sono più mirati alla definizione dell'impatto tecnologico sulla degradazione e recupero del DNA che ad una vera e propria validazione di metodo. Più utilizzato (anche se meno nei confronti delle tecniche ELISA) l'approccio "spiked sample"; anche in questo caso si possono ottenere delle sovrastime; il DNA aggiunto post-produzione non subisce infatti l'impatto tecnologico come il campione reale. Più informazioni sulle tematiche legate alla validazione di metodo ed alla accettabilità dei risultati ottenuti via PCR sono riportati nel paragrafo C.4 Criteri di validazione ed accettabilità delle metodiche analitiche.

Espressione dei risultati

Come nel caso dei test ELISA, la sensibilità raggiunta dai kit PCR viene normalmente espressa come mg di alimento allergizzante per kg di derrata alimentare. Trattandosi di metodi indiretti per la ricerca dell'alimento allergizzante, e non dell'allergene, nella loro messa a punto si tende a raggiungere una maggiore sensibilità e capacità di individuare la presenza dell'alimento, piuttosto che a fornire all'operatore una quantificazione assoluta dello stesso. Inoltre, il metodo non discrimina tra le diverse proteine, proprie di uno stesso alimento, ma in grado di causare reazioni allergiche di diversa portata (es: Cor a 1, responsabile di sindromi orali allergiche, e Cor a 8, potenziale causa di shock anafilattico, in nocciola). Ad oggi, sono disponibili kit commerciali per quasi tutti gli alimenti inseriti nella norma vigente (cereali, crostacei, uova, pesce, arachide, soia, latte vaccino, mandorla, nocciola, noce, anacardo, pistacchio, sedano, senape, sesamo, lupino, molluschi), ed altri per l'identificazione di altri alimenti allergizzanti non inseriti nell'elenco della normativa (grano saraceno, pesca, pomodoro...). Alcuni di questi kit presentano i propri limiti di sensibilità sotto forma di pg di DNA dell'alimento ricercato individuati in una miscela contenente una quantità fissa di un DNA proveniente da un'altra fonte (di solito DNA bovino). Oltre a questi kit commerciali esistono poi in letteratura decine di lavori, realizzati da singoli gruppi di ricerca, focalizzati sulla messa a punto di nuove metodiche per l'individuazione tramite tecniche PCR di alimenti allergizzanti, che in molti casi presentano sensibilità persino superiori ai kit commerciali; nel caso di questi lavori di ricerca i limiti di rivelazione sono presentati o come ppm, o come percentuale in una preparazione 'spiked' sul peso totale, o come pg assoluti di DNA.



La Norma Europea UNI EN 15634-1 dell'aprile 2009, relativa alla "Ricerca di allergeni alimentari mediante metodi di biologia molecolare basati sull'analisi del DNA", stabilisce che la sensibilità, identificata dal 'limit of detection' (LOD), debba essere espressa in termini di numero di copie di DNA, equivalenti ad una quantità totale di costituente allergenico per kilogrammo di alimento (mg/kg). La misura di questa equivalenza viene effettuata sulla base di materiali di riferimento certificati dall'Unione Europea.

C. 3 Metodi cromatografici, spettrometria di massa e criticità

Gli allergeni alimentari sono proteine capaci di indurre, dopo ingestione, una risposta anomala del sistema immunitario in individui sensibilizzati. Le proteine allergeniche costituiscono una classe di composti molto eterogenea, che può variare per peso molecolare (da poche migliaia a decine di migliaia di dalton), punto isoelettrico, quantità e tipo di modifiche post-traduzionali, e la cui varietà è incrementata dalla presenza, per numerose proteine allergeniche, di diverse isoforme. Inoltre, i trattamenti tecnologici degli alimenti possono modificare la struttura proteica, incrementando la diversità molecolare ed influenzando sul loro potenziale allergenico (van Henghel 2007).

Tra i metodi sviluppati per l'identificazione di proteine allergeniche negli alimenti, negli ultimi anni la spettrometria di massa (SM) ha svolto un ruolo sempre più centrale, grazie alla sua specificità e sensibilità. Infatti essa ha la capacità di identificare le molecole target in base ad una proprietà molecolare intrinseca, la massa, mantenendo allo stesso tempo una buona sensibilità nella rivelazione, requisiti indispensabili per identificare in maniera univoca molecole presenti in tracce in matrici complesse.

Per un approfondimento sulla SM, che in questi ultimi anni ha avuto una grande evoluzione, si rimanda a testi qualificati.

La MS viene spesso accoppiata alla cromatografia liquida, in modo da abbinare il suo elevato potere identificativo con l'alto potere separativo delle tecniche cromatografiche.

Le tecniche di analisi basate sulla SM delle proteine allergeniche negli alimenti riportate in letteratura seguono essenzialmente due approcci (Poms, Klein, Anklam, 2004):

- a) separazione cromatografica, rivelazione e quantificazione delle proteine intatte (approccio diretto);
- b) digestione delle proteine con enzimi specifici, seguita da separazione cromatografica, rivelazione e quantificazione di peptidi marker caratteristici della proteina cercata (approccio indiretto).

Il secondo metodo è molto più utilizzato del primo, a causa del fatto che i peptidi (molecole a basso peso molecolare) sono più facilmente separabili delle proteine (molecole ad alto peso molecolare) e, sempre a causa delle diverse dimensioni, possono essere rivelati dagli spettrometri di massa con maggiore sensibilità, anche se un fattore potenziale di errore viene introdotto dalla digestione enzimatica che precede l'analisi, che ovviamente deve essere quantitativa sulla proteina target, al fine di fornire risultati affidabili.

