



Ministero della Salute

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

Ufficio 5 - Nutrizione e informazione ai consumatori

ALLERGIE ALIMENTARI E SICUREZZA DEL CONSUMATORE



Documento di indirizzo e stato dell'arte

Italia 2018

SOMMARIO

Abstract	5
A - ALLERGIE ALIMENTARI: aspetti clinici ed epidemiologici	7
A 1 - DEFINIZIONE E TERMINOLOGIA.....	7
A 2 - QUADRI CLINICI	7
A 2.1 Quadri clinici IgE mediati	8
A 2.2 Sindrome orale allergica (SOA) o Pollen - Food related syndrome (PFS).....	8
A 2.3 Shock anafilattico.....	8
A 2.4 Orticaria – angioedema	9
A 2.5 Anafilassi da esercizio fisico e alimenti: manifestazioni allergiche (orticaria e anafilassi) associate ad esercizio fisico dopo consumo di un alimento.....	9
A 2.6 Disturbi respiratori	9
A 2.7 Disturbi gastroenterici	11
A 2.8 Quadri clinici misti IgE e cellulo-mediati: dermatite atopica e gastroenteropatie eosinofile	11
A 2.9 Quadri clinici cellulo mediati: enterocolite allergica da proteine alimentari e proctite da proteine alimentari.....	11
A 3 - DATI EPIDEMIOLOGICI.....	12
A 3.1 La situazione in Europa	12
A 3.2 La situazione in Italia	13
A 4 - ALLERGENI ALIMENTARI RILEVANTI NEGLI ADULTI E BAMBINI	15
A 4.1 Allergeni vegetali	16
A 4.2 Allergeni di origine animale	22
A 4.3 Allergeni emergenti.....	26
A 5 - DIAGNOSTICA DELLE ALLERGIE ALIMENTARI	27
A 5.1 Anamnesi	27
A 5.2 Esame obiettivo.....	27
A 5.3 Skin Prick Test (SPT)	28
A 5.4 Prick by prick	28
A 5.5 Atopy patch test.....	30
A 5.6 Test di provocazione orale nella diagnosi di allergia alimentare.....	30
A 5.7 Test utili in specifiche condizioni diagnostiche.....	31
A 5.8 Test non convenzionali.....	33
A 5.9 Test diagnostici privi di fondamento scientifico.....	34
A 5.10 Le difficoltà di comunicazione	35
A 6 - TERAPIA DELL'ALLERGIA ALIMENTARE E GESTIONE DEL PAZIENTE.....	37
A 6.1 La Dieta di eliminazione	37

A 6.2	<i>La terapia nell'urgenza: Adrenalina con autoiniettore e piano d'azione</i>	38
B - INFORMAZIONE AI CONSUMATORI, VALUTAZIONE E GESTIONE DEL RISCHIO		43
B.1	NORME DI ETICHETTATURA	43
B 1.1	<i>Gli allergeni in tracce o "nascosti"</i>	44
B 1.2	<i>Il consumatore allergico e i prodotti confezionati</i>	47
B 1.3	<i>Il consumatore allergico nella ristorazione collettiva</i>	47
B 1.4	<i>Il bambino allergico a scuola</i>	49
B 2	STRUMENTI E APPROCCI PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO NEL SETTORE DEGLI ALLERGENI ALIMENTARI	50
B 2.1	<i>Introduzione</i>	50
B 2.2	<i>Valutazione del rischio: aspetti generali</i>	52
B 2.3	<i>Approcci pratici per la valutazione del rischio e criticità</i>	54
B 2.4	<i>Esempi di applicazione dei principi di valutazione del rischio</i>	58
C - METODI ANALITICI PER L'IDENTIFICAZIONE E IL DOSAGGIO DEGLI ALLERGENI ALIMENTARI		59
C 1	METODI IMMUNOCHEMICI	59
C 1.1	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)</i>	59
C 1.2	<i>Lateral Flow Test</i>	61
C 1.3	<i>Immunelettroforesi-Immunoblotting</i>	62
C 2	METODI DI BIOLOGIA MOLECOLARE	64
C 2.1	<i>Metodi molecolari PCR-based</i>	64
C 2.2	<i>Altri approcci molecolari</i>	70
C 3	METODI CROMATOGRAFICI E SPETTROMETRIA DI MASSA	71
C 3.1	<i>Rivelazione diretta di proteine allergeniche intatte</i>	72
C 3.2	<i>Rivelazione di peptidi specifici come marker di proteine allergeniche</i>	72
C 4	CRITERI DI VALIDAZIONE ED ACCETTABILITÀ DELLE METODICHE ANALITICHE	72
ALLEGATI		79
BIBLIOGRAFIA		133

ABSTRACT

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'allergene 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.

A tale riguardo, in virtù delle evoluzioni normative, scientifiche e pratiche in materia di AA, è stato aggiornato il documento "Allergie alimentari e sicurezza del consumatore - documento d'indirizzo e stato dell'arte", già elaborato nel 2014.

Tale aggiornamento nei contenuti e nella grafica, non modifica la "mission" precedente e si rivolge a tutti i settori coinvolti: addetti all'assistenza sanitaria, medici, ditte produttrici di alimenti e di pasti, ristoratori, associazioni di consumatori e pazienti.

Negli ultimi anni, ci sono stati cambiamenti nella legislazione relativa all'etichettatura degli alimenti e, di conseguenza, le informazioni per i consumatori con allergia alimentare sono migliorate.

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 grava sul consumatore, creando insicurezza e frustrazione. D'altra parte va segnalato che, senza limiti di legge (valori soglia), le aziende si trovano in oggettiva difficoltà.

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

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'etichettatura dei prodotti alimentari.

Ancora oggi, 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. È di primaria importanza affrontare il tema delle metodiche analitiche che il settore della

produzione alimentare ha a disposizione, segnalando le criticità ad esse 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.

L'aggiornamento del documento è stato elaborato dall'ufficio 5 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*.

Un ringraziamento particolare a Federasma e Allergie ONLUS – Federazione Italiana Pazienti, e alla Sig.ra Sandra Frateiacchi – Delegato Rapporti Istituzionali, per i contributi forniti e la preziosa collaborazione. www.federasmaeallergie.org

*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 specifica e riproducibile legata all'ingestione degli alimenti. È una vera e propria malattia con precise caratteristiche che riguarda singoli individui; benché non sia trasmessa secondo le leggi mendeliane, esistono componenti genetiche che ne determinano la predisposizione. Diversamente dalle sostanze tossiche o dagli agenti infettivi, che costituiscono un pericolo per la popolazione generale, nel caso dell'AA talune molecole (principalmente proteine), normalmente presenti negli alimenti, sono in grado di determinare reazioni immediate o ritardate di diversa gravità fino ad eventi fatali per gli individui predisposti.

Non essendo ancora possibile una valutazione sistematica del rischio, l'inquadramento diagnostico e le indicazioni terapeutiche nei singoli pazienti, spesso non sono univoche, ma affidate all'esperienza dello Specialista; per questo è particolarmente indicato che la diagnosi di allergia alimentare, con i rischi clinici e la ridotta qualità della vita che comporta, sia affidata ai referenti per tale patologia, Specialisti in Allergologia ed Immunologia Clinica o con una competenza specifica in ambito Pediatrico. Un iter diagnostico appropriato e omogeneo che permetta la previsione del rischio e gli adeguati provvedimenti terapeutici, oltre a ridurre i costi diretti ed indiretti della patologia, renderebbe disponibili dati clinici ed epidemiologici rilevanti.

Con l'obiettivo di migliorare la qualità di vita e di proteggere la salute dei soggetti con allergia e intolleranza alimentare, dal 2014 è stato applicato il Regolamento Europeo 1169/2011, che rende obbligatoria la segnalazione degli allergeni anche negli alimenti non preconfezionati. Agli Stati membri è stato demandato di attivare linee guida e regole di applicazione. A oggi il risultato in Europa è ancora disomogeneo, nonostante la comune legislazione, con risultati non soddisfacenti, come segnalato dalle Associazioni di Pazienti: per superare tali limiti è auspicabile l'attivazione di linee attuative semplificate e di percorsi di formazione mirati per gli operatori del settore alimentare.

A 2 - QUADRI CLINICI

La presentazione clinica delle allergie alimentari può variare in base all'età, all'allergene alimentare coinvolto, al tipo e alla tempistica della reazione. La presenza di comorbidità atopica, l'evoluzione verso la tolleranza e la risposta all'immunoterapia, inoltre, possono essere valutati per definire quadri clinici omogenei (fenotipi):

- In base all'età ed alla risoluzione nel tempo: fattori rilevanti nella presentazione dell'allergia alimentare nell'infanzia, adolescenza o età adulta sono l'assetto genetico, i livelli di cellule T regolatorie e di citochine, il diametro del pomfo prodotto allo skin prick test e il livello delle IgE specifiche per alcuni componenti molecolari
- In base al tipo di allergene e alla severità della manifestazione clinica: la sensibilizzazione a particolari allergeni, le IgE specifiche per alcuni componenti molecolari, il rapporto tra IgE specifiche ed IgE totali, i livelli sierici del PAF e della PAF-acetilidrolasi sono utili alla stima del rischio di gravi reazioni.

I fenotipi, in base al coinvolgimento di anticorpi o altri mediatori cellulari possono essere classificati in subclassi (endotipi). L'approccio terapeutico mirato, basato sul profilo endotipico, viene denominato medicina di precisione o personalizzata (Muraro et al., 2017).

A 2.1 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 dell'alimento coinvolto (2-4 ore) e sono tanto più gravi quanto più precocemente insorgono. Un quadro particolare di allergia IgE mediata è rappresentato dall'allergia al galattosio-alfa-1,3 galattosio (alfa-gal), caratterizzata da una reazione ritardata che avviene anche dopo 12 ore dal consumo di carne rossa (bovina, ovina, suina) con quadri clinici di gravità variabile fino ad arrivare all'anafilassi.

Le allergie alimentari IgE mediate possono essere causate da una sensibilizzazione primaria, diretta ad un allergene alimentare specifico; ancora più frequente (60%) è la sensibilizzazione a strutture condivise tra allergeni respiratori ed alimentari. Gli anticorpi IgE che riconoscono tali strutture omologhe chiamate epitopi, determinano il fenomeno della cross-reattività tra quelli che vengono definiti panallergeni. Il profilo di sensibilizzazione dei soggetti interessati è influenzato, oltre che da fattori genetici, dall'area geografica di residenza. I pollini presenti nelle varie aree possono quindi influenzare i differenti profili di sensibilizzazione.

A 2.2 SINDROME ORALE ALLERGICA (SOA) O POLLEN - FOOD RELATED SYNDROME (PFS)

Si caratterizza per l'insorgenza di prurito con edema limitato in genere al cavo orale per ingestione di frutti come la mela. Deriva da una sensibilizzazione primaria a pollini di alberi, in particolare appartenenti alla famiglia delle *Betulaceae* come betulla e nocciolo, ricchi di una proteina chiamata Bet v 1 che è presente in forme omologhe nei vegetali della famiglia delle *Rosaceae*, che comprende appunto mela, pesca, ciliegia, noci, nocciole ed altri frutti e vegetali. Le proteine omologhe a Bet v 1 sono inattivate dalla digestione peptica e dai trattamenti termici della cottura o della lavorazione industriale. La sintomatologia è quindi fugace, limitandosi a prurito delle labbra e del cavo orale; le eccezioni a questa regola sono rappresentate da bevande o farine a base di soia, e dalla frutta a guscio in quantità elevata, la cui ingestione può dar luogo a reazioni anche gravi. La sintomatologia è più intensa nel periodo di esposizione stagionale ai pollini. Oltre alla sensibilizzazione al polline di alberi ed altri pollini, anche quella al Lattice di gomma determina un quadro caratteristico di reazioni ad alimenti come banana, avocado ed altri che contengono proteine cross-reattive.

Raramente evolve verso manifestazioni cliniche che superino il cavo orale (7% circa) o verso l'anafilassi (1-2%).

A 2.3 SHOCK ANAFILATTICO

È una reazione sistemica a rapida insorgenza coinvolgente diversi organi ed apparati che può includere la perdita di coscienza; è correlata con la liberazione immediata di mediatori vasoattivi, come l'istamina e può insorgere a qualsiasi età (Muraro, 2014).

Tutti gli alimenti possono indurre anafilassi, ma i classici "big eight", gli otto gruppi di alimenti più frequentemente in causa sono: arachidi, frutta a guscio, soia, crostacei e molluschi, pesce, latte, uova, e cereali (Allen, 2012).

La diagnostica molecolare (Food Component Resolved Diagnosis) ha consentito di evidenziare che a causare tale reazione sono molecole allergeniche particolarmente resistenti, non alterate dalla digestione peptica, né dal calore della cottura, né dalla lavorazione industriale. Nei Paesi dell'area mediterranea i quadri clinici gravi più spesso si correlano con la sensibilizzazione nei confronti della Lipid Transfer Protein (LTP) e di altre molecole con tali caratteristiche.

A 2.4 ORTICARIA - ANGIOEDEMA

Sono eventi clinici, caratterizzati 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, anche se sembrano più frequenti nell'età pediatrica; qualsiasi alimento può scatenare tali sintomi, anche se in realtà tale correlazione è molto più rara di quanto i genitori pensino.

A 2.5 ANAFILASSI DA ESERCIZIO FISICO E ALIMENTI: 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 dell'alimento stesso. La manifestazione 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 (farmaci antiinfiammatori non steroidei).

Pertanto, a tali soggetti 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 fare sempre una forma di "riscaldamento" prima di iniziare l'attività fisica, di interrompere l'attività alla minima comparsa di sintomi e di iniziare subito il trattamento farmacologico con antistaminici e se necessario adrenalina.

Da segnalare che l'anafilassi da sforzo può avvenire in alcuni soggetti, anche in assenza di sensibilizzazione allergiche o correlazioni con l'ingestione di alimenti (in particolare in soggetti affetti da mastocitosi).

A 2.6 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, dell'uovo e del pesce.

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 ed alfa amilasi. 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.

A 2.7 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.

A 2.8 QUADRI CLINICI MISTI IGE E CELLULO-MEDIATI: DERMATITE ATOPICA E GASTROENTEROPATIE EOSINOFILE

La dermatite atopica è una sindrome caratterizzata da sintomi che possono coinvolgere variamente diverse fasce d'età ed estendersi a diverse aree corporee. 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) e del tratto gastrointestinale.

Nell'età pediatrica l'associazione con la sensibilizzazione IgE mediata ad alimenti è nell'ordine di circa il 35%, ma è fondamentale che venga correttamente accertato che ci sia un nesso di causalità con alimenti, molto meno frequente di quanto abitualmente si creda, per evitare diete inutili e, a volte, dannose.

Nelle 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.

A 2.9 QUADRI CLINICI CELLULO MEDIATI: ENTEROCOLITE ALLERGICA DA PROTEINE ALIMENTARI E PROCTITE DA PROTEINE ALIMENTARI

L'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 spontanea. 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.

La proctite da proteine alimentari è tipica dell'infanzia, è correlata con infiammazione eosinofila localizzata ed è caratterizzata dalla comparsa di sanguinamento e mucillagini nelle feci; si associa principalmente al latte vaccino.

A 3 - DATI EPIDEMIOLOGICI

Nonostante i recenti sviluppi nelle conoscenze, i dati epidemiologici riguardanti le allergie alimentari sono ancora piuttosto eterogenei, in quanto le rilevazioni non sono metodologicamente omogenee, differendo per standard diagnostici, in particolare per quanto riguarda l'utilizzo del gold standard rappresentato dal test di provocazione orale in singolo o doppio cieco, non frequentemente utilizzato. Studi condotti 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).

Dati recenti attestano come le allergie alimentari interessino 15 milioni di persone negli USA (Gupta 2011) con prevalenza complessiva del 3-6%, fino al 10% in alcune zone (Sicherer, 2011). La prevalenza dell'AA presenta una differente distribuzione geografica determinata da differenti abitudini (e mode) dietetiche, dalle modalità prevalenti di cottura dei cibi, dalle modalità e tempi dello svezzamento nelle diverse popolazioni, dall'esposizione agli aeroallergeni, importante nel determinare i profili di sensibilizzazione nelle varie regioni, ed infine da fattori genetici (Bartra et al., 2016).

Allattamento al seno e svezzamento

- L'allattamento al seno rimane l'approccio nutrizionale migliore, più completo e da indicare sempre alla madre nutrice che ne può disporre.
- Nei primi 4-6 mesi di vita ha certamente un ruolo protettivo nei confronti delle malattie allergiche
- Recenti osservazioni hanno suggerito l'introduzione degli alimenti solidi nei primi 4-6 mesi di vita al fianco dell'allattamento materno
- Non si è grado di affermare se sia proprio il concomitante allattamento materno a favorire la tolleranza degli alimenti solidi introdotti nella dieta.
- I tempi di introduzione dei primi alimenti solidi non deve cambiare fra il lattante sano e il lattante con rischio atopico (colui che presenta un parente di I grado con comprovata malattia allergica)

A 3.1 LA SITUAZIONE IN EUROPA

Proprio in Europa è stato effettuato il primo studio sistematico per ottenere dei dati epidemiologici di buona qualità su una larga quota di popolazione: questionari validati, studi di coorte, utilizzazione di iter diagnostici standardizzati comprendenti test di provocazione orale in doppio cieco (DBPCFC) e l'utilizzo delle nuove metodiche diagnostiche molecolari hanno permesso di ottenere una fotografia più precisa della situazione europea. Negli studi di Burney et al. (2010 e 2014), partecipanti scelti nella popolazione generale di otto grandi città europee, di età compresa tra i 20 e i 53 anni hanno completato approfonditi questionari e sono stati sottoposti ad indagini sierologiche mirate; i risultati hanno evidenziato elevati livelli di sensibilizzazione ad allergeni alimentari secondarie alla sensibilizzazione a pollini.

Le sensibilizzazioni primarie a singoli allergeni alimentari sono invece più rare, e non omogeneamente distribuite: la specifica sensibilizzazione a sesamo, gamberi e nocciola si sono rivelate le più frequenti. Nello studio EuroPrevall (Fernandez-Rivas et al, 2015, Wong et al, 2010) 19

Paesi europei, rappresentativi delle diverse aree geografiche e climatiche dell'Europa, sono stati coinvolti in un progetto multidisciplinare. L'indagine è stata svolta contemporaneamente in altri Paesi del mondo, USA, Australia, Nuova Zelanda, Ghana, India, Cina e Russia, e si è rivolta a fasce d'età che comprendevano l'infanzia, adolescenza ed età adulta. Lo studio ha dimostrato un'ampia variabilità tra aree geografiche differenti, che impedisce di poter trarre conclusioni generalizzabili. Nell'ambito di EuroPrevall allo scopo di valutare non solo le sensibilizzazioni ma anche l'espressione clinica, sono stati applicati studi di coorte alla popolazione pediatrica. In particolare per quanto riguarda la sensibilizzazione al latte (CMA), tali studi hanno permesso di determinare l'incidenza e la storia naturale della CMA in bambini a partire dai 2 anni di età in 19 centri.

Il sospetto diagnostico in 358 bambini è stato confermato in 55 di essi; ne è derivata una stima dell'incidenza dello 0,54% (0,41-0,70) nei primi anni di vita. Tale stima, che è stata confermata da test di scatenamento in doppio cieco DBPCFC, è valida in tutti i Paesi, eccetto Grecia ed Italia, in cui la prevalenza è minore. Per quanto riguarda i bambini più grandi, gli adolescenti e gli adulti, molte delle reazioni ad alimenti sono dovute al fenomeno della cross-reattività tra allergeni respiratori, prevalentemente pollini, e alimenti vegetali (Werfel et al., 2015). La sensibilizzazione a polline di betulla, contenente l'allergene Bet v 1, è quella che conduce alla maggioranza delle sensibilizzazioni, in particolare ad alimenti come la mela, appartenenti alla famiglia delle *Rosaceae*.

A 3.2 LA SITUAZIONE IN ITALIA

I risultati dello studio prima citato EuroPrevall dimostrano come la situazione in Italia, pur con differenze regionali dovute alla configurazione del nostro Paese, in analogia con altri Paesi dell'area mediterranea, Spagna e Grecia, veda come causa più frequente di allergia ai vegetali le 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.

Un recente studio su più di 1200 bambini, svolto dalla rete I-PAN (Italian Pediatric Allergy Network) avvalendosi della diagnostica molecolare, ha dimostrato che la pollen-food syndrome (PFS) è molto frequente anche in pediatria ed ha individuato 5 diversi endotipi, a diversa distribuzione in Italia (Mastrorilli et al., 2016).

La situazione sanitaria del Paese, nel 2004-2005, evidenziava 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 2016 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 per classe di età (anni) e sesso
(ISTAT 2016)

Fascia di età	Totale	Maschi	Femmine
0-14	6,8	7,4	6,1
15-17	11,7	12,5	10,8
18-19	13,4	12,8	14,1
20-24	14,5	14,1	15,0
25-34	12,2	11,7	12,7
35-44	11,9	10,8	13,1
45-54	12,3	10,4	14,1
55-59	12,5	11,1	13,8
60-64	9,7	8,3	11,0
65-74	9,4	7,4	11,3
≥ 75	8,6	6,6	9,9
Tutta popolazione	10,7	9,7	11,6

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 scientifica, l'allergia alimentare si presenta con ampie differenze di prevalenza, che variano tra il 3,24% e 34,9% nella popolazione generale (Madsen, 2005).

Un'acquisizione condivisa è che la prevalenza dell'allergia alimentare, a differenza delle malattie allergiche considerate nel loro complesso (Tabella 1), 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).

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 di adrenalina per l'urgenza medica.

Dati più precisi riguardano l'anafilassi. L'incidenza delle reazioni anafilattiche, per quanto registrato 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, sull'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 un'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 lattice (Asero et al., 2009).

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%. Un quadro particolare di cross-reattività, inizialmente osservato negli USA e recentemente segnalato in Italia in aree rurali alpine (Calamari et al., 2015), è rappresentato dalla sensibilizzazione all'alfa-gal (galattosio alfa 1,3-galattosio) disaccaride contenuto nella saliva della zecca ed in grado di determinare una sensibilizzazione alla carne rossa (bovini, ovini, suini e cacciagione).

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 BAMBINI

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

Vengono di seguito considerati gli alimenti inclusi nella lista degli Allergeni alimentari della legislazione vigente (Regolamento UE 1169/2011). Un'ulteriore sezione definita "Allergeni emergenti" descriverà alcune allergie ad alimenti non inclusi nella lista della legislazione vigente, ma ritenuti di particolare interesse per la popolazione Italiana.

La nomenclatura degli allergeni prevede un'univoca sequenza di:

- Tre lettere di cui la prima maiuscola derivante dal genere dell'animale o della pianta a cui l'allergene appartiene;
- Una lettera (in caso di omonimia due) minuscola che è associata alla specie;
- Un numero progressivo in relazione all'ordine d'identificazione dell'allergene.

Nella Tabella 2 vengono riportati alcuni esempi di nomenclatura ufficiale degli allergeni.

Tabella 2 - Esempi di nomenclatura ufficiale di alcuni allergeni alimentari

Alimento	Allergene	Genere	Specie	Ordine di identificazione	Nomenclatura
Arachide	Conglutina	Arachis	hypogaea	2	Ara h 2
Soia	Profilina	Glycine	max	3	Gly m 3
Latte vaccino	Beta-caseina	Bos	domesticus	11	Bos d 11
Uovo di gallina	Ovomucoide	Gallus	domesticus	1	Gal d 1

La nomenclatura ufficiale è stata pubblicata per la prima volta nel 1986 ed è periodicamente aggiornata (Marsch et al., 1986). La lista è liberamente consultabile sul sito del “WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee” (<http://www.allergen.org>). Per coloro che fossero interessati agli aspetti molecolari, gli Allegati A 4.1, A 4.2 e A 4.3 riportano, per ciascun alimento descritto, gli allergeni riconosciuti a livello internazionale e quindi dotati di nomenclatura ufficiale.

Si possono pertanto consultare le tre maggiori banche dati del settore, di cui negli allegati si elencano i codici di riferimento:

- Allergome: <http://www.allergome.org>
- GenBank: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- UniProt: <http://www.uniprot.org>.

A 4.1 ALLERGENI VEGETALI

Gli allergeni di origine vegetale sono stati classificati in superfamiglie, famiglie e sottofamiglie di proteine allergeniche, in considerazione delle rispettive proprietà strutturali e/o funzionali (Breiteneder & Mills, 2005; Radauer et al., 2008). La scoperta di queste proteine, la loro classificazione e caratterizzazione ha dato un apporto determinante alla diagnosi, all'inquadramento clinico, e alla valutazione del rischio specifico dei Pazienti con sensibilizzazione ad allergeni vegetali (Zuidmeer et al., 2008). Nella descrizione dei singoli allergeni verranno fatti riferimenti alle molecole nell'ambito di quadri clinici caratteristici.

- 1) Superfamiglia delle cupine include la famiglia delle proteine di riserva dei semi: viciline (globuline 7S) e delle legumine (globuline 11S), importanti fonti di proteine per la dieta umana ma con elevato valore allergenico.
- 2) Superfamiglia delle prolamine comprende:
 - la famiglia delle proteine di riserva appartenenti alle albumine 2S, presenti in noci, nocciole, arachidi, e in semi come sesamo e senape;
 - la famiglia delle nsLTP (lipid transfer proteins) aspecifiche, tra cui gli allergeni più importanti della buccia dei frutti delle *Rosaceae* (mele, pesche, ecc.);
 - la famiglia degli inibitori dell'alfa amilasi e delle proteasi, tra questi alcuni importanti allergeni dei cereali;
 - la famiglia delle prolamine dei cereali, note per il loro coinvolgimento nella malattia celiaca.
- 3) Famiglia di Bet v 1, la proteina principale del polline di betulla, comprende un'importante sottofamiglia, costituita dalle proteine di difesa delle piante che includono numerosissime

componenti prodotte dalla pianta in risposta a stress, quali quelli determinati da patogeni (funghi, batteri e virus) o avverse condizioni ambientali. Tali proteine sono presenti nel polline, nei semi, e nei frutti delle piante, rappresentando la causa più frequente di reazioni orali allergiche (Vieths et al., 2002).

- 4) Superfamiglia delle profiline si trovano in tutte le cellule eucariotiche, spesso definite allergeni universali o panallergeni; appartengono a questo gruppo alcuni allergeni della betulla, del lattice e di molti frutti che cross-reagiscono con pollini (pesca, ciliegia, banana, melone, 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. Lo spettro delle patologie correlate all'esposizione al glutine comprende attualmente l'allergia al grano, la celiachia e l'intolleranza al glutine non celiaca (quest'ultimo quadro clinico dai confini diagnostici ancora imprecisi): è quindi di fondamentale importanza effettuare un iter diagnostico appropriato per differenziare le diverse condizioni.

L'allergia al grano riconosce quadri clinici diversi:

- quadri di allergia alimentare che insorgono preferenzialmente nell'infanzia, nei soggetti atopici, con una sintomatologia cutanea, gastrointestinale o respiratoria, e raramente perdurano oltre i 10 anni di età, legati a sensibilizzazione a omega-5 gliadina, agli inibitori delle amilasi e alle glutenine;
- l'anafilassi da sforzo e ingestione di farina di grano, caratteristica di adolescenti o adulti, di cui sono markers la sensibilizzazione ad omega-5 gliadina (Beyer et al., 2008) e a Tri a 14 (LTP (Pastorello et al., 2007).
- L'asma del panettiere è legato ad una sensibilizzazione inalatoria alla farina, che raramente si associa ad allergia alimentare; al contrario l'orticaria da contatto legata a sensibilizzazione, anche attraverso cosmetici, a proteine idrolizzate di grano, può preludere ad un'anafilassi da ingestione alimentare.

Il prick test per farina può essere positivo in soggetti con sensibilizzazione alle Poaceae (o Graminaceae); per la diagnosi certa di allergia alla farina sono necessari test in vitro per molecole allergeniche specifiche e test di tolleranza orale.

ARACHIDE (ARACHIS HYPOGAEA)

Le arachidi appartengono alla famiglia delle Leguminosae, e sono coltivate e consumate in tutto il mondo; le differenti modalità di cottura nei diversi Paesi sono rilevanti dal punto di vista allergologico. È infatti ormai noto come la tostatura delle arachidi ad elevata temperatura ne accresca la allergenicità, spiegando la maggiore prevalenza di reazioni in Paesi come gli USA. L'arachide è spesso responsabile di fenomeni allergici anche gravi come lo shock anafilattico.

Il potenziale allergenico dell'arachide persiste ai comuni trattamenti tecnologici che portano alla produzione di derivati (burro e farina di arachide). Risulterebbe invece tollerato dalla maggior parte

dei soggetti allergici l'olio di arachide, se sottoposto a processi di rettifica (praticamente sempre applicato), in grado di allontanare quasi totalmente la frazione proteica; l'olio non raffinato può invece contenere quantità di allergene sufficiente a scatenare una reazione allergica. Gli allergeni dell'arachide appartengono a diverse famiglie di proteine, il che determina cross-reattività con altri legumi o con altri alimenti vegetali.

Il profilo di sensibilizzazione ai singoli allergeni è determinato, oltre che dalla predisposizione genetica, dalla via di esposizione e dalle caratteristiche di stabilità e concentrazione degli stessi (Ballmer-Weber et al., 2015).

Sensibilizzazione agli allergeni stabili dell'arachide in bambini con eczema e alterazioni della barriera cutanea sembra essere alla base di successive reazioni gravi, sistemiche, come orticaria, vomito, dispnea e calo della pressione.

La sensibilizzazione ad altre proteine, come Ara h 8, omologo di Bet v 1, è invece legata alla cross-reattività con polline di *Betulaceae*, ed Ara h 5 con *Poaceae* (ex *Graminaceae*); gli allergeni sono più labili a cottura e digestione gastrica, e quindi meno correlati a reazioni gravi.

Nei Paesi Mediterranei, la sensibilizzazione a a nsLTP (Pru p 3) sembra determinare, per cross-reattività la positività alla molecola Ara h 9 che, per le caratteristiche di resistenza alla denaturazione, è una possibile causa di reazioni sistemiche (Romano et al., 2012).

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).

Va comunque sottolineato che, sebbene si osservi frequentemente co-sensibilizzazione tra

CROSS-REATTIVITÀ

- ANACARDO e PISTACCHIO (*Anacardiaceae*)
- NOCE e NOCE PECAN (*Juglandaceae*)

arachide ed altri legumi/frutta a guscio in test in vitro (RAST o Immunocap), 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.

SOIA (GLYCINE MAX)

La soia è un legume ricco di proteine e rappresenta una fonte alimentare poco costosa e molto utilizzata nell'alimentazione. Utilizzata in passato nelle formule destinate all'allattamento dei soggetti allergici al latte vaccino, la soia si è dimostrata a sua volta in grado di indurre sensibilizzazione (Ballmer-Weber & Vieths, 2008).

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 (EFSA, 2007a, 2007b). Più a rischio di causare allergia, sia pur raramente, è la lecitina di soia. I prodotti di soia fermentata come salsa di soia e miso sono meno allergenici rispetto a latte di soia e tofu.

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 rettificato, 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 (EFSA 2007a, 2007b).

L'allergia alla soia può derivare da una genuina sensibilizzazione a questo allergene alimentare, o ad una cross-reattività legata alla sensibilizzazione a pollini di *Betulaceae*. I diversi quadri clinici osservati evidenziano la possibilità di una sensibilizzazione precoce ad allergeni stabili (Gly 5-8), in soggetti atopici, con successive reazioni sistemiche. Nel 70% dei soggetti sensibilizzati al polline di *Fagales* contenente Betv1, che cross-reagisce con Gly 4, si possono osservare reazioni orofaringee; in alcuni casi anche reazioni sistemiche, per ingestione di bevande a base di soia, o preparati a base di soia in polvere (Holzhauser et al., 2009).

CONSIGLI DIETETICI ALLERGIA SOIA

- **REAZIONE GRAVE, SCATENATA DA PICCOLA QUANTITÀ:** evitare completamente SE NON DIVERSAMENTE CONCORDATO CON IL MEDICO ALLERGOLOGO
- **REAZIONE LIEVE MODERATA, SCATENATA da DOSE CONSISTENTE:** evitare parzialmente
- Salsa di soia (miso, shoyu e natto), che sono prodotti fermentati, sono **MENO** allergenici di latte di soia e tofu
- è opportuno evitare latte di soia, tofu, e farina di soia.

FRUTTA A GUSCIO E SEMI

Tra gli allergeni della frutta a guscio e dei semi troviamo componenti di tutte le famiglie di allergeni vegetali descritte in precedenza. Sono proteine stabili non denaturate dai trattamenti termici a cui questi frutti vengono comunemente sottoposti prima della commercializzazione. Frutta a guscio e semi condividono molti allergeni comuni, che appartengono a famiglie delle proteine di deposito, nsLTP e oleosine. Le relazioni botaniche determinano la somiglianza tra famiglie di proteine di noci e semi.

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

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 (*Corya illinoiensis*), la noce del Brasile (*Bertholletia excelsa*), il pistacchio (*Pistachia vera*) e la noce del Queensland (*Macadamia ternifolia*).

Tra i semi, sesamo e senape sono quelli più frequentemente coinvolti nei fenomeni allergici.

Le possibili reazioni immunologiche determinano varie possibilità di sensibilizzazione

- primaria, genuina, ad un singolo o più frutti a guscio e semi, correlati botanicamente e non;
- cross-reattività con pollini;
- co-sensibilizzazione ad allergeni diversi presenti in semi e frutti a guscio.

Queste diverse possibilità vanno indagate per evitare esclusioni dietetiche di difficile applicazione: gli allergici ad un singolo seme/frutto a guscio potranno evitare solo quello; la nota cross reattività tra pistacchio e anacardo, e quella tra noce e pecan comportano invece l'esclusione dietetica di entrambi. Noce e nocciola cross-reagiscono, ma spesso è possibile evitare solo quella che ha dato le reazioni più gravi. I soggetti polisensibilizzati a frutti a guscio e semi con elevati livelli di IgE specifiche, e con precedenti reazioni devono invece del tutto evitare questi alimenti.

SEDANO

Viene consumato sia crudo sia cotto in tutta Europa, 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 et al., 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). Non è ancora stato individuato un marker che possa predire la comparsa di reazioni orofaringee o reazioni sistemiche gravi; la contemporanea sensibilizzazione ad *Asteraceae* (Composite) sembra legata ad una maggiore gravità delle reazioni.

PROTEINE DI TRASPORTO LIPIDICO NON SPECIFICHE (NSLTPS)

Le proteine di trasporto lipidico non specifiche (nsLIPID TRANSFER PROTEIN), appartenenti alla superfamiglia delle Prolamine, si sono dimostrate, in questi ultimi decenni, le principali responsabili di reazioni allergiche alimentari a vegetali nei Paesi mediterranei (Asero et al, 2000 e 2014; Heinzerling et al., 2011; Ortolani et al., 1988; Sanchez-Monge et al., 1999), al contrario dei Paesi del nord ed est Europa.

Pru p 3 è l'allergene maggiore della pesca (Fernandez-Rivas et al., 2003; Pastorello et al., 1999, 2011); a differenza degli altri allergeni delle prolamine, le nsLTP non sono confinate nei semi, ma sono presenti nella polpa ed in misura maggiore nella buccia della frutta, con concentrazioni variabili in base alla cultivar/varietà del frutto stesso, al grado di maturazione ed anche dalla conservazione. Una caratteristica fortemente distintiva di queste molecole allergeniche è rappresentata dalla resistenza al calore, e quindi alla cottura, ed alla digestione gastrica. La presenza di molecole ancora reattive dal punto di vista allergologico può essere riscontrata in prodotti che hanno subito trattamenti tecnologici, come succhi di frutta e marmellate o conserve. La

FATTORI FAVORENTI LE REAZIONI A nsLTP

- ESERCIZIO FISICO
- ASSUNZIONE DI ALCOLICI
- USO DI ANTIACIDI
- ASSUNZIONE DI ANTINFIAMMATORI NON STEROIDEI
- SENSIBILIZZAZIONE SPECIFICA SOLO A nsLTP

sensibilizzazione a queste molecole è sempre più rilevante anche in ambito pediatrico (Pastorello et al., 2013); la sintomatologia nei bambini sensibilizzati si evidenzia precocemente, e tanto più è precoce tanto più può evolvere verso un quadro di polisensibilizzazione. La sintomatologia correlata a nsLTPs può essere rappresentata da tutto lo spettro delle reazioni allergiche, dalla sindrome orale allergica all'orticaria, dalla sintomatologia gastrointestinale a quella respiratoria fino alla anafilassi. Nel nostro Paese, rappresenta una delle più frequenti sensibilizzazioni associate all'anafilassi da sforzo e alimenti (Asero et al., 2009). La distribuzione di Pru p 3 nei vegetali è molto vasta, e non è facile la valutazione del rischio e la previsione del quadro di reattività del singolo Paziente: la nsLTP della farina ha dimostrato ad esempio di essere responsabile di alcuni casi di anafilassi da sforzo e alimenti (FDEIA), e le farine di riso e mais sono state più volte causa di reazioni gravi, confermate da test odi scatenamento in doppio cieco (DBPCFC); le correlazioni più diretta esiste con gli alimenti delle *Rosaceae* (mela, prugna, albicocca ed altri); ma il gruppo delle noci e le arachidi, anche se non correlati botanicamente, hanno una spiccata rilevanza clinica e possono essere causa di reazioni sistemiche; fagiolini, finocchio, arancio, lenticchie sono stati oggetto di segnalazioni. Da ricordare che la letteratura segnala come i soggetti sensibilizzati specificamente a nsLTP, non sensibilizzati a pollini, siano quelli a maggior rischio di reazioni; la sensibilizzazione multipla a molecole allergeniche sembra rappresentare un fattore protettivo. L'uso di antiacidi, l'assunzione di antinfiammatori non steroidei, l'ingestione di alcol e lo sforzo fisico associati all'ingestione di alimenti che contengono LTP costituiscono cofattori che aumentano il rischio di reazioni sistemiche.

A 4.2 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 in età pediatrica; la sua elevata prevalenza deriva dal fatto che i neonati che non possono essere allattati al seno, vengono alimentati con formule modificate a base di latte vaccino.

L'imaturità funzionale dell'apparato gastro-intestinale e del sistema immunitario nei primi mesi/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 però normalmente un'evoluzione favorevole, con l'insorgenza della tolleranza nella grande maggioranza dei casi entro i tre anni di vita (Høst & Halken, 1990; Fiocchi et al., 2010; Savilahti & Savilahti, 2013). Un importante documento sulla problematica dell'allergia al latte è stato pubblicato da Fiocchi e collaboratori nel 2010 (Fiocchi et al, 2010). Le proteine del latte sono classificate in caseine e sieroproteine, e costituiscono l'80 e il 20%, rispettivamente, delle proteine totali del latte. Le caseine (che comprendono α_{s1} , α_{s2} , 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 (Restani et al, 2009a).

Le sieroproteine sono la frazione proteica che rimane solubile dopo la cagliatura del latte effettuata durante la produzione dei formaggi; includono: alfa-lattoalbumina e beta-lattoglobulina (sintetizzate a livello della ghiandola mammaria), la sieralbumina e le immunoglobuline (di origine plasmatica), e altre proteine minori, quali lattoferrina e lisozima.

Dal momento che la beta-lattoglobulina è assente nel latte di donna, si credeva in passato che questa proteina rappresentasse l'allergene principale 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 o 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 da parte dei soggetti allergici del latte trattato termicamente. Alcuni studi hanno dimostrato che una percentuale elevata di soggetti allergici al latte ne può tollerare una certa quantità, se contenuto quale ingrediente di prodotti da forno (biscotti, torte, ecc.) (Leonard et al, 2015, Novak-Wegrzyn et al, 2008); tale possibilità va tuttavia esplorata in ambiente ospedaliero.

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; tra queste, le formule fortemente idrolizzate sono specificamente destinate all'allattamento dei neonati allergici al latte vaccino. La cross-reattività è un argomento estremamente delicato per i soggetti allergici al latte, e bisogna essere molto diffidenti quando viene ipotizzata la tolleranza a latte di altra specie animale senza comprovata valutazione clinica (caso tipico è il latte di capra). La "tossicità" e la tolleranza dei lattini di altre specie mammifere va valutata caso per caso e non si può generalizzare vista l'estrema complessità del problema (Restani et al., 2002).

Un altro aspetto critico è la distinzione tra l'allergia alle proteine del latte e l'intolleranza al lattosio (Bahna, 2002). Nel primo caso, in cui è coinvolto il sistema immunitario, la gravità della sintomatologia può portare anche ad eventi fatali (shock anafilattico) e il consumo di latte deve essere totalmente eliminato, se non diversamente deciso dal pediatra immunologo (per esempio nel caso della desensibilizzazione orale). Nell'intolleranza al lattosio, in cui risulta compromessa l'attività dell'enzima beta-galattosidasi (lattasi), la sintomatologia è di tipo gastro-intestinale e a parte rare eccezioni non comporta conseguenze gravi. L'intolleranza al lattosio è rarissima nei neonati e compare in genere in età adolescenziale; è dose dipendente e, sebbene esista un test diagnostico specifico (dosaggio dell'idrogeno espirato), in linea di massima il singolo consumatore è in grado di identificare la sua soglia di tolleranza.

CONSIGLI DIETETICI PER L'ALLERGIA AL LATTE

- EVITARE I PRODOTTI CHE RIPORTANO IL LATTE TRA GLI INGREDIENTI IN ETICHETTA
- ANCHE I PRODOTTI CON LA DICITURA "può contenere" o "confezionato in stabilimenti che producono anche.." DEVONO ESSERE EVITATI SE NON DIVERSAMENTE CONCORDATO CON IL MEDICO ALLERGOLOGO
- IL LATTE DI ALTRE SPECIE ANIMALI (BUFALA, CAPRA, PECORA) DEVE ESSERE EVITATO PERCHÉ RESPONSABILE DI POSSIBILI REAZIONI ALLERGICHE ANCHE GRAVI
- IL CONSUMO DI LATTE DI ALCUNE SPECIE DI MAMMIFERO (ASINA, CAVALLA) PUÒ ESSERE AMMESSO MA SEMPRE SOTTO CONTROLLO DEL MEDICO ALLERGOLOGO
- TALORA I PRODOTTI DA FORNO (TORTE, BISCOTTI) CONTENENTI LATTE POSSONO ESSERE TOLLERATI MA IN OGNI CASO L'INTRODUZIONE VA FATTA SOTTO CONTROLLO DEL MEDICO ALLERGOLOGO

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 proteine dell'albume e di queste l'ovotransferrina e il lisozima sembrerebbero responsabili della sensibilizzazione solo in un limitato numero di soggetti (Caubert & Wang, 2011). Anche nel tuorlo sono state descritte proteine allergeniche sebbene, in alcuni casi, la reattività riscontrata nei test clinici possa 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). In passato, solo la livetina (sieroalbumina) era considerata un allergene vero e proprio del tuorlo, ed è associata alla "Bird-egg syndrome (sindrome che prevede reattività a uovo e piume di uccello) (Quince et al., 2001; Szepefalusi et al. 1994); a questo allergene però più recentemente è stata aggiunta la vitellogenina (Arno et al., 2010).

