



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE
E NATURALI

DOTTORATO DI RICERCA IN
IMMUNOLOGIA

XXI CICLO DI DOTTORATO

Impatto della qualità dell'estratto allergenico
commerciale sull'appropriatezza della diagnosi delle
patologie allergiche

Dr.ssa Barbara Brunetto

A.A. 2008/2009

Tutori: Dr.ssa Patrizia Iacovacci, Dr. Carlo Pini

Coordinatore: Prof. Paolo Rossi

1. INTRODUZIONE.....	3
1.1 EPIDEMIOLOGIA E FATTORI PREDISPONENTI ALL'ATOPIA....	4
1.2 MECCANISMI PATOGENETICI DELL'ATOPIA.....	8
1.3 ALLERGENI.....	12
1.3.1 Il problema della standardizzazione degli estratti allergenici.....	13
1.4 DIAGNOSI.....	16
1.5 TERAPIA.....	18
1.5.1 Terapia farmacologica.....	19
1.5.2 Immunoterapia specifica.....	20
1.6 ALLERGOPATIE DA ACARI.....	26
1.6.1 Allergeni degli acari.....	28
1.6.2 Caratteristiche cliniche.....	29
2. FINALITA' DEL LAVORO.....	31
3. MATERIALI E METODI.....	34
3.1 DITTE PRODUTTRICI DI ESTRATTI ALLERGENICI.....	34
3.2 DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLE PROTEINE.....	35
3.3 ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMIDE IN SODIO DODECILSOFATO (SDS-PAGE).....	36
3.4 ELISA SANDWICH.....	37
3.5 SKIN PRICK TEST (SPT).....	39
3.6 SIERI DEI SOGGETTI ALLERGICI E NORMALI.....	43
3.7 IMMUNOBLOTTING CON I SIERI DI PAZIENTI ALLERGICI.....	44
4. RISULTATI.....	46
4.1 DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLE PROTEINE.....	46

4.2 ANALISI ELETTROFORETICA DEGLI ESTRATTI DI DERMATOPHAGOIDES FARINAE E DERMATOPHAGOIDES PTERONISSINUS PROVENIENTI DALLE OTTO DIFFERENTI DITTE..	48
4.3 DOSAGGIO DEGLI ALLERGENI MAGGIORI - ELISA SANDWICH.....	52
4.4 SKIN PRICK TEST (SPT).....	56
4.5 IMMUNOBLOTTING CON ANTICORPI IGE UMANI.....	62
5. CONCLUSIONI.....	66
6. ABSTRACT	
Inglese.....	79
Italiano.....	82
7.BIBLIOGRAFIA.....	86

1. INTRODUZIONE

L'atopia o allergia è una patologia ad azione multifattoriale, il cui sviluppo è legato ad una combinazione di cause ereditarie ed ambientali.

Il tasso di prevalenza di tale patologia è stato stimato, nei paesi industrializzati, intorno al 20-30% (Nicolai 1997 et al.; Von Hertzen 1998; Antico 2000; O'Connel 2004). Gli studi epidemiologici disponibili riportano una prevalenza della rinite allergica stimabile intorno al 30% della popolazione adulta, mentre per l'asma i valori sono fra il 4% e l'11% e l'OMS ha stimato che globalmente ci sono 300 milioni di persone affette da asma (Shea et al. 2008). Per spiegare questa tendenza all'aumento sono stati chiamati in causa diversi fattori, tra cui i cambiamenti ambientali, quali il clima e l'inquinamento atmosferico (Von Mutius e Schmid 2006; Upham e Holt 2005) ed il miglioramento della sensibilità dei metodi utilizzati in diagnostica.

Le manifestazioni patologiche legate all'allergia sono una importante causa di morbilità e di mortalità e costituiscono quindi un problema di salute pubblica di rilevante entità, con elevati costi socio-economici che includono sia costi diretti (mezzi diagnostici, farmaci, ospedalizzazione e trattamenti di emergenza al pronto soccorso), che indiretti (perdita di giornate lavorative e scolastiche, costi di adattamento ambientale nei luoghi lavorativi e nelle abitazioni) (European Allergy White Paper; Schoenwetter et al. 2004).