Rivelazione diretta di proteine allergeniche intatte

Come detto, i metodi pubblicati in letteratura sulla rivelazione diretta di proteine allergeniche intatte sono scarsi. Un metodo che accoppia una separazione HPLC con rivelazione di massa utilizzando uno spettrometro a triplo quadrupolo (ma utilizzato in modalità Full Scan o Multiple Ion Monitoring, come un singolo quadrupolo, senza utilizzare la frammentazione) è stato pubblicato per la rivelazione di sieroproteine del latte (alfa-lattalbumina, beta-lattoglobulina A e B) nei succhi di frutta, dopo estrazione su fase solida. Il limite di rivelazione di tale metodica si è rivelato essere di 1 mg/l (Monaci, van Hengel, 2008).



Un metodo basato sulla SM MALDI-TOF è stato anche riportato per la rivelazione del lisozima, una proteina potenzialmente allergenica, nei formaggi. Il lisozima, preventivamente purificato mediante immunocattura con particelle magnetiche rivestite di un anticorpo anti-lisozima, è stato rivelato con una sensibilità pari a 5 mg/kg (Schneider, Becker, Pischetsrieder, 2010).

Rivelazione di peptidi specifici come marker di proteine allergeniche

Gli esempi di rivelazione di peptidi specifici derivanti da proteine allergeniche sono molto più numerosi in letteratura, data la già citata facilità di separazione cromatografica e di rivelazione mediante SM di composti a peso molecolare più basso rispetto alle proteine. In generale questi metodi espongono però il fianco alla facile critica che il processo di digestione enzimatica è una variabile non perfettamente controllabile nel sistema alimentare, per cui se il singolo peptide può essere facilmente quantificato, la sua corrispondenza stechiometrica con la proteina di partenza è invece difficilmente verificabile, ragion per cui la quantificazione ottenuta può essere sottostimata.

In uno dei primi esempi pubblicati, la digestione enzimatica seguita da analisi LC/MS/MS è stata usata per rivelare e quantificare il più importante allergene dell'arachide Ara h 1, in una matrice modello costituita da un gelato. La rivelazione di alcuni peptidi specifici ha permesso di identificare univocamente Ara h1 e di quantificarla fino a 10 mg/kg (Shefcheck, Musser, 2004).

Gli stessi autori hanno in seguito presentato un confronto fra metodiche LC/ESI-MS, basate su uno strumento a singolo quadrupolo, con metodiche LC/ESI-MS/MS, basate su strumentazione a triplo quadrupolo, utilizzate per la rivelazione dell'allergene Ara h 1 nel cioccolato. È stato dimostrato che la digestione prima dell'estrazione fornisce una sensibilità migliore della digestione dopo estrazione, arrivando a 20 mg/kg con uno strumento a singolo quadrupolo. L'uso di una strumentazione a triplo quadrupolo consente di abbassare ulteriormente la sensibilità fino a 10 mg/kg. Infine il miglioramento dei metodi di estrazione può portare questo limite fino a 2 mg/kg (Shefcheck, Callahan, Musser, 2006).

Con una strumentazione più sofisticata, una cromatografia liquida con colonna capillare accoppiata ad uno SM dotato di interfaccia nanoelettrospray e un analizzatore quadrupolo-TOF (capLC/nano-ESI/Q-TOF MS/MS), si sono identificati, dopo digestione enzimatica, peptidi derivanti dagli allergeni dell'arachide Ara h 1, Ara h 2, e Ara h 3. In particolare, lo studio si è occupato anche della rivelabilità di questi peptidi in arachidi crude e tostate, al fine di trovare marcatori peptidici utilizzabili anche in prodotti trattati. I limiti di rivelazione per i singoli peptidi, riportati come quantità assoluta iniettata in colonna, sono stati di 7 ng per le arachidi non tostate, 10 ng per le arachidi mediamente tostate e 40 ng per le arachidi ad elevato grado di tostatura (Chassaigne, Norgaard, van Hengel, 2007).

Un metodo LC/ESI-MS/MS è stato anche proposto per l'analisi di digeriti triptici di diversi estratti alimentari ai fini di rivelare, dopo estrazione e clean-up, peptidi derivanti dalle caseine del latte. La sensibilità del metodo è stata stimata 5 mg/kg di proteina (Weber Raymond, Ben-Rejeb, Lau, 2006).

Altri esempi analoghi riportati in letteratura hanno sostanzialmente confermato le metodologie utilizzate ed i limiti di rivelazione. Anche l'utilizzo di tecniche di purificazione, di digestione e di analisi più innovative, quali procedure di estrazione immunomagnetica combinate con digestioni triptiche assistite da microonde, seguite da analisi LC/ESI-IT-MS/MS, hanno sostanzialmente confermato i livelli di sensibilità presentati in precedenza, dell'ordine di pochi mg/kg.

Un'interessante variante, recentemente proposta, prevede la rivelazione di peptidi provenienti da proteine allergeniche generati non da digestione triptica, bensì presenti nell'alimento in seguito a processi naturali di proteolisi.

Un metodo ESI-MS/MS preceduto da cromatografia liquida capillare (CapLC/ESI-MS/MS) è stato proposto per



la rivelazione di peptidi derivanti dalla caseina presenti nel vino. Anche se è stato dimostrato che il metodo consente di rivelare la presenza di caseina fino a 100 mg/l, è chiaro che la quantità di questi peptidi non può essere facilmente ed esattamente collegata alla quantità di caseina inizialmente presente, rendendo il metodo valido dal solo punto di vista qualitativo o, al massimo semiquantitativo (Monaci, Losito, Palmisano, Visconti 2010).

Conclusioni

Un riassunto dei metodi più significativi riportati in letteratura, basati sulla spettrometria di massa, per la rivelazione delle proteine allergeniche è riportato in **Tabella 3**.