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 sia 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.

Si è osservato però che una certa percentuale di soggetti tollera l'uovo molto cotto o meglio ancora quando l'uovo è presente, quale ingrediente dei prodotti da forno (biscotti, torte, ecc.) (Lemon-Mulé et al, 2008; Leonard et al, 2015). La tolleranza non deve comunque essere sperimentata individualmente, ma deve essere valutata sotto stretto controllo medico.

CONSIGLI DIETETICI PER L'ALLERGIA ALL'UOVO

- **EVITARE I PRODOTTI CHE RIPORTANO LE UOVA TRA GLI INGREDIENTI IN ETICHETTA**
- **ANCHE I PRODOTTI CON LA DICITURA "può contenere" o "confezionato in stabilimenti che producono anche.." DEVONO ESSERE EVITATI SE NON DIVERSAMENTE CONCORDATO CON IL MEDICO ALLERGOLOGO**
- **LE UOVA DI ALTRE SPECIE ANIMALI (ANATRA, PERNICE, ECC) DEVONO ESSERE EVITATE PERCHÉ RESPONSABILI DI POSSIBILI REAZIONI ALLERGICHE ANCHE GRAVI**
- **TALORA I PRODOTTI DA FORNO (TORTE, BISCOTTI) CONTENENTI UOVO POSSONO ESSERE TOLLERATI MA IN OGNI CASO L'INTRODUZIONE VA FATTA SOTTO CONTROLLO DEL MEDICO ALLERGOLOGO**
- **A PARTE RARI CASI, L'ALLERGIA ALL'UOVO NON COMPORTA ESCLUSIONE DALLA DIETA DELLA CARNE DI POLLO, MA ANCHE IN QUESTO CASO VA RICHiesto IL PARERE DEL PEDIATRA ALLERGOLOGO**

PESCI

I pesci rappresentano una complessa classe di alimenti, con vicinanza filogenetica molto diversificata. 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 (Kuehn et al, 2014). 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 cuocere il merluzzo (Yunginger et al., 1988). La cross-reattività, pur frequentemente osservata nei test in vitro, trova solo parziale riscontro nella co-sensibilizzazione in vivo. Nella valutazione della cross-reattività tra specie diverse di pesce ancora una volta è necessaria l'indagine clinica che potrà confermare con test di scatenamento orale la tolleranza specifica del soggetto (Dello Iacono et al., 2010). Molto importante è evitare la confusione tra allergia al pesce e allergia all'*Anisakis*, un parassita del pesce. L'*Anisakis simplex* è un nematode (un verme) frequentemente presente nell'intestino di molti pesci, in cui si ritrova allo stato larvale. In questo caso, il rischio deriva dal consumo di pesce crudo che deve essere opportunamente trattato per evitare la trasmissione del parassita all'uomo. Resta però aperta la possibilità che almeno un allergene presente nell'*Anisakis* sia termoresistente e quindi stabile ai comuni trattamenti di "detossificazione" (Carballeda-Sangiao et al., 2016).

CONSIGLI DIETETICI PER L'ALLERGIA AL PESCE

- EVITARE I PRODOTTI CHE RIPORTANO IN ETICHETTA INGREDIENTI DI ORIGINE ITTICA
- ANCHE SE NORMALMENTE POCHE SONO LE SPECIE DI PESCE COINVOLTE NELLA RELATIVA ALLERGIA, IL CONSUMO DI PESCI DIVERSI DA QUELLO CHE HA CAUSATO REAZIONE ALLERGICA DEVE ESSERE DISCUSSA CON IL MEDICO ALLERGOLOGO
- L'ALLERGIA AL PESCE NON VA CONFUSA CON L'ALLERGIA ALL'*ANISAKIS* O CON LA SINDROME SGOMBROIDE DOVUTA ALLA PRESENZA DI ISTAMINA IN PESCE MAL CONSERVATO

CROSTACEI E MOLLUSCHI

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

La tropomiosina è stabile al calore e quindi può determinare reazioni cliniche dopo il consumo di crostacei (e molluschi) sia crudi sia 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 4.3 ALLERGENI EMERGENTI

Tra gli allergeni di origine animale, che hanno un particolare interesse per la popolazione Italiana, va citata la carne.

L'allergia alla carne viene considerata piuttosto rara nello scenario mondiale, ma alcuni studi hanno dimostrato come la sua frequenza in Italia sia più elevata che in altri paesi, specialmente in età pediatrica (Restani et al., 2009b). Nella lista ufficiale degli allergeni pubblicata dalla "WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee", sono elencati quattro allergeni della carne (Allegato A 4.3), di cui tre sieroproteine (bovina, ovina e suina) e le immunoglobuline bovine.

In particolare, le sieroproteine sono state identificate come allergeni della carne di maiale (Asero et al., 1997; Sabbah et al., 1994a; Sabbah et al., 1994b), di agnello (Palacios Benito et al., 2002) e di coniglio (Palacios Benito et al., 2002). Altre proteine sono state ipotizzate quali allergeni della carne, ma la conferma sperimentale è incerta; inoltre, l'immunoreattività in questi casi è basata su studi in vitro e non ci sono prove inconfutabili del loro significato clinico.

Più recentemente sono state identificate reazioni cliniche ritardate (3-6 ore ed oltre) nei confronti di carne bovina, suina, e ovina (Commins et al., 2009). I soggetti inclusi in questa casistica rappresentano un sottogruppo particolare di allergici alla carne, che sviluppano IgE specifiche per il galattosio-alfa-1,3-galattosio (alfa-gal). L'epitopo alfa-gal è espresso abbondantemente in cellule e tessuti di mammiferi non primati ed è coinvolto nella reazione di rigetto dei trapianti di organi da suino a primati. Gli studi effettuati per identificare la risposta "anomala" a questo epitopo hanno dimostrato che ci sia connessione con le punture di pulci. Si ritiene, in particolare, che la sensibilizzazione ad alfa-gal negli stati centrali dell'USA, in Europa, Australia e parte dell'Asia sia dovuta esclusivamente a questo fattore (Steinke et al., 2015).

Non ci sono molti dati relativi alla stabilità degli allergeni della carne alla cottura; sono però stati pubblicati studi in cui sono stati descritti soggetti che hanno presentato reazione clinica alla carne cotta con associata tolleranza alla carne ben cotta. Questo fenomeno è stato confermato mediante somministrazione orale, sia con la carne bovina sia con la carne di pollo (Quirce et al., 2001). Come dimostrato in alcuni bambini allergici alla carne, l'omogeneizzazione e la liofilizzazione, utilizzate nella preparazione dei baby-foods, possono ridurre notevolmente l'allergenicità della carne bovina. La tolleranza della carne trattata termicamente sarebbe dovuta alla denaturazione o perdita con la cottura della sieroproteina, che rappresenta uno dei principali allergeni della carne. Il trattamento termico industriale risulterebbe più efficace nel rendere tollerabile la carne, quando confrontata ai procedimenti casalinghi di cottura (Cahen et al., 1998; Restani et al., 1997b). Non può infine essere dimenticato il fenomeno della cross-reattività che riguarda sia la presenza di sequenze proteiche conservate in specie animali filogeneticamente vicine, sia la possibile condivisione di allergeni tra alimenti diversi. Spesso, soggetti allergici alla carne bovina reagiscono anche alla carne suina e

CONSIGLI DIETETICI PER L'ALLERGIA ALLA CARNE

- **CHI PRESENTA L'ALLERGIA ALLA CARNE BOVINA DEVE CONSUMARE CARNE DI ALTRE SPECIE SOLO SU CONSIGLIO DEL MEDICO ALLERGOLOGO**
- **A PARTE UNA PICCOLA PORZIONE DELLA POPOLAZIONE ALLERGICA (10%), L'ALLERGIA ALLA CARNE NON COMPORTA ESCLUSIONE DALLA DIETA DEL LATTE. TUTTAVIA L'INCLUSIONE/ESCLUSIONE VA DISCUSSA CON IL MEDICO ALLERGOLOGO.**
- **TALORA LA CARNE BEN COTTA VIENE TOLLERATA MEGLIO DI QUELLA CRUDA O SCOTTATA, SPECIE SE SOTTOPOSTA A PROCESSI INDUSTRIALI (OMOGENEIZZATI E LIOFILIZZATI). VA COMUNQUE SEMPRE CONSULTATO IL MEDICO ALLERGOLOGO PER LA SCELTA DEI PRODOTTI AMMESSI.**

ovina, mentre tendenzialmente tollerano quella avicola (Cahen et al., 1998). Viceversa, chi è allergico alla carne di pollo generalmente deve astenersi dal consumo di carne di tacchino, mentre è consentita quella di mammiferi. Responsabile di queste cross-reattività è quasi sempre la sieralbumina (Restani et al., 1997a).

La cross-reattività tra latte e carne è determinata dalla presenza nei due alimenti degli stessi allergeni ovvero sieralbumina e immunoglobuline. Ne deriva quindi che i soggetti sensibilizzati alla sieroproteina dovranno astenersi dal consumare sia latte che carne; va sottolineato che questa popolazione rappresenta solo il 10% degli allergici al latte (Cahen et al., 1998; Fiocchi et al., 1998; Martelli et al., 2002; Quirce et al., 2001; Werfel et al., 1997).

Analogamente, i soggetti allergici alle uova possono consumare senza problemi la carne di pollo, ad eccezione di coloro che sono sensibilizzati alla sieralbumina (Quince et al., 2001).

A 5 - DIAGNOSTICA DELLE ALLERGIE ALIMENTARI

A 5.1 ANAMNESI

In medicina l'anamnesi costituisce il cardine della diagnosi e in caso di reazioni acute come l'anafilassi e/o l'orticaria verificatesi dopo ingestione isolata di un singolo alimento (es. uovo) presenta un elevato valore predittivo. La storia clinica fornisce informazioni atte a selezionare i test diagnostici cui sottoporre il paziente e consente di decidere se sia possibile effettuare il test di provocazione orale, gold standard nella diagnosi di allergia alimentare.

D'altra parte, proprio il test di provocazione orale svela come solo il 40-50% delle riferite reazioni alimentari sia da ricondurre ad allergia.

Nelle patologie croniche associate ad allergia alimentare (es. dermatite atopica, asma, gastroenterite allergica eosinofila) la storia clinica ha invece uno scarso valore predittivo positivo.

Nel raccogliere l'anamnesi sarà fondamentale insistere sull'attenta descrizione dei sintomi, sul tempo intercorso tra l'ingestione dell'alimento e la loro comparsa, sulla frequenza delle reazioni, sulla quantità di alimento necessaria ad evocarle, sull'epoca in cui si è verificata l'ultima importante reazione, su eventuali fattori associati (attività fisica, assunzione di farmaci), sui farmaci somministrati per contrastarla, sul contatto accidentale con altre sostanze (contaminazione con altri cibi, acari della polvere), sulla riproducibilità dei sintomi, specialmente quelli soggettivi (disturbi dell'umore, cefalea). Sintomi, questi ultimi, spesso attribuiti all'allergia alimentare, ma con scarse evidenze in proposito.

A 5.2 ESAME OBIETTIVO

L'esame fisico del paziente è diretto alla ricerca di "stigmate atopiche"; la cute rappresenta l'organo maggiormente colpito (dermatite atopica, orticaria) ma va ricordato come l'allergia alimentare sia più frequente nei bambini con dermatite atopica estesa e severa rispetto a quelli che presentano un eczema lieve e transitorio² e come poco frequentemente l'orticaria cronica sia sintomo di allergia alimentare³.

L'orticaria allergica compare contemporaneamente alla somministrazione dell'alimento cui si è allergici e dura poche ore. La diarrea cronica e il dolore addominale, espressione di allergia alimentare, raramente causano alterazioni dell'esame obiettivo e arresto della crescita, quest'ultimo rinvenibile solo in bambini sottoposti a diete incongrue con eliminazione di molti cibi e scarso

introito calorico. Scarsa crescita o arresto sono invece presenti nei bambini con enteropatia indotta da proteine alimentari⁴.

L'esame servirà ad accertare l'esistenza di disturbi respiratori cronici (rinite, sinusite, otite media ricorrente cronica, tosse persistente, asma), troppo spesso, da alcuni, attribuiti all'allergia/intolleranza alimentare⁵.

A 5.3 SKIN PRICK TEST (SPT)

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 > 95%) 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 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 et al., 2009). 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.

A 5.4 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 diano 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 (Bock, 1997; Macchia et al, 2011; Martelli et al, 2005).

A 5.5 ATOPY PATCH TEST

L'Atopy patch test (APT) non è ancora ottimizzato per essere utilizzato nel quotidiano della nostra diagnostica dell'AA non-IgE mediata. Dopo i primi entusiasmi, il test è stato molto ridimensionato nel suo significato specie in virtù dei risultati davvero dissimili osservati. I tentativi di standardizzazione dell'APT sono stati proposti ma la letteratura non si è mai univocamente allineata a questi. Anche i Practice parameter, al "summary statement 35", ribadiscono che l'uso routinario degli APT per alimenti non è raccomandato. Per quanto ci siano stati sforzi per uniformare la metodica, ad oggi non possiamo ancora affermare di poter fruire di una metodica standardizzata. È proprio questo che rende così diversi i risultati ottenuti. È vero che alcuni punti sono stati chiariti come la sede del dorso come punto ottimale di applicazione, la dimensione del supporto di 12 mm e la lettura a 72 ore, ma troppe sono ancora le variabili intra-test che andrebbero uniformemente definite. Pensiamo alla quantità di alimento da applicare, la sua preparazione, o alle modalità di lettura che dovrebbero sempre riguardare l'infiltrato e non l'eritema. L'APT è una tecnica diagnostica semplice, sicura ed economica, ma solo potenzialmente utile nell'approccio diagnostico al bambino con sospetta AA non-IgE mediata. Non è l'unica disponibile per questo tipo di bambino perché il test di provocazione orale con alimento in doppio cieco contro placebo rappresenta ancora il gold standard di riferimento nella diagnosi di questi casi. In attesa di ulteriori dati necessari per una maggiore definizione dell'accuratezza dell'APT nelle diverse forme di AA non-IgE-mediata, è auspicabile una migliore standardizzazione. Il test necessita di un po' di esperienza, specie nella lettura della reazione cutanea, ed il risultato deve essere sempre interpretato nell'ambito di una attenta valutazione di storia clinica, risposta alla dieta di eliminazione e risultato del test di provocazione orale. Ricordiamo che l'alimento non va mai tolto solo sulla base di un APT positivo per quell'alimento.

A 5.6 TEST DI PROVOCAZIONE ORALE NELLA DIAGNOSI DI ALLERGIA ALIMENTARE

La diagnosi di allergia alimentare è una diagnosi clinica che può essere raggiunta con sicurezza solo dopo un'osservazione diretta di quello che accade in seguito all'assunzione dell'alimento che si sospetta sia implicato nell'evento allergico. Infatti i comuni test per identificare la sensibilizzazione agli alimenti (SPT o determinazione delle IgE sieriche specifiche) non hanno una efficacia diagnostica assoluta, ovvero spesso risultano positivi anche in bambini che tollerano l'alimento¹⁰, al contrario, possono essere negativi pur in presenza di un'allergia alimentare ritardata, come ad es. nelle forme allergiche non IgE-mediate.

Il test di provocazione orale con alimento (TPO), il test in doppio cieco contro placebo (DBPCFC) rappresenta oggi, secondo la letteratura scientifica, il "gold standard" per la diagnosi di allergie alimentari (Bahna, 1994; Bindslev-Jensen et al., 2004; Bock et al. 1988).

In realtà, nell'età pediatrica, il cieco deve essere triplo perché neanche i genitori devono essere a conoscenza del tipo di alimento somministrato. Solo il personale che prepara il test, è a conoscenza del prodotto proposto in quel momento (alimento o placebo).

Purtroppo, in Italia, ancora troppi bambini hanno una diagnosi di allergia alimentare senza l'esecuzione del TPO. Maggiori informazioni sulla esecuzione dei test di scatenamento orale sono riportati nell'Allegato A 5.6.

A 5.7 TEST UTILI IN SPECIFICHE CONDIZIONI DIAGNOSTICHE

Component-Resolved Diagnosis (CRD)

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, alcune specifiche di quella fonte allergenica (molecole genuine), altre che possono essere presenti in più ingredienti alimentari (e non solo) e quindi sono cross-reagenti (panallergeni) (Figura 1).

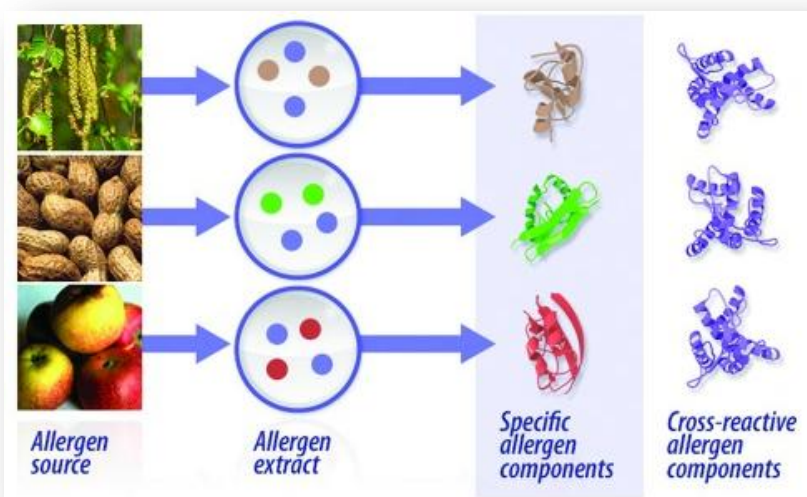


Figura 1 - La CRD consente la ricerca di IgE per le componenti specifiche e per quelle cross-reattive di una determinata fonte allergenica (Reinhardt, 2014)

Nella CRD non viene utilizzato un estratto allergenico, ma solo la singola molecola allergenica, o “nativa”, cioè di origine naturale e altamente purificata o creata artificialmente tramite la tecnica del DNA ricombinante (cosiddetta ingegneria genetica) che ha il vantaggio di permettere una migliore standardizzazione e di rendere la diagnostica più accurata. In altre parole, permette di stabilire quantitativamente un profilo specifico di reattività di un soggetto per le singole componenti allergeniche, aumentandone la specificità, concetto per cui il test 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, dato che richiede specifiche competenze e conoscenze del significato delle singole molecole.

Il limite di questo 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, ma a tutt'oggi, nonostante i numerosi studi, non esistono degli specifici cut-off (cioè livelli soglia dei risultati) che diano nella popolazione generale la certezza che il paziente sia clinicamente reattivo a quella data molecola o solo sensibilizzato.

Questo dipende da molte variabili, ma in particolare dal fatto che ogni cut-off viene ricavato da una specifica popolazione ed in un determinato centro, e ciò non consente di estrapolare il dato alla popolazione generale. Pertanto rimane fondamentale l'interpretazione clinica del singolo caso e, se

indicato, il ricorso al test di provocazione orale che rimane ancora il gold standard per la diagnosi di allergia alimentare.

Certamente la CRD può, in mani esperte, dare delle informazioni preziose perché permette di sapere se il paziente è sensibilizzato a molecole "pericolose", come le LTP (Lipid Transfer Protein, per esempio la Pru p3 della pesca) che sono molecole resistenti al calore ed alla digestione e che pertanto possono essere responsabili di molti sintomi, che possono andare dal banale prurito orale (Sindrome Allergica Orale, SOA) fino allo shock anafilattico. Diverso è il caso di un paziente che è reattivo a molecole più "innocue", come le Profiline, che possono dare SOA, ma, non anafilassi, se non in casi eccezionali. 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 singola molecola ricombinante altamente purificata (test in singleplex). In questo caso solo le IgE specifiche presenti nel siero del paziente per questa componente potranno legarsi e dare un risultato positivo (Figura 2).

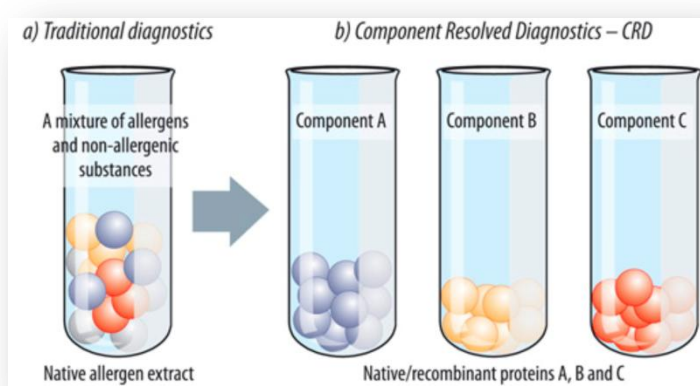


Figura 2 - La CRD, ovvero la ricerca di IgE per componenti specifiche, permette di determinare il profilo di reattività individuale (Cli-online.com, Available aT: https://www.clinlabint.com/newsletter/index_33.1.html).

Un secondo approccio è quello rappresentato dalle tecniche così dette Multiplex, tipo ISAC, Faber, Euroline, ecc. che consentono di testare con piccole quantità di sangue, condizione molto utile in ambito pediatrico (Mari et al., 2010), moltissimi allergeni sia come estratti che come singole molecole. Tali allergeni possono essere fissati su particolari vetrini o specifiche strisce di materiale particolare.

Il legame delle IgE specifiche viene rilevato mediante anticorpi coniugati ad una sostanza cromogena e la cui intensità di colore viene letta con varie metodiche e consente di ottenere un risultato semi-quantitativo (e questa è una differenza importante rispetto all'ImmunoCAP che dà una risposta quantitativa) della concentrazione delle IgE specifiche per quel dato allergene (Berti et al. 2010, Jahn-Schmid et al. 2003). Le prestazioni di questi test multiplex sembrano ampiamente comparabili con le metodiche tradizionali (Ott et al., 2008), ma in realtà ogni nuovo allergene, specie se molecolare, aggiunto ai comuni tests dovrebbe essere studiato in ampie casistiche per i vari aspetti di sensibilità, specificità e accuratezza, ma questo spesso non avviene.

In conclusione, la CRD risulta essere un test diagnostico valido, con sensibilità comparabile ai test per singole molecole/estratti (singleplex), ma piuttosto costoso e deve essere un test di secondo livello riservato allo specialista che ne conosca tutti possibili vantaggi, ma anche i limiti.

A 5.8 TEST NON CONVENZIONALI

Il termine non convenzionale, applicato ai test diagnostici dell'allergia, esprime i test che non vengono abitualmente e tradizionalmente eseguiti per la diagnosi, cioè i test diagnostici non ordinari. Entro questo ambito dobbiamo considerare alcuni test, come di attivazione dei basofili (BAT) e l'atopy patch test (descritto in precedenza e ancora in fase di ricerca), che possono avere, anche se solo in casi selezionati, uno specifico interesse. Infine, vi sono altri test che, usati davvero ben di rado, possono essere estremamente utili come il dosaggio della triptasi ematica. Esistono poi degli altri test, davvero utilizzati senza alcun rigore scientifico, ma purtroppo sempre più richiesti, che vengono più frequentemente definiti "alternativi" ma che potremmo meglio etichettare come "inutili".

IL TEST DI ATTIVAZIONE DEI BASOFILI (BAT)

Dopo l'identificazione dei basofili circolanti su campione, il test di attivazione dei basofili (BAT) si propone di verificare, in seguito a reazione in vitro, la capacità che ha questa granulocita di esporre alcune glicoproteine, alla superficie della membrana cellulare come effetto dell'esposizione ad un allergene noto. Tali glicoproteine sono presenti, nel basofilo quiescente, nei lisosomi citoplasmatici. La lettura quantitativa del CD 63, che è un marker di attivazione dei basofili, avviene attraverso un test in citofluorimetria, ancora molto dipendente dall'esperienza dell'operatore.

Le applicazioni sono state innumerevoli sia nel campo dell'allergia alimentare (AA) che dell'allergia a farmaci

Forse la vera novità del BAT è quella che, andando a saggiare il "rilascio" dei basofili, viene evitato l'aspetto confondente di tutti i parametri che sono a monte di tale reazione allergica come il numero delle IgE e il numero dei loro recettori sulle membrane cellulari di mastociti e basofili, l'affinità di legame con i recettori e la capacità di restare legate a lungo, di norma due settimane e così via.

Per questo motivo, nell'AA, il BAT è stato correlato alla severità della reazione allergica in bambini con allergia alle proteine del latte vaccino.

Ci sono anche segnalazioni che riguardano la capacità del BAT di discriminare fra bambini solo sensibilizzati e allergici all'uovo e all'arachide, sottendendo il concetto, in caso di conferma del dato, di poter evitare il test di provocazione orale in alcuni casi.

I risultati del BAT sembrano anche correlare con l'acquisizione della tolleranza in corso di desensibilizzazione orale per alimenti. Altrettanto stimolanti le applicazioni del BAT nel campo dell'allergia a farmaci dove i test diagnostici sono ancora poco affidabili rispetto all'AA.

Limiti del BAT

- Scarsa standardizzazione del test
- Non univoca standardizzazione degli allergeni
- La reattività dei basofili può variare da giorno a giorno
- Tecnica molto dipendente dall'esperienza dell'operatore, problema intrinseco del citofluorimetro
- Poco studiato in età pediatrica
- Campione ematico necessariamente processato entro 6-8 h

Per ora, l'utilità del BAT è circoscritta e limitata a situazioni specifiche, sotto elencate:

- Se l'allergene è capace di determinare false positività nelle prove cutanee (SPT)
- Se non è disponibile la fonte allergenica per poter predisporre SPT o IgE sieriche specifiche
- Se c'è discordanza fra anamnesi suggestiva per allergia e test di sensibilizzazione negativi
- Se l'anamnesi sconsiglia l'esecuzione di SPT per la possibile comparsa di reazioni sistemiche; in tal caso è sempre possibile eseguire, prima del BAT, la ricerca delle IgE sieriche specifiche.
- Prima del test di provocazione per determinare il possibile agente causale della reazione

DOSAGGIO DELLA TRIPTASI EMATICA

Il dosaggio della triptasi ematica, come effetto del rilascio mastocitario, può avere numerose applicazioni in ambito pediatrico (Beyer et al, 1994):

- L'utilizzo classico è per i casi incerti di anafilassi, quando la manifestazione clinica, osservata o riferita, non consente una diagnosi certa di anafilassi.
- Di norma, livelli elevati di triptasi possono essere rilevati da 3 a 6 ore dopo la reazione anafilattica e i livelli tornano normali entro 12-14 ore dal rilascio.
- Il livello di triptasi basale elevata può essere un fattore di rischio significativo per gravi reazioni ripetute alle punture di imenotteri, in accordo con altri reperti clinici che possono indicare la necessità di immunoterapia.
- Il dosaggio della triptasi ematica può guidare il trattamento iposensibilizzante con vaccino

A 5.9 TEST DIAGNOSTICI PRIVI DI FONDAMENTO SCIENTIFICO

Per la diagnosi di AA sono in commercio test diagnostici per i quali non è sufficientemente dimostrata l'efficacia o, peggio, è stata già dimostrata l'inefficacia diagnostica. Alcuni fra i più diffusi trovano però largo impiego e costringono le famiglie a costi e diagnosi errate. È indispensabile ribadire che tutti questi test, allegati nell'elenco, non hanno alcuna validità diagnostica dimostrata e determinano non solo diagnosi erronee ma anche allungamento nei tempi di vera diagnosi.

Elenco dei test non convenzionali utilizzati per la diagnosi di allergia ma **privi di validazione scientifica**

- Il test citotossico di Bryant
- Il test di provocazione e neutralizzazione sublinguale e intradermico
- La kinesiologia applicata
- Il test del riflesso cardio-auricolare
- Il Pulse test
- Il test elettrotermico o elettroagopuntura secondo Voll
- Il Vega test
- Il Sarmtest
- Il Biostrength test e varianti
- La biorisonanza
- L'analisi del capello (Hair analysis)
- Il Natrix o FIT 184 Test
- Il test per la misurazione del BAFF (Fattore attivante i linfociti B) e del PAF (Fattore attivante le piastrine)

L'elenco dei test non convenzionali è stato anche l'oggetto di uno dei “chosing wisley” della Società Italiana di Allergologia ed Immunologia pediatrica (SIAIP). Attraverso la definizione di questa iniziativa, denominata con traduzione letterale “scegliendo con saggezza”, si è voluto puntualizzare l'inutilità di alcune procedure nell'ambito allergologico. Talvolta si assiste anche ad autodiagnosi di AA da parte dei genitori sui propri figli e dati americani indicano che fino al 30% dei bambini mostrano segni che i loro genitori interpretano come reazioni avverse agli alimenti. Questo porta spesso ad intraprendere diete di eliminazione anche senza consultare un Pediatra. D'altra parte l'offerta di diagnostica allergologica sul territorio italiano, per quanto vasta, è piuttosto disomogenea per metodiche e standardizzazione e soprattutto non è in grado di fronteggiare una domanda di valutazione così imponente. Il test da carico con alimento, unico vero presidio per la diagnosi definitiva di AA è tuttora condotto solo in un ristretto numero di strutture pediatriche sia per carenza di personale, sia per mancanza di esperienza nella procedura sia per i costi e il “time consuming” che determina. Forse anche in questa considerazione va ricercata la spiegazione del sempre più frequente ricorso alle metodiche diagnostiche alternative da parte di famiglie con il quesito specifico, che si allinea con la crescente popolarità della medicina alternativa nel mondo occidentale e il relativo aumento di utilizzo di tali procedure.

Le diagnosi erranee di AA portano, a cascata, una serie di problemi accessori che è compito del Pediatra evitare nel modo più assoluto. Infatti sovrastimare l'AA è pericoloso, soprattutto per il bambino. Ecco nell'elenco sottostante, le conseguenze di una sovrastima dell'AA:

- Diete di eliminazioni in bambini che non sono allergici
- Diete inadeguate dal punto di vista nutrizionale
- Diete con costo elevato per le famiglie
- Ansia e iperprotezione della famiglia che determina stress nel bambino
- Alterazione delle dinamiche relazionali familiari
- Isolamento sociale della famiglia
- Disappunto per la mancata efficacia della dieta
- Angoscia e frustrazione in caso di reazione
- Scarsa compliance e conseguente ritardata guarigione

In particolare occorre ricordare che le diete inadeguate da un punto di vista nutrizionale possono portare gravi conseguenze cliniche, specie se protratte.

A 5.10 LE DIFFICOLTÀ DI COMUNICAZIONE

È esperienza comune, nella pratica allergologica quotidiana, incontrare genitori un po' smarriti e che non sanno come comportarsi, in merito ad una diagnosi sommaria di AA attribuita al proprio figlio. Spesso il fenomeno del “medical shopping”, probabile premonitore di diagnosi e terapie alternative, genera ancora più insicurezza anche indotta dal differente approccio che ciascun specialista propone per l'iter diagnostico del loro bambino. Ma poiché il numero di test di provocazione orale proposto nel nostro territorio è irrisorio rispetto alla richiesta, si realizzano un numero di diagnosi di AA basate sui soli test di sensibilizzazione e quindi spesso erranee. Ciò comporta da un lato diete inutilmente troppo restrittive e dall'altro la mancata eliminazione dell'alimento offendentente con la persistenza dei sintomi. Le madri hanno pertanto la netta percezione di una dieta inefficace per il loro piccolo anche per quanto concerne la dieta cui, talvolta, la madre nutrice deve essere sottoposta. La persistenza dei sintomi, condiziona invariabilmente uno decadimento nella qualità di vita non solo dei bambini ma di tutto il nucleo familiare. Pertanto la giustificata richiesta dei

genitori di una migliore qualità di vita, porta alla ricerca, con tutte le forze e l'immaginazione, di un rimedio che possa finalmente porre fine alle loro difficoltà. Pertanto non c'è dubbio che il ricorso alle diagnosi alternative trova anche la propria genesi nella cattiva gestione allergologica anche per quanto concerne l'aspetto della comunicazione. La comunicazione del Pediatra dovrebbe essere volta a scoraggiare, con fermezza, l'utilizzo dei test alternativi da parte della famiglia. Probabilmente, anche se siamo convinti tutti di essere degli ottimi comunicatori, non sempre siamo efficaci in questi passaggi. Altrimenti non si spiegherebbe il frequente ricorso a queste procedure diagnostiche.

Il problema della comunicazione non investe solo la terminologia ma anche e soprattutto le strategie utilizzate per ottenere il risultato voluto di aderenza alle indicazioni suggerite.

La comunicazione dovrebbe essere modulata anche in base alle condizioni socio-economiche cui è rivolta anche se un'informazione semplice, chiara e obiettiva è trasversalmente quella raccomandata.

Un esempio parallelo alla comunicazione per la dissuasione dai test alternativi arriva dal recente calo dell'adesione alle vaccinazioni sul nostro territorio. In un caso con i test alternativi, occorre dissuadere i genitori per la procedura, nell'altro delle vaccinazioni è indispensabile convincere i genitori che si tratta di una pratica indispensabile e talvolta salvavita. AA hanno dimostrato, ad esempio, che sottolineare i rischi delle gravi complicanze di alcune malattie infettive è il percorso comunicativo più corretto per convincere i genitori a sottoporre i figli alle vaccinazioni. Non sono al momento noti studi mirati sulle strategie di comunicazione per dissuadere dall'uso dei test alternativi ma i messaggi corretti ed equilibrati da trasmettere alla famiglia, per scoraggiare l'utilizzo dei test diagnostici alternativi, potrebbero essere i seguenti:

- Nessun lavoro della letteratura internazionale ne conferma l'utilizzo
- Non sono contemplati nel rimborso degli esami da parte del SSN e, pertanto, sono inutilmente molto costosi
- I conseguenti ritardi di una corretta diagnosi determinano effetti sfavorevoli sul bambino e sulla famiglia
- Avete mai visto uscire un bambino da questi ambulatori alternativi che non avesse alcuna allergia?

In conclusione, occorre essere molto fermi nel controindicare l'utilizzo di test alternativi che non hanno alcuna evidenza scientifica. Le strategie di comunicazione dovrebbero essere modulate, in base all'esperienza del Pediatra, in maniera diversa rispetto alla tipologia di genitore con il quale si deve affrontare l'argomento. Anche esperti di comunicazione potrebbero suggerire il percorso più corretto per cominciare almeno a ridurre il ricorso a tali procedure. Occorre, nel contempo, incrementare la possibilità di rendere fruibile, su tutto il territorio nazionale, il percorso corretto della diagnosi di AA con l'esecuzione del test di provocazione orale che rimane, nei casi dubbi, l'esame dirimente per la diagnosi. Dovranno essere, nello stesso tempo, implementate le ricerche per capire, nell'ambito di test come BAT e APT, in quali fenotipi allergici possano trovare la loro giusta collocazione.

A 6 - TERAPIA DELL'ALLERGIA ALIMENTARE E GESTIONE DEL PAZIENTE

A 6.1 LA DIETA DI ELIMINAZIONE

Una volta sospettata, in base a tutti questi elementi, la presenza di un'allergia alimentare, verrà proposta una dieta di eliminazione verso l'alimento ritenuto responsabile, durante la quale, la patologia dovrà scomparire (rapporto causa-effetto); la dieta dovrà essere accompagnata da un diario clinico che i genitori dovranno compilare per documentare meglio l'andamento dei sintomi.

La scrupolosa eliminazione dell'alimento e dei suoi derivati deve essere effettuata per 2 settimane o per 4-8 settimane nel caso di disturbi gastro-intestinali; se sarà in tal modo comprovato un rapporto di causa-effetto verrà proposto, successivamente, un test di provocazione orale (TPO) in ambiente protetto che dovrà dimostrare la ricomparsa dei sintomi. Solo dopo l'esito positivo di questo esame la dieta di eliminazione da diagnostica diverrà terapeutica. Qualora la dieta di eliminazione non provocasse la risoluzione dei sintomi, il TPO non andrà eseguito.

Si può comprendere a questo punto come la dieta di eliminazione costituisca un utile strumento per la diagnosi e la gestione dell'allergia alimentare, che rappresentano una vera e propria sfida per il pediatra e per tutti coloro che hanno a cuore la salute e lo sviluppo del bambino.

Il tipo e lo scopo di una dieta di eliminazione dipendono dal problema e dall'età del bambino. Infatti, anche se tutti gli alimenti possono essere responsabili di allergia, il 90% dei casi di allergia è dovuto nel bambino a: uovo, latte, arachide, soia, grano, pesce (Muraro et al., 2014).

Nei lattanti che assumono un latte formulato può essere utile un breve periodo di dieta di esclusione con sostituzione dell'abituale prodotto con uno a base di idrolizzati spinti di caseina per evidenziare un possibile ruolo dell'allergia alimentare.

Solo se i sintomi sembrano risolversi con la dieta si renderà necessaria un'approfondita valutazione allergologica, anche perché i bambini con allergia alimentare IgE-mediata sono a rischio di successive sensibilizzazioni alimentari, sintomi respiratori ed asma.

Nei bambini più grandi è possibile eliminare uno o due alimenti contemporaneamente anche se l'eliminazione contemporanea di più di un alimento andrebbe evitata, per non incorrere in gravi squilibri nutrizionali e per non generare inutili confusioni nell'iter diagnostico (Muraro et al., 2014).

Il successo della dieta dipende dall'identificazione dell'esatto allergene in causa, nonché dalla capacità da parte del paziente o dei suoi genitori di mantenere un'alimentazione completamente priva di tale sostanza. Questo vincolo è estremamente importante alla luce delle attuali conoscenze della biologia molecolare e delle possibili cross-reattività e co-riconoscimenti tra molecole simili contenute in alimenti diversi. Su tali conoscenze dovrà essere impostata l'alimentazione per evitare ancor oggi di assistere a incongruenze che conducono all'eliminazione di un alimento con la sostituzione di un altro del tutto simile dal punto di vista allergenico (latte di capra versus latte vaccino, uovo di altre specie aviarie versus uovo di gallina ecc.) (Muraro et al., 2014).

Anche gli utensili usati in cucina possono rappresentare inavvertiti veicoli di proteine allergeniche e ciò andrà spiegato ai genitori.

Durante l'esecuzione di una dieta di eliminazione non andrà tralasciato di annotare la presenza di fattori confondenti che potrebbero compromettere il risultato della dieta stessa, quali ad esempio una concomitante superinfezione della cute da *Staphylococcus aureus* in un paziente affetto da dermatite atopica, un'infezione virale in un paziente con asma, un deficit secondario di lattasi in un bambino con enterocolite indotta da proteine.

Il concetto ispiratore di una dieta oligoantigenica si basa sull'eliminazione di tutti i cibi assunti giornalmente dal bambino con la sostituzione di cibi ritenuti a bassa allergenicità, cercando di verificare se ciò possa comportare la soluzione del problema. Questa drastica risoluzione potrebbe

essere utile nell'evitare infinite e snervanti diete di eliminazione, nel bambino già grande, in cui l'assunzione di più alimenti può essere confondente; l'attuale conoscenza della biologia molecolare tende però a dissuaderci dal continuare un simile percorso.

La dieta oligoantigenica può essere ancora utilizzata in presenza di alcuni tipi di patologie gastrointestinali (esofagite e /o gastroenterite allergica eosinofila) in cui può essere presupposta una poli-allergia alimentare.

In merito all'eliminazione delle proteine del latte vaccino, recenti osservazioni suggeriscono che il bambino, abituato per tanti anni all'evitamento di queste proteine, assume, negli anni successivi, un comportamento alimentare particolarmente diffidente, con difficoltà ad avvicinarsi a nuovi gusti e nuovi alimenti con importanti conseguenze nutrizionali (Muraro et al., 2014). Questa osservazione, se confermata, consentirà di porre due diverse considerazioni: in primis risulta ancora più importante porre diagnosi certe di APLV (Allergia alle Proteine del Latte Vaccino) per evitare diete di eliminazione improprie e incongrue con possibili conseguenze future; ma anche in situazioni di comprovata APLV con diagnosi certa, sarà indispensabile introdurre il latte non appena sarà possibile, dopo test di scatenamento negativo. Una pratica relativamente recente ha studiato protocolli di somministrazioni orali a dosi crescenti per ridurre la reattività nei soggetti che trovino difficoltà a risultare tolleranti nel tempo. Questo vale particolarmente per i bambini che normalmente superano l'allergia a latte e uovo nei primi anni di vita. Una descrizione approfondita della desensibilizzazione orale è disponibile nell'Allegato A 6.1.

A 6.2 LA TERAPIA NELL'URGENZA: ADRENALINA CON AUTOINIETTORE E PIANO D'AZIONE

DOSAGGIO

Il farmaco di elezione per la terapia dell'anafilassi è l'adrenalina che rispetto agli altri si fa preferire per efficacia e rapidità d'azione (Campbell et al, 2008; Chowdhury & Mayer, 2002; Gold & Sainsbury, 2000; Grouhi et al, 1999; Gu et al, 2002; Niggemann & Beyer, 2012). Il problema della corretta dose di adrenalina da somministrare nel corso di un episodio di anafilassi riguarda prevalentemente la procedura attraverso l'autoiniettore, quando cioè si deve fronteggiare tale situazione di emergenza al di fuori della struttura ospedaliera. Infatti in ospedale le fiale da 1 mg = 1 mL, in soluzione acquosa 1:1.000, e la conoscenza, o la stima, del peso del bambino consentono di dosare la quantità di adrenalina da somministrare con molta precisione. Il dosaggio in età pediatrica prevede infatti l'utilizzo intramuscolare, nella maggior parte dei casi, di 0,01 mg/kg di adrenalina fino ad un massimo di 0,3 mg come dose somministrata. In caso di parziale o nulla risposta dopo la prima dose, l'intervallo fra 2 dosi successive di analoga quantità varia fra 5 e 10 minuti. Il 10% dei bambini che sviluppa anafilassi severa in ambiente extra-ospedaliero avrebbe bisogno di ripetere l'adrenalina con l'autoiniettore.

Nella Tabella 3 sono riportate le dosi anche in base all'età, nel caso in cui non sia possibile comunque eseguire una corretta valutazione del peso corporeo.

Tabella 3 - Dose di adrenalina intramuscolare per età nella terapia di emergenza dell'anafilassi.

Età (anni)	Volume per l'iniezione di adrenalina 1:1.000 (1 mg/mL)
<1	0.05 mL
1-2	0.1 mL
2-3	0.2 mL *
3-4	0.3 mL *
4-5	0.4 mL *
6-12	0.5 mL *
>12	0.5-1 mL
*Usare metà dose per bambini sottopeso	

Più difficile risulta stabilire la dose idonea con l'autoiniettore di adrenalina che è in commercio nel nostro Paese in solo 2 dosi predefinite di farmaco: da 0,150 mg e da 0,300 mg.

Come si può osservare è impossibile dosare correttamente l'adrenalina con l'autoiniettore per un bambino con un peso < 15 kg o compreso fra 15 e 30 kg. Il Pediatra deve scegliere quasi sempre fra 2 possibili errori valutando se è meglio sottodosare il farmaco o se conviene utilizzare un dosaggio maggiore. Non pare corretta nemmeno l'indicazione allegata alla confezione in commercio: se il bambino ha un peso < 45 kg si può usare la siringa preriempita da 0,150 mg. In questa fascia il peso può essere fino a 10 volte superiore: da un piccolo lattante di 4,5 kg ad un ragazzo di 45 kg.