1.1 Epidemiologia e fattori predisponenti all'atopia

Nei paesi occidentali si è osservato negli ultimi anni un incremento delle malattie allergiche respiratorie, rilevato principalmente negli individui nati intorno agli anni '60 e successivamente (Linneberg et al. 2000; Rudack et al. 2003). Circa il 20% della popolazione di queste zone è affetta da patologie allergiche quali asma, riniti, dermatiti atopiche e allergie alimentari (Burney 1997). Queste manifestazioni cliniche, in assenza di

opportuni approcci preventivi e terapeutici, possono cronicizzare, portando non solo ad un peggioramento della qualità della vita, ma talvolta anche a danni irreversibili ed esiti letali (Golden 2004; Kremer 2004).

Le manifestazioni cliniche dell'atopia sono legate a numerosi fattori, che possono essere distinti in fattori propri del soggetto (genetica, sesso, razza) e fattori ambientali (esposizione agli allergeni, inquinamento, esposizione ad infezioni batteriche, virali e parassitarie) (De Swert 1999; Holt 2004; Puc 2003; Wright 2005). L'importanza dei fattori genetici è dimostrata dal fatto che oltre il 50% dei soggetti allergici presenta una anamnesi familiare positiva per sindromi allergiche (Aubier 2000). Infatti, i figli di genitori non atopici hanno un rischio compreso tra il 9 e il 18% di sviluppare allergie, mentre questo valore aumenta al 50% nel caso di un genitore atopico e al 70% quando lo sono entrambi (Zeiger 1993; Chandra 1997; Wright 2005). In particolare, il livello delle IgE totali sembra essere geneticamente determinato, mentre la sensibilizzazione ad allergeni specifici è

notevolmente dipendente da fattori ambientali. Sesso ed età sono altre due condizioni correlate al rischio di sviluppare atopia, in associazione rispettivamente al calibro delle vie aeree e ai diversi fattori ormonali (De Marco et al. 2000; O'Connell, 2003; Osman, 2003), e alla suscettibilità per la sensibilizzazione allergica, che è particolarmente alta nei primi anni di vita (Croner e Kjellmann 1990; Sporik et al. 1990; Wills-Karp et al. 2001; Prescott 2003). Per ciò che concerne i fattori ambientali, l'esposizione protratta ad alte concentrazioni di sostanze allergizzanti rappresenta il principale fattore predisponente all'instaurarsi di allergopatie (Sears et al. 1996; Nicolai et al. 1997). È stato inoltre proposto che l'inquinamento atmosferico rappresenti un fattore adiuvante, cioè in grado di aumentare la probabilità che la sensibilizzazione allergica si instauri e si manifesti (Knox et al. 1996; Kainka-Stanicke et al. 1998; Antico 2000; Bernstein 2004). L'inquinamento atmosferico da inquinanti gassosi quali anidride solforosa (SO₂), biossido di azoto (NO₂), monossido di carbonio (CO), anidride

carbonica (CO₂), ozono (O₃), e di particelle sospese (PST), la cui fonte principale è rappresentata dal traffico automobilistico ed in particolare dai veicoli diesel (Diaz e Sanchez 1997), favorisce l'insorgenza di allergopatie respiratorie (Wardlow 1993; Takenaka et al. 1995), oltre a peggiorarne il decorso (Molfino et al. 1991; Devalia et al. 1994; Tunnicliffe et al. 1994; Jorres et al. 1996; Rusznak et al. 1996). L'inquinamento *indoor* ovvero in ambienti chiusi come abitazioni, uffici, luoghi di lavoro e di ritrovo, risale alla presenza in tali ambienti confinati sia di sorgenti allergeniche vere e proprie, di origine vegetale o animale (muffe, acari, derivati epidermici di animali domestici), sia di particolari condizioni ambientali (mobili, arredi, impianti di riscaldamento, di refrigerazione, e per la cottura dei cibi, condizioni di ventilazione, fumo di tabacco) che possono favorire la sensibilizzazione allergica. (Krzyzanowski et al. 1990; Takenaka et al. 1995; Jarvis et al. 1996; Fuhlbrigge e Weiss 1997; Garret et al. 1999).