Per quanto riguarda la sensibilità del metodo, è facile constatare come, nonostante la varietà di metodiche di preparazione del campione e di tecniche spettrometriche usate, che vanno dalle più semplici alle più sofisticate, i limiti di rivelazione si assestano in tutti i casi intorno a valori di pochi mg/kg. È quindi ragionevole supporre che nel caso vengano adottate procedure standard basate sulla SM da utilizzarsi nei laboratori di controllo, i limiti di sensibilità raggiungibili siano dello stesso ordine di grandezza.

Per quanto riguarda la specificità del metodo, la SM, grazie al suo potere identificativo, riduce praticamente a zero la possibilità di falsi negativi e falsi positivi, anche in campioni alimentari molto trattati (p.es. tostati) o in presenza di matrici alimentari complesse.

Tabella 3. - Sommario dei metodi basati sulla MS messi a punto per la rivelazione di proteine allergeniche negli alimenti

Metodo	Matrice	Proteina	Target SM	Limite di rivelazione
LC/ESI-MS	succhi di frutta	sieroproteine del latte	proteine intatte	1 mg/l
LC/ESI-MS/MS	gelati	Ara h 1	peptidi	10 mg/kg
LC/ESI-MS/MS	cioccolato	Ara h 1	peptidi	2 mg/kg
capLC/ESI- Q/TOF	arachidi	Ara h 1, 2, 3	peptidi	7 - 40 ng
capLC/ESI-Q/TOF	snacks	Ara h 2	peptidi	5 mg/kg
LC/ESI-IT/MS/MS	cereali da colazione	Ara h 3, 4	peptidi	3 mg/kg
LC/ESI-MS/MS	varie	caseine	peptidi	5 mg/kg
MALDI/TOF	formaggi	lisozima	proteina intatta	5 mg/kg

C. 4 Criteri di validazione ed accettabilità delle metodiche analitiche

Nel corso di questi ultimi anni, alcune metodiche analitiche per la ricerca degli allergeni sono state oggetto di studi di validazione da parte di singoli laboratori ed anche di un certo numero di studi interlaboratorio.

Da quanto emerge da alcuni di questi studi, che sono stati oggetto di pubblicazione, si evidenzia la notevole difformità delle procedure utilizzate nei protocolli di validazione soprattutto per quanto riguarda la preparazione dei campioni fortificati, i livelli di arricchimento scelti e i materiali di riferimento utilizzati.

Sarebbe quindi opportuno armonizzare a livello internazionale le procedure di validazione dei metodi per rendere confrontabili tra loro i risultati ottenuti e, nel contempo, cercare di individuare i requisiti di rendimento cui tali metodi debbono rispondere.

Allo scopo di uniformare i protocolli di validazione per la determinazione degli allergeni, negli ultimi anni diversi esperti del settore hanno pubblicato linee guida.



Alcuni esperti, sotto gli auspici della Presidential Task Force on Food Allergens dell'AOAC e con il contributo attivo dell'Allergen Working Group, appartenente al network MoniQA, nel 2010 hanno prodotto una linea guida per lo sviluppo e la validazione dei metodi ELISA per la determinazione quantitativa degli allergeni (Abbott 2010). Il documento contiene indicazioni sia di carattere generale applicabili a tutti gli allergeni che indicazioni specifiche per singoli allergeni. Queste ultime riguardano al momento due soli allergeni: l'uovo e il latte; altre linee guida specifiche saranno prodotte in seguito.

Le indicazioni di carattere generale comprendono una serie di informazioni che debbono obbligatoriamente accompagnare i metodi ELISA sottoposti a validazione:

- informazioni sull'anticorpo utilizzato nel test (mono o policlonale) e sulla natura della sua proteina target (singola/multipla, frazionata/modificata/sintetizzata ecc);
- lista delle derrate testate per la reattività crociata, con particolare riferimento a quelle che sono geneticamente simili alla derrata allergenica target e a quelle che è più probabile possano contenere l'allergene in esame (per il latte e l'uovo vengono fornite delle liste specifiche a cui fare riferimento);
- informazioni sulle sostanze utilizzate per calibrare il kit (informazioni sulle sue caratteristiche, sulla preparazione e standardizzazione, sui trattamenti tecnologici eventuali ecc.) e sul modo in cui vengono espresse le loro concentrazioni (alimento in toto o contenuto proteico totale ecc);
- informazioni sulle matrici a cui il metodo è applicabile, sulle eventuali matrici che possono dar luogo a difficoltà, e sullo stato dell'allergene che il metodo è in grado di rivelare (crudo, cotto o entrambi);
- dati relativi a uno studio di validazione condotto da un singolo laboratorio in cui siano stati verificati: le curve di calibrazione, LOD, LOQ e limite inferiore di applicazione (LLA). Quest'ultimo dato può essere superiore al LOQ e rappresenta il livello al di sotto del quale il produttore sconsiglia o non raccomanda l'utilizzo del metodo;
- robustezza;
- shelf-life dei reagenti forniti (data di scadenza del test e informazioni sulla variabilità tra lotti).