È auspicabile che possano presto essere fornite dosi supplementari di adrenalina per poter coprire le varie situazioni di bambini con pesi differenti. Sarebbe altrettanto favorevole una periodica educazione medica rivolta agli operatori sanitari perché è stata segnalata una carente preparazione nell'uso specifico degli autoiniettori. Questo concorre a determinare anche una scadente conoscenza del problema da parte delle famiglie e dei bambini con la conseguenza che il kit viene usato troppo di rado quando occorre. La prescrizione deve sempre essere infatti corredata da istruzioni scritte per il bambino e la famiglia per un uso il più possibile corretto. L'anafilassi va considerata, infatti, come un vero handicap di lunga durata e su questa base deve essere impostato l'approccio al bambino portatore.

La somministrazione sottocutanea di adrenalina può causare spiccato pallore cutaneo nella sede d'iniezione per un effetto vasocostrittore locale. Tale fenomeno potrebbe indurre anche una ritenzione locale del farmaco a causa di un più lento assorbimento dell'adrenalina nel torrente circolatorio. Per tale motivo sono state studiate altre vie di somministrazione del farmaco. In particolare l'assorbimento di adrenalina, nei bambini con anamnesi positiva per anafilassi, è stato valutato comparativamente, in uno studio randomizzato in cieco, per verificare quale via di somministrazione, intramuscolare vs sottocutanea, fosse la più efficace (Simons et al, 2002). Per quanto concerne il t_{max} (il tempo in cui l'adrenalina raggiunge, dopo la somministrazione, il picco plasmatico) si osservava una differenza significativa fra il valore di 8 ± 2 minuti dopo l'iniezione intramuscolare rispetto a 34 ± 14 minuti dopo la somministrazione sottocutanea. Anche nei giovani adulti tali osservazioni venivano confermate evidenziando, almeno per questo gruppo di pazienti, il minore t_{max} dopo l'iniezione nel muscolo vasto laterale del quadricipite ($p < 0.01$) rispetto alla somministrazione intramuscolare nel muscolo deltoide, alla somministrazione sottocutanea nella regione deltoidea e al placebo. La più spiccata vascolarizzazione del muscolo quadricipite potrebbe rendere ragione del diverso picco ematico rispetto alla somministrazione intramuscolare deltoidea.

Nei bambini con obesità, se non si ha l'accortezza di utilizzare un ago di almeno 2,5 cm, c'è la possibilità che la somministrazione del farmaco avvenga superficialmente, nel tessuto sottocutaneo, rispetto al piano muscolare più profondo del quadricipite.

Nei bambini con pregressa anafilassi è stata valutata la somministrazione di adrenalina con inalatori predosati rispetto alla via iniettiva. Nei bambini con anafilassi senza segni e sintomi respiratori i puff ripetuti di adrenalina con device predosati non si sono dimostrati efficaci perché la maggior parte dei bambini non era in grado di ottenere livelli plasmatici soddisfacenti del farmaco. Tale preparato non è comunque disponibile nel nostro Paese.

Anche la via endovenosa può essere considerata, in ambiente ospedaliero e nelle condizioni particolarmente gravi di shock con ipoperfusione. In tali circostanze una somministrazione intramuscolo (i.m) può indurre la presenza di elevate quote di adrenalina nel tessuto muscolare del quadricipite ma l'ipofunzione del circolo, condiziona la mancanza di emodistribuzione. Tali casi iperacuti sono per lo più di pertinenza del rianimatore ed, in queste condizioni particolarmente gravi di shock, l'adrenalina diluita a 1:10.000 o a 1:100.000 alla velocità di 10-20 mcg/min ha un'indiscussa indicazione. Se risulta difficile reperire un accesso venoso a causa del collasso circolatorio, nel bambino di età < 6 anni, si può anche, entro 90 secondi, utilizzare la via intraossea.

Nel bambino con intubazione naso-tracheale e ventilazione meccanica la somministrazione di adrenalina può avvenire anche per via endotracheale con un dosaggio di adrenalina dieci volte superiore a quello utilizzato per l'infusione endovenosa (e.v.). Sono infine stati eseguiti alcuni tentativi, su modello animale, per studiare il t_{max} plasmatico dell'adrenalina dopo somministrazione di compresse sub-linguali. Tale sede è stata scelta per la sua eccellente vascolarizzazione. I risultati sono incoraggianti ma nuove valutazioni sull'assorbimento sub-linguale nel bambino saranno indispensabili.

Per motivi etici i lavori di cinetica dell'adrenalina sono compiuti per lo più su bambini con pregressa anafilassi ma che al momento dell'osservazione sono ovviamente in ottime condizioni generali, cioè con un apparato cardiocircolatorio perfettamente funzionante. Ma sappiamo che la crisi severa di anafilassi si accompagna a profonde modificazioni dei parametri cardiovascolari e pertanto di distribuzione tissutale del farmaco. Quindi ulteriori verifiche saranno indispensabili studiando, se possibile, la distribuzione dell'adrenalina in corso di anafilassi.

IL PIANO D'AZIONE

Nel momento in cui si prescrive l'adrenalina con autoiniettore, occorre compilare e discutere con la famiglia il piano d'azione relativo.

Il piano d'azione è un documento che dovrebbe sempre accompagnare l'adrenalina con autoiniettore perché specifica, nei vari punti, il corretto comportamento da seguire nel corso di una reazione di anafilassi. Il piano d'azione dovrebbe essere spiegato, alla prima prescrizione di adrenalina con autoiniettore, non solo ai genitori ma anche agli altri familiari e, ove possibile, al personale scolastico dedicando un'ampia finestra di tempo per poter descrivere le modalità e le tempistiche necessari. Occorre anche, dopo la prima presentazione del piano d'azione, dedicare, a breve distanza di tempo, un secondo incontro dove i familiari possano chiedere tutti i dubbi che non sono venuti alla mente subito ma sono maturati in un secondo momento riflettendo, con più calma, sui vari passaggi. Il documento dovrebbe inoltre riportare una sorta di ripetizione scritta della spiegazione in maniera tale che, se il genitore volesse ripassarlo in assenza del Pediatra, può farlo avendo a disposizione una parte scritta che lo aiuti in questo percorso di apprendimento, come se il Pediatra fosse nuovamente presente.

Il documento riporta, nella parte iniziale, l'intestazione dei dati del bambino con, ben in vista, la dicitura dell'alimento, o degli alimenti o delle altre cause di anafilassi come farmaci o lattice. È bene applicare anche una fotografia aggiornata nella prima pagina del documento per un pronto riconoscimento nel caso in cui possano dover intervenire persone che non conoscono il bambino direttamente

Viene di norma suggerito di porre una fotografia ripresa con il bambino sdraiato perché, di norma, questa sarà la posizione in cui, nel caso di reazione di anafilassi, sarà possibile trovare e riconoscere il bambino per un primo intervento. Infatti gli arti inferiori dovrebbero essere sollevati, da sdraiato, per facilitare il ritorno venoso. Nella successiva parte del documento occorre aiutare la famiglia a capire in quali occasioni fare o non fare l'adrenalina con autoiniettore. Questa parte deve essere composta cercando, il più possibile, di fornire una semplice spiegazione di quando agire e quando aspettare ad utilizzare l'adrenalina con autoiniettore.

Nel coinvolgimento dei vari apparati, dovranno essere riportati i segni clinici con parole non tecniche o mediche ma di facile comprensione per i famigliari. Andrà direttamente suggerito il comportamento, caso per caso a seconda degli apparati coinvolti. È indubbio che l'atteggiamento terapeutico deve essere diverso fra i due casi principali: anafilassi che si verifica al di fuori di una struttura sanitaria e anafilassi che si verifica all'interno di un ospedale o di un ambulatorio ove è presente un medico o un Pediatra. Nel primo caso è ragionevole avere delle indicazioni all'utilizzo dell'adrenalina più ampie perché risulta difficile, per un famigliare, monitorare alcuni apparati in maniera precisa. Possono essere utili anche pittogrammi per meglio spiegare i segni dell'anafilassi. In questo caso, pur senza esagerare, occorre tutelare il bambino e spiegare al genitore che non bisogna temporeggiare perché l'evoluzione della reazione di anafilassi potrebbe essere molto rapida e tumultuosa. Al Medico, in ambiente protetto, questo documento non deve servire perché deve essere autonomamente in grado di gestire la situazione. In ambiente protetto la reazione di anafilassi potrebbe avvenire dopo la somministrazione di un farmaco o nel corso di una procedura diagnostica o terapeutica in allergia alimentare. Lo specialista ha la possibilità di osservare l'obiettività clinica e di conoscere un dato di pressione arteriosa, di saturazione periferica di O₂, di frequenza cardiaca e respiratoria ecc.

Questo, oltre a consentire un più attento monitoraggio, determina con l'esperienza del Medico, la possibilità di gestire il caso nel modo migliore possibile. Invece per la famiglia, sul piano d'azione, vicino ad ogni sintomo o segno, descritto semplicemente apparato per apparato, occorre scrivere o non scrivere la raccomandazione alla somministrazione dell'adrenalina, ricordando che gli apparati vitali, cardiocircolatorio e respiratorio, devono essere tutelati. Di norma lo steroide orale non viene invece riportato nel piano d'azione. Questo avviene per due motivi. Il primo motivo riguarda l'intervallo di tempo molto ampio fra la somministrazione dello steroide e l'inizio della sua efficacia. Il secondo motivo riguarda l'impossibilità, per il genitore, di fare troppe procedure in poco tempo. Occorre che ne faccia poche ma in maniera attenta e rapida. Non deve perdere tempo a realizzare altre procedure non attive in tempi brevi, concetto indispensabile nell'urgenza.

Dopo la somministrazione dell'adrenalina, la seconda procedura riportata sul piano d'azione sarà quella di chiamare il numero telefonico 112. Il piano d'azione dovrebbe riportare anche cosa dire al telefono, sapendo che il genitore, in quel momento, potrebbe essere molto agitato e preoccupato. Al telefono dovrebbe dire che è in corso una reazione allergica grave, che potrebbe servire altra adrenalina. Il piano d'azione dovrebbe anche raccomandare di non interrompere la telefonata prima che l'operatore del 112 dia il permesso di riagganciare dicendo che ha già acquisito tutti i dati necessari per l'intervento, indirizzo della famiglia compreso.

Dopo aver chiamato il 112 si può somministrare l'antistaminico alla dose riportata sul piano d'azione. Oltre all'adrenalina va specificato anche l'uso dell'antistaminico che va evitato nei casi di perdita di coscienza per l'assenza del riflesso della deglutizione. Anche la dose di antistaminico va

aggiornata in base al peso corporeo. Nei casi in cui vadano utilizzati entrambi, adrenalina e antistaminico, come sempre deve avvenire per la terapia medica in generale, si usa sempre prima il farmaco più attivo, l'adrenalina, e in seconda battuta l'antistaminico. L'adrenalina sempre subito. È inoltre possibile eseguire una seconda dose di adrenalina se nel tempo di 5-10 minuti non fosse ancora giunto il servizio con ambulanza del 112 e le condizioni cliniche non si fossero modificate. Occorre sempre ricordare ai Pediatri che i genitori devono fare l'adrenalina, secondo quanto prescritto dal piano d'azione, senza aspettare o perdere tempo. Una parte del piano d'azione deve necessariamente essere sempre presente: la spiegazione di come effettuare l'autoiniezione di adrenalina.

Occorre togliere il tappo di sicurezza, che serve da "sicura", ed appoggiare con forza l'altra estremità della siringa nella regione antero-laterale del III medio della coscia. Occorre contare per 10 secondi e poi rimuovere l'autoiniettore, massaggiando lentamente. Utili a tal proposito sono dei kit dimostrativi senza ago che possono essere utilizzati per simulare la manovra di autoiniezione. La terza parte dell'azione riguarda i contatti telefonici di pronta disponibilità. Occorre riportare i cellulari di madre e padre nel caso in cui la reazione avvenga in loro assenza (asilo, scuola, oratorio ecc.) e, se possibile, anche il numero diretto del Pronto Soccorso (P.S.) territorialmente più vicino all'area di residenza. Ci penserà il 112, dopo l'arrivo, ad avvisare l'ospedale di riferimento che sta arrivando un caso di anafilassi. Il documento deve essere alla fine firmato dal Pediatra allergologo responsabile del caso e da entrambi i genitori. Questo significa che il Centro di riferimento ed entrambi i genitori hanno condiviso questo percorso e sono d'accordo che, in caso di urgenza, la procedura possa essere effettuata sul loro figlio, in caso di loro assenza.

Il piano d'azione è un documento insostituibile per il bambino/ragazzo con anafilassi perché è la guida costante al comportamento condiviso in caso di reazione di anafilassi. Deve essere portato alla conoscenza di tutte le persone che gestiscono il paziente e deve far parte del kit che deve seguire il bambino. In questo kit devono essere presenti tre componenti: il piano d'azione, appunto, l'adrenalina con autoiniettore, con doppia dose ove previsto e la confezione di antistaminico. Occorre fare costante educazione sanitaria alle famiglie perché bisogna ricordare che uno dei problemi più frequenti è la mancata somministrazione di adrenalina con autoiniettore in corso di reazione di anafilassi.

Maggiori informazioni sul piano d'azione sono riportate nell'Allegato A 6.2.

B - INFORMAZIONE AI CONSUMATORI, VALUTAZIONE E GESTIONE DEL RISCHIO

B.1 - NORME DI ETICHETTATURA

Per quanto riguarda le informazioni da riportare in etichetta dei prodotti alimentari, un importante passo avanti è stato compiuto grazie all'applicazione del Regolamento UE 1169/2011 del Parlamento Europeo e del Consiglio relativo alla fornitura di informazione sui prodotti alimentari.

Tale Regolamento, prevede infatti disposizioni importanti per quanto riguarda gli allergeni riportati nell'allegato II. In particolare stabilisce l'obbligo di evidenziare nella lista degli ingredienti gli allergeni presenti nei prodotti alimentari. Inoltre, ai sensi dell'articolo 44 (1) (a), le informazioni sulla presenza di sostanze o prodotti che provocano allergie o intolleranze è obbligatoria anche per gli alimenti non preimballati, compresi quelli preparati e forniti da aziende di ristorazione o imballati sui luoghi di vendita su richiesta del consumatore o per la vendita diretta.

Il Regolamento prevede tuttavia una deroga all'obbligo di fornire informazioni sugli allergeni, quando il nome del prodotto alimentare faccia chiaramente riferimento alla sostanza o al prodotto in questione.

Nel caso di prodotti alimentari esentati dall'obbligo di riportare l'elenco degli ingredienti (es. bevande alcoliche), rimane l'obbligo di dichiarare in etichetta l'indicazione "contiene" seguito dal nome della sostanza o del prodotto che provoca allergia o intolleranza alimentare (ad esempio solfiti).

Secondo il sopracitato Regolamento, non sono considerate solo le sostanze elencate come allergeni alimentari ma anche i prodotti derivati. Per "prodotti derivati" si intendono tutti i prodotti provenienti da un ingrediente allergenico o prodotti ottenuti dopo una o più fasi di lavorazione.

Nel caso di ingredienti e coadiuvanti tecnologici derivati da frutta a guscio, va dichiarato il nome specifico, cioè mandorle, nocciole, noci, anacardi, noci pecan, noci del Brasile, pistacchi, noci macadamia o Queensland, ecc.

Nel caso di ingredienti derivati da cereali contenenti glutine va dichiarato il nome specifico del cereale (grano, segale, orzo, avena). La parola 'glutine' può essere aggiunta su base volontaria, ma è il nome specifico del cereale che deve essere sottolineato, non il termine 'glutine': ad esempio Farina di frumento (contiene glutine).

Se il glutine viene aggiunto come ingrediente, deve essere indicato il nome del cereale da cui il glutine proviene: ad esempio glutine (grano), o glutine di frumento, ecc.

Nel caso di ingredienti composti che contengono sostanze che provocano allergie o intolleranze elencate nell'allegato II, queste ultime devono essere evidenziate nella lista degli ingredienti: ed esempio Ingredienti del ripieno di fragola (uovo, fragola, zucchero, acqua, ...).

Secondo l'articolo 44 (2) del Regolamento (Disposizioni nazionali per gli alimenti non preimballati), quando gli alimenti sono offerti in vendita al consumatore finale o alle collettività senza imballaggio, o dove gli alimenti sono imballati sui luoghi di vendita su richiesta del consumatore o preimballati per la vendita diretta, gli Stati membri possono adottare disposizioni nazionali concernenti i mezzi attraverso i quali le informazioni sugli allergeni, che sono

intenzionalmente aggiunti ad un prodotto o un pasto, saranno messe a disposizione e, se del caso, la loro forma di espressione e presentazione.

Le informazioni sugli allergeni devono essere fornite dall'operatore del settore alimentare e non possono essere date solo su richiesta del consumatore.

Nel caso di alimenti non preimballati serviti dalle collettività (ristoranti, mense ecc.), è obbligatoria l'indicazione delle sostanze o prodotti di cui all'allegato II del medesimo regolamento. Tale indicazione deve essere fornita, in modo che sia riconducibile a ciascun alimento, prima che lo stesso venga servito al consumatore finale dalle collettività e deve essere apposta su menù o registro o apposito cartello o altro sistema equivalente, anche digitale, da tenere bene in vista. In caso di utilizzo di sistemi digitali, le informazioni fornite dovranno risultare anche da una documentazione scritta e facilmente reperibile sia per l'autorità competente sia per il consumatore finale.

In alternativa, può essere riportato l'avviso della possibile presenza delle medesime sostanze o prodotti che possono provocare allergie o intolleranze, sul menù, sul registro o su un apposito cartello che rimandi al personale cui chiedere le necessarie informazioni che devono risultare da una documentazione scritta e facilmente reperibile sia per l'autorità competente sia per il consumatore finale.

Resta aperta la questione relativa alla presenza accidentale non intenzionale di allergeni e resta comunque aperto il problema della presenza inaspettata di allergeni alimentari, dovuta a contaminazione. 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.

B 1.1 GLI ALLERGENI IN TRACCE O "NASCOSTI"

Quando la sostanza allergizzante costituisce uno degli ingredienti caratterizzanti del prodotto alimentare o ancora meglio, quando esso è riportato nella denominazione di vendita (latte, uova, ecc.) è facile individuare per il paziente allergico quale alimento non consumare. Problema ben più serio e che richiede una attenta lettura dell'etichetta o, in alternativa, la conoscenza di alcuni processi produttivi di alimenti complessi, è quello rappresentato dai cosiddetti allergeni nascosti o occulti.

Il fenomeno degli allergeni nascosti è causato dalla presenza in modo non esplicito di un allergene in un alimento, apparentemente non correlato allo stesso, verso cui è presente allergia: un esempio classico è rappresentato dal lisozima, estratto da uova, ed impiegato in molte trasformazioni casearie. Vale la pena di ricordare che il Reg 1169/2011 obbliga di dichiarare anche gli additivi che contengono sostanze allergizzanti come ad esempio il lisozima la cui fonte primaria è l'uovo. Anche le proteine utilizzate come chiarificanti nella produzione del vino, se dosabili, vanno riportate in etichetta. La produzione industriale degli alimenti, 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 ingredienti totalmente estranei ed apparentemente innocui rispetto alle sensibilizzazioni note.

L'industria alimentare ha iniziato in maniera volontaria a segnalare in etichetta, oltre alla lista degli ingredienti obbligatori, informazioni sulla modalità di produzione e sull'eventuale presenza inattesa di allergeni. 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:

- 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 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.

Ci sono stati, negli ultimi anni, grandi cambiamenti nella legislazione dell'etichettatura degli alimenti 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 la 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 diversificare con certezza la "sicurezza" 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 clinica negli individui più sensibili. La Tabella 4 illustra l'elenco degli allergeni per cui è prevista l'etichettatura obbligatoria in base al Regolamento Europeo n. 1169/2011.

Tabella 4 - Gli allergeni previsti dalla legislazione Europea*

1. Cereali contenenti glutine, vale a dire: grano (tra cui farro e grano khorasan), segale, orzo, avena o i loro ceppi ibridati e prodotti derivati, tranne a) sciroppi di glucosio a base di grano, incluso destrosio; b) maltodestrine a base di grano; c) sciroppi di glucosio a base di orzo; d) cereali utilizzati per la fabbricazione di distillati alcolici, incluso l'alcol etilico di origine agricola.
2. Crostacei e prodotti a base di crostacei.
3. Uova e prodotti a base di uova.
4. Pesce e prodotti a base di pesce, tranne: a) gelatina di pesce utilizzata come supporto per preparati di vitamine o carotenoidi; b) gelatina o colla di pesce utilizzata come chiarificante nella birra e nel vino
5. Arachidi e prodotti a base di arachidi
6. Soia e prodotti a base di soia, tranne: a) olio e grasso di soia raffinati; b) tocoferoli misti naturali (E306), tocoferolo D-alfa naturale, tocoferolo acetato D-alfa naturale, tocoferolo succinato D-alfa naturale a base di soia; c) oli vegetali derivati da fitosteroli e fitosteroli esteri a base di soia; d) estere di stanolo vegetale prodotto da steroli di olio vegetale a base di soia
7. Latte e prodotti a base di latte (incluso lattosio), tranne: a) siero di latte utilizzato per la fabbricazione di distillati alcolici, incluso l'alcol etilico di origine agricola; b) lattolo
8. Frutta a guscio, vale a dire: mandorle (<i>Amygdalus communis</i> L.), nocciole (<i>Corylus avellana</i>), noci (<i>Juglans regia</i>), noci di acagiù (<i>Anacardium occidentale</i>), noci di pecan [<i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch], noci del Brasile (<i>Bertholletia excelsa</i>), pistacchi (<i>Pistacia vera</i>), noci macadamia o noci del Queensland (<i>Macadamia ternifolia</i>), e i loro prodotti, tranne per la frutta a guscio utilizzata per la fabbricazione di distillati alcolici, incluso l'alcol etilico di origine agricola.
9. Sedano e prodotti a base di sedano.
10. Senape e prodotti a base di senape.
11. Semi di sesamo e prodotti a base di semi di sesamo.
12. Anidride solforosa e solfiti in concentrazioni superiori a 10 mg/kg o 10 mg/litro in termini di

SO ₂ totale da calcolarsi per i prodotti così come proposti pronti al consumo o ricostituiti conformemente alle istruzioni dei fabbricanti.
13. Lupini e prodotti a base di lupini.
14. Molluschi e prodotti a base di molluschi.

*Allegato II del regolamento (UE) n. 1169/2011

B 1.2 IL CONSUMATORE ALLERGICO E I PRODOTTI CONFEZIONATI

La dieta priva dell'ingrediente verso cui il paziente allergico è sensibilizzato è l'unica strategia per quella categoria di consumatori. Al momento dell'acquisto di prodotti confezionati la lettura dell'etichetta e, in particolare, della lista degli ingredienti e delle eventuali informazioni volontarie, è di fondamentale importanza.

Con riferimento al sopra citato allegato II il Regolamento CE1169/2011 prescrive che le sostanze allergizzanti siano facilmente individuate alla lettura. L'articolo 21, pur lasciando autonomia all'operatore del settore alimentare di individuare il mezzo per evidenziare l'allergene, recita:

“le indicazioni di cui all'articolo 9, paragrafo 1, lettera c)

- a) figurano nell'elenco degli ingredienti (...) con un riferimento chiaro alla denominazione della sostanza o del prodotto figurante nell'elenco dell'allegato II; (...)
- b) la denominazione della sostanza o del prodotto figurante nell'allegato II è evidenziata attraverso un tipo di carattere chiaramente distinto dagli altri ingredienti elencati, per esempio per dimensioni, stile o colore di sfondo.”

B 1.3 IL CONSUMATORE ALLERGICO NELLA RISTORAZIONE COLLETTIVA

Il Regolamento UE 1169/2011 all'articolo 44, prevede che per gli alimenti offerti in vendita al consumatore finale o alle collettività, senza imballaggio, imballati sui luoghi di vendita su richiesta del consumatore o preimballati per la vendita diretta, gli Stati membri possono adottare disposizioni nazionali concernenti i mezzi con i quali le indicazioni sugli allergeni devono essere rese disponibili e, eventualmente, la loro forma di espressione e presentazione.

Il Ministero della Salute Italiano ha pubblicato una nota (nota 6/2/2015 n°3674) relativa alle indicazioni sulla presenza di allergeni forniti alle collettività.

In materia di informazioni sugli alimenti e di responsabilità degli operatori del settore alimentare, è necessario in ogni caso il rispetto di quanto sancito dall'articolo 8 del Regolamento (CE) 1169/2011, che ai paragrafi 2, 6 e 8 recita:

“L'operatore del settore alimentare responsabile delle informazioni sugli alimenti assicura la presenza e l'esattezza delle informazioni sugli alimenti, conformemente alla normativa applicabile in materia di informazioni sugli alimenti e ai requisiti delle pertinenti disposizioni nazionali”;

“Gli operatori del settore alimentare, nell’ambito delle imprese che controllano, assicurano che le informazioni sugli alimenti non preimballati destinati al consumatore finale o alle collettività siano trasmesse all’operatore del settore alimentare che riceve tali prodotti, in modo che le informazioni obbligatorie sugli alimenti siano fornite, ove richiesto, al consumatore finale”

“Gli operatori del settore alimentare che forniscono ad altri operatori del settore alimentare alimenti non destinati al consumatore finale o alle collettività, assicurano che a tali altri operatori del settore alimentare siano fornite sufficienti informazioni che consentano loro, se del caso, di adempiere agli obblighi di cui al paragrafo 2”.

In relazione alle informazioni sulle sostanze che provocano allergie o intolleranze, così come elencati nell'allegato II del regolamento stesso, qualsiasi operatore che fornisce alimenti pronti per il consumo all'interno di una struttura, come ad esempio un ristorante, una mensa, una scuola o un ospedale, o anche attraverso un servizio di catering, o ancora per mezzo di un veicolo o di un supporto fisso o mobile, deve fornire al consumatore finale le informazioni richieste.

Tali informazioni possono essere riportate sui menù, su appositi registri o cartelli o ancora su altro sistema equivalente, anche tecnologico, da tenere bene in vista, così da consentire al consumatore di accedervi facilmente e liberamente. Nel caso in cui si utilizzino sistemi elettronici di tipo “applicazioni per smartphone”, codice a barre, codice QR etc., questi non possono essere in ogni caso predisposti quali unici strumenti per riportare le dovute informazioni, in quanto non facilmente accessibili a tutta la popolazione e dunque non sufficientemente idonei allo scopo.

Inoltre, la nota del 6 febbraio 2015 del Ministero della Salute, indica che gli obblighi d’informazione in materia di allergeni alimentari possono ritenersi assolti anche nel caso in cui sia presente in un luogo ben visibile all’interno del locale, sul menù, sul registro o su apposito cartello, una tra le seguenti diciture:

- “le informazioni circa la presenza di sostanze o di prodotti che provocano allergie o intolleranze sono disponibili rivolgendosi al personale in servizio;
- “per qualsiasi informazioni su sostanze e allergeni è possibile consultare l’apposita documentazione che verrà fornita, a richiesta, dal personale in servizio”.

In tal caso è necessario che le informazioni dovute risultino da idonea documentazione scritta, facilmente reperibile sia per l’autorità competente sia per il consumatore finale, di cui il personale avrà preventivamente preso visione e conoscenza con contestuale approvazione scritta.

La scelta circa la modalità da utilizzare per render edotto il consumatore finale è rimessa alla discrezionalità dell’operatore, che sceglierà la soluzione più idonea a seconda della propria organizzazione e dimensione aziendale. L’operatore, nel predisporre l’informativa scritta necessaria per adempiere all’obbligo di cui sopra, dovrà, inoltre, essere libero di indicare la presenza degli allergeni in rapporto alle singole preparazioni secondo le modalità che riterrà più opportune. Ciò potrà avvenire per esempio evidenziando nella lista degli ingredienti delle singole preparazioni la presenza degli allergeni, predisponendo una tabella che riporti le 14 categorie di allergeni previste dal Regolamento e che, contestualmente, individui le preparazioni che le contengono, o secondo altre e diverse modalità che garantiscano comunque l’informazione corretta al consumatore.

B 1.4 IL BAMBINO ALLERGICO A SCUOLA

La gestione dei pasti destinati ai soggetti che necessitano di diete speciali in un contesto di ristorazione scolastica riveste una grande importanza sia perché la popolazione infantile è la più soggetta alle allergie alimentari con reazioni gravi o sistemiche, sia per la fiducia che le famiglie ripongono nell'affidare al servizio di ristorazione scolastica i loro figli.

La programmazione delle produzioni deve permettere di fornire ai soggetti allergici o intolleranti, alimenti in grado di evitare rischi per la salute, squilibri nutrizionali e monotonia nelle tipologie degli alimenti. La logistica e la gestione degli spazi risulta di fondamentale importanza sia nei centri di cottura che nelle cucine di piccole dimensioni. Da un lato la gestione di numerosi flussi e dall'altra il rischio legato alle ridotte superfici disponibili posso rappresentare un rischio per la contaminazione crociata degli alimenti.

Per una gestione corretta delle diete speciali, i capitolati predisposti dai Comuni dovrebbero richiedere:

- selezione dei fornitori
- materie prime adeguate (e.i. prosciutto cotto senza glutine e/o derivati del latte)
- procedure per la preparazione delle diete speciali
- predisposizione di menu speciali scritti
- alternanza dei piatti, limitando la somministrazione di quelli freddi
- formazione specifica per gli operatori
- piano di autocontrollo adeguato
- procedure per la gestione e controllo dello stoccaggio e conservazione degli alimenti (evitare contaminazioni tra materie prime)

I fornitori devono fornire alimenti correttamente etichettati e offrire garanzie specifiche per le materie prime utilizzate per la preparazione di piatti speciali. Al momento dell'utilizzo, l'operatore deve valutare la corrispondenza e la correttezza delle informazioni riportate in etichetta, al fine di limitare eventuali rischi per il consumatore allergico.

La predisposizione di procedure per la preparazione dei piatti speciali è di fondamentale importanza soprattutto per la gestione delle attrezzature, degli utensili e delle superfici che entrano in contatto con gli alimenti (e il contatto tra e con alimenti nella catena di trasporto, manipolazione e trattamento delle materie prime). L'identificazione dei punti critici all'interno dei flussi produttivi permette di limitare il rischio per i soggetti allergici e intolleranti.

Ad esempio la copertura degli alimenti durante la procedura di cottura in forno, o durante la distribuzione, può limitare la contaminazione crociata accidentale. La fornitura dei pasti speciali dovrà avvenire in una vaschetta monorazione di materiale idoneo per il contatto con gli alimenti e termosaldata. La porzione dovrà altresì essere perfettamente identificabile da parte del personale addetto alla distribuzione del pasto mediante applicazione del nome e cognome del bambino e classe di appartenenza.

L'ente appaltante deve richiedere una certa alternanza nei piatti speciali, limitando l'utilizzo di piatti freddi, al fine di evitare squilibri nutrizionali e monotonia alimentare.

La ditta erogatrice del servizio deve garantire agli operatori una formazione adeguata e specifica al fine di permettere un aggiornamento continuo per tale problematica. All'interno dell'autocontrollo deve essere dedicata una parte adeguata per la gestione del pericolo allergeni e un piano di campionamento opportuno sia sulle materie prime che sul prodotto finito.

La stessa attenzione e le stesse procedure, adeguate al contesto, devono essere adottate anche nel caso di gestione delle mense scolastiche gestite direttamente dalle scuole.

Inoltre particolare attenzione alla gestione del pasto in classe (merenda) deve essere posta dal personale scolastico al fine di evitare contaminazioni e/o ingestione accidentale di alimenti causa di reazione (SIAIP-Federasma "Raccomandazioni per la gestione del bambino allergico a scuola" 2011-

https://www.siaip.it/upload/1925_Raccomandazioni%20Bambino%20Allergico%20a%20Scuola_Siaip-Federasma.pdf).

B 2 - STRUMENTI E APPROCCI PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO NEL SETTORE DEGLI ALLERGENI ALIMENTARI

B 2.1 INTRODUZIONE

Al momento attuale, la gestione del rischio allergeni può trovare adempimento essenzialmente attraverso azioni che abbiano come scopo quello di evitare che i soggetti allergici entrino in contatto con le molecole verso cui sono sensibilizzati. Da ciò deriva innanzitutto la necessità per il soggetto allergico di avere una corretta informazione che gli consenta di evitare l'alimento scatenante. In questo contesto è stato sviluppato il quadro normativo che rende obbligatoria la dichiarazione degli ingredienti ritenuti rilevanti per la salute dei consumatori allergici, negli alimenti preimballati e non (Regolamento 1169/2011). Questo tipo di intervento, che si riferisce esclusivamente a componenti che sono presenti intenzionalmente, non protegge il consumatore dalla possibile esposizione ad eventuali allergeni in tracce che, come già discusso, è legata a fenomeni di contaminazioni crociate che possono verificarsi in qualsiasi punto della filiera agro-alimentare.

Le industrie alimentari si trovano di conseguenza nella necessità di mettere in atto misure precauzionali mirate, anch'esse ampiamente regolamentate, volte ad evitare o quanto meno ridurre al minimo il rischio di contaminazioni. Tali misure sono rappresentate dai principi igienici generali di Buona Pratica di Fabbricazione (GMP, Good Manufacturing Practice) e dal sistema HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point).

L'applicazione di queste procedure risulta di non facile praticabilità in assenza di norme che definiscano i livelli ammissibili di residui di allergeni nelle derrate alimentari. Ciò ha portato da un

lato ad affidare esclusivamente alla sensibilità dei metodi analitici la definizione della presenza/assenza degli allergeni negli alimenti, utilizzando de facto il Limit of Detection (LOD) come livello di azione (Hattersley et al. 2014), dall'altro lato ha generato, da parte dell'industria, un utilizzo sempre più diffuso di etichette "precauzionali" volontarie del tipo: può contenere.... prodotto in stabilimenti in cui viene utilizzato...., ecc. La conseguenza di questo tipo di etichettatura, è diverso a seconda delle attitudini dei consumatori allergici: può portare da un lato ad una restrizione significativa del numero di alimenti ritenuti potenzialmente sicuri, con un impatto negativo sulla qualità della vita e un aumento del rischio di andare incontro a carenze nutrizionali; d'altra parte numerosi consumatori, ritenendo che ci sia un uso eccessivo di queste avvertenze, sono portati a ignorarle completamente aumentando il rischio di possibili effetti avversi (Crevel et al. 2014a; Hattersley et al. 2014).

Entrambi questi approcci non sono basati sull'applicazione dei principi di valutazione del rischio e non sono quindi in grado di stimare il rischio reale connesso al consumo di alimenti potenzialmente contaminati. Nel caso del LOD si assiste infatti ad una "corsa" da parte delle ditte produttrici di kit per il dosaggio degli allergeni verso valori sempre più bassi che non necessariamente rivestono un significato clinico. Nel caso dell'etichettatura precauzionale né la presenza, né l'assenza di etichettatura consente una valutazione affidabile del rischio da parte del consumatore: le evidenze disponibili suggeriscono che c'è una scarsa correlazione tra il messaggio e la presenza reale dell'allergene e che viceversa l'assenza di etichettatura precauzionale non assicura l'assenza di contaminazione (Allen et al. 2014a; DunnGalvin et al. 2015).

Di conseguenza c'è un'urgente necessità di azioni per stabilire standard condivisi relativi alla presenza non intenzionale di allergeni, che poggino su una solida valutazione del rischio. Un approccio basato sul rischio si concentra sulla valutazione della probabilità che l'esposizione ad un alimento si traduca in un effetto avverso ed è in grado di fornire il fondamento scientifico per stabilire livelli di riferimento da usare nelle decisioni di gestione del rischio (Madsen et al. 2011; Reese et al. 2015).

C'è ormai un consensus emergente che l'eliminazione totale del rischio di reazioni per esposizione accidentale agli allergeni (rischio zero) non è un'opzione realistica o raggiungibile e che devono essere presi provvedimenti per migliorare la situazione, attualmente non soddisfacente, definendo un livello accettabile di rischio (Crevel et al. 2014b; Hattersley et al. 2014; Madsen et al. 2011; Reese et al. 2015). Il grado di rischio accettabile dipende dalla frequenza degli effetti avversi e dalla loro natura in termini di severità, durata e reversibilità. Poiché, come è noto, la severità delle reazioni avverse varia significativamente tra i soggetti allergici, l'obiettivo principale potrebbe essere quello di migliorare la sicurezza attraverso la prevenzione delle reazioni severe da una parte e la minimizzazione del rischio per altri tipi di reazione dall'altra (Crevel et al. 2014b).

Questo richiede un giudizio di merito ed è in ultima analisi una decisione "sociale" che deve coinvolgere tutti gli stakeholders (operatori del settore). Una volta che il livello politico avrà preso una decisione in merito, potranno essere determinate le dosi di riferimento che soddisfano l'appropriato livello di protezione stabilito (Hattersley et al. 2014; Madsen et al. 2011).

Non rientrando queste decisioni nelle competenze degli Autori di questo documento, nelle sezioni che seguono verranno esposti i principi della valutazione del rischio, in grado di fornire, agli organi demandati alla gestione dello stesso, una base scientificamente valida per formulare politiche per la tutela della sicurezza dei soggetti allergici.

B 2.2 VALUTAZIONE DEL RISCHIO: ASPETTI GENERALI

Per lungo tempo è stato messo in discussione se i principi tossicologici classici di valutazione del rischio potessero applicarsi all'allergia e agli alimenti allergenici. È ora ampiamente accettato che la valutazione del rischio allergeni non differisce in modo fondamentale dalla valutazione del rischio da sostanze chimiche o da agenti microbiologici, sebbene ci siano alcune caratteristiche chiaramente distinte (Crevel et al. 2014a).

La valutazione del rischio è un processo codificato attraverso cui è possibile ottenere una caratterizzazione (stima) del rischio stesso, ovvero della probabilità del verificarsi di effetti avversi in una data popolazione. Come è noto, la valutazione del rischio include quattro fasi: identificazione del pericolo, caratterizzazione del pericolo, valutazione dell'esposizione e caratterizzazione del rischio (vedi Figura 3).

IDENTIFICAZIONE DEL PERICOLO

In questo contesto, il pericolo è rappresentato da quelle componenti dell'alimento in grado di indurre una reazione che coinvolge il sistema immunitario. Il test di provocazione orale in doppio cieco con placebo (DBPCFC) è il requisito per confermare una relazione causale tra la reazione clinica e l'assunzione dell'alimento sospetto e deve essere accompagnato da test sierologici per dimostrare la natura IgE-mediata della reazione. A differenza delle sostanze chimiche tossiche e dei microrganismi patogeni, che rappresentano un pericolo per l'intera popolazione, gli allergeni rappresentano un pericolo solo per una parte di essa e un alimento che risulta pericoloso per i soggetti allergici è spesso una importante fonte di nutrienti per il resto della popolazione (Crevel et al. 2014b, Madsen et al. 2010). Sebbene siano stati individuati più di 170 alimenti potenzialmente allergenici, solo pochi di questi alimenti causano la maggioranza delle reazioni allergiche (Houben et al. 2016). Alcuni alimenti (es. latte e uovo) risultano importanti a livello mondiale, mentre altri variano tra aree geografiche. E' chiaramente impraticabile, e anche non necessario, gestire allo stesso livello il rischio derivante da tutti questi alimenti e di conseguenza è necessario dare delle priorità sulla base della rilevanza sanitaria di ciascun allergene.

CARATTERIZZAZIONE DEL PERICOLO

Consiste nella caratterizzazione della relazione tra l'assunzione di allergene e la possibilità, natura e severità di un effetto avverso che si manifesta in seguito ad esposizione al pericolo. In questo contesto gli effetti avversi sono rappresentati dalle reazioni allergiche sia oggettive che soggettive. Una reazione allergica oggettiva è caratterizzata da almeno un sintomo che possa essere riscontrato ad una osservazione clinica (es. vomito, orticaria, rash, angioedema). Una reazione allergica soggettiva è definita come il verificarsi di sintomi non visibili all'osservazione clinica (es. dolore addominale, mal di testa, sensazione di formicolio in gola) (EFSA 2014).

Al fine della caratterizzazione del pericolo (relazione dose/risposta), il DBPCFC, sviluppato per la diagnosi dell'allergia alimentare, è stato adattato e standardizzato per rispondere a tale finalità (EFSA 2014).

Mentre nella maggior parte degli studi non è stato possibile individuare una dose senza effetto (NOAEL: No Observed Adverse Effect Level), poiché alcuni dei soggetti studiati hanno sviluppato effetti avversi già con la dose iniziale testata, diversi studi sono stati in grado di individuare la dose più bassa in grado di provocare la reazione avversa (LOAEL: Lowest Observed Adverse Effect Level denominata più appropriatamente nel caso degli allergeni MED: Minimum Eliciting Dose) (Crevel et al., 2014b; Madsen et al., 2009).

Dati clinici indicano che la MED può variare da soggetto a soggetto e può anche variare per lo stesso individuo nel tempo e a seconda delle circostanze (infezioni, malattie, stress, assunzione di alcool e farmaci, ecc.) (Björkstén et al., 2008; Houben et al. 2016), rendendo difficile individuare delle soglie che proteggano l'intera popolazione allergica.