1.2 Meccanismi patogenetici dell'atopia

Le immunoglobuline E (IgE) sono state identificate come gli anticorpi responsabili delle reazioni allergiche di tipo I (Ishizaka 1970), essendo coinvolti nelle manifestazioni cliniche dell'atopia quali rinite, asma, congiuntivite, dermatite atopica, anafilassi, in base agli organi interessati. Gli anticorpi IgE, normalmente coinvolti nella risposta immunitaria verso i parassiti, rappresentano negli individui allergici la risposta umorale verso antigeni generalmente innocui per la popolazione non atopica, gli allergeni.

Il ruolo delle IgE si realizza attraverso il legame con i recettori specifici (FcεRI) presenti sulla superficie cellulare di mastociti e basofili. Il successivo contatto dell'allergene con le IgE legate ai recettori cellulari determina, da parte delle cellule, un rilascio di mediatori in grado di indurre l'infiammazione allergica (Romagnani 1994; Romagnani 2000). Le interazioni cellulari che presiedono ai meccanismi patogenetici dell'atopia hanno

origine dall'internalizzazione e processazione dell'allergene (penetrato nell'organismo per inalazione, ingestione o attraverso la cute) da parte delle cellule che presentano l'antigene (APC), costituite principalmente dalle cellule dendritiche (Banchereau et al. 2000). In seguito avviene la migrazione delle APC verso i linfonodi regionali dove, dopo la processazione, queste cellule presentano l'antigene ai linfociti T *helper* appartenenti alla sottopopolazione Th2, che stimolano le cellule B a produrre anticorpi di isotipo IgE specifici per gli allergeni. L'altra sottopopolazione di cellule T *helper*, denominata Th1, esercita attività funzionalmente distinte, soprattutto nella risposta immune cellulo-mediata, come, ad esempio, le reazioni citotossiche, infiammatorie e di ipersensibilità ritardata. Le due sottopopolazioni Th differiscono principalmente per il profilo di citochine prodotte.

L'induzione dei linfociti B alla sintesi delle immunoglobuline in generale e quindi anche delle IgE richiede diversi segnali, tra i quali ha un ruolo primario l'interazione tra cellule che presentano l'antigene (APC),

cellule T e cellule B. Il primo segnale è costituito dall'interazione tra il TCR e il complesso antigene-molecola MHC di classe II; il contatto tra le cellule viene ulteriormente facilitato dall'interazione tra diverse molecole di superficie che forniscono un segnale co-stimolatorio, come, ad esempio, le molecole B7-1 e B7-2, espresse sulle cellule B e sulle APC, che interagiscono con il CD-28 presente sulle cellule T, o il CD40L, che interagisce con il CD40 presente sulle cellule B e sulle APC, promuovendo l'attivazione e la proliferazione delle cellule B. Oltre ai segnali derivanti dal diretto contatto tra le cellule, la secrezione di citochine da parte delle cellule T fornisce altri segnali mediati da fattori solubili. Infatti, durante l'interazione cellulare APC-T-B, le cellule T secernono diverse citochine, tra cui le più importanti per la produzione di IgE sono: l'IL-2, la cui principale azione è l'induzione di proliferazione delle cellule T stesse; l'IL-4, che agisce nelle fasi iniziali dell'attivazione e della proliferazione delle cellule B; l'IL-6, che rappresenta il

segnale più importante per la differenziazione finale delle cellule B (Abbas et al. 1996).