Lo stesso documento indica inoltre gli elementi chiave per le validazioni inter-laboratorio:

- numero di laboratori richiesto (min. 8, di cui non più di ¼ appartenente alla stessa organizzazione);
- numero di matrici (min. 2), livelli di concentrazione (min. 4 per matrice, di cui uno pari a zero e uno ≤ 2 volte LLA) e di repliche (min. 2 per ciascun livello) richiesto;
- criteri di accettabilità dei recuperi (ideali 80 - 120%, accettabili 50 - 150%);
- dati statistici da calcolare (outliers, media, accuratezza, ripetibilità e riproducibilità, LOD e LOQ), con indicazioni sul modo di ottenerne la stima;
- caratteristiche generali dei materiali di riferimento e materiali specifici da utilizzare nel caso della ricerca dell'uovo (polvere d'uovo NIST RM 8445) e del latte (polvere di latte scremato NIST RM 1549);
- metodi per la fortificazione dei campioni da utilizzare per il calcolo dei recuperi (uso di "incurred samples" ove possibile o in alternativa aggiunta di quantità note di allergene a ciascuna porzione test del campione in esame, utilizzando per la fortificazione materiali di riferimento in toto in entrambi i casi);
- matrici di interesse (preferibilmente quelle che è più probabile siano contaminate e lista di quelle consigliate per latte e uovo).

A livello comunitario, nel 2009, è stata elaborata la norma europea UNI EN 15633-1:2009 che prende in considerazione gli aspetti generali dei metodi qualitativi e quantitativi di tipo immunologico (ELISA). In questa norma sono contenute diverse indicazioni, alcune comuni alla linea guida dell'AOAC quali: la specificità degli anticorpi e la natura della proteina target, la cross-reattività verso target analoghi o differenti, l'espressione del risultato finale in termini sia di quantità totale (mg/kg) di alimento allergenico o in termini di proteina con un idoneo fattore di conversione per trasformarla in peso totale di alimento allergenico.



Vengono inoltre riportati alcuni elementi che è indispensabile considerare nel protocollo d'analisi (bianco, materiale di riferimento o standard analitico, campioni di controllo negativo e/o positivo) e i parametri di validazione che devono essere valutati: LOD, RSD di campioni replicati (non dovrebbe superare il 20%), RSD degli standards e dei campioni di controllo.

In aggiunta viene sottolineato che le matrici utilizzate negli studi di validazione dovrebbero mimare quanto più possibile i campioni reali.

Inoltre il Ministry of Health, Labor and Welfare giapponese oltre ad aver stabilito un valore soglia per l'etichettatura corrispondente a 10 µg/g (peso di proteina solubile dell'ingrediente allergenico/peso dell'alimento) per tutti gli allergeni, ha pubblicato nel 2006 delle linee guida ufficiali in cui sono descritti i criteri per i protocolli di validazione interlaboratorio (Sakai 2008). In breve i protocolli devono rispondere ai seguenti requisiti:

- numero di laboratori ≥ 8
- numero di "incurred samples" ≥ 5
- numero di livelli di fortificazione ≥ 1 (incluso 10 µg/g)
- recupero 50-150%
- $RSD_R \leq 25\%$

Nelle linee guida sono anche specificati e standardizzati i materiali di riferimento, le soluzioni estraenti e le procedure di estrazione.

Per quanto riguarda i metodi basati sul DNA, negli ultimi anni si è osservato uno sforzo notevole del mondo scientifico nella messa a punto di metodi per l'identificazione di sempre nuovi alimenti allergizzanti, ma raramente questi protocolli fanno riferimento a linee guida certificate. Anche l'espressione dei risultati varia, così come l'estensione del campionamento e dell'analisi statistica. Per quanto riguarda invece i kit commerciali, esistono attualmente numerosi kit PCR forniti da diversi distributori, ma solo uno, per la ricerca di arachide, ha ottenuto l'approvazione da parte dell'AOAC International (Monaci & Visconti, 2010). Il motivo di queste difformità è che, a differenza di quello accaduto per i test ELISA, non esistono delle vere e proprie linee guida per la validazione di questi protocolli. Un altro problema è la mancanza per moltissime matrici dei materiali di riferimento certificati, che renderebbero i risultati ottenuti in diversi laboratori più confrontabili. Per questo motivo gli operatori sono costretti a crearsi i propri standard utilizzando DNA genomico purificato e quantificato, o, in alcuni casi, plasmidi modificati contenenti l'inserito da amplificare in PCR.

A livello comunitario la norma europea EN 15634-1:2009 sulla "Ricerca di allergeni alimentari mediante metodi di biologia molecolare basati sulla analisi del DNA", oltre alle indicazioni su ambienti, materiali, reagenti e procedure da utilizzare, elenca i punti che devono essere sottoposti a validazione:

- estrazione e purificazione del DNA: i parametri fondamentali sono la purezza, la concentrazione, l'integrità;
- amplificazione del DNA: i parametri fondamentali sono la specificità della sequenza di DNA target, il disegno dei primer, la presenza di numerosi controlli;
- metodi per l'identificazione del prodotto;
- interpretazione ed espressione dei risultati, sia che si tratti di determinazioni qualitative tipo 'sì/no' (LOD), sia che la determinazione sia quantitativa (LOQ).

Nel 2010 è stata pubblicata la norma UNI EN 15842:2010 che riguarda le metodiche cromatografiche (LC – MS), immunochimiche e quelle basate sul DNA in cui vengono riportate definizioni e linee guida per l'organizzazione dei laboratori coinvolti nella rilevazione degli allergeni. Sono indicati, inoltre, i protocolli richiesti per la validazione del metodo, la descrizione dello stesso e la stesura dei *reports*. In modo specifico, il documento riporta le linee guida per l'utilizzo dei *reference materials*, specificando che questi sono pochi



e che ulteriori materiali, una volta validati ed approvati, potranno essere annessi alla norma. La norma non riporta le tecniche di campionamento, altro punto focale per la ricerca effettiva ed attendibile della presenza di allergeni-ingredienti allergizzanti negli alimenti.