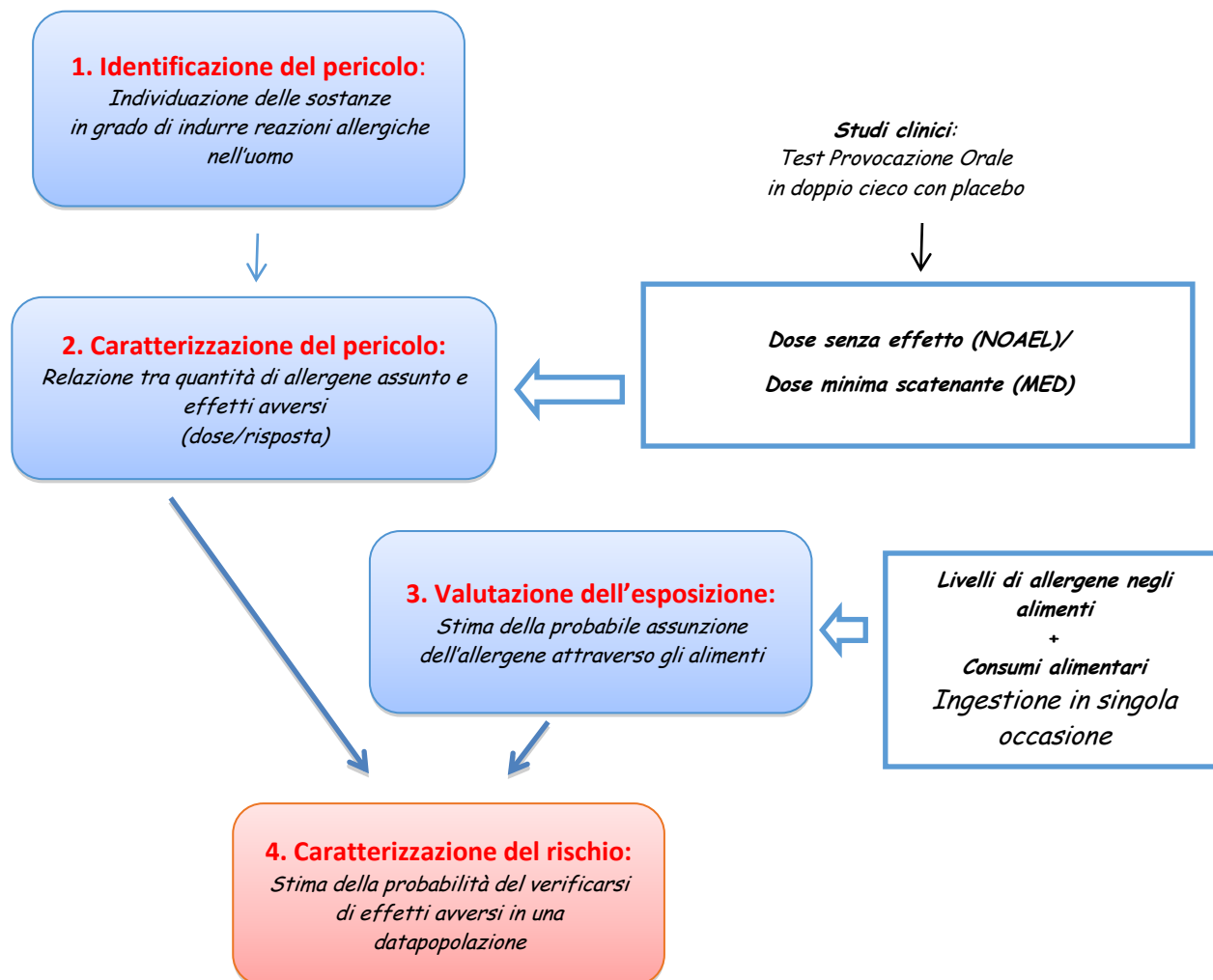


Figura 3 – Schema della valutazione del rischio per gli allergeni alimentari

VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE

Consiste nella stima della probabile assunzione dell'allergene attraverso gli alimenti e presuppone quindi la conoscenza approfondita delle fonti di esposizione:

- sostanze che hanno esenzione alla dichiarazione (coadiuvanti tecnologici quali i chiarificanti dei vini) o che possono essere dichiarati in modo complessivo (amidi, oli vegetali, spezie, ecc) e gli allergeni in tracce),
- informazioni sull'assunzione dell'alimento/i (quantità e frequenza) e
- i livelli di contaminazione.

I sintomi di reazioni mediate da IgE solitamente compaiono entro pochi minuti o poche ore dopo l'esposizione. L'unità di misura dell'esposizione per gli allergeni è quindi la quantità assunta in una singola occasione, o in un intervallo di tempo relativamente breve, piuttosto che l'esposizione a

lungo termine come nel caso della valutazione dell'esposizione ad agenti chimici (Crevel et al., 2014b).

La stima dell'assunzione dell'alimento deve essere poi associata ai livelli di allergene presenti nell'alimento. I metodi analitici adottati per ottenere questi ultimi dati dovrebbero idealmente avere come bersaglio il pericolo, di conseguenza dovrebbero essere preferiti i metodi in grado di determinare le proteine allergeniche (Crevel et al., 2014b; Muraro et al., 2014).

CARATTERIZZAZIONE DEL RISCHIO

È la stima della probabilità di comparsa e della gravità degli effetti dannosi per la salute in una determinata popolazione ed è basata sull'integrazione dei dati ottenuti con lo sviluppo dei primi tre punti: identificazione del pericolo, caratterizzazione del pericolo e valutazione dell'esposizione.

B 2.3 APPROCCI PRATICI PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO E CRITICITÀ

Tre approcci diversi sono stati proposti per la valutazione del rischio allergeni (Crevel et al., 2014b; EFSA 2014; Madsen et al., 2011).

Il primo approccio consiste nella valutazione tradizionale del rischio utilizzando il NOAEL/LOAEL e fattori di incertezza. Questo approccio è basato su stime puntuali e prevede di far riferimento allo scenario peggiore per ciascuna variabile presa in considerazione (NOAEL/LOAEL o meglio MED come già detto, fattori di incertezza e livelli di esposizione). In particolare la stima massima di assunzione dell'allergene viene confrontata con la più bassa MED trovata: se l'assunzione supera la MED non è possibile escludere che si verifichi una reazione avversa, almeno nei soggetti più sensibili. Questo approccio, se da un lato ha lo scopo di assicurare che anche questa parte della popolazione sia protetta in tutte le condizioni, dall'altro può portare alla conclusione che non si può mai escludere che possa verificarsi un effetto avverso e quindi sovrastima il rischio. Un altro svantaggio di questo approccio è che l'entità del problema rimane ignota, cioè non viene fornita indicazione della proporzione della popolazione che può essere a rischio (Spanjersberg et al., 2007).

L'approccio Benchmark Dose (BMD) e Margine di Esposizione (MoE), invece di utilizzare dati singoli, tiene conto di tutti i dati sperimentali disponibili relativi alle MED, che vengono inseriti in una distribuzione mediante diversi modelli matematici. Da questa distribuzione è possibile ricavare la Benchmark Dose, definita come la dose che induce un effetto avverso in una data percentuale dei soggetti studiati (ad es. 10% = BMD₁₀).

Questa dose viene usata come punto di partenza per ulteriori calcoli dai quali, sulla base degli intervalli di confidenza, si estrapola il limite inferiore della Benchmark Dose (BMDL, Benchmark Dose Lower Limit) che, diviso per l'apporto stimato di allergene nella popolazione, dà luogo al Margine di Esposizione (MoE: Margin of Exposure) (EFSA 2014; Madsen et al. 2009). Il confronto dei MOE ricavati per differenti allergeni e differenti scenari di esposizione, consente di individuare le priorità degli interventi di gestione del rischio.

Infine nel modello probabilistico vengono prese in considerazione, anziché delle stime puntuali, delle distribuzioni di probabilità: la distribuzione di probabilità di assunzione di un alimento allergenico in una data popolazione e la distribuzione di probabilità delle MED per quell'alimento allergenico nella stessa popolazione. Entrambi i dati vengono riportati in una curva cumulativa e la distribuzione risultante descriverà la probabilità che una parte della popolazione sia esposta a livelli e a circostanze in cui si possono verificare effetti avversi. La metodologia probabilistica consente una valutazione quantitativa del rischio. Poiché le variabili di ingresso possono essere modificate indipendentemente, la metodologia può essere utilizzata per calcolare, per livelli di esposizione

diversi, la percentuale di popolazione che è probabile vada incontro a effetti avversi o per calcolare le concentrazioni massime di allergene tollerabili, usando come punto di partenza il massimo rischio accettabile (Ciarrocchi et al., 2011; EFSA 2014). Ulteriori dettagli sui diversi approcci sono riportati nell'Allegato B 2.3

CRITICITÀ

Tutti e tre gli approcci per la valutazione del rischio sopra esposti possono essere utilizzati, tuttavia il modello probabilistico è considerato quello più promettente per la valutazione del rischio allergeni a livello di popolazione (Hattersley et al., 2014; Madsen et al., 2011). In ogni caso, indipendentemente dal modello scelto, l'affidabilità dei risultati ottenuti dipende dal tipo, qualità e quantità dei dati utilizzati per stimare sia le soglie di popolazione (o distribuzioni di soglia), che l'esposizione all'alimento/ingrediente allergenico. Sebbene grandi passi avanti siano stati fatti in tal senso permangono ancora delle criticità sia per quanto riguarda i dati clinici che quelli di esposizione.

DATI CLINICI

Come già sopra esposto, i dati utilizzati nella valutazione del rischio provengono essenzialmente dai test di provocazione orale in doppio cieco con placebo (DBPCFC). Tali test, strutturati inizialmente come conferma della diagnosi di allergia, negli anni più recenti sono stati adattati per generare dati sulle soglie. Nell'applicazione del test devono essere tenuti in considerazione diversi fattori che condizionano la qualità dei dati prodotti, quali la selezione dei pazienti, la procedura stessa del test e i materiali utilizzati (Tabella 5).

Tabella 5 - Fattori che influenzano il risultato degli studi di provocazione.

Selezione dei pazienti
Reattività documentata all'alimento
Caratterizzazione adeguata dei soggetti
Rappresentatività rispetto alla popolazione generale
Protocollo del test
Dose di partenza
Progressione delle dosi
Intervallo di tempo tra le dosi
Valutazione delle reazioni
Materiale utilizzato nel test
Matrice alimentare e contenuto di allergene
Alimento processato o meno
Adeguate mascheramento dell'alimento allergenico o del placebo

Un primo elemento critico è rappresentato dalla selezione dei pazienti, ovverosia dalla misura in cui i risultati degli studi clinici si applichino all'intera popolazione allergica.

Le popolazioni studiate, solitamente costituite da pazienti afferenti a centri specializzati, escludono gli individui meno sensibili, che sono in grado di gestire le loro allergie senza il ricorso all'aiuto della clinica, e rappresentano quindi un sottogruppo di soggetti più reattivi rispetto alla popolazione allergica generale. Inoltre la pratica frequente di escludere a priori dai test di provocazione orale gli individui che hanno avuto in passato reazioni severe (anafilassi), può ridurre ulteriormente la rappresentatività del campione (Crevel et al. 2014a e 2014b; EFSA 2014).

Un altro elemento critico è rappresentato dal protocollo utilizzato nel TPO; il modo in cui viene condotto il test determina infatti il tipo di dati generati e quindi la sua idoneità per scopi diversi. Nel 2004 è stato sviluppato un protocollo per TPO a basse dosi per la determinazione delle soglie (Taylor et al., 2004) e varianti simili sono state applicate a studi su larga scala (Crevel et al., 2014a e 2008, EFSA, 2014).

Anche i materiali usati nei test sono una variabile critica e dovrebbero essere attentamente caratterizzati, sia rispetto al materiale attivo (l'alimento) che rispetto alla dose presente nella matrice. Va tenuto anche conto che il trattamento tecnologico può influenzare l'allergenicità degli alimenti, in particolare per gli allergeni termolabili rispetto a quelli termostabili e che la composizione della matrice utilizzata per veicolare l'allergene (presenza di grassi, polifenoli ecc) può influenzarne la disponibilità e quindi la reazione clinica. Un altro aspetto importante è l'efficacia del mascheramento, va attentamente verificato se la matrice rende irriconoscibile l'alimento allo studio dal placebo in ogni aspetto (odore, sapore, consistenza ecc) (Crevel et al. 2014a, 2007, 2008).

DATI DI ESPOSIZIONE

Come già evidenziato, lo scenario di esposizione per la valutazione del rischio allergeni è relativo all'assunzione di alimenti specifici, contenenti l'allergene, durante un pasto o occasione di ingestione. I dati delle indagini sui consumi alimentari condotti nella popolazione generale o in specifici sottogruppi di popolazione (es. bambini, adolescenti, anziani) sono disponibili per la maggior parte dei paesi europei. Queste indagini, tuttavia, non essendo progettate per la valutazione del rischio allergeni riportano solitamente i dati di consumo su base giornaliera (EFSA, 2014).

L'apporto medio giornaliero di alimenti non è molto utile nella valutazione del rischio allergeni e quindi si cerca di ovviare a questo problema facendo riferimento a diversi scenari (consumo medio o 95° percentile basato sui soli consumatori, assunzione massima ipotizzabile ecc.) (Crevel et al., 2014a). La scelta dei dati di assunzione ovviamente influenza i risultati della valutazione del rischio.

I soggetti allergici chiaramente eviteranno gli alimenti contenenti come ingrediente l'allergene, mentre per gli alimenti consentiti s'ipotizza che la quantità e la frequenza di consumo sia simile a quella della popolazione generale. Sebbene questa assunzione possa essere ragionevole per molti scenari alimentari, una prova formale non è attualmente disponibile (Crevel et al., 2014a). Vi è quindi la necessità di ottenere dati sul comportamento dei consumatori affetti da allergia alimentare, comprese le scelte alimentari e i relativi dati di consumo.

Per quanto riguarda il secondo elemento necessario per la valutazione dell'esposizione e cioè la conoscenza dei livelli di contaminazione degli alimenti da residui di allergeni, i dati attualmente disponibili sono molto limitati. Come già detto, i metodi da utilizzare per raccogliere questi dati dovrebbero dosare le proteine allergeniche. Le metodiche ELISA rilevano le proteine presenti nella fonte allergenica, anche se non necessariamente quelle che causano l'allergia nel singolo soggetto. I

metodi basati sulla spettrometria di massa, dosando le specifiche proteine d'interesse, possono fornire una valutazione diretta del livello di residui allergenici per la valutazione del rischio anche se si tratta di tecniche più complesse e non usabili nella routine (vedi sezione analitica). Viceversa i test PCR non rilevano le proteine e quindi la loro utilità nella valutazione del rischio è limitata (Crevel et al., 2014a).

B 2.4 ESEMPI DI APPLICAZIONE DEI PRINCIPI DI VALUTAZIONE DEL RISCHIO

I principi della valutazione del rischio sono stati presi in considerazione solo da pochi organismi regolatori e non.

In particolare la UK Food Standards Agency (Food Standards Agency, 2006) ha pubblicato nel 2006 una guida qualitativa, per aiutare l'industria a gestire il rischio inerente la presenza involontaria (cross-contaminazione) di allergeni negli alimenti durante la produzione e a determinare se e quando sia appropriato l'uso dell'etichettatura precauzionale per informare il consumatore. Partendo da tale documento, la Food Drink Europe ha sviluppato nel 2013 (Food Drink Europe, 2013) una nuova linea guida, includendo maggiori dettagli sul modo in cui il rischio può essere gestito e minimizzato.

Di recente un gruppo di esperti (ILSI Europe Food Allergy Task Force Expert Group) ha proposto un approccio, basato sui principi di valutazione del rischio, per classificare gli alimenti allergenici in base alla loro importanza per la salute pubblica (Houben et al., 2016). Tale approccio è basato su due parametri indipendenti: prevalenza dell'allergia (proporzione della popolazione allergica ad uno specifico alimento) e potenza dell'allergene (espressa come ED₅₀ cioè la quantità di allergene che scatena una reazione nel 50% della popolazione). Tali parametri vengono rappresentati graficamente e la posizione del singolo alimento nel grafico può essere utilizzata per stabilire la necessità o meno dell'etichettatura precauzionale.

In Australia l'Allergen Bureau, istituito con lo scopo di migliorare la gestione del rischio allergeni e limitare l'uso diffuso dell'etichettatura precauzionale, ha sviluppato nel 2007 un approccio pratico basato sulla valutazione del rischio, noto come programma VITAL (Voluntary Incidental Trace Allergen Labelling). Una parte essenziale di questo programma è stata la fissazione di una griglia contenente livelli di azione per guidare l'uso dell'etichettatura precauzionale (Allen et al., 2014b; Crevel et al., 2014a). Il programma è stato successivamente rivisto e nuove raccomandazioni e dosi di riferimento sono state pubblicate nel 2014 (Taylor et al., 2014), tenendo in considerazione il notevole volume di dati e conoscenze che si sono accumulate negli ultimi anni.

L'approccio VITAL è stato ripreso in due successivi "position paper" da altri organismi: l'European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) e la German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI) che riportano le dosi di riferimento suggerite, indicando per ciascuna di esse anche la sensibilità richiesta per i metodi analitici (Muraro et al., 2014; Reese et al., 2015,).

L'iniziativa VITAL rappresenta un primo tentativo di introdurre una base formale e trasparente per l'applicazione dell'etichettatura precauzionale. Tale approccio presuppone un consenso su un rischio residuo accettabile e l'identificazione dei pazienti più sensibili che devono ricevere ulteriori informazioni ed avvertenze sulle strategie dietetiche da adottare.

Al momento attuale non esiste un accordo internazionale su questo tipo d'iniziative, sarà quindi necessario approfondire la problematica ed ampliare il numero dei dati disponibili, nonché effettuare studi di validazione clinica per le dosi di riferimento (Muraro et al., 2014).

C - METODI ANALITICI PER L'IDENTIFICAZIONE E IL DOSAGGIO DEGLI ALLERGENI ALIMENTARI

L'identificazione e la quantificazione di un allergene può essere ottenuta mediante diversi approcci analitici. Le tecniche per la rivelazione di potenziali allergeni nei prodotti alimentari sono da considerarsi di due tipologie: approccio diretto (identificazione della proteina allergizzante) e indiretto (identificazione di altre proteine di quell'ingrediente allergizzante, oppure identificazione della sua presenza mediante analisi del DNA). I diversi approcci analitici sono illustrati in Figura 4.

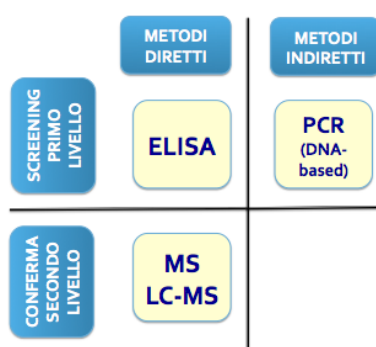


Figura 4 - Schema delle principali tecniche analitiche dirette e indirette per il rilevamento dell'allergene o dell'ingrediente allergenico nell'alimento

I metodi più frequentemente impiegati sono quelli immuno-chimici o basati sulla biologia molecolare. Più recentemente, sono stati sviluppati metodi di identificazione diretta di allergeni o loro frammenti mediante analisi basata sulla spettrometria di massa. Gli approcci e le criticità di questi metodi saranno discussi nei paragrafi seguenti.

C 1 - METODI IMMUNOCHIMICI

I metodi basati sull'analisi delle proteine, solitamente, prevedono dei protocolli di rivelazione immunochimici quali radio-allergosorbent test (RAST), enzyme allergosorbent test (EAST), dispositivi "lateral flow" (LFD) 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., 2004a; van Henghel, 2007)

C 1.1 ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

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 ormai disponibili (Baumert, 2013; 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. La quantificazione viene effettuata, 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) I test ELISA competitivi utilizzano prevalentemente la rivelazione indiretta (Figura 5): 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 quindi inversamente proporzionale alla quantità di antigene presente nel campione. La rivelazione del complesso antigene-anticorpo formatosi avviene in seguito ad aggiunta di un anticorpo secondario, coniugato con l'enzima.

ii) I test ELISA sandwich sfruttano prevalentemente la rivelazione diretta (Figura 6): 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. In questo caso, 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-Ulrich et al. 2009). I kit commerciali disponibili per la determinazione degli allergeni utilizzano principalmente la tecnica sandwich con rivelazione diretta.

Figura 5 – Rappresentazione schematica del Test ELISA competitivo indiretto
(http://www.uniroma2.it/didattica/LabBioanalitica/deposito/bioanalitica_-_ELISA.ppt)

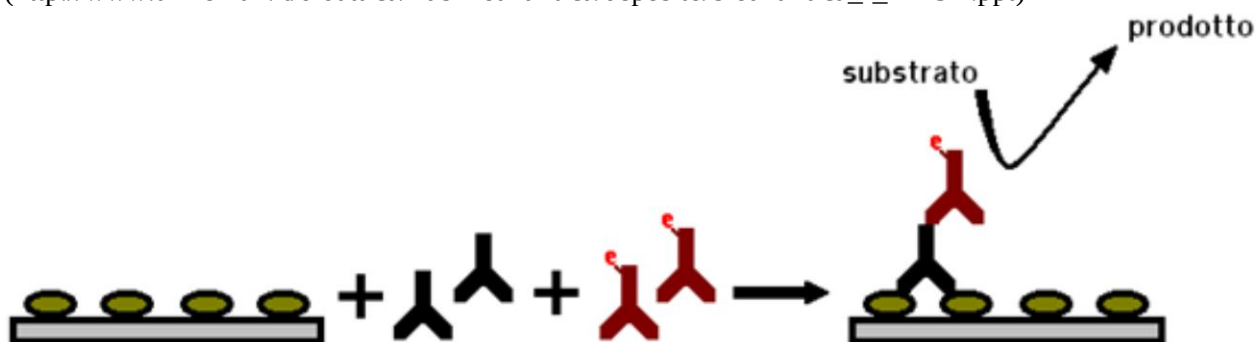
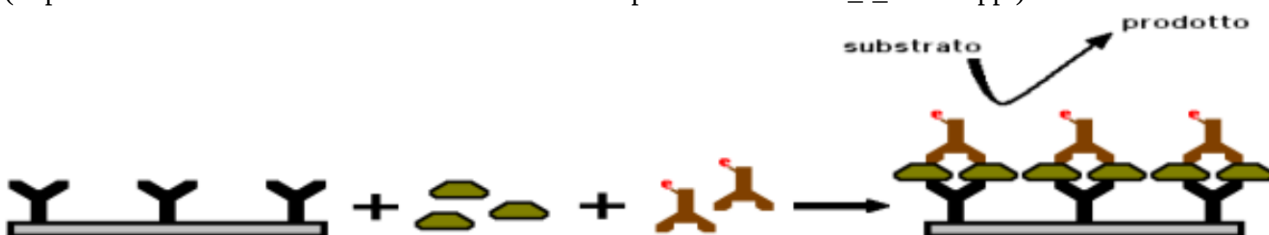


Figura 6 – Rappresentazione schematica del metodo ELISA sandwich
(http://www.uniroma2.it/didattica/LabBioanalitica/deposito/bioanalitica_-_ELISA.ppt)



I metodi ELISA presentano diversi vantaggi tra cui la relativa semplicità d'uso, tempi brevi di analisi e sensibilità elevata. 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, correlati all'utilizzo di diversi tipi di anticorpi (mono o policlonali), allestiti verso varie tipologie di proteine e pertanto caratterizzati da prestazioni non sovrapponibili (efficienza). Le criticità più significative dell'ELISA possono essere riassunte e schematizzate in:

- fase di estrazione del campione: la procedura di estrazione dovrebbe essere in grado di consentire un'estrazione efficiente delle proteine target dagli alimenti ed essere applicabile sia all'alimento tal quale, che al prodotto alimentare sottoposto a trattamenti tecnologici in grado di modificare le caratteristiche delle proteine. Una scelta non ottimale può portare all'estrazione di componenti che possono interferire con il saggio (falsi positivi) o a errori di quantificazione per sottostima (falsi negativi)
- scelta dell'anticorpo: gli anticorpi policlonali, generalmente più utilizzati, riconoscono epitopi multipli; i monoclonali riconoscono un invece un epitopo singolo. Gli anticorpi policlonali avendo più "punti" di riconoscimento risultano più versatili nel riconoscere anche proteine "processate" tecnologicamente e in parte modificate, dall'altra presentano lo svantaggio di portare più facilmente a fenomeni di cross-reattività;
- standard di calibrazione: spesso non sono indicate chiaramente le caratteristiche degli standard utilizzati per la preparazione delle curve di taratura e se le loro concentrazioni sono espresse come alimento intero, come proteine totali o come singole frazioni proteiche;
- manca di materiali di riferimento certificati;
- determinazione di LOD e LOQ: sono spesso ottenuti da prove condotte non su matrice, ma semplicemente utilizzando il tampone di estrazione (situazione ottimale che porta a definire soglie di sensibilità molto basse);
- allestimento delle prove di recupero: idealmente dovrebbero essere utilizzati incurred samples (campioni addizionati d'ingrediente allergenico a monte del processo tecnologico), che mimano quanto più possibile i campioni reali. Nella pratica vengono invece solitamente utilizzati spiked samples (dove l'allergene viene aggiunto all'estratto del campione in fase pre-misura);
- espressione dei risultati: i risultati analitici vengono espressi come alimento in toto, come proteine totali o solubili o come specifica proteina allergizzante (es. betalattoglobulina). Ciò implica una difficoltà nel confrontare i risultati ottenuti, soprattutto in assenza di adeguati fattori di conversione.

Nell'Allegato C 1.1 sono riportate più in dettaglio le criticità tecniche correlate all'utilizzo di questa tecnica analitica.

C 1.2 LATERAL FLOW TEST

Il Lateral Flow Test è un approccio analitico, relativamente recente, che si basa sulla immunocromatografia e consente di ottenere in pochi secondi/minuti una risposta qualitativa (positiva/negativa) o semi-quantitativa. Ha un costo relativamente basso, non richiede strumentazione (a meno di voler ottenere un risultato quantitativo) e il personale che lo esegue non deve essere necessariamente formato. Le applicazioni del Later Flow nel campo degli allergeni alimentari sono diverse, ma certamente la più utile riguarda il controllo delle superfici di lavoro per

verificare la perfetta pulizia di ripiani o macchinari durante i cambi di produzione. È noto, infatti, come l'uso di linee di produzione promiscue possa comportare il trasferimento di tracce di ingredienti allergenici da un alimento ad un altro. Lo stesso vale per lavorazioni diverse effettuate su ripiani condivisi. La possibilità di poter verificare l'efficacia del trattamento di sanificazione (lavaggio approfondito) dal punto di vista dei residui di allergeni, aumenta di molto la sicurezza offerta al consumatore e consente di ridurre l'uso inappropriato di indicazioni, quali “può contenere tracce di...”, “prodotto in uno stabilimento in cui si lavorano anche...”. Il Lateral Flow può essere usato anche per la ricerca di ingredienti allergenici negli alimenti, ma in questo caso la risposta si limita comunemente a definire il superamento o meno di una soglia. Nella Figura 7 è illustrata la struttura di un dispositivo per Lateral Flow: sulla base di sostegno viene posta una membrana, normalmente di nitrocellulosa. Il Sample Pad rappresenta la zona in cui si deposita il campione. Il Particle Conjugate rappresenta un reagente rivelatore, ed è costituito da un anticorpo (specifico per l'allergene ricercato) coniugato a latice o a un metallo colloidale (per lo più oro). Questo complesso viene depositato su un supporto detto Conjugate Pad (Zona del coniugato). La Test Line è la zona fondamentale per la risposta; è costituita da anticorpi, specifici per la sostanza ricercata di cui riconoscono però un sito diverso rispetto a quello dell'anticorpo contenuto nel Particle Conjugate.

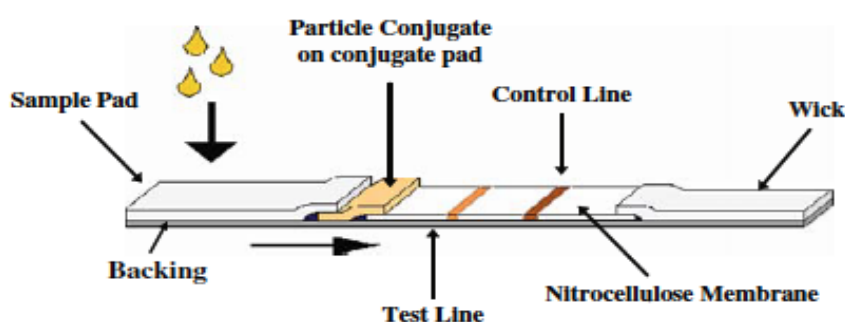
La Control Line è la linea che ci garantisce l'efficienza del dispositivo ed è costituita da una zona in cui sono presenti gli anti-anticorpi in grado di legare gli anticorpi presenti nel Conjugate Pad.

Nel caso del controllo delle superfici si effettua un lavaggio dell'area interessata con un piccolo volume di soluzione estraente e si deposita nel Sample Pad.

Nel caso di controllo di alimenti, il campione deve essere estratto con opportuno solvente e quindi deposto sul Sample Pad.

Nell'Allegato C 1.2 è riportata in dettaglio la tecnica analitica

Figura 7 - Rappresentazione del dispositivo per Lateral Flow (Wong and Tse, 2009)



C 1.3 IMMUNELETTROFORESI-IMMUNOBLOTTING

Le tecniche immunoelettroforetiche sfruttano la combinazione di una tecnica separativa (l'elettroforesi) con il riconoscimento immunochimico ottenuto aggiungendo un anticorpo specifico o il siero di un soggetto allergico.

Il risultato ottenuto nelle due applicazioni è il seguente:

- usando un anticorpo specifico è possibile evidenziare la presenza di un allergene in una matrice complessa (alimento) anche se contenuto in piccola quantità. Nel caso in cui l'allergene sia presente in tracce, può risultare necessario procedere con l'estrazione e la concentrazione della frazione proteica;
- qualora si utilizzi il siero di un soggetto allergico, è possibile identificare la molecola responsabile della sensibilizzazione/reazione allergica all'interno di un alimento come tale (ad esempio latte, uova, ecc.), o di una matrice complessa (biscotto al latte, all'uovo, ecc.).

A seconda della variante utilizzata, la separazione elettroforetica delle proteine può avvenire sulla base:

- 1) del rapporto massa/carica (non frequente in questa applicazione)
- 2) del peso molecolare quando le proteine vengono sospese in un tensioattivo. In questo caso, la tecnica è definita SDS-PAGE (Sodio DodecilSolfato- PoliAcrilamide Gel Elettroforesi);
- 3) del punto isoelettrico in un campo in cui si sia creato un gradiente di pH (isoelettrofocalizzazione)

La tecnica di separazione più utilizzata nell'immunoblotting è quella dell'SDS-PAGE, che verrà descritta in dettaglio nell'Allegato C 1.3.

L'immunoblotting è una tecnica che presenta il vantaggio dell'alta capacità risolutiva dell'elettroforesi associata alla specificità di riconoscimento dovuta all'anticorpo.

Ha inoltre il grande vantaggio di consentire l'individuazione di cross-reattività o legami aspecifici, perché la reazione è visivamente associata ad una banda che ha una certa corsa elettroforetica confrontabile con proteine standard. Se la corsa non coincide con quella della proteina standard caricata in parallelo, la risposta non è specifica.

GEL

Separazione delle proteine

TRASFERIMENTO

MEMBRANA

Incubazione con anticorpi

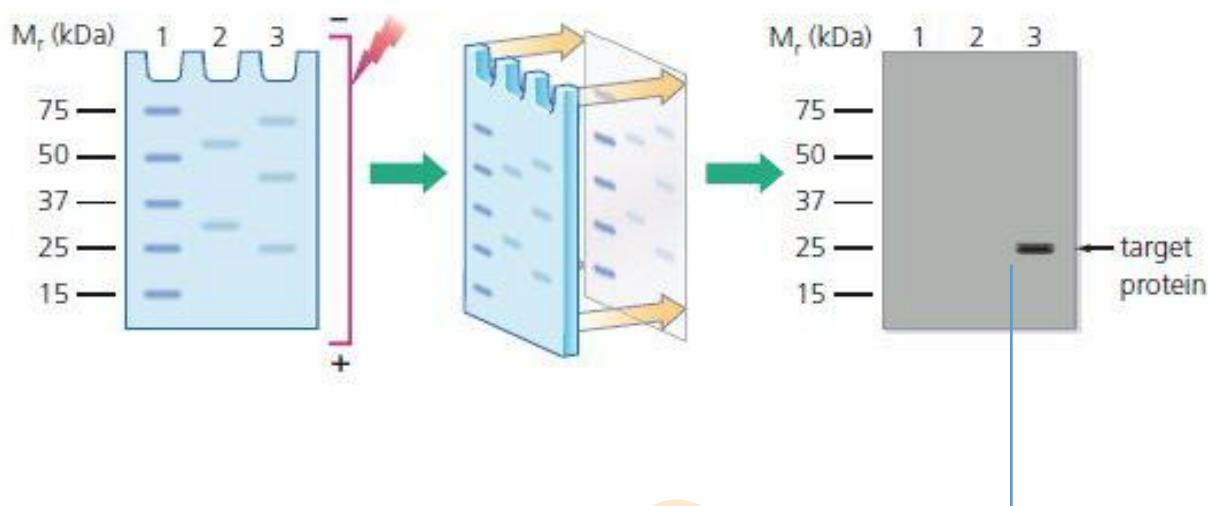
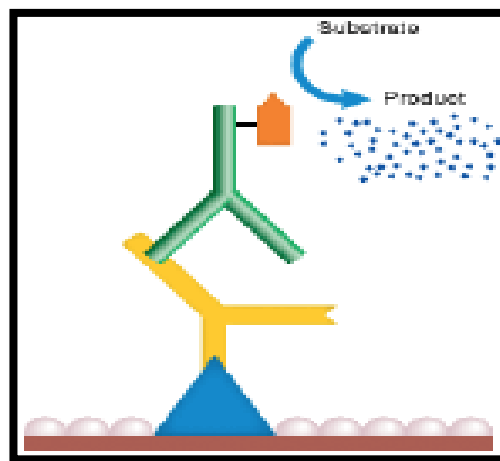


Figura 8 – Schema generale della tecnica immunoelettroforetica o immunoblotting (modificato da <https://www.bio-rad-antibodies.com/western-blotting-immunoblotting-introduction.html>)



I principali svantaggi derivano invece dalla relativa complessità della procedura che la rende poco idonea ai controlli di routine e alla quantificazione che richiede molta esperienza. L'immunoblotting rappresenta comunque uno strumento talora insostituibile, specialmente quando ci si trovi di fronte a problematiche complesse, difficilmente risolvibili con le comuni tecniche analitiche del settore (ELISA e ricerca del DNA).

C 2 - METODI DI BIOLOGIA MOLECOLARE

La biologia molecolare è quella branca della biologia che studia i meccanismi molecolari alla base della fisiologia degli esseri viventi, analizzando le interazioni tra le macromolecole (proteine e acidi nucleici, DNA e RNA). Le tecniche di biologia molecolare consentono di rilevare, analizzare, manipolare ed amplificare (PCR based) gli acidi nucleici.

C 2.1 METODI MOLECOLARI PCR-BASED

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 spettrometria di massa), ma piuttosto all'identificazione dei geni che codificano per quel particolare allergene (o di altri geni marker che permettono di dimostrare la presenza specifica delle sostanze che potenzialmente apportano il rischio). Si tratta quindi di un approccio analitico 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 si sviluppa attraverso reazioni enzimatiche controllate a differente temperatura ed è schematizzata nella Figura 9.

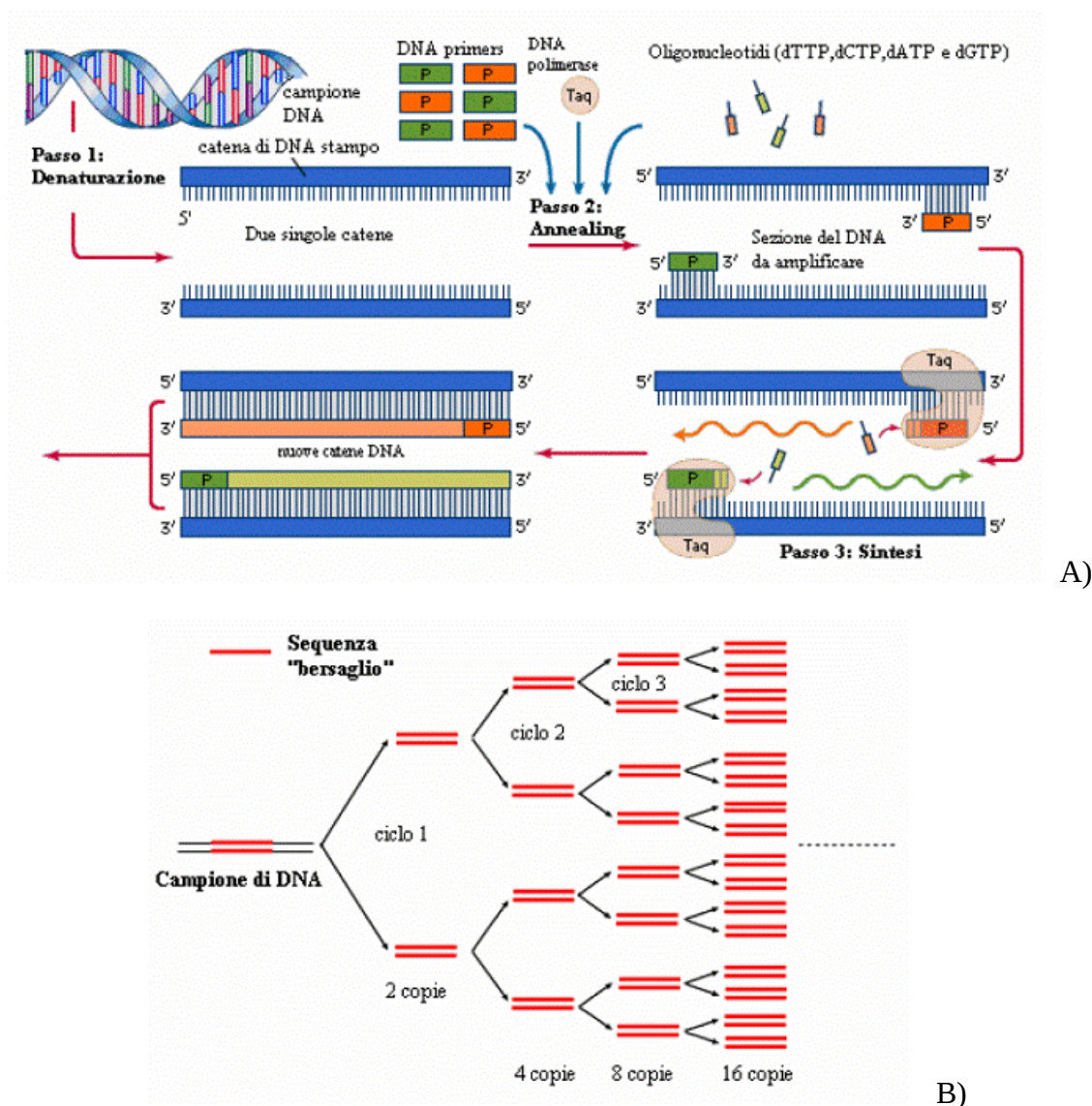


Figura 9 - A) Ciclo completo della PCR (fasi di denaturazione del DNA genomico, annealing dei primers e sintesi); B) Amplificazione del DNA

(Fonte: <http://www.disrv.unisa.it/~ads/BIOINFORMATICA/SequenziamentoDNA/ibridazione.htm>)

Essa è costituita da tre fasi:

1. apertura della doppia elica del DNA template (DNA "stampo" da amplificare),
2. riconoscimento e attacco dei primer (sequenze di innesco) sugli specifici siti complementari (fase di annealing),
3. estensione dei primer ad opera di un enzima 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) (Saunders & Parkes, 1999).

La tecnica di amplificazione del DNA applicata all'identificazione allergeni negli alimenti può essere usata nelle sue principali varianti:

End point PCR (o PCR qualitativa): permette di identificare la presenza di un organismo (anche in traccia ma non ne consente la quantificazione);

Real time PCR (PCR quantitativa o qPCR): permette la rivelazione 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, essendo 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 ad ogni ciclo di amplificazione, permettendo, inoltre, di raggiungere una sensibilità significativamente più elevata 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 marcata in grado di riconoscere e legarsi alla sequenza genomica compresa fra i siti di annealing della coppia di primer utilizzati (detti forward e reverse), 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 ad esempio la tecnica basata sull'uso di molecole intercalanti, 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 (bersagli) 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 l'identificazione di allergeni 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, è preferibile 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 (Altshuler, 2006 ; Saunders & Parkes, 1999).

Il miglioramento della sensibilità della End point PCR qualitativa può anche essere ottenuto attraverso l'uso della tecnologia correlata alla microelettroforesi in fase liquida su “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 rivelazione 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 *conditio 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., 2011).

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. I più frequentemente studiati negli ultimi anni sono stati il frumento, l'arachide e la nocciola, seguiti 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:

- scarsa riproducibilità inter-kit ottenibile da kit pre-allestiti diversi

- elevata complessità 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

- individuazione della potenziale presenza dell'allergene nell'alimento, senza peraltro provarne la presenza né l'attività

Più recentemente, è stata sviluppata la tecnica della PCR digitale (Collier et al., 2017; Hindson et al., 2013; Huggett et al., 2015;).

Il concetto base del protocollo "PCR digitale" è quello di distribuire il DNA genomico presente nel campione in numerose frazioni (diluendo quindi fino ad 1-2 molecole di DNA, potenzialmente) in celle o micro-gocce di dimensioni micrometriche (Figura 10). Considerando l'attuale offerta del mercato esistono almeno due diverse tecnologie per effettuare questo tipo di amplificazione: quella che si basa sulla preparazione del campione mediante formazione di micro-emulsione (micro-gocce; metodo definito Droplet Digital PCR) e quello basato ii) sull'utilizzo di "microchip" formati da micro-comparti in cui viene suddiviso il campione e quindi amplificato.

In ogni "comparto" (micro-goccia o cella) viene quindi fatta avvenire la convenzionale reazione di PCR utilizzando sonde fluorescenti (come nel caso della real-time PCR) e al termine della reazione procede con la quantificazione del segnale fluorescente ottenuto. Si tratta sempre di un approccio "end point" (al contrario della PCR quantitativa Real time) che peraltro permette anche di diluire nel campione le molecole interferenti (es. gli inibitori della DNA polimerasi) aumentando la possibilità di amplificazione anche da campioni alimentari "difficili" (si consideri ad esempio un campione ricco di grassi e polifenoli, come il cioccolato, nella ricerca di proteine di latte o di frutta a guscio).

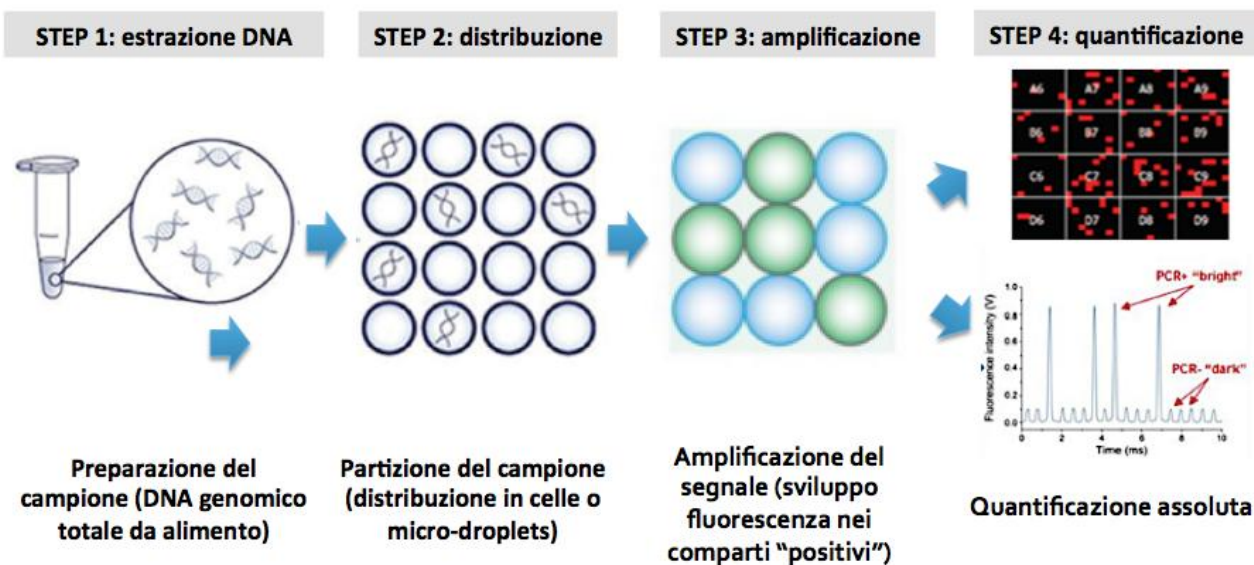
Il risultato "positivo" è chiaramente quello dove nella frazione si è sviluppato segnale fluorescente (al contrario del negativo dove non si sviluppa segnale fluorescente monitorabile). Essendo numerose le celle/gocce di reazione, al contrario della PCR convenzionale, si procede quindi con un calcolo di distribuzione mediante approccio statistico attraverso software (distribuzione di Poisson, definibile come l'espressione delle probabilità per il numero di eventi che si verificano successivamente ed indipendentemente in un dato intervallo di tempo, sapendo che mediamente se ne verifica un numero λ), risalendo quindi al numero di molecole di DNA target iniziale. Attraverso questa tecnica è quindi possibile ottenere la quantificazione del materiale genetico.