Successivamente alla sintesi di IgE, avviene il legame di questi anticorpi ai recettori ad alta affinità (FcεRI) presenti su mastociti e basofili. Quando le IgE adese su queste cellule entrano in contatto con l'allergene inducono, per degranolazione, il rilascio di mediatori solubili che scatenano le reazioni allergiche. I mediatori dell'anafilassi possono essere suddivisi in fattori preformati, quali istamina, serotonina, eparina, enzimi proteolitici e fattori chemiotattici (ECF-A e NCF-A), e in fattori di nuova sintesi come i leucotrieni, il fattore di aggregazione piastrinica (PAF) e le prostaglandine. I mediatori innescano una serie di reazioni che conducono alle manifestazioni cliniche dell'allergia, sia sistemiche che localizzate, agendo sulla regolazione della dilatazione e della permeabilità dei vasi distrettuali, sull'ampiezza del lume bronchiale e sulla produzione di secrezioni mucose (Costa et al. 1997).

1.3 Allergeni

Viene definito allergene una sostanza che, in seguito a particolari condizioni di esposizione, ha la capacità di indurre la produzione di IgE con concomitante sensibilizzazione allergica. Le sostanze con proprietà allergeniche possono essere di origine vegetale, animale o sintetica, come i pollini di numerose specie di piante, alimenti vegetali ed animali, epiteli, piume, acari, veleni di imenotteri e farmaci. Sono state individuate alcune caratteristiche biologiche condivise dalla maggior parte degli allergeni: natura glicoproteica, peso molecolare in genere compreso tra poche migliaia e 100.000 Da, solubilità in acqua. Questa caratteristica è alla base della loro capacità di penetrare attraverso le mucose e di agire come antigene (Aalberse 2000).

1.3.1 Il problema della standardizzazione degli estratti allergenici

Gli estratti allergenici sono soluzioni acquose complesse contenenti sia proteine allergeniche con diversa attività biologica, sia numerose altre molecole non allergeniche. Gli estratti grezzi ottenuti dalle sorgenti allergeniche costituiscono il materiale di partenza per la caratterizzazione e la purificazione dei singoli allergeni.

L'impiego in diagnosi ed immunoterapia di estratti allergenici è attualmente basato sull'uso di materiali estremamente eterogenei dal punto di vista sia del numero delle componenti presenti, sia della loro attività biologica e potenza allergenica. Risulta quindi evidente l'importanza di un processo di standardizzazione di tali estratti. Sino ad oggi, non esiste completa uniformità a livello internazionale nei requisiti di qualità e nelle norme di registrazione relative a tali prodotti, sebbene a livello europeo e mondiale gli organismi regolatori stiano promuovendo in tal senso iniziative coordinate. Nella Comunità Europea gli allergeni sono stati definiti

“*immunological medicinal products*” (Directive 2001/83/EC, medicinal product for human use) e in Italia il decreto legislativo del 24 aprile 2006, n. 219 - attuazione della direttiva 2001/83/EC (e successive modifiche) relativa ad un codice comunitario concernente i medicinali per uso umano, nonché della direttiva 2003/94/EC (GU n.142 del 21/6/2006-Suppl Ordinario n.153) - definisce gli allergeni “medicinali”. Tutti i prodotti per la diagnosi *in vivo* e per l’immunoterapia specifica dovrebbero pertanto essere soggetti a controlli di qualità esterni prima dell’immissione in commercio. In Europa attualmente tali procedure sono in vigore soltanto in alcuni paesi quali Francia e Germania, ma non in Italia.

Il controllo di qualità per le preparazioni allergeniche, come per tutti i prodotti biologici, necessita di una caratterizzazione chimico-fisica ed immunochimica, di numerosi saggi di sicurezza (tossicità, sterilità, etc.) per escludere potenziali proprietà dannose per l’organismo, e di una titolazione dell’attività allergenica sulla base di uno standard internazionale. Per trovare una soluzione alla

mancanza di standards internazionali, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e l'Unione Internazionale delle Società di Immunologia (IUIS), hanno elaborato delle direttive concernenti l'allestimento di preparazioni di riferimento (Proposed International Biological Reference Preparation, PIBRP) da sottoporre a studi collaborativi internazionali; in base al risultato di questi studi, viene scelta la preparazione di riferimento alla quale è assegnato un numero arbitrario di unità internazionali (IU) di *potency*. Essa è poi resa disponibile per i laboratori che ne facciano richiesta per calibrare in IU le proprie preparazioni di estratti allergenici, che andranno a costituire le Preparazioni di Riferimento Interne di ciascuna ditta Produttrice. Infatti, gli organismi regolatori raccomandano l'adozione, da parte di tutte le Compagnie produttrici, di tali Preparazioni di Riferimento Interne, con le quali valutare la riproducibilità tra lotti di produzione.