Sono invece riportati in dettaglio gli aspetti che vanno dal ricevimento del materiale in laboratorio alla preparazione del *report* di analisi (criteri per la produzione e la conservazione di *reference materials*; suggerimenti per la selezione del metodo; descrizione delle metodiche immunochimiche, basate sull'analisi del DNA e cromatografiche; organizzazione del laboratorio; preparazione del campione ed estrazione; preparazione delle curve di calibrazione; descrizione delle analisi qualitative e quantitative; criteri di assicurazione qualità; interpretazione ed espressione dei risultati; risultati ambigui; preparazione del *report* finale).

Nonostante la mancanza fino ad oggi di specifiche normative universalmente accettate, la disponibilità di queste norme europee fornisce alcuni requisiti minimi accettabili per valutare la qualità delle analisi mirate alla individuazione di ingredienti allergenici negli alimenti, permettendo, di fatto, di programmare nel prossimo futuro una armonizzazione degli approcci analitici, a livello nazionale ed internazionale.



Hanno collaborato alla stesura del documento:

Marco Arlorio

Professore associato Chimica degli Alimenti, Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi del Piemonte Orientale A. Avogadro

Concetta Boniglia

Primo ricercatore Dip. Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare Istituto Superiore Sanità (ISS)

Roberto Copparoni

Dirigente medico Ministero della Salute DG Igiene Sicurezza Alimenti e Nutrizione Ufficio V

Lucia De Castelli

Dirigente veterinario Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta

Maria Antonietta Di Vincenzo

già Dirigente medico Ministero della Salute DG Igiene Sicurezza Alimenti e Nutrizione Ufficio V

Stefania Giammarioli

Primo ricercatore Dip. Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare ISS

Lucia Guidarelli

già Direttore Ufficio V Ministero della Salute DG Igiene Sicurezza Alimenti e Nutrizione

Donatella Macchia

Componente Direttivo nazionale Società Italiana Allergologia e Immunologia Clinica, Dirigente medico UO Allergologia e Immunologia Clinica. Azienda Sanitaria Firenze

Rosangela Marchelli *

Professore ordinario Chimica organica Dip. Chimica organica e industriale Università di Parma

Alberto Martelli

Rappresentante Società Italiana Allergologia e Immunologia Pediatrica, Responsabile UOC Pediatria Azienda Ospedaliera Salvini, Bollate e Garbagnate MI

Paola Minale

Rappresentante Associazione Allergologi e Immunologi territoriali e ospedalieri, Dirigente medico UO Allergologia e Immunologia. Azienda Ospedaliera San Martino Genova

Patrizia Restani

Professore associato Chimica degli Alimenti Dip. Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano

Elisabetta Sanzini

già Direttore Rep. Dietetica Dip. Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare ISS

Salvatore Tripodi

Dirigente medico UO Dip. Allergologia pediatrica Ospedale Sandro Pertini Roma

* ha partecipato nella stesura del capitolo "Metodi cromatografici, spettrometria di massa e criticità"





Bibliografia essenziale A. 1, A. 2, A. 3

- Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, Williams H; ISAAC Phase Three Study Group. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*. 2006;368:733-43
- Beasley R, Crane J, Lai CK, Pearce N. Prevalence and etiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105:S466-72
- Boyce JA, et al; Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States : report of the NAIID –sponsored expert panel, *J Allergy Clin Immunol*, Dec. 2010; 126:S1-S58
- Cataldo F, Accomando S, Fragapane ML, Montaperto D. Are food intolerances and allergies increasing in immigrant children coming from developing countries ? *Pediatr Allergy Immunol* 2006;17:364-9
- Downs SH, Marks GB, Sporik R, Belosouva EG, Car NG, Peat JK. Continued increase in the prevalence of asthma and atopy. *Arch Dis Child* 2001;84:20-3
- Helbling A, Hurni T, Mueller UR, Pichler WJ. Incidence of anaphylaxis with circulatory symptoms: a study over a 3-year period comprising 940,000 inhabitants of the Swiss Canton Bern. *Clin Exp Allergy*. 2004 Feb;34:285-90
- Madsen CH. Prevalence of food allergy: an overview. *Proc Nutr Soc* 2005; 64: 413-417 Sicherer SH, Epidemiology of food allergy, *J Allergy Clin Immunol* Jan 2011
- Moritta E. et al, Food omega-gliadin is a major allergen in wheat dependent exercise-induced anaphylaxis, *J Dermatol Sci* 2003; 33:99-104
- Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Parisot L. First survey from the "Allergy Vigilance Network": life-threatening food allergies in France. *Allerg Immunol (Paris)*. 2002; 34: 194-8
- Roehr CC, Edenharter G, Reimann S, Ehlers I, Worm M, Zuberbier T et al. Food allergy and non-allergic food hypersensitivity in children and adolescents. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1534-41
- Osterballe M, Hansen TK, Mortz CG & Bindslev-Jensen C. The clinical relevance of sensitization to pollen-related fruits and vegetables in unselected

pollen-sensitized adults. *Allergy* 2005;60:218–25

- Pastorello EA, Rivolta F, Bianchi M, Mauro M, Pravettoni V. Incidence of anaphylaxis in the emergency department of a general hospital in Milan. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 756:11-7.
- Sabra A, Bellanti JA, Malka Rais J, Castro HJ, Mendez de Inocencio J, Sabra S. IgE and non-IgE food allergy. *Ann allergy Asthma Immunol*.2003; 90: 71-76
- Sampson HA, Update on food allergy, *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:805-19
- Schäfer T, Bohler E, Ruhdorfer S, Weigl L, Wessner D, Heinrich J et al. Epidemiology of food allergy/ food intolerance in adults: associations with other manifestations of atopy. *Allergy* 2001;56:1172-79
- Scibilia J, Pastorello EA, Zisa G, Ottolenghi A, Bindslev-Jensen C, Pravettoni V, Scovena E, Robino A, Ortolani C. Wheat allergy: a double-blind, placebo-controlled study in adults. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:433-9
- Steinke M. Perceived food allergies in the european adult population. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 96: 77
- www.salute.gov.it