Pur versatile e promettente al momento della scrittura il numero delle applicazioni "digital PCR" nel campo della rilevazione degli allergeni è ancora ridotto, ma si prevede un aumento nelle sue

applicazioni proprio in ragione della robustezza della metodica e della sua versatilità in campo alimentare.

Figura 10 - Fasi dell'analisi in PCR Digitale

(Modificato da: <https://www.thermofisher.com/it/en/home/life-science/pcr/digital-pcr.html>;
<https://research.pasteur.fr/en/tool/digital-pcr-2/> and [https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/digital-pcr-\(dpcr\)-what-is-it-and-why-use-it-](https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/digital-pcr-(dpcr)-what-is-it-and-why-use-it-))



Nell'Allegato C 2 vengono elencate le principali caratteristiche e criticità delle tecniche basate sulla PCR.

C 2.2 ALTRI APPROCCI MOLECOLARI

Oltre alle tecniche correlate alla rilevazione immunochimica ELISA (in tutte le sue varianti) e all'amplificazione del DNA negli ultimi anni molti si sono sviluppati altri approcci molecolari basati sul concetto di "biosensing". Tali sensori (micro- o nano-strutturati, come le celle a quarzo o i micro-cantilever) hanno permesso talvolta di raggiungere ottimi livelli di sensibilità, seppure queste tecniche siano considerate - ad oggi - ancora premature ed in fase di validazione.

L'utilizzo di aptameri (brevi sequenze di DNA o RNA capaci di riconoscere uno specifico target), come anche l'uso di classici anticorpi disegnati contro proteine allergeniche è stato sfruttato nell'immobilizzazione di sonde molecolari su diverse matrici e tipologie di sensori, sfruttando inoltre diversi sistemi di trasduzione e amplificazione del segnale (elettrochimica, termica, massa, termica). La rilevazione dell'avvenuto legame del ligando (immobilizzato) con l'analita (sia nel caso dell'uso di una sonda a DNA che di altro tipo) può essere effettuata anche mediante tecniche che sfruttano la risonanza plasmonica di superficie (SPR), sistemi a laser o led, come nel caso dei "micro-cantilever" o degli strumenti automatizzati che, mediante specifiche strategie brevettate, possono permettere l'applicazione della SPR ed il riconoscimento/quantificazione del target (Alves et al., 2016; Costa et al., 2016; Eissa & Zourob, 2017; Mairal et al., 2014; Mullet et al., 2000; Pilolli et al., 2013; Zhang et al., 2017;).

C 3 - METODI CROMATOGRAFICI E SPETTROMETRIA DI MASSA

Gli allergeni alimentari sono proteine capaci di indurre, in particolare in seguito ad 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 a volte modificare la struttura proteica, incrementando ulteriormente la diversità molecolare ed influenzando sul loro potenziale allergenico (van Hengel, 2007). Per alcuni allergeni (es. arachide) le pratiche di trasformazione industriale (torrefazione o frittura) possono addirittura comportare l'aumento del potenziale allergenico, apportando modifiche che comportano una maggior esposizione dei determinanti antigenici (epitopi).

Negli ultimi anni, oltre alle tecniche d'identificazione di allergeni negli alimenti considerate "classiche", basate sull'immunochimica (test ELISA in primis), la spettrometria di massa (SM) ha dimostrato di essere un valido ausilio sia per la caratterizzazione degli allergeni, sia per la loro identificazione negli alimenti, svolgendo un ruolo sempre più centrale, grazie a specificità e sensibilità. La SM, come noto, permette di identificare le molecole target in base ad una proprietà molecolare intrinseca, la massa, espresso come rapporto massa/carica rivelato, mantenendo allo stesso tempo una buona sensibilità nella rivelazione, requisito indispensabile 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 ed è stata declinata in numerosi approcci metodologici, si rimanda a testi specifici e qualificati.

La SM può essere utilizzata come tecnica singola, ma viene oggi comunemente accoppiata alla cromatografia liquida (HPLC, High Performance Liquid Chromatography), in modo da abbinare il suo elevato potere identificativo con l'alto potere separativo delle tecniche cromatografiche. La maggior parte delle tecniche cromatografiche in HPLC sono sviluppate sfruttando colonne impaccate con particelle delle dimensioni da 2,5 a 5 μ m. L'utilizzo di fasi preparate con microparticelle di dimensione inferiore a 2 μ m, pur richiedendo l'utilizzo di pressioni superiori (partendo da 6,000 PSI, pound-force per square inch, tipicamente limite superiore per le tecniche HPLC), permette di ottenere velocità di separazione e risoluzioni maggiori: in questo caso si parla di UPLC (UltraPerformance Liquid Chromatography) e UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography, sinonimo del precedente acronimo, nonostante in questo caso si possano usare regimi di pressioni addirittura superiori nell'ordine di 20.000 PSI). La velocità, la risoluzione e la sensibilità delle tecniche UPLC/UHPLC sono idealmente ottimali per l'interfaccia con i moderni sistemi di SM.

Considerato lo sviluppo delle tecniche di rilevazione basate sulla SM, oggi sono disponibili spettrometri ad alta risoluzione (High Resolution Mass Spectrometry) che potenziano significativamente le capacità intrinseche di questo approccio analitico, aprendo nuove prospettive in particolare nel settore delle analisi di "secondo livello" (conferma post-ELISA).

Le diverse combinazioni strumentali, basate su diversi sistemi di separazione cromatografica, metodi di ionizzazione e spettrometri di massa (LC/ESI-MS, LC/ESI-MS/MS, MALDI/TOF,

LC/ESI-MS/MS, capLC/ESI-Q/TOF, capLC/ESI-Q/TOF, LC/ESI-IT/MS/MS, LC/ESI-MS/MS) mostrano potenzialità diversificate, sensibilità fino all'ordine del $\mu\text{g/kg}$ e un significativo potere identificativo. Anche per l'approfondimento di questo tema si rimanda a testi specialistici sulle cromatografie accoppiate alla SM.

A livello applicativo, le tecniche di analisi basate sulla SM delle proteine allergeniche negli alimenti riportate in letteratura seguono essenzialmente due approcci (Poms et al., 2004):

- approccio “diretto”
- approccio “indiretto”

C 3.1 RIVELAZIONE DIRETTA DI PROTEINE ALLERGENICHE INTATTE

Questo approccio si basa sulla separazione cromatografica seguita dalla rivelazione e dalla quantificazione delle proteine “intatte”. I metodi pubblicati in letteratura sulla rivelazione “diretta” di proteine allergeniche intatte sono scarsi, in parte per la complessità dell'approccio, in parte per la tendenza a perseguire le analisi su un prodotto della digestione triptica e sulla seguente identificazione dei peptidi “markers”.

C 3.2 RIVELAZIONE DI PEPTIDI SPECIFICI COME MARKER DI PROTEINE ALLERGENICHE

Questo approccio, si basa sulla digestione delle proteine con enzimi idrolitici specifici (proteasi), seguita dalla separazione cromatografica, dalla rivelazione/identificazione e quantificazione di peptidi marker caratteristici della proteina cercata. Si caratterizzano quindi peptidi marker specifici che possano indirettamente portare all'identificazione certa (ed alla quantificazione, anche se con alcune problematiche) dell'allergene nella matrice in studio). Il metodo indiretto è molto più utilizzato del primo, principalmente perché i peptidi (molecole a basso peso molecolare) sono più facilmente separabili delle proteine (molecole ad alto peso molecolare). Sempre a causa delle diverse dimensioni, i peptidi possono essere rivelati dalla SM con maggiore sensibilità, anche se un fattore potenziale di errore viene introdotto dalla fase di digestione enzimatica che precede l'analisi, che ovviamente deve essere quantitativa sulla proteina target, al fine di fornire risultati affidabili.

Ulteriori informazioni sulla spettrometria di massa applicata allo studio degli allergeni sono riportate in Allegato C.3.

C 4 - CRITERI DI VALIDAZIONE ED ACCETTABILITÀ DELLE METODICHE ANALITICHE

Nel corso di questi ultimi anni, diverse metodiche analitiche per la ricerca degli allergeni sono state oggetto di studi di validazione intra e interlaboratorio.

Da quanto emerge da questi studi 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.

Allo scopo di 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, diversi organismi del settore hanno pubblicato specifiche linee guida.

Il Codex Alimentarius nel 2010 ha stabilito linee guida (CAC/GL 74-2010) relative ai criteri di prestazione e validazione dei metodi per la rivelazione, identificazione e quantificazione di specifiche sequenze di DNA e specifiche proteine negli alimenti. Nelle linee guida sono inseriti allegati che contengono indicazioni sulla validazione per i metodi PCR ed immunochimici, sia qualitativi che quantitativi.

Mentre le linee guida del Codex non sono state sviluppate specificamente per la ricerca degli allergeni, a livello comunitario, nel 2009, sono state elaborate due norme, che prendono in considerazione gli aspetti generali dei metodi di tipo immunologico (ELISA) e di biologia molecolare (PCR), utilizzate per la determinazione degli allergeni negli alimenti.

Nella norma UNI EN 15633-1 (2009) “Ricerca di allergeni alimentari mediante metodi immunologici” sono contenute diverse indicazioni relative alla specificità degli anticorpi e natura della proteina target, alla cross-reattività verso target analoghi o differenti, all'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 (Limit of Detection), RSD (Relative Standard Deviation) di campioni replicati (che 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.

La norma UNI EN 15634-1 (2009) “Ricerca di allergeni alimentari mediante metodi di biologia molecolare”, 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, Limit of Quantification).

Successivamente è stata pubblicata la norma UNI EN 15842 (2010) in cui vengono riportate definizioni e linee guida relative alle metodiche cromatografiche (LC – MS), immunochimiche e quelle basate sul DNA.

Il documento riporta in modo più specifico indicazioni per l'utilizzo, produzione e conservazione dei materiali di riferimento e per la selezione dei metodi. Vengono inoltre fornite indicazioni dettagliate sui principi generali da seguire nell'organizzazione dei laboratori, nella validazione dei metodi e nella stesura delle procedure e dei rapporti di prova.

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.

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 et al., 2010). Tale linea guida è stata successivamente inserita nei Metodi Ufficiali AOAC (Appendice M) (AOAC International, 2016). Il documento contiene indicazioni sia di carattere generale applicabili a tutti gli allergeni che indicazioni specifiche riguardanti l'uovo e il latte. Le indicazioni di carattere generale comprendono una serie d'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 disotto 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).

Nel 2016 la AOAC ha pubblicato uno standard (SMPR 2016.002) che descrive i requisiti minimi raccomandati per i metodi basati sulla spettrometria di massa, utilizzati nella determinazione degli allergeni nei prodotti finiti e negli ingredienti (Paez et al., 2016). Nella Tabella 6 vengono riportati i requisiti di prestazione del metodo per uovo, latte, arachidi e nocciola. Lo standard fornisce inoltre esempi di materiali di riferimento appropriati.

Tabella 6 - Requisiti di prestazione del metodo di spettrometria di massa SMPR®2016.002 (Paez et al., 2016)

	Allergene			
Parametri	uovo intero	latte	arachidi	nocciola
Range analitico, ppm ^c	10-1000	10-1000	10-1000	10-1000
MQL ^a , ppm ^c	≤5	≤10	≤10	≤10
MDL ^b , ppm ^c	≤1.65	≤3	≤3	≤3
Recupero, %	60-120	60-120	60-120	60-120
RSD _r , %	≤20	≤20	≤20	≤20
RSD _R , %	≤30	≤30	≤30	≤30

^a Method Quantitation Limit: minima concentrazione o massa di analita in una data matrice che può essere riportato come risultato quantitativo

^b Method Detection Limit: concentrazione minima dell'analita che può distinta dallo 0 con un livello di fiducia del 99%

^c riportato come ppm dell'allergene target nella derrata alimentare

Nel 2016 e 2018 sono stati pubblicati due altri standard che descrivono i requisiti minimi di prestazione per metodi ELISA per la determinazione di uovo e latte (SMPR® 2017.020 e SMPR® 2018.003) (Tabelle 7 e 8).

Tabella 7 - Requisiti di prestazione del metodo ELISA SMPR®2017.020 (AOAC International, 2017)

Parametri	Criteri minimi di accettabilità per l'uovo	
Range analitico, ppm ^a	Limite inferiore	≤ 5
	Limite superiore	≥ 10
LOQ, ppm ^b	≤5	
LOD, ppm ^b	≤5	
Recupero, % ^c	50-150	
RSD _r , %	≤20	
RSD _R , %	≤30	

^a ppm uovo essiccato

^b Vedi Annex A: Scelta del LOD/LOQ per la quantificazione dell'uovo di gallina mediante metodi ELISA

^c determinato usando campioni "incurred"

Tabella 8 - Requisiti di prestazione del metodo ELISA SMPR®2018.003 (AOAC International, 2018)

Parametri	Criteri minimi di accettabilità per il latte	
Range analitico, ppm ^a	Limite inferiore	≤ 10
	Limite superiore	≥ 20
LOQ, ppm ^b	≤10	
LOD, ppm ^b	≤10	
Recupero, % ^c	50-150	
RSD _r , %	≤20	
RSD _R , %	≤30	

^a ppm latte scremato essiccato

^b Vedi Annex I: Scelta del LOD/LOQ per la quantificazione del latte mediante metodi ELISA

^c determinato usando campioni "incurred"

Infine 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 per le metodiche ELISA e PCR sia qualitative che quantitative (Sakai et al., 2013). In breve i protocolli devono rispondere ai seguenti requisiti:

Metodi quantitativi

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

Metodi qualitativi

- numero di laboratori ≥ 6
- numero di "incurred samples" ≥ 5
- numero di livelli di fortificazione ≥ 2 , inclusi controllo negativo (bianco) e controllo positivo (10 µg/g)
- precisione $\geq 90\%$

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

Nonostante la mancanza fino ad oggi di specifiche normative universalmente accettate, i documenti sopra citati forniscono alcuni requisiti minimi accettabili per valutare la qualità delle analisi mirate alla individuazione d'ingredienti allergenici negli alimenti, permettendo, di fatto, di programmare nel prossimo futuro una armonizzazione degli approcci analitici, a livello nazionale ed internazionale.

Nella Tabella 9 vengono schematizzati i principali vantaggi e svantaggi delle tecniche analitiche descritte.

Tabella 9 - Principali vantaggi e svantaggi delle tecniche analitiche utilizzate nella ricerca di allergeni

C1.1 METODI ELISA:

VANTAGGI

- semplicità d'uso
- tempi brevi di analisi
- sensibilità elevata
- buona riproducibilità tra lo stesso Kit svantaggi
- scarsa riproducibilità con Kit diversi
- mancanza di materiali di riferimento certificati
- personale esperto e dotazione di laboratorio adeguata

C1.2. LATERAL FLOW TEST

VANTAGGI

- risposta qualitativa pochi secondi/minuti
- costo relativamente basso
- non richiede strumentazione
- non richiede personale formato

C1.3. IMMUNOBLOTTING

VANTAGGI

- elevata capacità risolutiva
- elevata specificità
- individuazione di cross-reattività o legami aspecifici

SVANTAGGI

- tecnica analitica complessa
- personale molto esperto.

C2 METODI DI BIOLOGIA MOLECOLARE

VANTAGGI

- specificità di reazione
- tempi di esecuzione brevi

SVANTAGGI

- scarsa riproducibilità inter-kit ottenibile da kit pre-allestiti diversi
- elevata complessità della fase di estrazione,
- individuazione del DNA (potenziale presenza dell'allergene nell'alimento)

C3 METODI CROMATOGRAFICI E SPETTROMETRIA DI MASSA

VANTAGGI

- Elevata capacità risolutiva
- Elevata sensibilità

SVANTAGGI

- Tecnica analitica complessa
- Personale esperto
- Costi elevati
- Poco idonea per controlli routinari

ALLEGATI

ALLEGATO A 4.1 - ALLERGENI DI ORIGINE VEGETALE

Caratteristiche molecolari dei principali allergeni del frumento (*Triticum aestivum*) e riferimenti per ricerche approfondite in banche dati

Allergene	Nome della proteina	Peso molecolare (Da)	Banca dati	Codice per la ricerca
Tri a 12	Profilina	14.224 ^U	Allergome GenBank UniProt	767 X89825 P49232
Tri a 14	Non-specific lipid transfer protein (LTP)	9.542 ^U (frammento)	Allergome GenBank UniProt	1059 FN391139 D2T2K2
Tri a 18	Agglutinin isolectin 1	21.239 ^U	Allergome GenBank UniProt	650 M25536 P10968
Tri a 19	Gliadina omega-5	53.025 ^U	Allergome GenBank UniProt	3677 AB181300 Q40215
Tri a 25	Tioredoxina	13.355 ^U	Allergome GenBank UniProt	2683 AJ404845 Q9LDX4
Tri a 26	Glutenina ad alto peso molecolare	90.293 ^U	Allergome GenBank UniProt	2898 X12928 P10388

U= UNIPROT

Allergie alimentari e sicurezza del consumatore - Documento di indirizzo e stato dell'arte
Italia 2018

Caratteristiche molecolari dei principali allergeni dell'arachide (*Arachis hypogaea*) e riferimenti per ricerche approfondite in banche dati

Allergene	Nome della proteina	Peso molecolare (Da)	Banca dati	Codice per la ricerca
Ara h 1	Cupina (vicilin-like, 7S globulina)	71.345 ^U	Allergome GenBank UniProt	50 L34402 P43238
Ara h 2	Conclutina-7 (2S Albumina)	20.114 ^U	Allergome GenBank UniProt	51 AY007229 Q6PSU2
Ara h 3	Glicinina (legumin-like, 11S globulina)	58.350 ^U (frammento)	Allergome GenBank UniProt	52 AF093541 O82580
Ara h 5	Profilina	14.051 ^U	Allergome GenBank UniProt	54 AF059616 Q9SQ19
Ara h 6	Conglutina (2S albumina)	16.920 ^U	Allergome GenBank UniProt	55 AF092846 Q647G9
Ara h 7	Conglutina (2S albumina)	18.418 ^U	Allergome GenBank UniProt	56 AF091737 Q9SQH1
Ara h 8	Patogenesis-related protein, PR-10, Bet v 1 family member	16.952 ^U	Allergome GenBank UniProt	1215 AY328088 Q6VT83
Ara h 9	Non-specific lipid-transfer protein - tipo 1 (LTP)	11.651 ^U	Allergome GenBank UniProt	742 EU159429 B6CEX8
Ara h 10	Oleosina-1	17.753 ^U	Allergome GenBank UniProt	5758 AY722694 Q647G5
Ara h 11	Oleosina-1	14.308 ^U	Allergome GenBank UniProt	5760 DQ097716 Q45W87
Ara h 12	Defensina	5.184 (MS) [^]	Allergome GenBank UniProt	10187 EY396089 -
Ara h 13	Defensina	5.472 (MS) [^]	Allergome GenBank	10189 EY396019

Allergie alimentari e sicurezza del consumatore - Documento di indirizzo e stato dell'arte
Italia 2018

Allergene	Nome della proteina	Peso molecolare (Da)	Banca dati	Codice per la ricerca
			UniProt	-
Ara h 14	Oleosina Variante A	18.435 ^U	Allergome GenBank UniProt	11753 AAK13449 (PT) Q9AXI1
Ara h 15	Oleosina	16.875	Allergome GenBank UniProt	913 AAU21501 (PT) Q647G3
Ara h 16	Non-specific Lipid Transfer Protein 2 (LTP)	8.500 [^]	Allergome GenBank UniProt	11780 - -
Ara h 17	Non-specific Lipid Transfer Protein 1 (LTP)	11.000 [^]	Allergome GenBank UniProt	11782 - -

U= UNIPROT

[^] WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee

MS= Mass Spectrometry

PT= GenBank Protein

Caratteristiche molecolari dei principali allergeni della soia (*Glycine max*) e riferimenti per ricerche approfondite in banche dati

Allergene	Nome della proteina	Peso molecolare (Da)	Banca dati	Codice per la ricerca
Gly m 4	Pathogenesis-related Protein, PR-10, Bet v 1 family member	16.772 ^U	Allergome GenBank UniProt	749 X60043 P26987
Gly m 5	Beta-conglycinina (vicilina, 7S-Globulina)	63.165 ^U (frammento)	Allergome GenBank UniProt	5816 AB008678 O22120
Gly m 6	Glicinina (legumina, 11S globulina)	55.706 ^U	Allergome GenBank UniProt	5821 M36686 P04776
Gly m 8	2S albumina	18.460 ^U	Allergome GenBank UniProt	1189 AF005030 P19594

U= UNIPROT

Allergie alimentari e sicurezza del consumatore - Documento di indirizzo e stato dell'arte
Italia 2018

Caratteristiche molecolari dei principali allergeni da frutti a guscio e riferimenti per ricerche approfondite in banche dati

Allergene	Frutto	Nome della proteina	Peso molecolare (Da)	Banca dati	Codice per la ricerca
Cor a 1	Nocciola (<i>Corylus avellana</i>)	Pathogenesis-related protein, PR-10, Bet v1-family member (vari isoallergeni)	17.512 ^U	Allergome GenBank UniProt	232 X70999 Q08407
Cor a 9	Nocciola (<i>Corylus avellana</i>)	11S Globulina (proteina legumin-like)	59.127 ^U	Allergome GenBank UniProt	246 AF449424 Q8W1C2
Cor a 14	Nocciola (<i>Corylus avellana</i>)	2S Albumina	17.078 ^U	Allergome GenBank UniProt	5886 FJ358504 D0PWG2
Jug r 1	Noce (<i>Juglans regia</i>)	2S Albumina	16.373 ^U (frammento)	Allergome GenBank UniProt	424 U66866 P93198
Ana o 1	Anacardio (<i>Anacardium occidentale</i>)	Vicilin-like protein	61.841 ^U	Allergome GenBank UniProt	34 AF395894 Q8L5L5
Ana o 2	Anacardio (<i>Anacardium occidentale</i>)	Legumin-like protein	51.996 ^U (frammento)	Allergome GenBank UniProt	976 AF453947 Q8GZP6
Ana o 3	Anacardio (<i>Anacardium occidentale</i>)	2S Albumina	16.335 ^U	Allergome GenBank UniProt	1077 AY081853 Q8H2B8
Pis v 1	Pistacchio (<i>Pistacia vera</i>)	2S Albumina	17.290 ^U	Allergome GenBank UniProt	3581 DQ631675 B7P072
Pis v 4	Pistacchio (<i>Pistacia vera</i>)	Manganese superossido dismutasi	25.756 ^U	Allergome GenBank UniProt	3913 EF470980 B2BDZ8
Pru du 3	Mandorla (<i>Prunus dulcis</i>)	Non-specific lipid transfer protein (nsLTP1)	12,488 ^U	Allergome GenBank UniProt	754 FJ652103 COLOI5
Pru du 4	Mandorla (<i>Prunus dulcis</i>)	Profilina	14.061 ^U	Allergome GenBank UniProt	1047 AY081850 Q8GSL5
Pru du 6	Mandorla (<i>Prunus dulcis</i>)	Amandina, 11S globulin-like protein	63.052 ^U	Allergome GenBank UniProt	1078 GU059260 E3SH28

U= UNIPROT

Allergie alimentari e sicurezza del consumatore - Documento di indirizzo e stato dell'arte
Italia 2018

Caratteristiche molecolari dei principali allergeni del sedano e sesamo e riferimenti per ricerche approfondite in banche dati

Allergene	Frutto	Nome della proteina	Peso molecolare (Da)	Banca dati	Codice per la ricerca
Api g 1	Sedano (<i>Apium graveolens</i>)	Pathogenesis-related protein, PR-10, Bet v 1-family member	16.321 ^U	Allergome GenBank UniProt	40 Z48967 P49372
Ses i 1	Sesamo (<i>Sesamum indicum</i>)	2S Albumina	17.504	Allergome GenBank UniProt	624 AF240005 Q9AUD1
Ses i 2	Sesamo (<i>Sesamum indicum</i>)	2S Proteina di deposito dei semi 1	17.524	Allergome GenBank UniProt	625 AF091841 Q9XHP1

U= UNIPROT

ALLEGATO A 4.2 - ALLERGENI DI ORIGINE ANIMALE

Caratteristiche molecolari degli allergeni del latte vaccino e riferimenti per ricerche approfondite in banche dati

Allergene	Nome della proteina	Peso molecolare (Da)	Banca dati	Codice per la ricerca
Bos d 4	Alfa-lattoalbumina	14.200 16.247 (Precursore)	Allergome GenBank UniProt	163 M18780 P00711
Bos d 5	Beta-lattoglobulina	18.300 19.883 (Precursore)	Allergome GenBank UniProt	164 X14712 P02754
Bos d 6	Albumina di siero (BSA)	67.000 69.293 (Precursore)	Allergome GenBank UniProt	165 M73993 P02769
Bos d 7	Immunoglobuline	160.000	Allergome GenBank UniProt	166 - -
Bos d 8	Frazione caseinica	Vedi Bos d 9-12		Vedi Bos d 9-12
Bos d 9	Alfa s ₁ -caseina	24.529	Allergome GenBank UniProt	2734 X00564 P02662
Bos d 10	Alfa s ₂ -caseina	26.019	Allergome GenBank UniProt	2735 M16644 P02663
Bos d 11	Beta-caseina	25.107	Allergome GenBank UniProt	2736 M16645 P02666
Bos d 12	Kappa-caseina	21.269	Allergome GenBank UniProt	2737 X14907 P02668

Allergie alimentari e sicurezza del consumatore - Documento di indirizzo e stato dell'arte
Italia 2018

Caratteristiche molecolari degli allergeni dell'uovo e riferimenti per ricerche
approfondite in banche dati

Allergene	Nome della proteina	Peso molecolare (Da)	Banca dati	Codice per la ricerca
Gal d 1	Ovomucoide	22.591 (Precursore)	Allergome GenBank UniProt	359 J00902 P01005
Gal d 2	Ovalbumina	42.750 42.881 (Precursore)	Allergome GenBank UniProt	360 V00383 P01012
Gal d 3	Ovotransferrina (Conalbumina)	- 77.777 (Precursore)	Allergome GenBank UniProt	361 X02009 P02789
Gal d 4	Lisozima	- 16.239 (Precursore)	Allergome GenBank UniProt	362 V00428 P00698
Gal d 5	Albumina del siero (alfa-livetina)	69.918 (Precursore)	Allergome GenBank UniProt	363 X60688 P19121
Gal d 6	Vitellogenina	210.630 (Precursore)	Allergome GenBank UniProt	8172 - P87498

Allergie alimentari e sicurezza del consumatore - Documento di indirizzo e stato dell'arte
Italia 2018

Caratteristiche molecolari dei principali allergeni di pesci, crostacei e molluschi e riferimenti per ricerche approfondite in banche dati

Allergene	Nome della proteina	Peso molecolare (Da)	Banca dati	Codice ricerca per la
Gad c 1	Parvalbumina (Merluzzo)	12.108	Allergome GenBank UniProt	357 - P02622
Sal s 1	Beta-parvalbumina (Salmone)	11.889	Allergome GenBank UniProt	619 X97824 Q91482
Met e 1	Tropomiosina (Gambero)	31.705	Allergome GenBank UniProt	477 U08008 Q25456
Tod p 1 [^]	Tropomiosina (Calamaro)	-	Allergome GenBank UniProt	649 - -

[^] not present in the list of WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee

ALLEGATO A 4.3 - ALLERGENI EMERGENTI

Caratteristiche molecolari dei principali allergeni della carne e riferimenti per ricerche approfondite in banche dati

Allergene	Nome della proteina	Peso molecolare (Da)	Banca dati	Codice per la ricerca
Bos d 6	Albumina del siero (carne bovina)	67.000 69.293 (Precursore)	Allergome GenBank UniProt	165 M73993 P02769
Bos d 7	Immunoglobuline (carne bovina)	160.000	Allergome GenBank UniProt	166 - -
Gal d 5	Albumina del siero (carne di pollo)	69.918 (Precursore)	Allergome GenBank UniProt	363 X60688 P19121
Ovi a 6 [^]	Albumina del siero (carne ovina)		Allergome GenBank UniProt	758 - -
Sus s 1	Albumina del siero (carne suina)	69.692	Allergome GenBank UniProt	757 M36787 Po8835

[^] not present in the list of WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee

ALLEGATO A 5.6 - TEST DI PROVOCAZIONE ORALE

Definizioni, esecuzione ed interpretazioni

Test di provocazione orale (TPO)

I TPO sono prove diagnostiche, in vivo, che vengono eseguite per confermare, in via definitiva, una preliminare e sospetta diagnosi di allergia alimentare.

I TPO possono essere condotti con tre diverse modalità:

- in aperto dove tutti sono a conoscenza che quell'alimento viene proposto al bambino in quella giornata;
- in cieco semplice dove il Pediatra è al corrente ed il bambino e i genitori no.
- in doppio cieco contro placebo (DBPCFC) dove né il Pediatra né il bambino con i genitori conoscono la giornata in cui l'alimento il placebo sarà somministrato.

Reazione allergica immediata e ritardata dopo TPO

Sono definite reazioni allergiche immediate quelle che insorgono entro 2 ore dopo la somministrazione della dose massima di alimento e reazioni tardive quelle che compaiono dopo più di 2 ore. Altri Autori ritengono positive le reazioni tardive al test, se si verificano entro 7, 9 o 14 giorni. Entro tali periodi però la diagnosi di reazione ritardata può essere ardua perché, quando il bambino è tornato a casa, fattori ambientali multipli (emotivi, climatici, occasionali, legati all'attività fisica o sportiva) possono rendere molto variegata l'interpretazione diagnostica.

Segni clinici immediati e ritardati possono anche essere associati nello stesso bambino.

Definizione di TPO positivi e negativi

Positivo è il TPO nel corso del quale si è verificata una reazione allergica immediata o ritardata che non permette la re-introduzione domiciliare dell'alimento.

Negativo è il TPO nel corso del quale non si è verificata alcuna reazione immediata o ritardata o si è verificata una reazione così lieve da non controindicare la reintroduzione domiciliare dell'alimento.

Indicazioni per l'esecuzione del TPO

Il TPO è un test complesso, lungo da eseguire, che impegna per diverse ore sia il Pediatra che la famiglia, e soprattutto non scevro da rischi per il bambino. Per tali motivi, data anche la frequenza con cui si sospettano le allergie alimentari, è necessario pesare attentamente le indicazioni ad eseguirlo. Inoltre, sebbene sia considerato da anni il gold standard nella diagnosi delle allergie alimentari, sono presenti ancora molti punti controversi su chi siano i bambini che devono essere sottoposti al TPO e su quale sia il migliore modo di eseguirlo.

Un corretto approccio diagnostico è il cardine del percorso iniziale. Tutti i pazienti dovrebbero essere esaminati valutando attentamente sia la storia clinica sia i test in vivo ed in vitro a disposizione prima di iniziare una dieta di eliminazione in attesa della riesposizione all'alimento sospetto. I criteri di inclusione dei bambini per l'esecuzione dei TPO sono elencati in Tabella A1 e A2:

Tabella A1 - Motivi di esecuzione dei TPO, nei bambini di ogni età, con anamnesi positiva per reazione avversa ad alimento.

1. Per stabilire o escludere la diagnosi di allergia/intolleranza alimentare
2. Per ragioni scientifiche nei trials clinici
3. Per determinare il valore soglia per l'alimento testato
4. Per saggiare l'avvenuta tolleranza nel tempo dopo la diagnosi di allergia alimentare

Tabella A2 - Motivi di esecuzione dei TPO, nei bambini con anamnesi negativa per reazione avversa ad alimento.

1. Se segni clinici con andamento cronico sono sospettati essere alimento-correlati
2. Se il bambino sta eseguendo un'incongrua dieta di eliminazione ma ci sono ragioni per sospettare la possibilità di una reazione avversa alla reintroduzione.
3. Se 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 per la scelta del tipo di TPO

I criteri d'inclusione dei bambini (Tabella A3 e A4) per le indicazioni ai vari tipi di TPO stabiliscono:

Tabella A3 - Indicazioni al DBPCFC

1. È il metodo di scelta per i protocolli scientifici
2. È il metodo di scelta quando si devono studiare reazioni ritardate con segni clinici ad andamento cronico
3. È il solo modo per studiare convenientemente sintomi clinici soggettivi
4. È il metodo da utilizzare sempre, in seconda battuta, tutte le volte che si assiste ad un TPO in aperto di dubbia interpretazione

Tabella A4 - Indicazioni al TPO in aperto

1. Un DBPCFC negativo dovrebbe essere seguito da un TPO in aperto
2. Un TPO in aperto potrebbe essere sufficiente se si manifestano segni immediati IgE mediati
3. Un TPO in aperto deve essere il primo approccio quando è elevata la probabilità di un TPO negativo
4. Un TPO in aperto è spesso sufficiente se si attendono reazioni di tipo immediato

TPO in aperto

Il TPO in aperto è il più semplice, richiede meno impegno per il Pediatra e per il bambino con la sua famiglia, costi più contenuti per la struttura sanitaria. Dopo aver eseguito un minuzioso esame obiettivo, cardine per una valutazione comparativa fra pre e post TPO, vengono somministrate al bambino solo le dosi di verum, ovvero le dosi di alimento sospette di essere responsabili della reazione allergica. L'osservazione clinica procede fino a 2 ore dopo l'assunzione dell'ultima dose di alimento per le eventuali reazioni immediate e, dopo la dimissione, viene stabilito un appuntamento in ambulatorio per l'osservazione delle reazioni ritardate.

Singolo cieco

Il TPO in singolo cieco è una procedura, meno usata, perché comporta in linea di massima le stesse difficoltà che eseguire un DBPCFC, ma è un po' meno attendibile in quanto introduce il possibile bias della interpretazione soggettiva dell'osservatore.

Si prevede l'esecuzione del test nel corso di 2 diverse giornate, una per il verum (alimento) e una per il placebo, ma il Pediatra è a conoscenza di quale alimento viene sottoposto al bambino in quel momento. Le indicazioni possono essere varie ma il minimo comune denominatore rimane quello di non far sapere a genitori e bambino quale prodotto viene proposto in quel momento.

Il Pediatra, per motivi diversi, può trarre vantaggio dal sapere l'alimento somministrato benché la procedura non sia necessariamente semplificata rispetto al DBPCFC.

Dopo un TPO negativo in cieco è prevista la somministrazione in aperto.

DBPCFC

Il DBPCFC consiste nella somministrazione per os, in doppio cieco e, di norma in giorni diversi, di quantità crescenti di placebo e dell'alimento in questione. Utilizzato per la prima volta nel 1973 da May che studiò le reazioni allergiche ad alimenti nei bambini con asma bronchiale, il DBPCFC rappresenta oggi il test di scelta nella diagnosi di allergia alimentare in genere.

In realtà, nell'età pediatrica, il cieco deve essere triplo perché neanche i genitori devono essere a conoscenza del tipo di alimento somministrato. Solo il personale che prepara il test, è a conoscenza del prodotto proposto in quel momento: verum o placebo. Nei DBPCFC un operatore sanitario, che non è in contatto né con il bambino né con la famiglia, è l'unico a preparare i prodotti da somministrare e, di norma, a deciderne la randomizzazione. Inoltre il mascheramento dei prodotti per non renderli riconoscibili comporta la necessità di aggiungere altri ingredienti e quindi talvolta altri allergeni. In tali circostanze sarà opportuno verificare, in via preliminare, attraverso l'anamnesi e i test (SPT e IgE sieriche specifiche) l'eventuale sensibilizzazione verso gli ingredienti utilizzati come mascheramento. Per poter rendere il più possibile simili di aspetto e di sapore il pasto contenente il verum e quello con il solo placebo è necessario che anche nel verum il placebo rappresenti approssimativamente la metà.

Condizioni cliniche del bambino per poter essere sottoposto a TPO e quando differire un TPO con alimento

È importante che il bambino stia bene, non abbia episodi febbrili intercorrenti, non abbia vomito e/o diarrea e non presenti rinite o asma bronchiale stagionale nel periodo implicato. La dermatite atopica, eventualmente presente, deve essere stabilizzata, nelle settimane che precedono il TPO, e non soggetta a fluttuazioni significative che renderebbero non interpretabile il test.

Quali farmaci e quando sospenderli

Il bambino deve essere in sospensione terapeutica di farmaci antistaminici per un periodo sufficiente ad avere un test cutaneo normale per l'istamina (controllo positivo). Altre indicazioni sono meno restrittive e prevedono la sospensione della terapia antistaminica almeno 72 ore prima del TPO.

I corticosteroidi sistemici devono essere interrotti 4 settimane prima del test di provocazione. I beta agonisti e i cromoni dovrebbero essere sospesi almeno 12 ore prima del test. È indubbio che i tempi di sospensione non possono prescindere dalla conoscenza della cinetica della singola molecola farmacologica. Bisogna sempre ricordare che la sospensione di alcuni farmaci, come ad esempio gli antistaminici, può, già di per sé, provocare un peggioramento dei sintomi con un "effetto rimbalzo". Se tale evento si verifica casualmente durante il TPO alimentare, i risultati possono essere non correttamente interpretabili. In questi casi la procedura in cieco consente di discriminare le varie possibilità. In altre circostanze sarà opportuno eseguire il TPO solo quando le condizioni cliniche si saranno stabilizzate.

Rischi del TPO con alimento

I TPO sono a rischio di gravi reazioni sistemiche e certamente tali test non hanno le caratteristiche di sicurezza di un test ideale. Quando si decide che è necessario un TPO, la prima cosa da fare è discutere con la famiglia/paziente, in dettaglio, la procedura e pesare attentamente i rischi e i benefici connessi.

Le reazioni più gravi sono indubbiamente quelle immediate perché possono essere generalizzate. I rischi sono connessi al meccanismo immunologico coinvolto; le forme IgE-mediate, che costituiscono oltre la metà delle allergie alimentari, sono quelle più a rischio di sviluppare una reazione sistemica, con l'unica eccezione dell'enterocolite allergica (FPIES) del primo anno di vita, nella quale la reazione pur interessando principalmente l'apparato gastrointestinale, comporta spesso l'insorgenza di vomito ripetuto, ipotensione ed acidosi metabolica. D'altra parte il problema del meccanismo immunologico si pone soprattutto nei primi 2-3 anni di vita, in quanto oltre questa età nella gran parte dei casi le forme non IgE mediate si sono risolte.

Altro fattore di rischio per prevedere la gravità di una reazione al TPO è la storia clinica e la gravità delle reazioni osservate in precedenza. Spergel, in uno studio retrospettivo eseguito su circa 3000 bambini con allergia alimentare sottoposti a TPO in un periodo di 5 anni, ha dimostrato che esiste una significativa correlazione tra la sintomatologia iniziale e quella sviluppata al TPO, mentre non vi era una significativa associazione con l'intensità della cutipositività. Che la gravità della reazione clinica sia poco correlata all'intensità della cutipositività o delle IgE specifiche emerge anche da altri lavori.

Allo stesso modo costituiscono probabilmente fattori di rischio: una storia di asma instabile o grave, un'anamnesi di reazioni progressivamente più severe, o all'assunzione di minime quantità o un concomitante trattamento con farmaci antagonisti dei beta adrenergici.

Ma quale frequenza hanno le reazioni allergiche gravi nei TPO? Torr et al (2002) riferiscono un'incidenza di circa 1% di reazioni allergiche gravi nei TPO eseguiti in una pratica di routine in aperto. Altri studi hanno messo in evidenza risultati diversi. Nella casistica di Reibel et al. (2000), il 67% dei test positivi ha richiesto la somministrazione di farmaci, di cui il 35% per via parenterale. In base alla stretta correlazione (90%) osservata, in questa casistica, fra i livelli di IgE specifiche e la necessità dell'intervento terapeutico gli Autori suggerirono di preparare un accesso venoso, prima del TPO, nei bambini con IgE specifiche per latte maggiori di 17.50 kU/L. Tale scelta rimane peraltro controversa per la natura invasiva della procedura. Infatti, nel DBPCFC, non sapendo

quando viene somministrato il placebo, la via venosa va mantenuta anche durante tale parte dell'esame.

Circa la necessità di applicare un ago-cannula, le più recenti indicazioni suggeriscono che un accesso venoso dovrebbe essere disponibile quando si effettua un TPO e sempre se si sospetta la possibilità di una reazione severa sistemica. Nei bambini piccoli l'accesso e.v. è necessario solo in casi selezionati, ma se vi è dubbio circa la possibile severità della reazione, è consigliabile applicare un agocannula prima del test.

Queste raccomandazioni tengono in considerazione probabilmente il fatto che le morti per anafilassi sono più frequentemente descritte dopo l'età di 5 anni. Un atteggiamento di cautela è peraltro raccomandabile anche per questioni medico-legali.

Quando fare il TPO in caso di pregressa anafilassi

Nel caso di anafilassi da alimento riferita nell'anamnesi, il TPO andrebbe eseguito solo nelle seguenti due circostanze:

- qualora non sia certa l'esatta responsabilità dell'alimento sospetto, perché assunto in concomitanza con altri;
- nella valutazione dell'acquisizione della tolleranza all'alimento responsabile dell'anafilassi nei bambini dopo congruo periodo di tempo dalla pregressa anafilassi. Nei casi in cui l'anamnesi riporti una precedente reazione allergica grave, il TPO deve essere eseguito in strutture attrezzate anche con reparti di terapia intensiva.

Dove eseguire un TPO per alimenti

Decidere dove eseguire un TPO dipende da una parte dall'esperienza e dalle capacità organizzative per la preparazione dell'alimento, talvolta anche con il placebo per il DBPCFC, e dall'abilità nella somministrazione. Ma il punto nodale rimane, d'altra parte, la sicurezza nella procedura e la capacità interpretativa del test. Occorre pertanto che sia garantita, al bambino e alla famiglia, la possibilità di trattare nel modo migliore possibile, un'eventuale reazione di anafilassi.

In questi casi l'ambiente ospedaliero è il più idoneo in quanto si ha possibilità di gestire il bambino in tutta sicurezza.

Non sempre però l'anamnesi è sufficiente perché la reazione precedente non è sempre predittiva della manifestazione clinica al TPO.

Come condurre un TPO e il challenge labiale

Non è stato raggiunto alcun consensus per quanto concerne dosi e tempi di somministrazione degli allergeni allo studio (tra cui le proteine del latte), ed inoltre mancano osservazioni che possano comparativamente confrontare, per questi parametri, la migliore efficacia di un protocollo rispetto ad un altro. Alcune proposte di protocollo hanno anche suggerito di individualizzare la dose in base all'anamnesi.