Bibliografia essenziale A. 4 e A. 5

- Asero R, Ballmer-Weber BK, Beyer K, Conti A, Dubakiene R, Fernandez-Rivas M, et al. IgE-mediated food allergy diagnosis: Current status and new perspectives. *Molecular nutrition & food research*. 2007;51(1):135-47
- Ballmer-Weber B, Besler M, Hoffmann-Sommergruber K, Vieths S, Wuthrich B. 2000. Allergen Data Collection: Celery (*Apium graveolens*). Internet Symposium on Food Allergens 2 (suppl 3): 145-167.
- Benhamou AH, Zamora SA, Eigenmann PA. Correlation between specific immunoglobulin E levels and the severity of reactions in egg allergic patients. *Pediatr Allergy Immunol*. 2008;19(2):173-9
- Berti I, Bergamini M, Calzone L, Iacono ID, Galli E, Martelli A, et al. Caratteristiche dei test di provocazione orale per alimenti in Italia. Studio retrospettivo multicentrico. *Rivista di immunologia e allergologia pediatrica*.2010;3;8-14



- Besler M, Daul CB, Leung PSC. 2001. Allergen Data Collection – update: Shrimps (*Natantia*). Internet Symposium on Food Allergens 3: 37-53.
- Boyce J a, Assa'ad A, Burks a W, Jones SM, Sampson H a, Wood R a, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *Nutr Res*. 2011; 31(1):61-75
- Breiteneder H, Radauer C. 2004. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 113: 821-830.
- Chiu JT, Haydik B. 1991. Sesame seed oil anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 88:414-415.
- DL 2006. Decreto Legislativo 8 Febbraio 2006, n. 114. "Attuazione delle direttive 2003/89/CE, 2004/77/CE e 2005/63/CE in materia di indicazione degli ingredienti contenuti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale* n. 69 del 23 Marzo 2006.
- EC 1997. Effect of Processing and Preparation of Foods. In: Study on nutritional factors in food allergies and food intolerance. European Commission, Brussels.
- Hamilton RG, Franklin Adkinson N. In vitro assays for the diagnosis of IgE-mediated disorders. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;114(2):213-225
- Hochwallner H, Schulmeister U, Swoboda I, Twaroch TE, Vogelsang H, Kazemi-Shirazi L, Kundi M, Balic N, Quirce S, Rumpold H, Fröschl R, Horak F, Tichatschek B, Stefanescu CL, Szépfalusi Z, Papadopoulos NG, Mari A, Ebner C, Pauli G, Valenta R, Spitzauer S. Patients suffering from non-IgE-mediated cow's milk protein intolerance cannot be diagnosed based on IgG subclass or IgA responses to milk allergens. *Allergy*. 2011;66(9):1201-7
- Høst A, Husby S, Gjesing B, Larsen JN, Løwenstein H. Prospective estimation of IgG, IgG subclass and IgE antibodies to dietary proteins in infants with cow milk allergy. Levels of antibodies to whole milk protein, BLG and ovalbumin in relation to repeated milk challenge and clinical course of cow milk allergy. *Allergy*. 1992; 47(3):218-219.
- Host A, Halken S. 1990. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first years of life. *Allergy* 45: 587-596.
- Knight AK, Shreffler WG, Sampson H a, Sicherer SH, Noone S, Mofidi S, et al. Skin prick test to egg white provides additional diagnostic utility to serum egg white-specific IgE antibody concentration in children. *J allergy clin immunol*. 2006; 117(4):842-7.
- Jahn-Schmid B, Harwaneggw C, Hillerw R, Bohle B, Ebner C, Scheiner O, et al. Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy*. 2003;33:1443-9.
- Isolauri E, Turjanmaa K. Combined skin prick and patch testing enhances identification f food allergy in infants with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;97:9-15.
- Mari A, Alessandri C, Bernardi ML, Ferrara R, Scala E, Zennaro D. Microarrayed allergen molecules for the diagnosis of allergic diseases. *Current allergy and asthma reports*. 2010;10(5):357-64.
- Ott H, Baron JM, Heise R, Ocklenburg C, Stanzel S, Merk H-F, et al. Clinical usefulness of microarray-based IgE detection in children with suspected food allergy. *Allergy*. 2008;63(11):1521-8.
- Ocmant a, Mulier S, Hanssens L, Goldman M, Casimir G, Mascart F, et al. Basophil activation tests for the diagnosis of food allergy in children. *Clin experimental allergy*. 2009;39(8):1234-45.
- Quinti I, PaganelliR, Scala E, Guerra E, Aiuti F. Humoral response to food antigens. *Allergy*. 1989;44:59-64.
- Restani P, Ballabio C, Corsini E, Fiocchi A, Isoardi P, Magni C, Poiesi C, Terracciano L, Duranti M. 2005. The basic subunit of Ara h 3 is the major allergen in one group of children allergic to peanut. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 94: 262-266.
- Roehr CC, Reibel S, Ziegert M, Sommerfeld C, Wahn U, Niggemann B. 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; Mar 107(3):548-53.
- Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, et al. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J allergy clin immunol*. 2007;120(3):638-46
- Rovatti G. Allergia alimentare nella medicina

alternativa tradizionale. *Eur J Pediatr Dermatol*. 2003;13:165-72

- Rubio a, Vivinus-Nébot M, Bourrier T, Saggio B, Albertini M, Bernard a. Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children. *Allergy*. 2011;66(1):92-100.
- Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Annual review of medicine*. 2009;60:261-77
- Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:S116-25
- Wuthrich B. Unproven techniques in allergy diagnosis. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2005;15:86-90
- Szepefalusi Z, Ebner C, Pandjaitian R, Orlicek F, Scheiner O, Boltz-Nitulescu G, Kraft D, Ebner H. 1994. Egg yolk γ -livetin (Chicken serum albumin) is a cross-reactive allergen in the bird-egg syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 93: 932-942.
- Yunginger JW, Sweeney KG, Sturmer WQ, Giannandrea LA, Teigland JD, Bray M, Benson PA, York JA, Biedrzycki L, Squillace DL, Helm R. 1988. Fatal food-induced anaphylaxis. *JAMA* 260:1450-2

Bibliografia essenziale A. 6

- Eggleston P. Prospective studies in the natural history of food allergy. *Ann Allergy* 1987;59:179-81.
- Garcia-Ara MC, Boyano-Martinez MT, Diaz-Pena JM, Martin-Munoz MF, Martin-Esteban M. Cow's milk-specific immunoglobulin E levels as predictors of clinical reactivity in the follow-up of the cow's milk allergy infants. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:866-70.
- James JM, Sampson HA. Immunologic changes associated with the development of tolerance in children with cow milk allergy. *J Pediatr* 1992; 121:371-7
- Longo G, Barbi E, Berti I, Meneghetti R, Pittalis A, Ronfani L, Ventura A. Specific oral tolerance induction in children with very severe cow's milk-induced reactions. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:343-7.
- Sicherer SH, Food allergy *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:S116-25
- Bibliografia essenziale A. 7
- Angus F. The prevalence of food allergy and

intolerance in Europe. *Food Allergy Intolerance* 2000; 1: 26-34

- Asher I, Boner A, Chuchalin A, Custovic A, Dagli E, Haus M, Hemmo-Lotem M, Holgate ST, Holt PG, Host A, Iikura I, Johansson SG, Kowalski ML, Naspitz CK, Odhiambo J, Vichyanond P, Volovitz B, Wahn U, Warner JO, Weiss K, Zhong NS. Prevention of allergy and asthma: interim report. *Allergy* 2000; 55:1069-88
- Bergmann RL, Diepgen TL, Kuss O, Bergmann KE, Kujat J, Dudenhausen JW, Wahn U; MAS-study group. Breastfeeding duration is a risk factor for atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:205-9.
- Boner AL, Bodini A, Piacentini GL Environmental allergens and childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 1998; 28 Suppl 5:76-81
- Fiocchi A et al. Food allergy and the introduction of solid foods to infants: a consensus document. Adverse Reactions to Foods Committee, ACAAI. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;97:10-20
- Hansen TK, Poulsen LK, Stahl Skov P et al. A randomized, double-blinded, placebocontrolled oral challenge study to evaluate the allergenicity of commercial, food-grade fish gelatin. *Food Chem Toxicol* 2004; 42: 2037-2044.
- Høst A, Koletzko B, Dreborg S, et al. Dietary products used in infants for treatment and prevention of food allergy. Joint statement of the European Society for Paediatric Allergology and Clinical Immunology (ESPACI) Committee on Hypoallergenic formulas and the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) Committee on Nutrition. *Arch Dis Child*. 1999; 81:80-84.
- Jarvinen KM, Laine ST, Jarvenpää AL, Suomalainen HK. Does low IgA in human milk predispose the infant to development of cow's milk allergy? *Pediatr Res*. 2000; 48:457-462
- Kjellman NI, Nilsson L Is allergy prevention realistic and beneficial? *Pediatr Allergy Immunol* 1999;10(12 Suppl):11-7.
- Kramer MS. Maternal antigen avoidance during lactation for preventing atopic disease in infants of women at high risk. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;18;(4):CD000132.





- Kuehn A J *All Clin Immunol* 2009
- Laubereau B, Brockow I, Zirngibl A, Koletzko S, Gruebl A, von Berg A, Filipiak-Pittroff B, Berdel D, Bauer CP, Reinhardt D, Heinrich J, Wichmann HE; GINI Study Group. Effect of breast-feeding on the development of atopic dermatitis during the first 3 years of life--results from the GINI-birth cohort study. *J Pediatr* 2004;144:602-7.
- Matricardi PM, Rosmini F, Riondino S, Fortini M, Ferrigno L, Rapicetta M, Bonini S. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *BMJ*. 2000 12;320:412-7.
- Osborn DA, et al. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(4): CD006475
- REDALL 2002. Reduced allergenicity of processed Foods (Containing animal allergens). Progetto Europeo QLK1-CT-2002-02687. <http://www.chemie.uni-hamburg.de/lc/redall/>
- Saarinen KM, Juntunen-Backman K, Jarvenpaa AL, Kuitunen P, Lope L, Renlund M, Siivola M, Savilahti E. Supplementary feeding in maternity hospital and the risk of cow's milk allergy: A prospective study of 6209 infants. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:457-461.
- Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 805-819
- Steve L. Taylor and Sue L. Hefle Food allergen labeling in the USA and Europe. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006; 6: 186-190
- Taylor SL, Hefle SL. Hidden triggers of adverse reactions to foods. *Can J Allergy Clin Immunol* 2000; 5: 106-110.
- Taylor SL, Hefle SL. Allergen control. *Food Technol* 2005; 59: 40-43, 75
- von Berg A, Koletzko S, Grubl A, Filipiak-Pittroff B, Wichmann HE, Bauer CP et al and the German Infant Nutritional Intervention Study Group. The effect of hydrolyzed cow's milk formula for allergy prevention in the first year of life: the German Infant Nutritional Intervention Study, a randomized double-blind trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:533-40
- Warner JA, Jones CA, Jones AC, Warner JO. Prenatal origins of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: S493-6.
- Warner JO. European food labeling legislation - a nightmare for food manufacturers and allergy sufferers alike. *Pediatr Allergy Immunol* 2005; 16 (1): 1-2.
- Bibliografia essenziale C. 1
- Abbott M et al. Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: community guidance and best practices. *JAOAC Int*. 2010, 93: 442-45
- Hefle S et al. Antibodies. In : *Detecting allergens in food*. Koppermann J and Hefle L Eds, CRC Press 2006, pp 65-78
- Immer U. Factors affecting the effectiveness of allergen detection In: *Detecting allergens in food*. Koppermann J and Hefle L Eds, CRC Press 2006, pp 330-347
- Matsuda R et al. Interlaboratory evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay kits for the detection of egg, milk, wheat, buckwheat, and peanut in foods. *JAOAC Int*. 2006; 89: 1600-1608
- Norma Europea UNI EN 15633-1. Ricerca di allergeni alimentari mediante metodi immunologici. Parte 1: Considerazioni generali. Aprile 2009
- Norma Europea UNI EN 15842 Ricerca di allergeni alimentari. Considerazioni generali e validazione dei metodi. Aprile 2010
- Poms RE et al. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants* 2004, 21: 1-31
- Poms RE et al. Effect of roasting history and buffer composition on peanut protein extraction efficiency. *Mol. Nutr. Food Res*. 2004, 48: 459-464
- Poms R et al. Reference materials and method validation in allergen detection. In: *Detecting allergens in food*. Koppermann J and Hefle L Eds, CRC Press 2006, pp 348-356.
- Sakai S. et al. Interlaboratory evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay kits for the determination of crustacean protein in processed foods. *J. AOAC Int* 2008, 91 :123-130
- Schubert-Ullrich P et al. Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. *Anal Bioanal Chem* 2009, 395: 69-81
- Taylor SL et al. Allergen immunoassays-consideration for use of naturally incurred standards. *Anal. Bioanal.*