La dose iniziale potrebbe consistere in un semplice challenge labiale con dosi minime poste a contatto della mucosa labiale. Per il latte vaccino, ad esempio, si può porre sulle labbra una goccia e procedere, dopo 20-30 minuti, con il TPO completo in caso di non reattività. Attenzione se il bambino presenta xerosi labiale perché, in questo modo, si effettua un vero prick test labiale che potrebbe diventare positivo, né più né meno come quello cutaneo. In questo caso è un test di poco significato perché ripete quanto già acquisito con il prick test.

Quando considerare positivo un TPO e quando sospenderlo

È questo uno dei temi più discussi e controversi: trovare il giusto equilibrio tra la prudenza dettata dalla volontà di evitare una reazione allergica potenzialmente grave e la volontà di evitare una falsa diagnosi di allergia alimentare, con tutte le conseguenze nutrizionali e psicologiche che ne possono seguire. Abitualmente si consiglia di sospendere un TPO alla comparsa di sintomi obiettivi. Tuttavia diversi studi hanno dimostrato che un TPO in aperto, considerato positivo per la comparsa di alcuni pomfi sulla faccia o sulle mani, in assenza di sintomi gastrointestinali o respiratori, viene spesso smentito da un successivo DBPCFC. Questo perché spesso si tratta di sintomi evocati dal contatto dell'alimento sulla cute, contatto che andrà quindi accuratamente evitato. Quindi in presenza di modesti e localizzati sintomi obiettivi è consigliabile proseguire il TPO in aperto. Lo stesso andrà fatto in presenza di sintomi soggettivi, come sensazione di nausea o vomito o dolore addominale o prurito orale. Il test potrà essere considerato positivo se i sintomi si ripetono all'aumentare della dose per 2 volte di seguito, specie se di entità marcata. In generale si consiglia di sospendere un TPO alla comparsa di sintomi obiettivi, visibili, e quindi in qualche modo non simulabili, mentre in caso di comparsa di sintomi soggettivi, è necessario continuare il TPO, senza aumentare la dose di alimento. Si può inoltre considerare positivo un DBPCFC se i sintomi soggettivi si ripetono almeno 3 volte solo con il verum e non con il placebo. Allo stesso modo, riteniamo che se i sintomi soggettivi si ripetono più volte in modo convincente, nel bambino piccolo, laddove possa essere ragionevolmente esclusa una componente soggettiva, il TPO potrà essere interrotto e considerato positivo.

Andando in maggior dettaglio:

1. Tra i sintomi cutanei, la comparsa di una orticaria generalizzata oppure un rash eritematoso con intenso prurito e grattamento costituiscono certamente un segno obiettivo. Nel caso in cui compaiano solo alcuni pomfi, specie sulle mani o nella regione periorale, in assenza di altra sintomatologia, è necessario continuare il TPO dato che questi potrebbero essere solo sintomi evocati dal contatto dell'alimento sulla cute, contatto che andrà quindi accuratamente evitato. Infatti un TPO considerato positivo solo per la comparsa di alcuni pomfi sulla faccia o sulle mani, in assenza di sintomi gastrointestinali o respiratori, viene spesso smentito da un successivo DBPCFC (Bock et al, 1988, 1997);
2. Per quanto riguarda i sintomi gastrointestinali, il prurito orale, la nausea o la disfagia sono sintomi soggettivi, mentre il vomito o il dolore addominale sono sintomi obiettivi che tuttavia potrebbero anche esser causati dalla avversione che il bambino prova per l'alimento o dalla paura e dalla agitazione, o infine anche solo all'esser stato costretto ad assumere l'alimento contro voglia. In questo caso, se si ritiene probabile che sia legato alla paura o alla avversione, si può continuare il test, magari camuffando l'alimento nel bambino più piccolo, se si sta effettuando un TPO in aperto. Il ripetersi del sintomo alle successive somministrazioni conferisce maggiore probabilità che la diagnosi di allergia sia corretta (Muraro et al., 2017);
3. Tra i sintomi respiratori, la sensazione di ostruzione respiratoria è un sintomo soggettivo mentre la congestione nasale, gli starnuti ripetuti, la rinorrea acquosa o la rino-congiuntivite, le variazioni nel tono della voce, lo stridore, il laringospasmo, o il tirage inspiratorio, così come la tosse e il wheezing sono segni obiettivi, sufficienti a considerare positivo il TPO e che devono sempre allertare per la possibile insorgenza di una successiva crisi respiratoria più severa. Laddove si controllino i parametri di funzionalità respiratoria, una riduzione del FEV1 di oltre il 15% o del Peak Flow di oltre il 20% costituiscono un criterio oggettivo sufficiente a considerare positivo un TPO.
4. Per quanto riguarda i sintomi generali, il cambiamento del comportamento, la prostrazione, la cefalea o il rifiuto di assumere l'alimento costituiscono sintomi soggettivi, mentre sono

considerati sintomi obiettivi un abnorme pallore, l'aumento della frequenza cardiaca di oltre il 20% o la diminuzione della pressione arteriosa di oltre il 20% e ovviamente il collasso o l'anafilassi.

In tutti i casi, alla comparsa di sintomi soggettivi è necessario interrompere il test, visitare il bambino, ispezionando accuratamente la cute, l'orofaringe, l'apparato respiratorio e quello cardiovascolare, alla ricerca di ulteriori segni o sintomi associati. Se si riscontrano sintomi oggettivi, il TPO verrà interrotto e considerato positivo. In alternativa può essere prudente allungare l'intervallo di tempo della successiva somministrazione, dato che talora i sintomi soggettivi possono essere il prodromo di un'incipiente reazione allergica.

Se il bambino riesce ad assumere tutto l'alimento senza avere alcuna reazione, il TPO può essere considerato negativo per reazioni immediate, ma è comunque necessario aspettare almeno 24-48h per considerare il bambino veramente tollerante l'alimento, in quanto potrebbero verificarsi delle reazioni tardive.

Come comportarsi in caso di rifiuto dell'alimento

Non è infrequente che il TPO possa parzialmente fallire perché il bambino rifiuta l'alimento proposto. Le cause di questo evento sono molteplici. In primis il condizionamento psicologico del bambino più grande che, dopo aver eliminato dalla dieta prolungatamente l'alimento, magari per alcuni anni, è condizionato dall'idea che possa far male e lo rifiuta parzialmente o in toto. Un'altra causa può essere indotta dall'ambiente ospedaliero e dal rifiuto del bambino di rimanere in tale sede. Inoltre ci sono problemi di palatabilità legati alla non conoscenza del "nuovo" alimento, nuovo perché non assunto per molti anni o mai assunto, e al rifiuto del nuovo gusto. In tale occasione i provvedimenti correttivi possono essere adottati solo dopo aver osservato, nel corso di un TPO, il motivo del rifiuto dell'alimento. Nel caso in cui sia rifiutata una o più dosi del test, deve essere misurata la quantità realmente assunta.

In un TPO successivo, di norma programmato a breve distanza dal precedente, si potranno utilizzare altri ingredienti da mescolare all'alimento allo studio per renderlo più gradevole. Occorrerà che il dietista contatti preliminarmente la madre per sapere: sia se l'alimento che intende utilizzare per il mascheramento è già tollerato senza reazione dal bambino, sia se è anche di suo gradimento, per rendere più gradevole il gusto (Muraro et al., 2017).

Nel caso in cui ci sia una parziale assunzione dell'alimento raccomandiamo di non forzare il bambino ad assumere tutta la dose prevista nel corso del TPO. Il vomito in questi casi è un evento molto frequente che può invalidare l'interpretazione del risultato del TPO. In questi casi infatti non è possibile stabilire con certezza se il vomito è indotto dall'alimento o dalla forzatura del bambino ad assumerlo. Se il TPO fosse interrotto ad un certo punto per rifiuto, ma senza alcuna reazione clinica ancora provocata, si potrà assegnare una tolleranza per l'alimento solo relativa alla dose realmente assunta fino a quel momento nel TPO.

Utilità degli esami di laboratorio nell'interpretazione del TPO

Notevoli sono stati gli sforzi per capire se qualche esame di laboratorio fosse in grado di confermare il risultato clinico di positività o negatività del TPO. Le concentrazioni urinarie di 1-metilistamina e sieriche di triptasi non sono parametri utili per monitorare l'andamento del TPO alimentare a causa dell'insufficiente sensibilità e specificità. Gli stessi Autori hanno osservato che il numero degli eosinofili periferici diminuiva significativamente ($p < 0.0004$) indipendentemente dal tipo di reazione e dall'apparato coinvolto, immediatamente dopo le manifestazioni cliniche nei TPO

positivi a causa del sequestro tissutale. Di contro la proteina cationica degli eosinofili (ECP) aumentava significativamente ($p < 0.03$) 8 ore dopo la provocazione alimentare raggiungendo un picco dopo 24 ore. Questo incremento era principalmente correlato alle reazioni eczematose. L'osservazione relativa agli eosinofili non è stata successivamente confermata e l'ECP richiede nuove verifiche anche in relazione al tipo di test sicuramente non di uso comune.

È stato anche possibile verificare che i livelli sierici di interleuchina 10, una citochina con funzione inibitoria dell'ipersensibilità ritardata, erano ridotti nei bambini con reazioni tardive al TPO rispetto a quelli con reazioni immediate.

Ad oggi non sono ancora disponibili esami di laboratorio che possano suffragare con certezza il risultato clinico del TPO.

L'interpretazione

Non esistono al momento né score (punteggi) clinici sicuri, né esami di laboratorio che siano in grado di etichettare come positivo o negativo un TPO. Bock et al. (1988) hanno proposto un "food TPO symptom score" ma la valutazione sulla tolleranza clinica di un determinato alimento nel corso di un TPO, è sempre relativa ad un giudizio clinico globale che poggia sull'esperienza specifica nel test del singolo Pediatra allergologo.

Il TPO può essere falsamente negativo per le seguenti circostanze:

- Utilizzo contemporaneo di farmaci anti-reazionali;
- Preparazione dell'alimento (ad esempio la cottura di un alimento non predice la tolleranza allo stesso alimento come tale, ad esempio per l'uovo)
- Assunzione solo di alcune dosi con rifiuto delle successive.

Il TPO può essere falsamente positivo per le seguenti circostanze:

- Difficoltà nel mantenere dieta ferrea durante la procedura;
- Effetto rimbalzo della recente sospensione della terapia (specie per dermatite atopica);
- Utilizzo di vari ingredienti per il mascheramento;
- Sospensione troppo precoce del TPO (ai primi segni);
- Vomito indotto dal gusto o da fattori psicologici;
- Anche il placebo può indurre reazioni al DBPCFC.

Come comportarsi in caso di anafilassi al TPO

In caso di anafilassi al TPO con l'alimento è sempre importante ricordare la possibilità dell'anafilassi bifasica che suggerisce un periodo di osservazione di 6-8 ore nel caso in cui siano presenti sintomi respiratori in corso di TPO, e di 24 ore in caso di reazione anafilattica con sintomi cardiovascolari. L'ipotensione arteriosa, comparsa nel corso della prima anafilassi, rappresenta un valido parametro per predire la reazione bifasica.

Cosa fare per la reintroduzione o la prosecuzione della dieta

Dopo la dimissione dall'ospedale, il bambino può aver già ricevuto l'indicazione di una prosecuzione della dieta priva dell'alimento testato se ha presentato una reazione immediata al TPO o una reazione tardiva comparsa entro l'osservazione ospedaliera oppure non aver ancora ricevuto alcuna indicazione dietetica in attesa di valutare in ambulatorio, dopo qualche giorno, l'eventuale

comparsa di segni tardivi. Dopo tale visita solo l'eventuale riscontro dei segni tardivi comparsi dopo la dimissione consentirà di eliminare l'alimento sospetto dalla dieta del bambino. Se il DBPCFC è risultato negativo, l'alimento può essere somministrato in aperto, sotto l'osservazione medica, in maniera tale che i genitori e il Pediatra possano osservare se il piccolo paziente può assumere l'alimento senza avere reazione. Questa procedura può essere particolarmente utile nel caso in cui ci siano ancora perplessità, da parte del bambino o della famiglia, dopo un TPO negativo.

Occorre sempre verificare che il bambino, diventato tollerante a quel determinato alimento, continui ad assumerlo a domicilio. Nel 10% dei casi, dopo TPO negativo, i bambini, per paura di reazioni domiciliari o per rifiuto dell'alimento proseguono una dieta priva di quell'alimento senza più motivo (Muraro et al., 2017).

Dopo quanto tempo può essere ripetuto un TPO con l'alimento

Un nuovo TPO per saggiare l'eventuale acquisizione della tolleranza per quell'alimento viene di norma proposto dopo un anno. Occorre ricordare che la tolleranza al pesce e alla frutta secca avviene solo nel 20% dei casi, nel corso degli anni. Viceversa latte vaccino, uovo e grano richiedono la ripetizione del TPO dopo un anno per la buona probabilità di aver raggiunto la tolleranza.

Esistono però alcuni criteri che possono modificare tale atteggiamento. Il TPO può essere riproposto dopo 18-24 mesi se:

- Si è verificata una reazione grave al TPO precedente. Tale osservazione suggerisce molta cautela e di norma tempi più lunghi;
- Si sono osservate reazioni per dosi modeste del TPO. Anche in tali circostanze si suggeriscono attese più protratte;
- Ognuna di queste decisioni, per la scelta temporale del nuovo TPO deve essere sempre attentamente concordata anche con i genitori.

ALLEGATO A 6.1 - LA DESENSIBILIZZAZIONE ORALE: POTENZIALITÀ E LIMITI

È possibile interferire con la storia naturale dell'allergia alimentare (ed in particolare alle proteine del latte vaccino) con la desensibilizzazione orale?

Interferire con la storia naturale di una malattia significa poterne modificare il decorso naturale tentando di anticiparne la guarigione o di modificarne, in maniera positiva, l'andamento. Il decorso naturale dell'allergia alle proteine del latte vaccino (APLV) non è sempre semplice da determinare, essendo molteplici le patologie che a essa possono essere collegate (Høst et al., 2002). È inoltre importante tenere presente che secondo l'European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) si definisce APLV qualunque sintomatologia indotta dall'assunzione di latte vaccino (LV) purché a essa sottenda un meccanismo immunologico, sia IgE-mediato, sia non IgE-mediato (Johansson et al., 2001). In questa trattazione, parlando di desensibilizzazione orale, si tiene conto solo dell'APLV IgE-mediata i cui sintomi possono variare da reazioni locali lievi fino all'insorgenza di anafilassi (Bock et al., 2001 e 2007; Pumphrey & Gowland, 2007; Sampson et al., 1992). Poiché l'incidenza dell'APLV è maggiore nei bambini di 7-9 anni (Bock, 1987; Høst & Halken, 1990; Sampson, 1999a) rispetto all'adulto (Jansen et al., 1994; Metcalfe, 1997) è evidente che la sua storia naturale sia, tutto sommato, benigna. Høst e coll. (2002), che hanno seguito una popolazione non selezionata di bambini dalla nascita fino a 15 anni (con visite effettuate a 18 mesi, 5 e 10 anni), hanno dimostrato, nella loro coorte, un'incidenza dell'APLV all'età di 1 anno pari al 2,2%. Per quanto concerne, invece, il decorso naturale, la quota di guarigione è risultata essere del 56% a 1 anno, del 77% a 2 anni, dell'87% a 3 anni e del 92% a 5 e a 10 anni con un ulteriore guadagno di guarigione del 97% a 15 anni di età. Høst (1994 e 1998) ha inoltre dimostrato che bambini con APLV non-IgE mediata hanno un maggiore tasso di guarigione rispetto ai bambini che presentino maggiori livelli di IgE specifiche nei confronti delle proteine del latte vaccino, i quali vanno, inoltre, più facilmente incontro all'insorgenza di asma e rino-congiuntiviti allergiche. Questo dato è stato recentemente riproposto dal lavoro di Saarinen e coll. (2005) che hanno osservato come le APLV non IgE-mediate abbiano una notevole probabilità di guarire sotto i 3 anni di età, al contrario delle forme IgE-mediate che hanno invece molta più probabilità di persistere oltre l'età scolare (Saarinen et al., 2005).

Sebbene il dibattito sia ampio circa gli approcci futuri a questo importante problema (Chapman et al., 2006; Nowak-Wegrzyn, 2003), a oggi la terapia ufficiale dell'APLV è la somministrazione di una dieta priva di tale alimento (Burks et al., 2001; Høst, 1994; Sampson, 1999b). Quest'approccio, più semplice nelle prime età della vita, diviene talora difficile nel bambino più grandicello, essendo il LV alimento molto comune e contenuto in quasi tutti gli alimenti che il commercio offre ai bambini (biscotti, merendine, dolci, gelati ecc.). È facile comprendere come questo possa indurre notevoli disagi, talora anche psicologici, e come possa modificare la qualità di vita dei bambini e delle loro famiglie (Bollinger et al., 2006; Cohen et al., 2004; Sicherer et al., 2001). Un ulteriore problema è quello dell'assunzione inconsapevole di LV, che può mettere a rischio di vita i pazienti più sensibili (Bock et al., 2007; Macdougall et al., 2002; Sampson et al., 1992; Simons et al., 2002). Considerazione analoghe si possono fare anche per un altro alimento fondamentale come l'uovo (Savage et al., 2016). Recentemente sta ricevendo attenzione da parte di molti Autori il tentativo di rendere tolleranti ad alcuni cibi (fra cui il LV) soggetti con allergia alimentare somministrando loro dosi crescenti dell'alimento, dapprima in un ambiente controllato (almeno durante le prime fasi) e poi in maniera domiciliare. Gli alimenti fino ad ora studiati sono stati, oltre al LV, l'uovo, l'arachide e la nocciola, il kiwi, il frumento, il sedano, il pesce, la mela (Bauer et al., 1999; Buchanan et al., 2007; Enrique et al., 2005; Longo et al., 2008; Meglio et al., 2004; Mempel et al., 2003; Morisset et al., 2007; Nucera et al., 2005; Patriarca et al., 1984, 1998, 2003, 2007; Rolinck-Werminghaus et al., 2005; Ruëff et al., 2001; Staden et al., 2007). I risultati di questi trattamenti variano dalla protezione nei confronti dell'introduzione di dosi accidentali alla tolleranza di una

normale quotidiana quantità di alimento. Considerata la storia naturale dell'APLV è sembrato opportuno, per la maggior parte degli Autori, tentare questo approccio solo nei bambini di età superiore ai 5-6 anni confidando nel fatto che oltre questa età la probabilità di una guarigione spontanea dall'APLV IgE-mediata fosse assolutamente meno probabile rispetto alle età precedenti.

Nello studio di Meglio e coll. (2004) su 21 bambini con provata APLV IgE-mediata, è stato possibile indurre una tolleranza clinica di una dose giornaliera di 200 mL di LV in 18 bambini (86%), mentre 3 bambini (14%) sono riusciti a tollerare tra i 40 e gli 80 mL di LV poiché oltre queste dosi insorgevano sintomi. I restanti 3 bambini (14%) non sono riusciti a tollerare neanche minime quantità di LV. Gli effetti della desensibilizzazione orale sembrano essere persistenti nel tempo poiché dopo un follow-up di oltre 4 anni era presente una tolleranza clinica del LV in 13/20 (65%) bambini e parziale in 1/20 (3%) (Meglio et al., 2008). Tuttavia, 5/20 bambini, dopo quattro anni circa, non assumevano più LV, 3 poiché erano effettivamente ancora allergici, 2 perché potevano assumere solo quantità minime senza che insorgessero sintomi, ma questo aveva provocato problemi di ansia nelle mamme che hanno poi preferito interrompere del tutto la somministrazione quotidiana di piccole dosi di LV (Meglio et al., 2008). In linea generale le percentuali di successo diminuiscono se si selezionano soggetti con sintomi di partenza importanti. Nello studio di Longo e coll. (2008), infatti, di 30 soggetti con precedenti di reazioni gravi e avviati al protocollo di desensibilizzazione con LV, dopo 1 anno erano completamente tolleranti il 36%, mentre lo erano solo parzialmente il 54%. Anche in questa casistica vi era un certo numero di bambini (10%) che non sono riusciti a tollerare neanche piccole dosi di LV. I bambini del gruppo di controllo, costituito da soggetti che non hanno eseguito il protocollo di desensibilizzazione, dopo 1 anno non tolleravano ancora l'assunzione del LV.

Dati della letteratura: efficacia e sicurezza

La Figura A1 sintetizza il decorso storico delle pubblicazioni relative alla SOTI (Specific Oral Tolerance Induction), che è di fatto iniziata con i primi report aneddotici di Finkelstein (1905) per il latte e poi quello di Schofield (1908) per l'uovo. La scuola italiana è stata pionieristica in questo settore (Dello Iacono et al., 2013; Longo et al., 2008; Meglio et al., 2004 e 2008; Patriarca et al., 1984, 1998, 2003 e 2007). Nel 2007 sono stati pubblicati i primi studi clinici controllati e negli ultimi anni anche le revisioni sistematiche e le metanalisi.

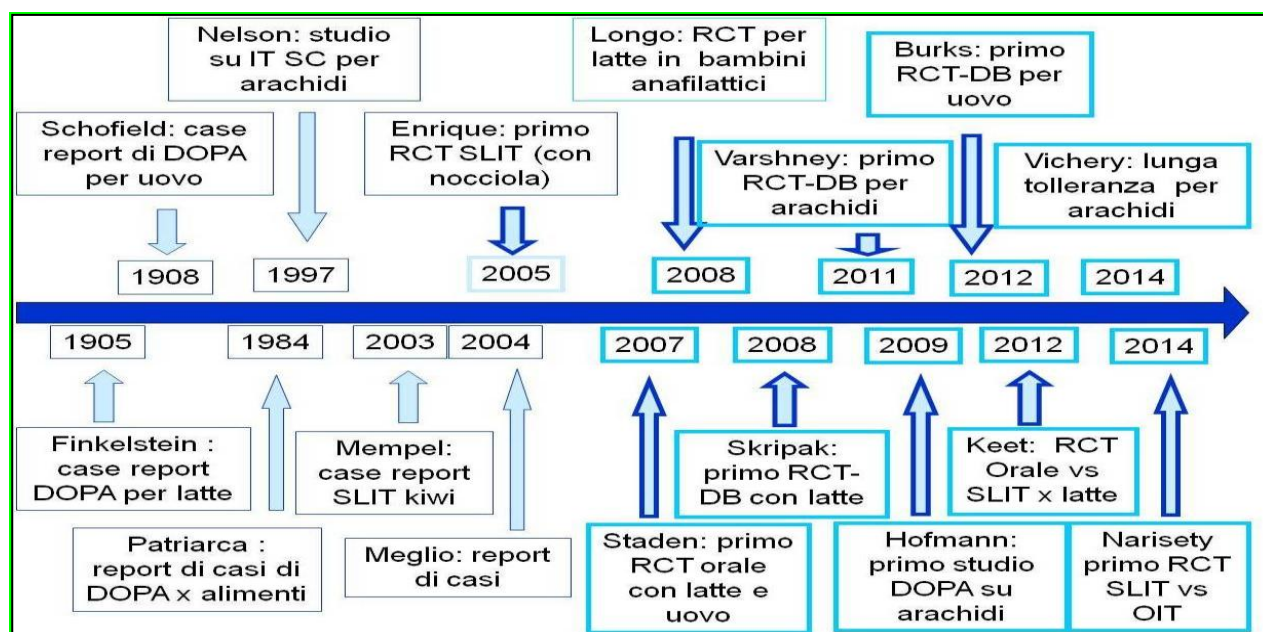


Figura A1 – Decorso storico delle pubblicazioni relative alla SOTI

Una revisione recente, pubblicata sotto l'egida dell'EAACI (Nurmatov et al, 2017), ha documentato che la SOTI (o OIT, Oral ImmunoTherapy, come è definita in questa pubblicazione) è efficace nell'aumentare la soglia di reattività ai vari alimenti (desensibilizzazione) e, anche se in un minor numero di casi, anche di vera e proprio tolleranza (assenza di reattività dopo interruzione dell'assunzione dell'alimento).

Il lavoro segnala, ovviamente, anche una maggiore incidenza di eventi avversi nei soggetti trattati rispetto ai controlli.

Questo è un problema molto importante che non può essere sottovalutato e che richiede una stretta collaborazione tra la famiglia ed i centri di riferimento, che debbono avere una particolare esperienza nel campo, in quanto a tutt'oggi questa metodica non può essere considerata routinaria.

Fino ad oggi non è mai stato riportato un evento fatale dovuto alla SOTI, che sia stato scientificamente documentato, ma il rischio potenziale c'è, specie in pazienti particolarmente reattivi. Ne consegue che la famiglia deve essere adeguatamente istruita ed avere tutti i farmaci necessari, compresa l'adrenalina autoiniettabile, per gestire eventuali reazioni avverse che si dovessero verificare a domicilio.

Sempre parlando di sicurezza della SOTI è fondamentale che passi il messaggio (alle famiglie, ma anche ai Pediatri e Medici curanti) che l'eventuale raggiungimento di una desensibilizzazione o tolleranza, vale esclusivamente per l'alimento usato e non per altri che, seppur molto simili, potrebbero dare reazioni gravi.

Questo è per esempio il caso pubblicato relativamente ad una bambina desensibilizzata al latte vaccino, ma che ha avuto una reazione anafilattica quasi fatale da ingestione di piccola quantità di ricotta di pecora; per fortuna il pronto intervento della madre, adeguatamente istruita, ha permesso di evitare una tragedia (Tripodi et al., 2013)..

Infine, restando sempre nell'ambito della sicurezza della SOTI sono stati recentemente pubblicati lavori che hanno documentato il rischio di Esofagite Eosinofila, dovuta proprio all'assunzione dell'alimento per cui il paziente è stato desensibilizzato, e che si può verificare anche a distanza di anni. Ciò determina che i pazienti sottoposti a SOTI debbono essere indagati preventivamente per tale aspetto e comunque seguiti per molto tempo (Lucendo et al., 2014).

Quella indotta dalla desensibilizzazione orale, è vera tolleranza?

Un soggetto normale tollera tutti gli alimenti che mangia in maniera indipendente dalla quantità e dalla frequenza con cui li assume. Nel caso, invece, dei soggetti desensibilizzati ci si pone il problema se l'assunzione del cibo precedentemente non tollerato porti, alla fine, a una reale tolleranza ad esso, oppure se quest'ultima sia funzione della necessaria e continua somministrazione dell'alimento, tolto il quale si torna allo stato d'intolleranza precedente.

Se modificare la storia naturale di una malattia significa solamente guarirla in modo completo, allora possiamo affermare che molti dei successi clinici della desensibilizzazione orale non modificano la storia naturale dell'APLV, ma semplicemente elevano la soglia di tolleranza a questo alimento. A questo proposito lo studio preliminare di Rolinck-Werninghaus e coll. (2005) riportava il caso di un bambino desensibilizzato con successo per il LV. Esso aveva raggiunto la dose massima prevista in 37 settimane e l'aveva mantenuta per altre 27. Sottoposto di nuovo a dieta senza LV per 8 settimane, egli è stato di nuovo sottoposto a test di provocazione alimentare che ha indotto orticaria alla dose cumulativa di 50 mL di LV. Di nuovo sottoposto a programma di desensibilizzazione orale ha riacquisito la tolleranza clinica. In un'altra casistica (Meglio et al., 2008), questo si è verificato in un bambino desensibilizzato al LV al quale, a causa di una diarrea virale, era stata interrotta l'assunzione regolare di questo alimento per 1 mese. La successiva reintroduzione di 100 mL di LV ha indotto orticaria e asma.

Queste singole osservazioni sono state ulteriormente inquadrare da Staden e coll. (2008). Nel loro studio sono stati inclusi bambini allergici sia al LV e sia all'uovo. Essi, dopo la verifica dell'allergia effettuata con test di provocazione alimentare in doppio cieco, sono stati inseriti in una prima fase d'induzione della tolleranza della durata di 67 giorni, cui è seguita una fase di mantenimento. I bambini sono stati quindi sottoposti di nuovo a dieta di eliminazione per 8 settimane seguita da un'ulteriore verifica con test di provocazione alimentare.

Il risultato di questo lavoro ha portato alla definizione di quattro profili di risposta: profilo I (responders) che erano in grado di tollerare il LV anche dopo la seconda dieta di eliminazione, profilo II (responders-con assunzione regolare) che tolleravano l'alimento, ma solo a patto di un'assunzione regolare; profilo III (partial responders) che riuscivano a tollerare solo dosi più basse di quelle pianificate e che non potevano quindi arrivare ad un'assunzione libera dell'alimento; profilo IV (non-responders) bambini in cui era stato impossibile indurre una tolleranza a causa dell'insorgenza di sintomi, anche per dosi molto basse dell'alimento.

Da un punto di vista teorico, potremmo affermare che una reale tolleranza clinica e immunologica sia stata indotta solo nei bambini definiti con il profilo I. Solo in essi, infatti, la storia naturale è stata realmente modificata potendo assumere il LV a loro piacimento, scegliendone la quantità, interrompendone l'assunzione e poi riprendendola, come avviene in un soggetto normale. Sicuramente non hanno raggiunto la tolleranza immunologica né i soggetti definiti profilo II, poiché la loro tolleranza clinica è condizionata dalla continua assunzione dell'alimento, né i soggetti definiti con profilo III essendo essi costretti a non superare una data soglia di alimento.

Ma sia la vera tolleranza immunologica sia quella parziale (desensibilizzazione condizionata dalla continua assunzione dell'alimento) hanno un notevole impatto sulla qualità di vita di questi bambini. Il ragionamento è ovvio per chi giunge a tollerare il cibo in maniera completa e indipendente dalla quantità e dalla frequenza delle assunzioni (profilo I). In questo caso, infatti, la tolleranza clinica coincide, necessariamente, con una tolleranza immunologica. Va però sottolineato che, da un punto di vista pratico, anche i soggetti con profilo II (tolleranza condizionata dall'assunzione continuativa dell'alimento) possono, in sostanza, vivere una vita normale poiché il LV è un alimento di uso comune, contenuto nella maggior parte dei cibi, commerciali e non, che il bambino regolarmente mangia e che, di fatto, sarebbe più difficile evitare che non assumere. Un

caso peculiare è, invece, quello dei bambini appartenenti al profilo III, in altre parole di coloro che possono tollerare solo dosi parziali di LV. Come abbiamo già avuto modo di sottolineare, se da un lato la tolleranza clinica parziale può essere considerata un successo limitato della desensibilizzazione orale, dall'altro essa è un grande aiuto per il cambiamento della qualità e dello stile di vita di questi pazienti. Infatti, chi grazie alla desensibilizzazione riesce a tollerare un alimento solo parzialmente è, in genere, un soggetto che parte da sintomi di partenza più gravi e che, più degli altri, teme l'assunzione inconsapevole di LV, specialmente se esso sia presente in tracce in altri alimenti. Poiché l'introduzione accidentale di cibi avviene per lo più in situazioni non controllate, e talora non controllabili, come scuola, ristoranti, casa di amici, questo porta spesso a modificare, consapevolmente o no, lo stile di vita. In questa condizione il poter assumere una quantità seppure limitata di LV mette al riparo dal rischio dell'insorgenza di sintomi, gravi o temuti gravi, in seguito a introduzioni accidentali che, per loro natura, devono essere di minime quantità.

La condizione dei soggetti appartenenti al profilo IV è ovvia, non essendo possibile raggiungere una tolleranza né clinica né, tantomeno, immunologica.

Che la desensibilizzazione orale con LV abbia un impatto sul sistema immunologico è dimostrato dal fatto che in quasi tutti gli studi è stata osservata una diminuzione della concentrazione sierica delle IgE specifiche per il LV. Questa, pur non potendo essere considerata la prova dell'induzione della tolleranza, può invece essere interpretata, in un certo senso, come la prova di una modificazione della storia naturale "biologica" di questi bambini, indipendentemente dal risultato clinico della SOTI. Oltre alle modificazioni delle IgE specifiche, sono state osservate anche variazioni, in aumento, delle IgG4 specifiche. Queste linee di tendenza, vale a dire il calo delle IgE specifiche e l'aumento delle IgG4 specifiche, pur potendo essere interpretate da un punto di vista clinico come fattori prognostici positivi, non possono essere utilizzate come strumenti sicuri per definire l'effetto positivo o negativo di una desensibilizzazione orale con alimenti. La prova della tolleranza clinica può essere fornita, allo stato attuale, solo dall'esecuzione di un test di provocazione alimentare. Protocolli di desensibilizzazione effettuati con altri alimenti hanno messo in evidenza anche variazioni di IL-10, IL-5, IFN- γ , TNF- α , ma questo va oltre gli scopi di questa trattazione (Jones et al., 2009).

Qualità dei lavori e metodiche

Sono pochi gli studi sulla desensibilizzazione orale che potrebbero superare un esame di qualità come la medicina dell'evidenza richiederebbe. Inoltre, ogni Autore, sino a oggi, ha in pratica usato un protocollo diverso.

Per quanto attiene alla tipologia del protocollo, alcuni Autori hanno adottato uno schema di introduzione lento partendo dalla somministrazione di dosi molto basse di LV e tentando di giungere alla dose massima prevista in un lasso di tempo variabile da studio a studio (Meglio et al., 2004; Patriarca et al., 1998 e 2003; Skripak et al., 2008; Staden et al., 2007; Zapatero et al., 2008). Inoltre, anche nell'ambito della stessa tipologia di approccio, variano in maniera notevole sia le dosi d'inizio, sia le quantità finali. Patriarca e coll. (2003), per esempio, partendo da una dose iniziale di 0,00025 mL di LV giungono a somministrare 120 mL di LV dopo 4, 5 mesi.

Zapatero e coll., (2008) invece, partendo da una dose iniziale di 0,05 mL di LV (che è una quantità 200 volte superiore a quella utilizzata negli studi di Patriarca e coll.) giungono a somministrare 250 mL di LV in 70 giorni. Altri protocolli lenti, partendo da dosi intermedie giungono alla dose prevista in tempi più lunghi.

Altri Autori hanno utilizzato un protocollo rapido (rush) e sono giunti alla dose di mantenimento di 120-200 mL di LV al giorno impiegando dai 3 ai 12 giorni (Martorell et al., 2007; Nucera et al.,

2008; Staden et al., 2008). Longo e coll. (2008) hanno invece utilizzato all'inizio una metodica rush seguita da una somministrazione lenta domiciliare del LV.

Diversamente dagli altri, De Boisseau & Dupont (2006) hanno usato una metodica SLIT (sublingual immunotherapy), mutuata dalla immunoterapia specifica attuata per gli allergeni inalanti, somministrando per tutto il periodo dei 6 mesi 1 mL al giorno di LV per via sublinguale a partire da una dose di 0,1 mL.

Recentemente la scuola giapponese (Yanagida et al., 2016) ha proposto una nuova metodologia, da riservare a pazienti molto reattivi, di desensibilizzazione per vari alimenti (latte, uovo, grano, arachidi) basata sull'idea di somministrare la minima quantità tollerata (per esempio per il latte solo 3 mL) per un intero anno senza tentare incrementi successivi. Tali autori hanno documentato comunque un aumento della soglia di reattività, per es. per il latte sono stati tollerati almeno 25 mL, che comunque ha protetto tali pazienti da reazioni anafilattiche da piccole dosi.

Un'altra strada promettente che è stata recentemente proposta è quella della desensibilizzazione per via epicutanea (Du Pont et al., 2010). Lo studio ha documentato che, dopo il trattamento, la dose tollerata aumentava da 1.7 a 23 mL mentre non variava nel gruppo controllo. Non vi era variazione nelle IgE sieriche in entrambi i gruppi, ed anche gli effetti collaterali sono stati solo locali in 4 bambini trattati e in 2 controlli. Ovviamente sono necessari altri studi su casistiche più ampie.

Se escludiamo i singoli case report, tutti a esito positivo (Bauer et al., 1999; Dupont et al., 2010), negli studi con un più ampio numero di soggetti è possibile osservare, in proporzioni variabili, bambini che raggiungono una tolleranza clinica completa, altri una tolleranza parziale e altri, infine, che non sono assolutamente in grado di tollerare neanche le dosi più basse di LV.

Se il variare della proporzione fra soggetti tolleranti e non sia da ascrivere alle caratteristiche del singolo protocollo o alla selezione iniziale dei pazienti non è facile da dire. Va però osservato che lo studio che in assoluto ha reclutato i casi più gravi ha ottenuto per lo più risultati parziali, seppure molto importanti da un punto di vista pratico poiché la maggior parte di questi bambini aveva avuto reazioni gravi dopo l'assunzione di dosi anche piccole di LV (Longo et al., 2008).

Conclusioni

Sebbene la terapia ufficiale dell'APLV sia, ad oggi, l'eliminazione di questo alimento, oltre l'età scolare si sta facendo strada, come altra opzione terapeutica sperimentale, la desensibilizzazione orale con LV.

I protocolli attuati fino a ora differiscono in quanto a tipologia, modalità di attuazione, e quantità somministrate mancando, di fatto, una reale standardizzazione del metodo.

Tale procedura va certamente proposta per alimenti che il paziente può regolarmente introdurre nella propria dieta, es. latte uova e grano, proprio per mantenere il livello di desensibilizzazione acquisito, mentre non trova applicazione per alimenti che vengono consumati più raramente (es. kiwi, pesca, ecc.).

La selezione dei pazienti, che possono avere reazioni più o meno gravi dopo l'introduzione del LV, rende inoltre difficile il confronto tra i vari tipi di approccio. Siamo ancora in una fase assolutamente preliminare.

Ciononostante, i risultati sembrano essere promettenti poiché in tutti gli studi fino ad ora condotti esistono quote, seppure variabili da studio a studio, di successo parziale o totale associato a quote minime di insuccesso.

La desensibilizzazione orale con alimenti modifica solo in parte la storia naturale dell'APLV intesa in senso clinico/immunologico, ma modifica fortemente la storia naturale clinica e ha un notevole impatto positivo sulla qualità di vita di questi piccoli pazienti.

Sebbene la qualità degli studi fino ad ora prodotti non soddisfi del tutto i criteri della Evidence Based Medicine, il messaggio che da essi è scaturito è forte e sta inducendo molti ricercatori a confermare con studi sicuramente più appropriati e meglio condotti ciò che i lavori precedenti, in maniera più pionieristica, hanno già evidenziato.

È auspicabile, in questo senso, una maggiore standardizzazione delle procedure di desensibilizzazione anche in dipendenza della tipologia dei pazienti e un approfondimento dei meccanismi immunologici che sottendono la tolleranza indotta tramite queste procedure.

Nel complesso la desensibilizzazione orale con LV, ed anche per altri alimenti, sembra essere sostanzialmente sicura, ma va ribadito in maniera ferma che questo approccio ha ancora carattere sperimentale e deve, almeno per ora, restare nello stretto ambito di gruppi specialistici.

ALLEGATO A 6.2 - PIANO DI AZIONE PER LA FAMIGLIA E LA SCUOLA IN CASO DI ANAFILASSI

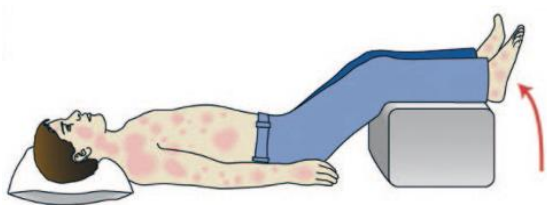
Piano d'azione per la famiglia e la scuola nella reazione allergica da alimento

Fotografia del
bambino

Cognome e Nome Classe

Anafilassi a:

Asma bronchiale sì* no * elevato rischio per reazioni severe



Da fare subito: guardare ed eventualmente trattare

Localizzazione dei sintomi	Segni e sintomi	Terapia	
		Adrenalina	Antistaminico
Alimento appena assunto	Ancora nessun sintomo		sì
Cavo orale	Prurito, pizzicore e/o gonfiore delle labbra, della lingua o della bocca		sì
Pelle	Prurito, rash pruriginoso, gonfiore del volto o delle estremità (mani e piedi)		sì
Tratto gastro-intestinale	Nausea, dolori addominali, vomito o diarrea		sì
Gola[^]	Gola secca, senso di ostruzione, tosse abbaiente	sì	sì
Polmone[^]	Respiro breve e frequente, tosse ripetuta, fischio	sì	sì
Coscienza[^]	Offuscamento della vista, svenimento	sì	
Cuore[^]	Polso frequente, bassa pressione arteriosa, pallore, cianosi	sì	sì
Altro			
Se la reazione sta progredendo (più sedi coinvolte)		sì	sì

[^] Potenzialmente a rischio di vita

Dosaggio:

Adrenalina: iniezione intramuscolare nella coscia

Adrenalina adulti /Adrenalina bambini

Antistaminico: somministra **Cetirizina**

Numero di gocce per bocca

farmaco, dose, via di somministrazione

Come praticare l'adrenalina:



1. Rimuovi il tappo di attivazione
2. Appoggia con forza l'estremità arrotondata del dispositivo sulla parte antero-laterale della coscia (sempre sulla coscia!)
3. Spingi con forza finché scatta il meccanismo di auto-iniezione. Tienilo ben pressato e conta con calma fino a 10.
4. Rimuovi l'autoiniettore di Adrenalina e massaggia la zona di iniezione per 10 secondi.

Dopo il trattamento con l'autoiniettore di Adrenalina, chiama il 112 e somministra Cetirizina. Al telefono dite che può essere necessaria altra adrenalina. Non riagganciate fino a che non avrete ottenuto il permesso di farlo dall'operatore del 112. Portate in Pronto Soccorso anche l'autoiniettore di Adrenalina usato. Pianifica una osservazione in Pronto Soccorso per almeno 4 ore.

Per i bambini con allergie a più alimenti, considera di preparare piani di azione separati per ogni alimento.

Subito dopo il trattamento: chi chiamare

Chiamare il **112**: dite che c'è una reazione **allergica grave** in un bambino, e che è già in corso di trattamento; ma che potrebbe essere necessaria altra adrenalina.

Chiamare il dottor al numero.....

Contatti familiari di emergenza:

Nome/relazione con il bambino	Telefono n.1	Telefono n.2
a. Padre		
b. Madre		
c. Altro		

NON ASPETTATE DI TROVARE IL GENITORE O PARENTE! TRATTATE SUBITO E POI PORTATE IL BAMBINO..... AL PRONTO SOCCORSO

CHI CERCARE AL CENTRO ALLERGOLOGICO:

Dottor o infermiere	Telefono n.1	Telefono n.2
a.		
b.		
c.		

Firma del Pediatra

Firma dei genitori

Data

Allegato esplicativo al piano d'azione.

Questo documento consente di non perdere nel tempo le informazioni che abitualmente vengono date dall'allergologo pediatra ai genitori nel momento della consegna dell'action plan. I genitori dovranno infatti spiegare, a loro volta, l'action plan ad un altro familiare, ad un insegnante ecc e può essere utile avere un documento che ricordi in dettaglio tutto quanto deve essere riferito.

Ricordarsi che tutta la procedura dell'action plan deve essere "ripassata" tutti i mesi assieme al bambino.