Chem. 2009, 395: 83-92

- van Hengel AJ. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Anal Bioanal Chem* 2007
- Westphal CD et al. Evaluation of extraction buffers using the current approach of detecting multiple allergenic and nonallergenic proteins in food. *JAOAC Int.* 2004, 87: 1458-1465

Bibliografia essenziale C. 2

- Altshuler ML. 2006. PCR Troubleshooting: The Essential Guide Book. Publisher: Caister Academic Press
- Coisson JD, Cereti E, Garino C, D'Andrea M, Recupero M, Restani P, Arlorio M. *Food Res. Int.* 2010, 43, 5, 1237-1243
- Dovicovicova L, Olexova L, Pangallo D, Siekel P, Kuchta T. *Eur. Food Res. Technol.* 2004, 218, 5, 493-495
- D'Andrea M, Coisson JD, Locatelli M, Garino C, Cereti E, Arlorio M. *Food Chem.* 2011, 124, 3, 1164-1171
- Di Bernardo G, Del Gaudio S, Galderisi U, Cascino A, Cipollato M. *Biotechnology Progress* 2007, 23(2), 297-301
- D'Andrea M, Coisson JD, Travaglia F, Garino C, Arlorio M. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 23, 11201-11208
- Holzhauser T, Stephan O, Vieths S. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 21, 5808-5815
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. *Biotechnology* 1992, 24, 17-27
- Pafundo S, Gulli M, Marmiroli N. *Food Chem.* 2009, 116, 3, 811-815
- Saunders GC, Parkes HC. 1999. *Analytical Molecular Biology Quality and Validation*, supplement 190: pp 81-102, Redwood Books Ltd., Wiltshire, UK
- Scaravelli E, Brohee M, Marchelli R, van Hengel AJ. *Eur. Food Res. Technol.* 2008, 227, 3, 857-869
- Schoringhumer K, Redl G, Cichna-Markl MJ. *Agric. Food Chem.* 2009, 57, 6, 2126-2134
- Stephan O, Vieths S. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 12, 3754-3760
- Weber P, Steinhart H, Paschke A. *Food Addit. Contam. A* 2010, 27, 3, 273-282.
- Bibliografia essenziale C. 3
- Chassaigne H, Norgaard JV, van Hengel AJ.

Proteomics-based approach to detect and identify major allergens in processed peanuts by capillary LC-Q-TOF (MS/MS). *J. Agric. Food Chem.*, 2007; 55: 4461-4473

- Monaci L, Losito I, Palmisano F, Visconti A. Identification of allergenic milk proteins markers in fined white wines by capillary liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J. Chrom. A.* 2010; 1217: 4300-4305
- Monaci L, Van Hengel AJ. Development of a method for the quantification of whey allergen traces in mixed-fruit juices based on liquid chromatography with mass spectrometric detection. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 1192: 113-120
- Poms RE, Klein CL, Anklam E. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit. contam.* 2004; 21: 1-31
- Schneider N, Becker CM, Pischetsrieder M. Analysis of lysozyme in cheese by immunocapture mass spectrometry. *J. Chrom. B.* 2010; 878: 201-206.
- Shefcheck KJ, Callahan JH, Musser SM, Confirmation of peanut protein using peptide markers in dark chocolate using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 7953-7959.
- Shefcheck KJ, Musser SM, Confirmation of the allergenic peanut protein, Ara h 1, in a model food matrix using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52: 2785-2790
- van Hengel AJ. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Anal Bioanal Chem.* 2007; 389: 111-118
- Weber D, Raymond P, Ben-Rejeb S, Lau B, Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method using capillary liquid chromatography and nanoelectrospray ionization-quadrupole time-of-flight hybrid mass spectrometer for the detection of milk allergens *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 1604-1610.

Bibliografia essenziale C. 4

- Monaci L, Visconti A. *Trends in Food Science & Technology* 2010, 21, 6, 272-283.