- *La fotografia del bambino deve essere effettuata in posizione sdraiata e sostituita ogni anno. Questo perché il bambino, all'esordio di un episodio di anafilassi, deve essere sdraiato in una posizione di sicurezza e il riconoscimento da parte dell'operatore potrebbe avvenire attraverso questa posizione*
- *Per asma bronchiale si intende sia che il bambino abbia avuto pregressa diagnosi di asma bronchiale sia che, nel precedente episodio di anafilassi alimentare, sia comparsa anche asma.*
- *Per l'alimento appena assunto, se non sono ancora comparsi segni clinici, si tiene pronta l'adrenalina ma si resta in attesa somministrando intanto terapia antistaminica per bocca. Non c'è indicazione a fare l'adrenalina se il bambino sta bene.*
- *Nell'ambito dei segni e sintomi noterete che gola, polmone, coscienza e cuore hanno vicino un piccolo simbolo che esprime, attraverso il loro coinvolgimento, il rischio potenziale di vita. L'interessamento anche di uno solo di questi quattro distretti richiede sempre la somministrazione dell'adrenalina con l'autoiniettore. La terapia antistaminica deve essere somministrata sempre nei casi descritti (con l'unica eccezione per lo stato di coscienza nel caso dovesse mancare il riflesso della deglutizione).*
- *Per il cavo orale e la pelle sarà il vostro allergologo pediatra a suggerire il comportamento più corretto.*
- *Per l'intestino si preferisce somministrare solo l'antistaminico e utilizzare l'adrenalina solo se dovesse comparire, poco dopo, il coinvolgimento di altri organi.*
- *Anche se la reazione sta progredendo si dovranno eseguire entrambi i farmaci.*

Il tipo di Adrenalina, bambini o adulti, va scelta in relazione al peso corporeo, ma occorre sempre verificare, con il vostro allergologo, che, in relazione all'incremento ponderale del bambino, non ci sia bisogno di passare al tipo adulti. Non occorre tenere l'autoiniettore di adrenalina in frigorifero. Controllate però sempre la scadenza.

Nello spazio relativo all'antistaminico ricordarsi che non tutti gli antistaminici sono uguali, specie per quanto concerne il rapido inizio della loro efficacia. In questa situazione diventa cruciale utilizzare un antistaminico ad azione veloce come la cetirizina. Il dosaggio è relativo ad un numero di gocce pari a metà del peso corporeo.

Per i contatti familiari di emergenza indicare sempre i numeri di telefono (fisso e cellulare di papà mamma).

Nello spazio relativo a chi cercare conviene indicare il numero di telefono del P.S. dell'Ospedale territoriale di competenza dove l'Ambulanza del 112 è obbligata a condurre vostro figlio/a.

ALLEGATO B 2.3 - VALUTAZIONE DEL RISCHIO

Sviluppo e evoluzione di approcci pratici per la valutazione del rischio

Tre approcci diversi sono stati proposti per la valutazione del rischio allergeni (EFSA 2014, Crevel et al., 2014a; Madsen et al., 2011): la valutazione tradizionale del rischio utilizzando il NOAEL/LOAEL e fattori di incertezza; l'approccio Benchmark Dose (BMD) e Margine di Esposizione (MoE); modelli probabilistici.

Approccio basato su NOAEL/LOAEL e fattori d'incertezza

Tradizionalmente la caratterizzazione del rischio è basata su un approccio deterministico, ovvero il rischio calcolato è basato su una stima puntuale, solitamente il caso peggiore per ciascuna delle variabili da prendere in considerazione (NOAEL o LOAEL, fattori di incertezza e livelli di esposizione) (Spanjersberg et al., 2007).

In questo caso sono utilizzati studi sperimentali in cui vengono testate dosi differenti di una sostanza per determinare il NOAEL o il LOAEL, e successivamente vengono applicati dei fattori di incertezza (spesso tra 100 e 1000) per tenere conto dell'estrapolazione dall'animale all'uomo e della variabilità inter-individuale umana.

Nell'allergia alimentare, l'uso di dati ottenuti sull'uomo per derivare il NOAEL o il LOAEL evita la necessità di utilizzare fattori di incertezza che tengano conto della variabilità tra specie. D'altra parte, come già detto, il NOAEL/LOAEL (o meglio MED) varia in modo ampio da soggetto a soggetto ed è molto basso per alcuni pazienti allergici; può quindi essere difficile da stabilire per la popolazione allergica nel suo complesso (EFSA 2014; Madsen et al., 2009).

Per quanto riguarda l'esposizione, la stima dell'assunzione massima dell'allergene viene ottenuta prendendo in considerazione l'assunzione massima ipotizzabile di un alimento e la concentrazione massima di allergene in quell'alimento. Se l'assunzione stimata è più elevata della più bassa MED trovata o di una soglia stabilita, non è possibile escludere che si verifichi una reazione avversa (Spanjersberg et al., 2007).

Per gli allergeni può essere difficile o addirittura impossibile stabilire una soglia basata sulle stime del caso peggiore, in quanto ogni livello di esposizione può portare al verificarsi di un effetto avverso nella parte più sensibile della popolazione. Questo approccio, se da un lato ha lo scopo di assicurare che anche questa parte della popolazione sia protetta in tutte le condizioni, dall'altro può portare alla conclusione che non si può mai escludere che possa verificarsi un effetto avverso e quindi sovrastima il rischio.

Un altro svantaggio di questo approccio è che l'entità del problema rimane ignota, cioè non viene fornita indicazione della proporzione della popolazione che può essere a rischio (Spanjersberg et al., 2007). Questo modello può anche essere ripetuto utilizzando il consumo medio, la concentrazione media di allergene e il valore più basso di MED. In questo modo è possibile ottenere una valutazione più realistica del problema, ma la proporzione della popolazione a rischio rimane comunque ignota (Ciarrocchi et al., 2011, Spanjersberg et al., 2007).

Approccio basato su Benchmark dose (BMD) e Margine di Esposizione (MoE)

L'approccio BMD è stato sviluppato per fare un uso migliore dei dati sperimentali di quanto sia possibile fare utilizzando i dati singoli di NOAEL/LOAEL. Questo approccio invece di utilizzare un data point singolo da un singolo

studio, tiene conto di tutti i dati sperimentali disponibili che vengono inseriti in una distribuzione mediante diversi modelli parametrici (log normal, log logistic, Weibull).

La Benchmark Dose può essere definita come la dose che induce un effetto avverso in una data percentuale del campione studiato (ad es. 10% = BMD_{10}). Questa dose viene usata come punto di partenza per ulteriori calcoli dai quali, sulla base degli intervalli di confidenza, si estrapola il limite inferiore della Benchmark Dose (BMDL, Benchmark Dose Lower Limit) che, diviso per l'apporto stimato della sostanza nella popolazione, dà luogo al Margine di Esposizione (MoE: Margin of Exposure) (Madsen et al., 2009, EFSA, 2014).

Nel caso dell'allergia alimentare per calcolare BMD e BMDL vengono utilizzate, nella strutturazione dei modelli statistici dose-distribuzione, le MED ottenute nei test orali in doppio cieco con placebo (DBPCFC) (vedi Figura B1).

Per quanto riguarda l'esposizione si fa solitamente riferimento a diversi scenari: esposizione massima prevista, 95° percentile dell'intera popolazione, 95° percentile dei soli consumatori ecc. Il MoE è quindi fortemente dipendente dalla stima dell'esposizione selezionata per la valutazione. Ad ogni modo più alto è il MoE e più bassa è la probabilità di una reazione allergica nella popolazione dei soggetti allergici. Anche questo approccio non consente una stima quantitativa del rischio, ma il confronto dei MoE ricavati per differenti allergeni e differenti scenari di esposizione, consente di individuare le priorità degli interventi di gestione del rischio. (Ciarrocchi et al., 2011, EFSA, 2014).

Un'altra applicazione di questo modello è quello di ricavare i livelli di dosi scatenanti, solitamente ED01, ED05, o ED10. Il termine dose scatenante (EDp) denota la dose di allergene in corrispondenza della quale è probabile che reagisca una percentuale p della popolazione allergica (l'ED10 ad es. è equivalente alla BMD_{10}). L'EDp può essere usata per ricavare dosi di riferimento definendo il livello di rischio che può essere accettabile, cioè la percentuale della popolazione allergica che sarà protetta.

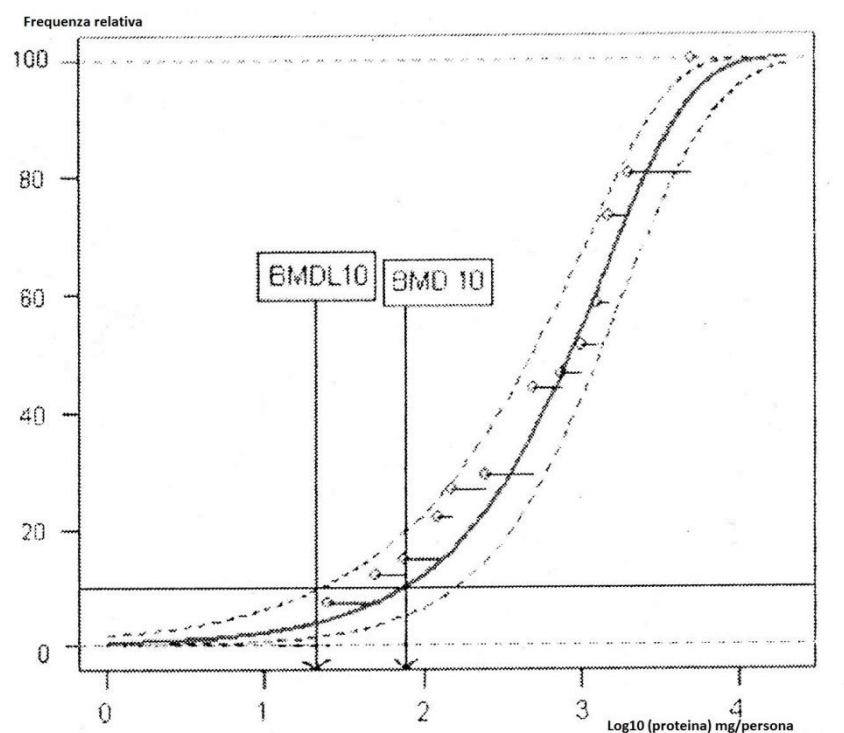


Figura B1 – Esempio di calcolo di BMD_{10} e $BMDL_{10}$ per l'arachide a partire da dati raccolti da test di provocazione orale (MED) usando il modello Weibull (da Madsen et al., 2009, modificata)

Nella Tabella B1 sono riportate le EDp per diversi alimenti allergenici (in mg di proteine), stimate in varie pubblicazioni, applicando diversi modelli matematici e una metodologia statistica (ICSA: Interval Censoring Survival Analysis) che tiene conto delle incertezze derivanti dall'impossibilità di stabilire la MED o il NOAEL per alcuni individui in numerosi TPO in doppio cieco con placebo (EFSA, 2014).

Tabella B1 – Soglie di popolazione calcolate, in diversi studi, per alcuni alimenti/ingredienti allergenici (esprese come mg di proteine totali dell'alimento) da EFSA 2014 semplificata.

Alimento	N. pazienti	Reazioni oggettive			Tutte le reazioni		
		ED ₀₁	ED ₀₅	ED ₁₀	ED ₀₁	ED ₀₅	ED ₁₀
Uovo (di gallina)	53 bambini	0.07	1.51	5.82	0.04	0.75	2.75
	206 prevalentemente bambini	0.0043-0.056*	0.21-0.44*	1.2-1.6*	--	--	--
	120 (≤3.5 anni)	--	--	0.6-1.3*	--	--	--
	21 (>3.5 anni)	--	--	20.4-27*	--	--	--

Allergie alimentari e sicurezza del consumatore - Documento di indirizzo e stato dell'arte
Italia 2018

	155 prevalentemente bambini	--	2.08	5.36	--	--	--
--	-----------------------------------	----	------	------	----	----	----

Alimento	N. pazienti	Reazioni oggettive			Tutte le reazioni		
		ED ₀₁	ED ₀₅	ED ₁₀	ED ₀₁	ED ₀₅	ED ₁₀
Latte (vaccino)	93 bambini	0.05	1.07	4.24	0.007	0.27	1.31
	351 prevalentemente bambini	0.016-0.14*	0.57-1.9*	2.8-5.1*	--	--	--
	80 (≤3.5 anni)	--	--	0.1-0.2*	--	--	--
	13 (>3.5 anni)	--	--	5.3-7.6*	--	--	--
	42 prevalentemente bambini	--	59.3	100.2	--	--	--
Arachide	135 bambini	0.15	1.56	4.42	0.007	0.14	0.52
	750 adulti/bambini	0.015-0.13*	0.5-1.5*	2.3-4.1*	--	--	--
	51 adulti/bambini	--	--	2.8-6.6*	--	--	--
	149 prevalentemente bambini	--	18.9	32.9	--	--	--
	41 bambini	--	--	87	--	--	--
Nocciola	28 bambini	0.01	0.29	1.38	0.001	0.05	0.22
		0.038-0.42*	1.2-2.6*	5.2-7.9*	--	--	--
	90 prevalentemente adulti	--	--	8.5-10.1*	--	--	--
	59 prevalentemente adulti	--	8.7	15.9	--	--	--
Anacardio	31 Bambini	1.3	7.41	16.0	0.02	0.32	1.07
		1.4-2.8*	8.9-11.5*	16.8- 22.7*	--	--	--
Soia	80 adulti/bambini	0.078-3.1*	4.7-22.2*	28.2- 63.4*	--	--	--
	23 adulti/bambini	37.2	--	--	0.21	--	--
Frumento	40 adulti/bambini	0.14-1.1*	2.0-4.3*	6.6-10.2*	--	--	--
Senape	33 adulti/bambini	0.022- 0.097*	0.32- 0.46*	1.0-1.2*	--	--	--

Allergie alimentari e sicurezza del consumatore - Documento di indirizzo e stato dell'arte
Italia 2018

Lupino	24 adulti/bambini	0.83-3.7*	7.8-19.1*	20.8-33*	--	--	--
Sesamo	21 adulti/bambini	0.10-0.67*	2.1-3.8*	7.6-10.6*	--	--	--
Gamberetto	48 adulti	3.7-6.1*	73.6-127*	284-500*	--	--	--
	28 prevalentemente adulti	--	--	~2500	--	--	--
Pesce	34 adulti e bambini	--	--	25.8- 32.6*	--	--	--
Sedano	41 prevalentemente adulti	--	--	1.6-2.8*	--	--	--

* a seconda del modello statistico di distribuzione utilizzato (log-logistic, log-normal, Weibull)

Sulla base di stime di EDp sono state proposte, da parte di alcuni gruppi industriali, dosi di riferimento da utilizzare per l'etichettatura volontaria di allergeni non intenzionalmente presenti negli alimenti (Programma VITAL).

Modelli probabilistici

Nei modelli probabilistici di valutazione del rischio vengono presi in considerazione sia la variabilità che la incertezza dei dati relativi al pericolo e all'esposizione impiegando, anziché delle stime puntuali, distribuzioni di probabilità. Nel caso degli allergeni vengono prese in considerazione la distribuzione di probabilità di assunzione di un alimento allergenico in una data popolazione e la distribuzione di probabilità della soglia per quell'alimento allergenico nella stessa popolazione.

Tali distribuzioni tengono conto di diverse variabili: presenza e concentrazione dell'allergene nell'alimento, probabilità che un soggetto allergico consumi quell'alimento e quantità di alimento consumata, MED individuali ottenute nei DBPCFC.

I dati vengono riportati in una curva cumulativa di distribuzione come mostrato in Figura B2. La distribuzione risultante descriverà la probabilità che una parte della popolazione sia esposta a livelli e a circostanze tali da determinare il verificarsi di un effetto avverso.

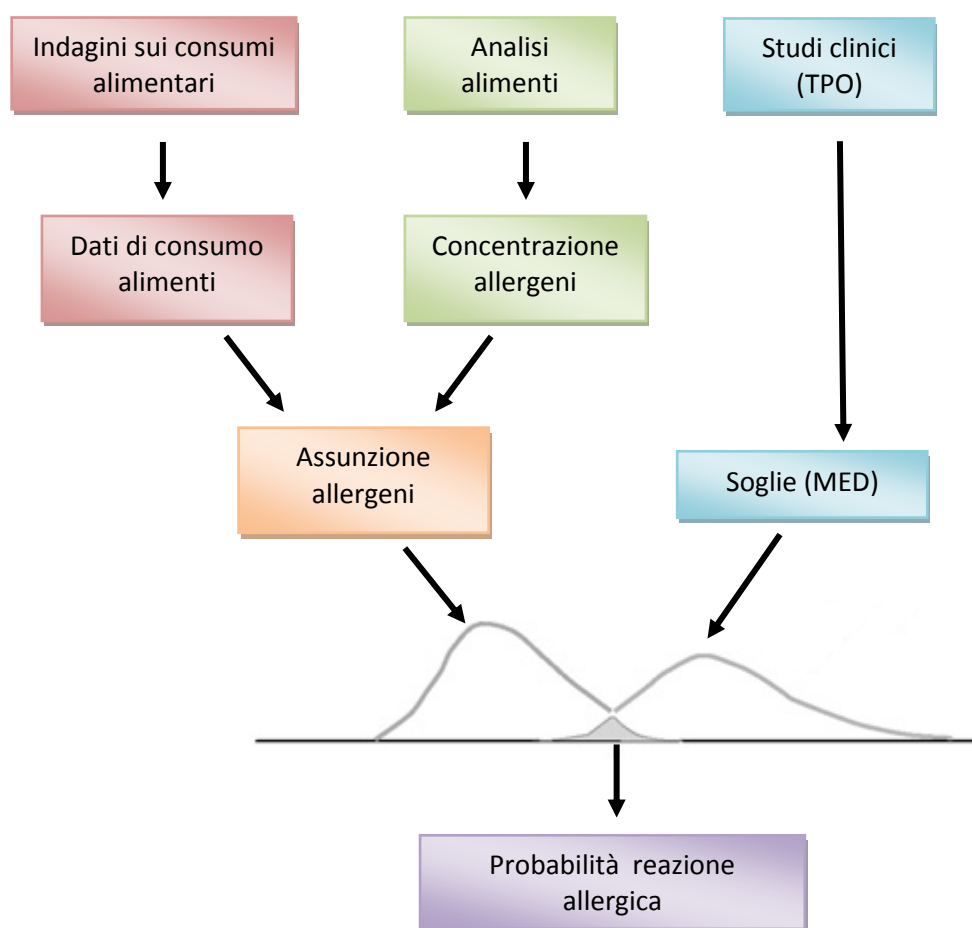


Figura B2 - Modello probabilistico di previsione del rischio di reazione allergica
(modificata da Spanjersberg et al., 2007).

La metodologia probabilistica consente una valutazione quantitativa del rischio. Poiché le variabili di ingresso possono essere modificate indipendentemente, la metodologia può essere utilizzata per

calcolare, per livelli di esposizione diversi, la percentuale di popolazione che è probabile sperimenti effetti avversi o per calcolare le concentrazioni massime di allergene tollerabili, usando come punto di partenza il massimo rischio accettabile (Ciarrocchi et al., 2011; EFSA, 2014).

Sono state condotte analisi di sensibilità per determinare come i cambiamenti nelle variabili di ingresso (sia le MED che le componenti di esposizione) influenzino il risultato.

Sia la posizione della distribuzione delle MED che la proporzione della popolazione che consuma un dato alimento hanno una grande influenza sul numero di reazioni allergiche predetto, mentre il modello statistico utilizzato per adattare la distribuzione della soglia (MED), la dimensione della porzione dell'alimento e l'utilizzo di reazioni più "severe" come base delle MED hanno un'influenza relativamente minore (Ciarrocchi et al., 2011, EFSA, 2014).

ALLEGATO C 1.1 - APPROFONDIMENTI SU METODI IMMUNOCHEMICI (ELISA)

Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Criticità legate alla fase di estrazione e preparazione del campione per il test ELISA

La procedura di estrazione dovrebbe essere in grado di consentire un'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 (Poms et al., 2004a e 2004b; Westphal 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 et al., 2009).

Al momento attuale non esiste alcun tampone di estrazione universale e quindi è necessario effettuare una valutazione caso per caso. Da qualche anno è stato introdotto 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, arachide, soia e crostacei) in differenti matrici alimentari (Matsuda et al., 2006; Sakai et al., 2008 e 2010).

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 degli 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 che essendo più tolleranti a piccole variazioni della struttura dell'antigene, possono essere la scelta preferibile 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 (Hefle et al., 2006; Taylor et al., 2009).

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. Pertanto è 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 altrettanto fondamentale conoscere con chiarezza come è stata costruita 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 et al., 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). Di recente è stato proposto dal network MoniQA un materiale di riferimento certificato per il latte costituito da controlli negativi/positivi e da campioni incurati a due livelli di fortificazione (Dumont 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 che sono in grado di indurre un evento clinico (soglia) stabilite per lo specifico alimento allergenico. Non c'è infatti necessità di spingere la sensibilità oltre i limiti necessari ad assicurare la salute dei consumatori allergici, che assisterebbero ad una eccessiva riduzione del numero di prodotti alimentari ritenuti sicuri riducendone la qualità della vita senza alcun vantaggio per la salute (Taylor et al., 2009).

Per quanto riguarda i valori di LOD e LOQ riportati nei vari test ELISA, non è in alcuni casi definito in modo chiaro se essi siano stati ottenuti a partire dai dati di assorbanza dei tamponi di diluizione o da estratti di matrici alimentari reali privi dell'analita, né quale sia stata la procedura per il calcolo. L'effetto matrice può impattare significativamente in questo senso e deve essere considerato con attenzione nella validazione del metodo e nella definizione di LOD e LOQ. 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 samples, 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: pertanto 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 (Abbott et al. 2010; Taylor et al., 2009) e delle interazioni con la matrice. 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. Tuttavia, 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. I risultati espressi secondo una di queste basi differiranno notevolmente gli uni dagli altri.

Dal punto di vista della valutazione del rischio l'espressione dei risultati come mg di proteine è probabilmente più appropriata, in quanto direttamente confrontabile con i valori soglia (MED) espressi come mg di proteine.

La Norma Europea UNI EN 15633-1, 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 (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 risulta molto variabile all'interno delle diverse matrici; 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 essere ancora più complesso per mancanza di dati al riguardo (Taylor et al., 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 et al., 2004).

ALLEGATO C 1.2 - APPROFONDIMENTI SU LATERAL FLOW TEST

Procedura analitica

La procedura per l'analisi può essere riassunta nei seguenti passaggi:

1. Il campione, opportunamente preparato, viene aggiunto alla porzione prossimale del dispositivo, sul Sample Pad;
2. Il campione inizia a migrare per capillarità e si sposta verso la zona del Particle Conjugate; se nel campione è presente l'antigene ricercato, questo si lega all'anticorpo specifico del Particle Conjugate, forma un immunocomplesso e continua la sua migrazione;
3. Il complesso arriva nella zona di lettura (Test Line) dove gli anticorpi specifici immobilizzati legano l'antigene secondo il principio del sandwich, già descritto per l'ELISA;
4. L'eccesso di anticorpi complessati o tutti gli anticorpi in assenza di antigeni migrano ulteriormente verso la linea di controllo che deve sempre risultare colorata a dimostrare che l'immunocromatografia è avvenuta correttamente.
5. La colorazione rossa è associata alla presenza dell'oro colloidale.

In caso di positività (presenza della sostanza nel campione) si osserveranno due bande colorate in rosso: una legata alla reazione dell'antigene con l'anticorpo della Linea Test e la seconda dovuta al legame anticorpo-anti-anticorpo che avviene nella Linea Controllo (Figura C1). Nel caso di negatività, ovvero in assenza di antigeni, tutti gli anticorpi presenti nel Particle Conjugate continueranno la loro corsa fino alla Linea Controllo, che sarà quindi l'unica a colorarsi di rosso.

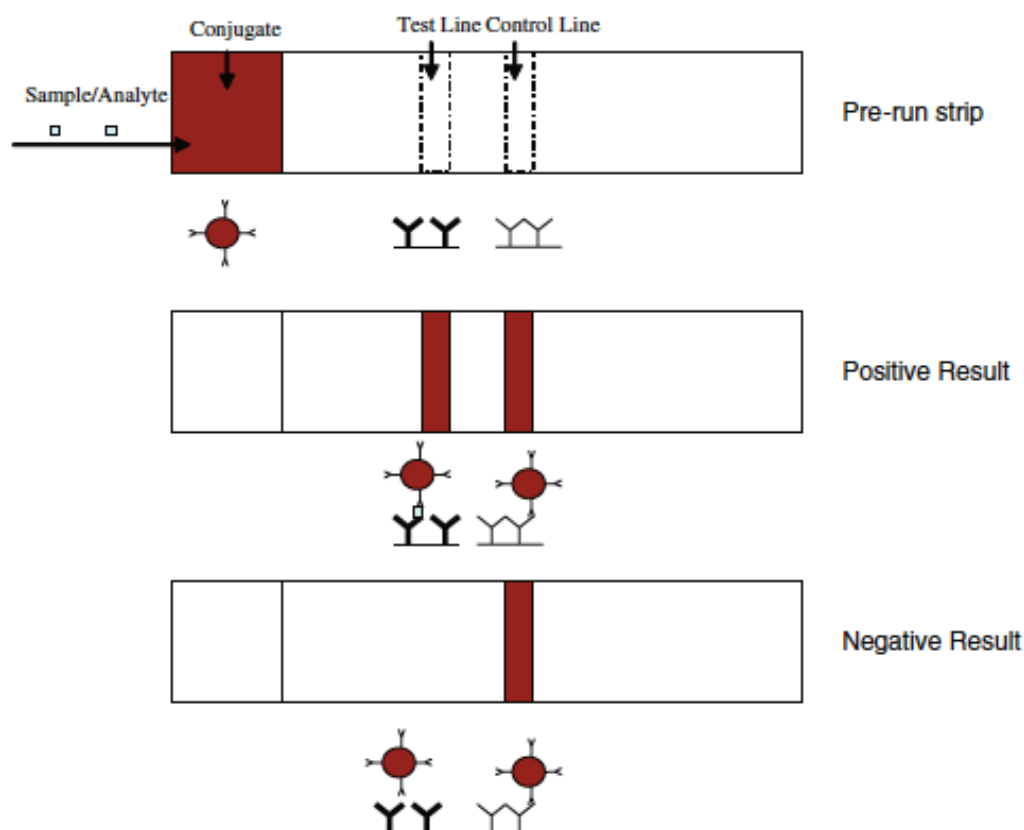


Figura C1 – Rappresentazione del risultato positivo e negativo con Lateral Flow per la ricerca di allergeni (Wong & Tse, 2009)

ALLEGATO C 1.3 - APPROFONDIMENTI SU TECNICHE IMMUNOELETTROFORETICHE

Immunoblotting

Preparazione del campione. Il campione può essere caricato sul gel di separazione come tale, previa solubilizzazione in un tampone idoneo alla corsa elettroforetica (Sample buffer). Se l'allergene è presente in quantità minime (tracce) si consiglia di estrarre e concentrare la frazione proteica prima di sospenderla nel tampone.

Caricamento sul gel. Accanto al campione preparato come descritto sopra, si caricano sul gel (generalmente di poliacrilamide) proteine purificate, che consentono di individuare le proteine allergeniche nel campione in base alla corsa elettroforetica (stessa proteina = stessa corsa elettroforetica). Si utilizzano inoltre markers di pesi molecolari sempre allo scopo di aiutare all'identificazione degli eventuali allergeni presenti.

Normalmente si preparano due gel "gemelli", che al termine della corsa elettroforetica seguono destini diversi:

- il primo viene colorato con opportune soluzioni per visualizzare il profilo proteico del campione e la corrispondenza delle varie bande con le proteine di riferimento;
- il secondo prosegue nella tecnica dell'immunoblotting.

Trasferimento delle proteine dal gel alla membrana. Dopo la separazione elettroforetica, il gel non colorato viene messo a contatto con una membrana (di nitrocellulosa o polivinilidene difluoruro-PVDF) e le proteine vengono elettroeluite dal gel alla membrana. In pratica si otterrà un profilo proteico analogo a quello visualizzato nel gel colorato ma invisibile.

Incubazione della membrana con l'anticorpo primario. Dopo il trasferimento delle proteine si aggiunge l'anticorpo specifico o il siero del soggetto allergico.

- se sto cercando un allergene in traccia in un alimento userò un anticorpo mono- o policlonale disponibile sul mercato. Ad esempio se cerco tracce di caseina, userò un anticorpo contro questa frazione proteica. Questi anticorpi vengono prodotti nell'animale e sono quindi di classe IgG;
- se sto studiando il profilo di sensibilizzazione di un soggetto allergico, aggiungerò il siero come tale, nel quale sono contenute le IgE specifiche (gli anticorpi umani più frequentemente responsabili delle reazioni allergiche).

Aggiunta dell'anticorpo secondario. Terminata la prima incubazione, ed effettuati i necessari lavaggi, si aggiunge l'anticorpo secondario:

- se nella fase precedente ho aggiunto un anticorpo commerciale di origine animale userò un anti-anticorpo che riconosce le IgG;
- se ho usato un siero, aggiungerò un anti-anticorpo che riconosca le IgE umane.
- In entrambi i casi gli antianticorpi sono legati ad un enzima (fosfatasi, perossidasi).

Identificazione del riconoscimento antigene-anticorpo. Per l'identificazione dell'antigene responsabile del legame con l'anticorpo primario, aggiungerò un substrato dell'enzima legato all'anticorpo secondario. Quando la banda si colora significa che l'anticorpo secondario ha identificato l'anticorpo primario che a sua volta è legato all'antigene.

- nel caso si stia analizzando un alimento, una banda colorata indicherà la presenza dell'allergene ricercato (quello riconosciuto dall'anticorpo);
- nel caso si stia studiando la sensibilizzazione di un soggetto, potremo riconoscere gli allergeni che hanno indotto sensibilizzazione.

ALLEGATO C 2 - APPROFONDIMENTI SU METODI DI BIOLOGIA MOLECOLARE

Estrazione ed effetto - matrice

La procedura di estrazione e purificazione del DNA genomico totale dagli alimenti è fondamentale 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 influenzare e rendere difficile l'amplificazione.

L'impatto della temperatura può portare alla neoformazione di sostanze con capacità inibente, ad esempio le melanoidine per lo sviluppo delle reazioni di Maillard, a seguito dell'interazione di zuccheri e proteine durante la cottura degli alimenti. Poiché il DNA genomico può, inoltre, essere degradato termicamente, 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., 2010). Protocolli di estrazione differenti (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., 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 se preceduto da 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. 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.

Gli alimenti processati sottoposti a trattamenti ad alta temperatura (es. *roasting*), possono rappresentare delle difficoltà 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 problematica è rappresentata dall'esigua quantità di DNA presente in alcune matrici alimentari, che impone una concentrazione estrema del campione. È il caso del DNA che può residuare nel vino, in seguito ai processi tecnologici di chiarifica e filtrazione. L'uso di coadiuvanti tecnologici ed additivi di origine animale (colle di pesce, gelatine animali, proteine di uovo...) potrebbe comportare la potenziale presenza di allergeni in traccia nel vino. Tale problematica, attuale e oggetto di vari studi (Penas et al., 2015; Weber et al., 2010), rende necessaria l'ottimizzazione di protocolli di estrazione, concentrazione ed amplificazione del DNA residuo, non ancora disponibili né commercializzati alla data della stesura di questo documento.

Seppure molto utilizzate, le estrazioni "manuali" (anche utilizzando biglie magnetiche o sistemi commerciali disponibili in kit che sfruttano strategie per intrappolare e concentrare il DNA genomico o strategie per liberarlo dai contaminanti co-estratti) saranno a poco a poco soppiantate da sistemi automatici di estrazione. Questi, basati sulle tecnologie di *liquid handling*, permettono di estrarre in modo automatico e simultaneo un significativo numero di campioni, risultando particolarmente utili nelle applicazioni di routine

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 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. Per questa ragione, in alcune situazioni analitiche particolari, è auspicabile poter usufruire di entrambe le tecniche, che sono da considerarsi complementari e non alternative. 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 biodiversità presente 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, qualora non vengano applicate rigorosi controlli di 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;
- la ri-amplificazione del prodotto utilizzato come template in una reazione denominata "nested PCR" e, ovviamente, il sequenziamento dell'amplicato.

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.

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 caratterizzati da questo approccio pubblicati in letteratura (Holzhauser et al., 2002).

La degradazione del DNA genomico in seguito all'impatto del trattamento tecnologico sull'alimento è particolarmente significativa 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, si ritiene sembra fondamentale 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 tramite 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 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" sono quindi fondamentali 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 presentare maggiori problematiche 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 valutare 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 scelti 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 l'analisi del DNA via PCR per la rivelazione 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 rivelazione).

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, basati su tecniche PCR, 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 un processo tecnologico 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 non paragonabile alle tecniche ELISA, è 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 all'accettabilità dei risultati ottenuti via PCR sono riportati nel paragrafo inerenti i 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 normativa 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 stessa (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 Normativa Europea UNI EN 15634-1 del 2009 (UNI EN 15634-1, 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. La Tabella C1 mette a confronto le caratteristiche delle tecniche ELISA e PCR.

Tabella C1- Confronto tra tecnica ELISA e PCR per la ricerca degli allergeni
negli alimenti (Kerbach et al., 2009).

	ELISA	PCR
Target	Proteine	DNA
Specificità	Possibile cross-reattività	Molto specifica
Sensibilità	Nell'ordine di 1 mg/Kg	Nell'ordine di 10 mg/kg
Manualità	Semplice e rapida	Rapida ma più complessa
Alterazioni del segnale	Variabilità biologica Variabilità climatica Efficienza di estrazione Alterazioni (es. glicosilazione, fosforilazione) dovute ai processi produttivi Interferenza di matrice	Genotipo stabile Efficienza di estrazione DNA stabile ad alte temperature, ma possibile frammentazione a pH acido Effetto matrice – inibitori della PCR nella matrice

ALLEGATO C 3 - APPROFONDIMENTI SU SPETTROMETRIA DI MASSA

Approfondimento sulle tecniche di analisi per Spettrometria di Massa applicate alla rilevazione di proteine intere e di peptidi caratteristici di allergeni alimentari: esempi di applicazioni e criticità

Rilevazione diretta di proteine: esempi

Un primo esempio di quest'approccio può essere il metodo pubblicato da Monaci & van Hengel (2008) finalizzato a rilevare la presenza di sieroproteine del latte (alfa-lattalbumina, beta-lattoglobulina A e B) nei succhi di frutta, dopo estrazione su fase solida. Questo metodo accoppiava 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 quindi la frammentazione (LOD: 1 mg/L).

Un ulteriore esempio dell'approccio diretto basato sulla Spettrometria di Massa MALDI-TOF può essere quello dedicato all'identificazione della presenza di lisozima (proteina potenzialmente allergenica, anche perché spesso non purificata e "carrier" di altri allergeni dell'uovo da cui viene estratta) utilizzato e autorizzato come additivo nei formaggi. Questo approccio può essere di aiuto nel caso in cui se ne sospetti la presenza, senza che vi sia indicazione in etichetta. Il lisozima, in questo lavoro preventivamente purificato mediante immuno-cattura con particelle magnetiche rivestite di un anticorpo anti-lisozima, in questo caso è stato rivelato con una sensibilità pari a 5 mg/kg (Schneider et al., 2010).

Rilevazione di peptidi marker: esempi

Gli esempi di rivelazione e identificazione di peptidi specifici derivanti da proteine allergeniche sono molto più numerosi in letteratura. Questi approcci analitici espongono però il fianco alla comune 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 affetta da 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 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).

Lo stesso gruppo ha quindi 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 fornirebbe una sensibilità migliore della digestione dopo estrazione, arrivando a 20 mg/kg con uno strumento a singolo quadrupolo; il triplo quadrupolo consente di abbassare ulteriormente la sensibilità a 10 mg/kg. Infine il miglioramento dei metodi di estrazione porterebbe questo limite fino a 2 mg/kg (Shefcheck et al., 2006). Questo conferma la necessità di porre particolare attenzione non solo alla scelta della strumentazione analitica, ma

anche (e soprattutto) alla fase di estrazione e clean up delle proteine dalla matrice complessa alimentare.

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 riusciti ad identificare, dopo digestione enzimatica, peptidi derivanti da tre allergeni dell'arachide (Ara h 1, Ara h 2, e Ara h 3), comparando la rivelabilità 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 et al., 2007). Questo esempio conferma come il processing possa portare ad una significativa riduzione della sensibilità delle metodiche di analisi, anche utilizzando la SM come dimostrato per altre matrici (Gomaa & Boye, 2013).

Un metodo LC/ESI-MS/MS è stato 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 et al., 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 immunomagnetiche 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 tramite accoppiamento della cromatografia capillare con uno spettrometro di massa QTOF. Un metodo di questo tipo ESI-MS/MS preceduto da cromatografia liquida capillare (CapLC/ESI-MS/MS) è stato proposto per la rivelazione di peptidi selezionati come marker della presenza di un'eventuale contaminazione esogena caseina in un biscotto, o nel vino. Nonostante il metodo consentisse di rivelare la presenza di caseina fino a 100 mg/L, questo risultava piuttosto valido dal punto di vista qualitativo o, al massimo semiquantitativo (Monaci et al., 2010a e 2010b).

Studi più recenti hanno previsto per l'identificazione di allergeni in vino (una matrice particolarmente difficile per l'estrema diluizione delle proteine derivanti dagli agenti di chiarifica, potenzialmente allergizzanti) una fase di pre-arricchimento on line su precolonna con fase stazionaria C18, sfruttando sia concentrazioni del campione per UF, sia cromatografia size exclusion, accoppiata ad un sistema di analisi LC-SRM-MS/MS. Un esempio di questo approccio è riportato da De Angelis et al., 2017a.

La tendenza all'identificazione simultanea di più target simultaneamente (approccio in "array") vede oggi la possibilità di utilizzare la tecnica della SM per identificare peptidi derivati dalla digestione triptica di diverse proteine allergeniche derivanti da diversi organismi vegetali e animali sfruttando il sistema di arricchimento on line precedentemente descritto. La sensibilità di questo approccio è correlata alla tipologia del target, variando da 6 (µg ingrediente allergenico/g matrice alimentare) a 13 µg/g per soia e arachide, rispettivamente. Peptidi da proteine di latte, nocciola e uova hanno mostrato valori compresi fra questi due limiti di rivelabilità (Pilolli et al. 2016). In generale lo step cruciale nello sviluppo di un metodo LC-MS per la determinazione di allergeni alimentari è la fase di preparazione del campione che richiede una preliminare estrazione del contenuto proteico con tamponi salini in presenza o meno di agenti denaturanti al fine di accrescerne la resa di estrazione proteica, una successiva fase di frazionamento della miscela proteica attraverso l'utilizzo di sistemi ad ultrafiltrazione con variabili cut-off dimensionali o estrazione su colonnine usa e getta basate su cromatografia a esclusione dimensionale ed infine una fase di digestione enzimatica guidata da enzimi con siti di taglio specifici in grado di produrre peptidi stabili e sovrapponibili con quelli della ottenuti per digestione in silico.

Un campo di ricerca più recente basata sulla spettrometria di massa riguarda l'interesse verso la simulazione della digestione delle proteine allergeniche, e la conseguente caratterizzazione via LC-MS (oltre che sfruttando immunoblotting, per valutare la capacità reattiva nei confronti di sieri degli individui allergici). La simulazione della digestione (che nelle sue diverse fasi può essere ottenuta in vitro mediante diversi protocolli basati sull'uso di enzimi, per cui non esiste ancora un consenso generalmente accettato, oltre che con sistemi più complessi che sfruttano anche l'utilizzo di succhi gastrici e intestinali umani) è un approccio molto importante sia per determinare la reale capacità allergenica delle proteine post-digestione sia per valutare l'effetto della digestione su proteine pre-trattate tecnologicamente (e potenzialmente modificate). Un esempio condotto per caratterizzare la digestione su proteine di soia è riportato da De Angelis et al (2017b).

Conclusioni e criticità

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 trattati e processati “pesantemente” (esempio mediante tostatura) o in presenza di matrici alimentari complesse.

Questo approccio, in ogni caso, sta prendendo sempre più consensi passando concettualmente da un approccio “di conferma” ad un possibile approccio sostitutivo (o meglio “di appoggio”) alle tecniche ELISA. Grazie alla specificità ed al numero crescente di metodi multiplexing in grado di identificare più peptidi marker correlabili a diversi allergeni contemporaneamente, la SM rappresenta un valido potenziale analitico nella valutazione dei rischi connessi alle allergie alimentari, pur richiedendo un maggior sforzo nella produzione di standard certificati di riferimento (anche marcati isotopicamente) e protocolli di validazione intra- e interlaboratorio (Johnson et al., 2011).

Le criticità principali dell'approccio analitico basato sulla SM sono sicuramente da correlare all'alto costo di acquisizione e gestione del sistema analitico e dalla formazione richiesta per il personale tecnico che esegue le analisi. La tecnica, sicuramente più complessa dell'ELISA e dell'analisi biomolecolare sul DNA, richiede un investimento significativo, che peraltro giustifica il suo suggerimento come tecnica avanzata di “secondo livello” per la conferma di eventuali campioni risultati positivi (o dubbi) alle analisi di screening e di prima valutazione della contaminazione.

Le sensibilità, sicuramente correlate alla strumentazione ma anche alla preparazione e clean up del campione (effetto “matrice”) variano comunque da pochi nanogrammi ad alcuni mg/kg/L per diverse matrici e diversi allergeni, come riportato in numerosi lavori scientifici. La sensibilità varia chiaramente in funzione del rilevamento di una proteina intatta o di un peptide “marker”.

BIBLIOGRAFIA

A 1, A 2, A 3

- Allen KJ. 2012. The epidemiology of IgE-mediated food allergy and anaphylaxis. *Immunol Allergy Clin North Am* 32:35-50.
- Asero R, Antonicelli L, Arena A, et al. 2009. EpidemAAITO: features of food allergy in Italian adults attending allergy clinics: a multicentre study. *Clin Exp Allergy* 39: 547-55.
- Bartra J, Garcia-Moral A, Enrique E. 2016. Geographical differences in food allergy. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 59:755-63
- Burney P, Summers C, Chinn S, et al. 2010. Prevalence and distribution of sensitization to foods in the European Community Respiratory Health Survey: a EuroPrevall analysis. *Allergy* 65:1182-8.
- Burney PG, Potts J, Kummeling I, et al. 2014. The prevalence and distribution of food sensitization in European adults. *Allergy* 69:365-71.
- Calamari AM, Poppa M, Villalta D et al. 2015. Alpha-gal anaphylaxis: the first case report in Italy *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 47:161-162.
- Cataldo F, Accomando S, Fragapane ML et al. 2006. Are food intolerances and allergies increasing in immigrant children coming from developing countries? *Pediatr Allergy Immunol* 17: 364-9.
- Fernandez-Rivas M, Barreales L, Mackar, et al. 2015. The EuroPrevall outpatient clinic study on food allergy: backgrounds and methodology. *Allergy* 70: 576-84.
- Mastorilli C, Tripodi S, Caffarelli C, et al. 2016. Endotypes of pollen-food syndrome in children with seasonal allergic rhinoconjunctivitis: a molecular classification. *Allergy* 71:1181-91
- Madsen C. 2005. Prevalence of food allergy: an overview. *Proc Nutr Soc* 64: 413-7.
- Muraro A, Lemanske RF Jr, Castells M, et al 2017. Precision medicine in allergic disease-food allergy, drug allergy, and anaphylaxis-PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *Allergy* 72:1006-1021.
- Muraro A, Worm RG, Bilò MB et al. 2014. Anaphylaxis: guidelines from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* 69:1026-45.
- Pastorello EA, Rivolta F, Bianchi M, et al. 2001. Incidence of anaphylaxis in the emergency department of a general hospital in Milan. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 756: 11-7.
- Sabra A, Bellanti JA, Rais JM, et al. 2003. IgE and non-IgE food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 90: 71-6.
- Sicherer SH. 2011 - Epidemiology of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 127:594-602.
- Werfel T, Asero R, Ballmer-Weber BK, et al. 2015. Position paper of the EAACI: food allergy due to immunological crossreactions with common inhalant allergens. *Allergy* 70:1079-90.

Wong GWK, Mahesh PA, Ogorodova L, et al. 2010. The EuroPrevall-INCO surveys on the prevalence of food allergies in children from China, India and Russia: the study methodology. *Allergy* 65:385-90.

A 4

Arno A, Rodriguez-Perez R, Blanco J, et al. 2010. Gal d 6 is the second allergen characterized from egg yolk. *J Agric Food Chem* 58:7453-7457.

Asero R, Mistrello G, Falagiani P. 1997. Oral allergy syndrome from pork. *Allergy* 52: 684-686.

Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, et al. 2000. Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *Int Arch Allergy Immunol* 122:20–32.

Asero R, Antonicelli L, Arena A, et al. 2009. Causes of food-induced anaphylaxis in Italian adults: a multi-centre study. *Int Arch Allergy Immunol* 150: 271–7.

Asero R. 2014. In patients with LTP syndrome food-specific IgE show a predictable hierarchical order. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 46:142–6

Bahna SL. 2002. Cow's milk allergy versus milk intolerance. *Ann Allergy Asthma Immunol* 89 (suppl):56-60.

Ballmer-Weber BK, Lidholm J, Fernandez-Rivas M, et al. 2015. IgE recognition patterns in peanut allergy are age dependent: perspectives of the EuroPrevall study. *Allergy* 70:391–407.

Ballmer-Weber BK, Vieths S. 2008. Soy allergy in perspective. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8: 270–5.

Ballmer-Weber BK, Vieths S, Lüttkopf D, et al. 2000. Celery allergy confirmed by double-blind, placebo-controlled food challenge: a clinical study in 32 subjects with a history of adverse reactions to celery root. *J Allergy Clin Immunol* 106:373-378.

Besler M, Steinhart H, Paschke A. 2001. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *J. Chromatogr B: Biomed. Sci. Appl* 756:207–228.

Beyer K, Chung D, Schulz G, et al. 2008. The role of wheat omega-5 gliadin IgE antibodies as a diagnostic tool for wheat allergy in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 122:419–21.

Breiteneder H, Mills EN. 2005. Molecular properties of food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 115:14–23.

Cahen YD, Fritsch R, Wuthrich B. 1998. Food allergy with monovalent sensitivity to poultry meat. *ClinExp Allergy* 28:1026-30.

Carballeda-Sangiao N, Rodriguez-Mahillo AI, Careche M, et al. 2016. Anisakis 11-like protein is a pepsin- and heat-resistant major allergen of *Anisakis* spp. and a valuable tool for anisakis allergy component-resolved diagnosis. *Int. Arch Allergy Immunol* 169:108-12.

Caubert JC, Wang G. 2011. Current understanding of egg allergy. *Pediatr. Clin. North Am.* 56:427-443.

- Commings SP, Satinover SM, Hosen J, et al. 2009. Delayed anaphylaxis, angioedema, or urticaria after consumption of red meat in patients with IgE antibodies specific for galactose- α -1,3-galactose. *J Allergy Clin Immunol* 123:426-433.
- Dello Iacono I, Limongelli MG, Parente C, et al. 2010. Allergia al pesce e cross-reazioni. *Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica* 02/2010, 14-20.
- EFSA 2007a. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to a notification from Cognis, ADM and Cargill on vegetable oils-derived phytosterols and phytosterol esters from soybean sources pursuant to Article 6 paragraph 11 of Directive 2000/13/EC. *The EFSA Journal* 486: 1-8.
- EFSA 2007b. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to a notification from Raisio Life Sciences on plant stanol esters produced from soybean oil sterols pursuant to Article 6, paragraph 11 of Directive 2000/13/EC - for permanent exemption from labelling. *The EFSA Journal* 571: 1-6
- Fernandez-Rivas M, Gonzalez-Mancebo E, Rodriguez-Perez R, et al. 2003. Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population. *J Allergy Clin Immunol* 112: 789-95.
- Fiocchi A, Restani P, Riva E, et al. 1998. Meat allergy: II – Effects of food processing and enzymatic digestion on the allergenicity of bovine and ovine meats. *J Am Coll Nutr* 14:245-250.
- Fiocchi A, Schünemann HJ, Brozek J, et al. 2010. Diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA): A summary report. *J. Allergy Clin Immunol.* 126:1119-28.
- Heinzerling LM, Burbach GJ, Edenharter Gonzalez-Mancebo E, et al. 2011. Prevalence of sensitization to lipid transfer proteins and profilins in a population of 430 patients in the south of Madrid. *J Investig Allergol Clin Immunol* 21:278-82.
- Holzhauser T, Wackermann O, Ballmer-Weber BK, et al. 2009. Soybean (Glycine max)allergy in Europe: Gly m 5 (betaconglycinin) and Gly m 6 (glycinin) are potential diagnostic markers for severe allergic reactions to soy. *J Allergy Clin Immunol* 123:452-8.
- Høst A, Halken S. 1990. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. Clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity reaction. *Allergy* 45:587-96.
- Kuehn A, Swoboda I, Arumugam K, et al. 2014. Fish allergens at a glance: Variable allergenicity of parvalbumins, the major fish allergens. *Front Immunol* 5:179.
- Lemon-Mulé H, Sampson HA, Sicherer SH, et al. 2008. Immunologic changes in children with egg allergy ingesting extensively heated egg. *J. Allergy Clin Immunol* 122:977-83.
- Leonard SA, Caubet J-C, Kim JS, et al. 2015. Baked milk- and egg-containing diet in the management of milk and egg allergy. *J. Allergy Clin Immunol* 122:342-347.
- Marsch DG, Goodfriend L, King TP, et al. 1986. Allergen nomenclature. *Bull World Health Organ* 64:767-774.

- Martelli A, De Chiara A, Corvo M, et al. 2002. Beef allergy in children with cow's milk allergy; cow's milk allergy in children with beef allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 89(Suppl):38–43.
- Novak-Wegrzyn A, Bloom KA, Sicherer SH, et al. 2008. Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy. *J. Allergy Clin Immunol Pract.* 3:13-23.
- Ortolani C, Ispano M, Pastorello E, et al. 1988. The oral allergy syndrome. *Ann Allergy* 61:47-52
- Palacios Benito R, Alvarez-Lovel MC, Martinez-Cocera C, et al. 2002. Allergy to meat. *Allergy* 57:858-859.
- Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, et al. 1999. The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol* 103:520–6.
- Pastorello EA, Farioli L, Conti A, et al. 2007. Wheat IgE-mediated food allergy in European patients: alpha-amylase inhibitors, lipid transfer proteins and low molecular-weight glutenins. Allergenic molecules recognized by double-blind, placebo-controlled food challenge. *Int Arch Allergy Immunol* 144:10–22.
- Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, et al. 2011. Pru p 3-sensitised Italian peach allergic patients are less likely to develop severe symptoms when also presenting IgE antibodies to Pru p 1 and Pru p 4. *Int Arch Allergy Immunol* 156: 362–72
- Pastorello EA, Farioli L, Stafylaraki C, et al. 2013. Anti-rPru p 3 IgE levels are inversely related to the age at onset of peach-induced severe symptoms reported by peach allergic adults. *Int Arch Allergy Immunol* 162:45–9.
- Quirce S, Maranon F, Umpierrez A, et al. 2001. Chicken serumalbumin (Gal d 5) is a partially heat-labile inhalant and food allergen implicated in the bird-egg syndrome. *Allergy* 56:754-62.
- Radauer C, Bublin M, Wagner S, Mari A, Breiteneder H. 2008. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J Allergy Clin Immunol* 121:847–52.
- Restani P, Fiocchi A, Beretta B, et al. 1997a. Meat allergy III – Proteins involved and cross-reactivity between different animal species. *J Am Coll Nutr* 16:383-394.
- Restani P, Fiocchi A, Restelli AR, et al. 1997b. Effect of technological treatments on digestibility and allergenicity of meat-based baby foods. *J Am Coll Nutrition* 16:376-82.
- Restani P, Beretta B, Fiocchi A, et al. 2002. Cross-reactivity between mammalian proteins. *Ann Allergy Asthma Immunol* 89 (suppl):11-15.
- Restani P, Ballabio C, Corsini E, et al. 2005. Identification of the basic subunit of Ara h 3 as the major allergen in a group of children allergic to peanuts. *Ann Allergy Asthma Immunol* 94:262-266.
- Restani P, Ballabio C, Di Lorenzo C, et al. 2009a. Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events. *Ann. Bioanal. Chem.* 395:47-56.
- Restani P, Ballabio C, Tripodi S, Fiocchi A. 2009b. Meat allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 9:265-269.

- Romano A, Scala E, Rumi G, et al. 2012. Lipid transfer proteins: the most frequent sensitizer in Italian subjects with food dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* 42:1643–53.
- Sabbah A, Lauret MG, Chene J, et al. 1994a. La syndrome porc-chat ou l'allergie croisée entre viande de porc et épithélia de chat (2nd partie) [The pork-cat syndrome or crossed allergy between pork meat and cat epithelia]. *Allerg Immunol (Paris)* 26:173-174.
- Sabbah A, Rosseau C, Lauret MG, Drouet M. 1994b. The pork-cat syndrome: RAST inhibition test with Fel d 1. *Allerg Immunol (Paris)* 26:259-260.
- Sanchez-Monge R, Lombardero M, Garcia-Selles FJ, Barber D, Salcedo G. 1999. Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *J Allergy Clin Immunol* 103:514–9.
- Savilahti EM, Savilahti E. 2013. Development of natural tolerance and induces desensitization in cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 24:114-21.
- Steinke JW, Platts-Mills TAE, Commimins SP. 2015. The alpha gal story: lessons learned from connecting dots. *J Allergy Clin Immunol* 135:589-597.
- Szépfolusi Z, Ebner C, Pendjaitan R, et al. 1994. Egg yolk alpha-livetin (chicken serum albumin) is a cross-reactive allergen in the bird-egg syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 93:932-42.
- Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B. 2002. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann N Y Acad Sci* 964:47–68.
- Werfel SJ, Cooke SK, Sampson HA. 1997. Clinical reactivity to beef in children allergic to cow's milk. *J Allergy Clin Immunol* 99:293-300.
- Yunginger JW, Sweeney KG, Sturner WQ, et al. 1988. Fatal food-induced anaphylaxis. *JAMA* 260:1450-1452.
- Zuidmeer L, Goldhahn K, Rona RJ, et al. 2008. The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol* 121:1210–8.

A 5 e Allegato A 5.6

- Bahna SL. 1994. Blind food TPO testing with wide-open eyes. *Ann Allergy* 72:235-8.
- Berti I, Bergamini M, Calzone L, et al. 2010. Caratteristiche dei test di provocazione orale per alimenti in Italia. Studio retrospettivo multicentrico. *Rivista di immunologia e allergologia pediatrica* 3: 8-14
- Bindslev-Jensen C, Ballmer-Weber BK, Bengtsson U, et al. 2004. Standardization of food TPOs in patients with immediate reactions to food – position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 59:690-697.
- Bock SA, Sampson HA, Atkins FM, et al. 1988. Double-blind, placebo-controlled food TPO (DBPCFC) as an official procedure: A manual. *J Allergy Clin Immunol* 82:986-97.
- Bock SA. 1997. In vivo diagnosis: Skin testing and oral TPO procedures. In: Metcalfe DD, Sampson HA, Simon RA. *Food allergy: Adverse Reactions to Foods and Food Additives*, Cambridge MA, Blackwell Science, 2nd Edition: p. 161.

- Knight AK, Shreffler WG, Sampson HA, et al. 2006. Skin prick test to egg white provides additional diagnostic utility to serum egg white-specific IgE antibody concentration in children. *J Allergy Clin Immunol* 117:842-7
- Jahn-Schmid B, Harwanegw C, Hillerw R, et al. 2003. Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy* 33:1443-9.
- Macchia D, Capretti S, Cecchi L. 2011. Position statement: in vivo and in vitro diagnosis of food allergy in adults. *J Allergy Clin Immunol* 21:57-72.
- Mari A, Alessandri C, Bernardi ML, et al. 2010. Microarrayed allergen molecules for the diagnosis of allergic diseases. *Curr Allergy Asthma Rep* 10: 357-64.
- Martelli A, Bouygue GR, Isoardi P, et al. 2005. Oral food TPOs in children in Italy. *Allergy* 60:907-11.
- Muraro A, Lemanske RF Jr, Castells M, et al. 2017. Precision medicine in allergic disease-food allergy, drug allergy, and anaphylaxis-PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *Allergy* 72: 1006-21.
- Ott H, Baron JM, Heise R, et al. 2008. Clinical usefulness of microarray-based IgE detection in children with suspected food allergy. *Allergy* 63:1521-8.
- Reibel S, Rohr C, Ziegert M, Sommerfeld C, Wahn U, Niggemann B. 2000. What safety measures need to be taken in oral food TPOs in children?. *Allergy* 2000; 55: 940-4.
- Reinhardt RW. 2014. The Food -Sensitization dilemma. *Clinical Lab Products*. Available at: <http://www.clpmag.com/2014/05/food-sensitization-dilemma/>
- Sicherer SH, Muñoz-Furlong A, Godbold JH, Sampson HA. 2010. US prevalence of self-reported peanut, tree nut, and sesame allergy: 11-year follow-up. *J Allergy Clin Immunol* 125: 1322-1326.
- Torr T, Gaughan M, Roberts G, et al. 2002. Food TPOs; a review and audit. *Paediatr Nurs* 14:30-4.
- Tripodi S, Businco AD, Alessandri C, Panetta V, Restani P, Matricardi PM. 2009. Predicting the outcome of oral food challenges with hen's egg through skin test end-point titration. *Clin Exp Allergy* 39:1225-33.

A 6 e Allegato A 6.1

- Bauer A, Ekanayake Mudiyanse S, Wigger-Alberti W, et al. 1999. Oral rush desensitisation to milk. *Allergy* 54: 894-5.
- Bock SA. 1987. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics* 1987, 79:683-688.
- Bock SA, Muñoz-Furlong A, Sampson HA. 2001. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J Allergy Clin Immunol* 107:191-3.

- Bock SA, Munoz-Furlong A, Sampson HA. 2007. Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006. *J Allergy Clin Immunol* 119:1016-8.
- Bollinger ME, Dahlquist LM, Mudd K, Sonntag C, Dillinger L, McKenna K. 2006. The impact of food allergy on the daily activities of children and their families. *Ann Allergy Asthma Immunol* 96:415-21.
- Buchanan AD, Green TD, Jones SM, et al. 2007. Egg oral immunotherapy in nonanaphylactic children with egg allergy. *J Allergy Clin Immunol* 119:199-205.
- Burks W, Bannon G, Lehrer SB. 2001. Classic specific immunotherapy and new perspectives in specific immunotherapy for food allergy. *Allergy* 56(s67):121-124.
- Campbell RL, Luke A, Weaver AL, et al. 2008. Prescriptions for self-injectable epinephrine and follow-up referral in emergency department patients presenting with anaphylaxis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 101:631-6.
- Chapman JA, Bernstein L, Lee LE, et al. 2006. Food allergy: a practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol* 96: s1-s68.
- Chowdhury BA, Meyer RJ. 2002. Intramuscular versus subcutaneous injection of epinephrine in the treatment of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 109:720.
- Cohen BL, Noone S, Munoz-Furlong A, Sicherer SH. 2004. Development of a questionnaire to measure quality of life in families with a child with food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 114:1159-63.
- de Boissieu D, Dupont C. 2006. Sublingual immunotherapy for cow's milk protein allergy: a preliminary report. *Allergy*. 61:1238-9.
- Dello Iacono I, Tripodi S, Calvani M, Panetta V, Verga MC, Miceli Sopo S. 2013. Specific oral tolerance induction with raw hen's egg in children with very severe egg allergy: a randomized controlled trial. *Pediatr Allergy Immunol*. 24:66-74
- Dupont C . Kalach N, Soulaïnes P, et al. 2010. Cow's milk epicutaneous immunotherapy in children: a pilot trial of safety, acceptability, and impact on allergic reactivity. *J Allergy Clin Immunol*. 125:1165-7.
- Enrique E, Pineda F, Malek T, Bartra J, Basagana M, Tella R, et al. 2005. Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study with a standardized hazelnut extract. *J Allergy Clin Immunol* 116:1073-9.
- Finkelstein H. 1905. Kumilch als ursache akuter ernahrungs storungen bei sauglingen [Latte bovino come causa dei disordini nutrizionali acuti nei lattanti]. *Monatshr Kinderheilkd* 4:65-72.
- Gold MS, Sainsbury R. 2000. First aid management in children who were prescribed an epinephrine autoinjector device (EpiPen). *J Allergy Clin Immunol* 106:171-176.
- Grouhi M, Alshehri M, Hummel D, Roifman CM. 1999. Anaphylaxis and epinephrine auto-injector training: Who will teach the teachers? *J Allergy Clin Immunol* 103:190-193.
- Gu X, Simons KJ, Simons FE. 2002. Is epinephrine administration by sublingual tablet feasible for the first-aid treatment of anaphylaxis? A proof-of-concept study. *Biopharm Drug Dispos* 23:213-6.

- Høst A. 1994. Cow's milk protein allergy and intolerance in infancy. Some clinical, epidemiological and immunological aspects. *Pediatr Allergy Immunol* 5(S5):1–36.
- Høst A. 1998. Clinical course of cow's milk protein allergy and intolerance. *Pediatr Allergy Immunol* 9(s11):48
- Høst A, Halken S. 1990. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. Clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity reaction. *Allergy* 45:587–596.
- Høst A, Halken S, Jacobsen HP, et al. 2002. Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood. *Pediatr Allergy Immunol*. 13 s15:23-8.
- Jansen JJ, Kardinaal AF, Huijbers G, Vlieg-Boerstra BJ, Martens BP, Ockhuizen T. 1994. Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. *J Allergy Clin Immunol* 93:446–456.
- Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Brujinzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T et al. 2001. EAACI (the European Academy of Allergology and Clinical Immunology) nomenclature task force. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 56:813–824.
- Jones SM, Pons L, Roberts JL, Scurlock AM, Perry TT, Kulis M, Shreffler WG, Steele P, Henry KA, Adair M, Francis JM, Durham S, Vickery BP, Zhong X, Burks AW. 2009. Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 124:292-300.
- Longo G, Barbi E, Berti I, Meneghetti R, Pittalis A, Ronfani L, et al. 2008. Specific oral tolerance induction in children with very severe cow's milk-induced reactions. *J Allergy Clin Immunol* 121:343-7.
- Lucendo AJ, Arias A, Tenias JM. 2014. Relation between eosinophilic esophagitis and oral immunotherapy for food allergy: a systematic review with meta-analysis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 113:624-9.
- Macdougall CF, Cant AJ, Colver AF. 2002. How dangerous is food allergy in childhood? The incidence of severe and fatal allergic reactions across the UK and Ireland. *Arch Dis Child* 86:236-9.
- Martorell Aragonés A, Félix Toledo R, Cerdá Mir JC, Martorell Calatayud A. 2007. Oral rush desensitization to cow milk. Following of desensitized patients during three years. *Allergol et Immunopathol* 35:174-176.
- Meglio P, Bartone E, Plantamura M, Arabito E, Giampietro PG. 2004. A protocol for oral desensitization in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergy* 59:980-7.
- Meglio P, Giampietro PG, Gianni S, Galli E. 2008. Oral desensitization in children with immunoglobulin E-mediated cow's milk allergy--follow-up at 4 yr and 8 months. *Pediatr Allergy Immunol* 19:412-9
- Mempel M, Rakoski J, Ring J, Ollert M. 2003. Severe anaphylaxis to kiwi fruit: Immunologic changes related to successful sublingual allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 111:1406-9.

- Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Guenard L, et al. 2007. Oral desensitization in children with milk and egg allergies obtains recovery in a significant proportion of cases. A randomized study in 60 children with cow's milk allergy and 90 children with egg allergy. *Allerg Immunol (Paris)* 39:12–9.
- Muraro A, Worm RG, Bilò MB et al. 2014. Anaphylaxis: guidelines from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* 69:1026-45.
- Metcalf DD. 1997. Food allergy in adults. In: Metcalfe DD, Sampson HA, Simon RA, editors. *Food Allergy: adverse reactions to foods and food additives*, 2nd edn. Cambridge: Blackwell Science, pp.183–191.
- Niggemann B, Beyer K. 2012. Adrenaline autoinjectors in food allergy: in for a cent, in for a euro? *Pediatr Allergy Immunol* 23:506-8.
- Nowak-Wegrzyn A. 2003. Future approaches to food allergy. *Pediatrics* 111: 1672–80.
- Nucera E, Pollastrini E, De Pasquale T, et al. 2005. New protocol for desensitization to wheat allergy in a single case. *Dig Dis Sci* 50:1708–9.
- Nucera E, Schiavino D, Buonomo A, Pollastrini E, Altomonte G, Pecora V, Decinti M, Lombardo C, Patriarca G. 2008. Sublingual-Oral Rush Desensitization to Mixed Cow and Sheep Milk: A Case Report. *J Invest Allergol Clin Immunol* 18:219-222
- Nurmatov U, Dhami S, Pajno GB, et al. 2017. Allergen immunotherapy for IgE-mediated food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy* 72: 1133-47.
- Patriarca G, Nucera E, Pollastrini E, Roncallo C, De Pasquale T, Lombardo C, et al. 2007. Oral specific desensitization in food-allergic children. *Dig Dis Sci* 52:1662-72.
- Patriarca G, Nucera E, Roncallo C, et al. 2003. Oral desensitizing treatment in food allergy: clinical and immunological results. *Aliment Pharmacol Ther* 17:459-65.
- Patriarca G, Romano A, Venuti A, et al. 1984. Oral specific hyposensitization in the management of patients allergic to food. *Allergol Immunopathol (Madr)* 12:275–81.
- Patriarca G, Schiavino D, Nucera E, et al. 1998. Food allergy in children: results of a standardized protocol for oral desensitisation. *Hepatogastroenterology* 45: 52–8.
- Pumphrey RS, Gowland MH. 2007. Further fatal allergic reactions to food in the United Kingdom, 1999-2006. *J Allergy Clin Immunol* 119:1018-9.
- Rolinck-Werninghaus C, Staden U, Mehl A, et al. 2005. Specific oral tolerance induction with food in children: transient or persistent effect on food allergy? *Allergy* 60:1320–2.
- Ruëff F, Eberlein-König B, Przybilla B. 2001. Oral hyposensitization with celery juice. *Allergy* 56:82-3.
- Saarinen KM, Pelkonen AS, Mäkelä MJ, Savilahti E. 2005. Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status. *J Allergy Clin Immunol* 116:869-75.
- Sampson HA, Mendelson L, Rosen JP. 1992. Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J Med* 327:380-4.

- Sampson HA. 1999a. Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 103:717–728.
- Sampson HA. 1999b. Food allergy. Part 2: diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol* 103:981–989.
- Savage J, Sicherer S, Wood R. 2016. The Natural History of Food Allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 4:196-203
- Schofield AT. 1908. A Case of Egg Poisoning. *Lancet* 171:716.
- Sicherer SH, Noone SA, Munoz-Furlong A. 2001. The impact of childhood food allergy on quality of life. *Ann Allergy Asthma Immunol* 87:461-4.
- Simons FER, Chad ZH, Gold M. 2002. Real-time reporting of anaphylaxis in infants, and adolescents by physicians involved in the Canadian Pediatric Surveillance Program. *J Allergy Clin Immunol* 109(suppl):S181.
- Skripak JM, Nash SD, Rowley H, Brereton H, Oh S, Hamilton RG, Matsui EC, Burks AW, Wood RA Mda. 2008. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 122:1154-60
- Staden U, Blumchen K, Blankenstein N, et al. 2008. Rush oral immunotherapy in children with persistent cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 122:418-9
- Staden U, Rolinck-Werninghaus C, Brewe F, Wahn U, Niggemann B, Beyer K. 2007. Specific oral tolerance induction in food allergy in children: Efficacy and clinical patterns of reaction. *Allergy* 62:1261-9.
- Tripodi S, Comberiati P, Di Rienzo Businco A, Bianchi A, Bondanini F, Sargentini V, Pingitore G, Ballabio C, Restani P, Miceli Sopo S. 2013. Severe anaphylaxis to sheep's milk cheese in a child desensitized to cow's milk through specific oral tolerance induction. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 45:56-60.
- Yanagida N, Okada Y, Sato S, et al. 2016. New approach for food allergy management using low-dose oral food challenges and low-dose oral immunotherapies. *Allergol Int* 65:135-40.
- Zapatero L, Alonso E, Fuentes V, Martínez MI. 2008. Oral Desensitization in Children With Cow's Milk Allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 18: 389-396.

B 2 e Allegato B 2.3

- Allen KJ, Reminton BC, Baumert JL, et al. 2014b. Allergen reference doses for precautionary labeling (VITAL 2.0): Clinical implications. *J Allergy Clin Immunol* 133:156-164.
- Allen KJ, Turner PJ, Pawankar R, et al. 2014a. Precautionary labelling of foods for allergen content: are we ready for a global framework? *World Allergy Org J* 7:10-24.
- Björkstén B, Crevel R, Hischenhuber C, et al. 2008. Criteria for identify allergenic foods of public health importance. *Regulatory Toxicol Pharmacol* 51:42-52.
- Ciarrocchi M, Boniglia C, Giammarioli S, et al. 2011. Tutela dei consumatori affetti da allergie alimentari: presupposti e modalità di intervento. *Rapporti ISTISAN* 11/27.

- Crevel RWR, Ballmer-Weber BK, Holzhauser T, et al. 2008. Threshold for food allergens and their value to different stakeholders. *Allergy* 63:597-609.
- Crevel RWR, Baumert JL, Baka A, et al. 2014a. Development and evolution of risk assessment for food allergens. *Food Chem Toxicol* 67:262-276.
- Crevel RWR, Baumert JL, Luccioli L, et al. 2014b. Translating reference doses into allergen management practice: Challenges for stakeholders. *Food Chem Toxicol* 67:277-287.
- Crevel RWR, Briggs D, Hefle SL, et al. 2007. Hazard characterisation in food allergen risk assessment: the application of statistical approaches and the use of clinical data. *Food Chem Toxicol* 45:691-701.
- DunnGalvin A, Chan CH, Crevel R, et al. 2015. Precautionary allergen labelling: perspective from key stakeholder groups. *Allergy* 70:1039-1051.
- EFSA 2014. Scientific opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredient for labeling purposes. *EFSA J* 12 (11): 3894: 56-63.
- Food Drink Europe. 2013. Guidance on Food Allergen Management for Food Manufacturers. Scaricabile da: http://www.fooddrinkeurope.eu/uploads/press-releases_documents/temp_file_FINAL_Allergen_A4_web1.pdf
- Food Standards Agency. 2006. Guidance on Allergen Management and Consumer Information. July FSA/1064/0606. Scaricabile da: <https://www.food.gov.uk/sites/default/files/multimedia/pdfs/maycontainguide.pdf>
- Hattersley S, Ward R, Baka A, et al. 2014. Advances in the risk management of unintended presence of allergenic foods in manufactured food products – An overview. *Food Chem Toxicol* 67:255-261.
- Houben G, Burney P, Chan CH, et al. 2016. Prioritisation of allergenic foods with respect to public health relevance. Report from an ILSI Europe Food Allergy Task Force Expert Group. *Food Chem Toxicol* 89:8-18.
- Madsen CB, Crevel R, Chan CH, et al. 2010. Food allergy: Stakeholder perspectives on acceptable risk. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 57:256-265.
- Madsen CB, Hattersley S, Allen KJ, et al. 2011. Can we define a tolerable level of risk in food allergy? Report from a EuroPrevall/UK Food Standards Agency workshop. *Clin Exp Allergy* 42:30-37.
- Madsen CB, Hattersley S, Buck J, et al. 2009. Approaches to risk assessment in food allergy: Report from a workshop “Developing a framework for assessing the risk from allergenic foods”. *Food Chem Toxicol* 47:480-489.
- Muraro A, Hoffmann-Sommergruber K, Holzhauser T, et al. 2014. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines. Protecting consumers with food allergies: understanding food consumption, meeting regulations and identifying unmet needs. *Allergy* 69:1464-1472.

- Reese I, Holzhauser T, Dölle S, et al. 2015. Allergen and allergy risk assessment, allergen management, and gaps in the European Food Information Regulation (FIR). *Allergo J Int* 24:180-184.
- Spanjersberg MQI, Kruizinga AG, Rennen MAJ, et al. 2007. Risk assessment and food allergy: the probabilistic model applied to allergens. *Food Chem Toxicol* 45:49-54.
- Taylor S, Baumert JL, Kruizinga AG, et al. 2014. Establishment of Reference Doses for residues of allergenic foods: Report of the VITAL Expert Panel. *Food Chem Toxicol* 63:9-17.
- Taylor SL, Hefle SL, Bindsley-Jensen C, et al. 2004. A consensus protocol for the determination of the threshold doses for allergenic foods: how much is too much? *Clin Exp Allergy* 34:689-695.

C 1 e Allegati C 1.1, C 1.2, C 1.3

- Abbott M, Hayward S, Ross W, et al. 2010. Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: community guidance and best practices. *J AOAC Int* 93:442-45.
- Baumert JL. 2013. Detecting and Measuring Allergens in Food. In: *Risk Management for Food Allergy*, Elsevier, pp. 215-226.
- Dumont V, Kerbach S, Poms R, et al. 2010. Development of milk and egg incurred reference materials for the validation of food allergen detection methods. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* 2: 208–215
- Hefle S, Yeung J, Helm R. 2006. Antibodies. In: *Detecting allergens in food*. Koppermann J and Hefle L Eds, CRC Press, pp 65-78
- Immer U. 2006. Factors affecting the effectiveness of allergen detection In: *Detecting allergens in food*. Koppermann J and Hefle L Eds, CRC Press. pp 330-347
- Matsuda R, Yoshioka Y, Akiyama H, et al. 2006. Interlaboratory evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay kits for the detection of egg, milk, wheat, buckwheat, and peanut in foods. *J AOAC Int* 89:1600-1608
- Poms RE, Emons H, Anklam E. 2006. Reference materials and method validation in allergen detection. In: *Detecting allergens in food*. Koppermann J and Hefle L Eds, CRC Press, pp 348-356.
- Poms RE, Cappelletti C, Anklam E. 2004b. Effect of roasting history and buffer composition on peanut protein extraction efficiency. *Mol Nutr Food Res* 48:459-464
- Poms RE, Klein CL, Anklam E. 2004a. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants* 21:1-31
- Sakai S, Adachi R, Akiyama H et al. 2010. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay kit for the determination of soybean protein in processed foods: Interlaboratory evaluation. *J AOAC Int* 93:243-248.
- Sakai S, Matsuda R, Adachi R, et al. 2008. Interlaboratory evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay kits for the determination of crustacean protein in processed foods. *J AOAC Int* 91:123-130

- Schubert-Ullrich P, Rudolf J, Ansari P, et al. 2009. Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. *Anal Bioanal Chem* 395:69-81
- Taylor SL, Nordlee Ja, Niemann LM, et al. 2009. Allergen immunoassays-consideration for use of naturally incurred standards. *Anal Bioanal Chem* 395:83-92
- UNI EN 15633-1:2009. Prodotti alimentari - Ricerca di allergeni alimentari mediante metodi immunologici. Parte 1: Considerazioni generali. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione
- van Hengel AJ. 2007. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Anal Bioanal Chem* 389:111-118
- Westphal CD, Pereira MR, Raybourne RB, et al. 2004. Evaluation of extraction buffers using the current approach of detecting multiple allergenic and non-allergenic proteins in food. *J AOAC Int* 87:14581465.
- Wong RC, Tse HY (eds.). 2009. *Lateral Flow Immunoassay*. Springer. e-ISBN: 978-1-59745-240-3.

C.2 e Allegato C.2

- Altshuler ML. 2006. *PCR Troubleshooting: The Essential Guide Book*. Publisher: Caister Academic Press.
- Alves RC, Barroso MF, González-García MB, et al. 2016. New Trends in Food Allergens Detection: Toward Biosensing Strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56:14, 2304-2319.
- Coisson JD, Cereti E, Garino C, et al. 2010. Microchip capillary electrophoresis (Lab-on-chip®) improves detection of celery (*Apium graveolens* L.) and sesame (*Sesamum indicum* L.) in foods. *Food Res. Int.* 43:1237-1243.
- Collier R, Dasgupta K, Xing YP, et al. 2017. Accurate measurement of transgene copy number in crop plants using droplet digital PCR. *The Plant Journal*. 90:1014-1025.
- Costa J, Fernandes TJ, Villa C, et al. 2016. Advances in Food Allergen Analysis. *Food Safety: Innovative Analytical Tools for Safety Assessment*, 305.
- D'Andrea M, Coisson JD, Travaglia F, et al. 2009. Development and validation of a SYBR-Green I real-time PCR protocol to detect hazelnut (*Corylus avellana* L.) in foods through calibration via plasmid reference standard. *J. Agric. Food Chem.* 57:11201-11208.
- D'Andrea M, Coisson JD, Locatelli M, et al. 2011. Validating allergen coding genes (Cor a 1, Cor a 8, Cor a 14) as target sequences for hazelnut detection via Real-Time PCR. *Food Chem.* 124:1164-1171.
- Di Bernardo G, Del Gaudio S, Galderisi U, et al. 2007. Comparative evaluation of different DNA extraction procedures from food samples. *Biotechnology Progress*. 23:297-301.
- Dovicovicova L, Olexova L, Pangallo D, et al. 2004. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of celery (*Apiumgraveolens*) in food. *Eur. Food Res. Technol.* 218:493-495.

- Eissa S, Zourob M. 2017. In vitro selection of DNA aptamers targeting β -lactoglobulin and their integration in graphene-based biosensor for the detection of milk allergen. *Biosensors and Bioelectronics* 91:169-174.
- Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, et al. 2013. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature methods*, 10:1003-1005.
- Holzhauser T, Stephan O, Vieths S. 2002. Detection of Potentially Allergenic Hazelnut (*Corylus avellana*) Residues in Food: A Comparative Study with DNA PCR-ELISA and Protein Sandwich-ELISA. *J. Agric. Food Chem.* 50:5808-5815.
- Huggett JF, Cowen S, Foy CA. 2015. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clinical Chemistry* 61:79-88.
- Kerbach S, Alldrick A J, Crevel RW, et al. 2009. Managing food allergens in the food supply chain—viewed from different stakeholder perspectives. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 1-1: 50-60
- Mairal T, Nadal P, Svobodova M, et al. 2014. FRET-based dimeric aptamer probe for selective and sensitive Lup an 1 allergen detection. *Biosensors and Bioelectronics* 54:207-210.
- Mullett WM, Lai EP, Yeung JM. 2000. Surface plasmon resonance-based immunoassays. *Methods*, 22:77-91.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, et al. 1992. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology* 24:17-27.
- Pafundo S, Gulli M, Marmiroli N. 2009. SYBR Green real-time PCR to detect almond in traces in processed food. *FoodChem* 116:811-815.
- Peñas E, Di Lorenzo C, Uberti F, et al. 2015. Allergenic Proteins in Enology: A Review on Technological Applications and Safety Aspects. *Molecules*. 20:13144-13164.
- Pilolli R, Monaci L, Visconti A. 2013. Advances in biosensor development based on integrating nanotechnology and applied to food-allergen management, *Trends in Analytical Chemistry* 47:12-26.
- 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, et al. 2008. Development of three real-time PCR assays to detect peanut allergen residue in processed food products. *Eur. Food Res. Technol* 227:857-869.
- Schoringhumer K, Redl G, Cichna-Markl MJ. 2009. Development and Validation of a Duplex Real-Time PCR Method To Simultaneously Detect Potentially Allergenic Sesame and Hazelnut in Food *Agric. Food Chem* 57:2126-2134.
- Stephan O, Vieths S. 2004. Development of a Real-Time PCR and a Sandwich ELISA for Detection of Potentially Allergenic Trace Amounts of Peanut (*Arachis hypogaea*) in Processed Foods. *J. Agric. Food Chem* 52:3754-3760
- UNI EN 15634-1:2009. *Prodotti alimentari - Ricerca di allergeni alimentari mediante metodi di biologia molecolare*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione

Weber P, Steinhart H, Paschke A. 2010. Characterization, antigenicity and detection of fish gelatine and isinglass used as processing aids in wines. *Food Addit Contam A* 27:273-282.

Zhang Y, Wu Q, Wei X, et al. 2017. DNA aptamer for use in a fluorescent assay for the shrimp allergen tropomyosin. *Microchimica Acta* 184:633-636.

C 3 e Allegato C 3

Abbott M, Hayward S, Ross W, et al. 2010. Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: community guidance and best practices. *J AOAC Int* 93:442-45.

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

De Angelis E, Pilolli R, Monaci L. 2017a. Coupling SPE on-line pre-enrichment with HPLC and MS/MS for the sensitive detection of multiple allergens in wine. *Food Control* 73:814-820.

De Angelis E, Pilolli R, L. Bavaro S, et al. 2017b. Insight into the gastro-duodenal digestion resistance of soybean proteins and potential implications for residual immunogenicity. *Food Funct* 8:1599-1610.

Gomaa A., Boye J.I. 2013. Impact of thermal processing time and cookie size on the detection of casein, egg, gluten and soy allergens in food. *Food Res Int* 52:483-489.

Johnson PE, Baumgartner S, Aldick T, et al. 2011. Current perspectives and recommendations for the development of mass spectrometry methods for the determination of allergens in foods. *J AOAC Int* 94 (4):1026-33.

Kerbach S, Alldrick A J, Crevel RW, et al. 2009. Managing food allergens in the food supply chain—viewed from different stakeholder perspectives. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 1-1: 50-60

Monaci L, Losito I, Palmisano F, et al. 2010a. Identification of allergenic milk proteins markers in fined white wines by capillary liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Chrom A* 1217:4300-4305

Monaci L, Norgaard JV, Broheè M, et al. 2010b. Feasibility of a capillary LC/ESI-Q-TOF MS method for the detection of milk allergens in an incurred model food matrix. *Anal Methods* 2: 967-972.

Monaci L, Van Hengel AJ. 2008. 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* 1192:113-120

Pilolli R, De Angelis E, Monaci, L. 2016. Streamlining the analytical workflow for multiplex MS/MS allergen detection in processed foods, *Food Chemistry* 221:1747-1753.

Poms RE, Klein CL, Anklam E. 2004. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food AdditContam* 21:1-31

Schneider N, Becker CM, Pischetsrieder M. 2010. Analysis of lysozyme in cheese by immunocapture mass spectrometry. *J Chrom B*. 878:201-206.

- Shelfcheck KJ, Callahan JH, Musser SM. 2006. Confirmation of peanut protein using peptide markers in dark chocolate using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J Agric Food Chem* 54:7953-7959.
- Shelfcheck KJ, Musser SM. 2004. 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* 52:2785-2790
- van Hengel AJ. 2007. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Anal Bioanal Chem* 389:111-118
- Weber D, Raymond P, Ben-Rejeb S, et al. 2006. 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*. 54:1604-1610.

C 4

- Abbott M, Hayward S, Ross W, et al. 2010. Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: community guidance and best practices. *J AOAC Int* 93:442–450.
- AOAC International 2016. Official Methods of Analysis – Appendix M. Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices. 20th Edition, AOAC INTERNATIONAL; Rockville, MD, USA.
- AOAC International 2017. Standard Method Performance Requirements for Quantitation of Chicken Egg by ELISA-Based Methods. SMPR®2017.020.
- Scaricabile da:
http://www.aoac.org/AOAC_Prod_Imis/AOAC_Docs/ISPAM/SMPR_2017.020.pdf
- AOAC International 2018. Standard Method Performance Requirements for Quantitation of Milk by ELISA-Based Methods. SMPR®2018.003. Scaricabile da:
http://www.aoac.org/AOAC_Prod_Imis/AOAC_Docs/ISPAM/SMPR_2018_003_for_Milk.pdf
- Paez V, Barrett WB, Deng X, et al. 2016. AOAC SMPR® 2016.002 Standard Method Performance Requirements for Detection and Quantitation of Selected Food Allergens. *J AOAC Int* 99:1122-1124.
- Sakai S, Adachi R, Akiyama H, et al. 2013. Validation of quantitative and qualitative methods for detecting allergenic ingredients in processed foods in Japan. *AgricFoodChem* 61:5675-80.
- UNI EN 15842:2010 Prodotti alimentari - Ricerca di allergeni alimentari - Considerazioni generali e validazione dei metodi. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione.

Allergie alimentari e sicurezza del consumatore - Documento di indirizzo e stato dell'arte Italia 2018

Per la stesura del documento hanno collaborato:

Gaetana Ferri	Direttore Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli alimenti e della Nutrizione
Marco Arlorio	Professore ordinario Chimica degli Alimenti Università degli studi del Piemonte orientale
Concetta Boniglia	Primo ricercatore Dip. di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria Istituto Superiore di Sanità (ISS)
Roberto Copparoni	Dirigente medico Ufficio Nutrizione e informazione ai consumatori DGISAN – Ministero della salute
Lucia De Castelli	Direttore Struttura Complessa Controllo Alimenti e Igiene delle Produzioni Istituto zooprofilattico sperimentale (IZS) Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta
Stefania Giammarioli	Primo ricercatore Dip. di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria Istituto Superiore di Sanità (ISS)
Donatella Macchia	Direttore SOC Allergologia Immunologia clinica, AUSL Toscana Centro, Firenze
Tomassina Mancuso	Dirigente medico U. Nutrizione e informazione ai consumatori DGISAN – Ministero della Salute
Alberto Martelli	Responsabile UOC Pediatria - Ospedale G. Salvini - Garbagnate Milanese - ASST Rhodense
Paola Minale	Rappresentante Associazione Allergologi e Immunologi territoriali e ospedalieri, Dirigente medico UO Allergologia e Immunologia. Azienda Ospedaliera San Martino Genova
Giuseppe Plutino	Direttore U. Nutrizione e informazione ai consumatori DGISAN – Ministeo della salute
Patrizia Restani	Professore ordinario di Chimica degli Alimenti - Dip. Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano
Salvatore Tripodi	Direttore UOC Pediatria e Servizio Allergologia Pediatrica - Sandro Pertini