Permane comunque il rilevante problema relativo al fatto che le ditte produttrici utilizzano differenti metodi interni di standardizzazione e riportano i risultati ottenuti in unità

specifiche tra loro discordanti. Questo fatto comporta che i prodotti provenienti da differenti ditte non possano essere confrontati tra loro (Focke et al. 2008).

1.4 Diagnosi

Sulla base delle conoscenze sui meccanismi patogenetici delle malattie allergiche e del ruolo preminente svolto dagli anticorpi IgE, la diagnosi di queste patologie si basa su due momenti fondamentali: l'anamnesi clinica effettuata dallo specialista allergologo e la determinazione delle IgE specifiche per un determinato allergene prodotti dai soggetti sensibili, mediante saggi *in vivo* e *in vitro*.

Le tecniche diagnostiche *in vitro* comprendono, ad esempio, il RAST e l'ELISA, mentre tra le metodiche diagnostiche *in vivo* possiamo annoverare le prove cutanee (il più diffuso è lo *Skin Prick Test* o SPT) (Malling 1993; Pastorello et al. 1993) e i test di provocazione. Lo SPT si effettua deponendo una goccia di soluzione dell'allergene

sulla cute del soggetto e praticando in corrispondenza una leggera abrasione della cute. Viene usata come controllo positivo della reazione cutanea una soluzione di istamina (1 mg/ml) e come controllo negativo il diluente dell'estratto allergenico. La reazione positiva si manifesta con la formazione di un pomfo che viene poi valutato in modo semiquantitativo.

Le prove diagnostiche *in vitro* si basano sulla determinazione delle IgE sieriche specifiche verso singoli allergeni mediante saggi immunologici disponibili commercialmente, quali, ad esempio, il Radio-Allergo-Sorbent-Test (RAST) sviluppato agli inizi degli anni '80 (Adkinson 1980) e delle sue varianti più recenti (Deinhofer et al. 2004; Ebo et al. 2004). In questa categoria di test analitici l'allergene sospettato è coniugato su diversi tipi di fasi solide ottimizzate a questo scopo, e quindi posto a contatto con il siero in esame. Le IgE specifiche eventualmente presenti nel siero in esame vengono successivamente evidenziate mediante riconoscimento da parte di anticorpi anti-IgE marcati con

traccianti radioattivi, enzimatici o chemiluminescenti. La concentrazione delle IgE sieriche viene valutata grazie al confronto con uno standard ed espressa in vari sistemi di Unità con opportuni valori soglia ed eventualmente definizioni di classi di positività.

1.5 Terapia

La terapia per le patologie allergiche si basa su due differenti approcci: la terapia farmacologica, finalizzata a prevenire o a ridurre la sintomatologia legata al rilascio di mediatori da parte delle cellule effettrici, e l'immunoterapia specifica (ITS) che consiste nella somministrazione graduale al paziente di dosi via via crescenti degli allergeni verso i quali è risultato essere sensibilizzato.

1.5.1 Terapia farmacologica

La terapia farmacologica influisce a vari livelli sui differenti aspetti patogenetici che portano allo scatenamento della sintomatologia. I farmaci comunemente impiegati appartengono a tre tipologie con differenti meccanismi d'azione: gli antistaminici (de Vos 1991; Meltzer 1991; Du Buske 1996) che hanno una struttura chimica simile all'istamina e quindi sono in grado di legarsi ai recettori H1, presenti sulle cellule bersaglio, bloccandone l'attività; i corticosteroidi, in grado di inibire l'istidina-decarbossilasi, enzima che converte l'istidina in istamina, e dotati inoltre di attività inibitoria sul sistema immunitario e di attività antinfiammatoria (Indiveri 1993; Toogood 1998); il sodio cromoglicato e composti analoghi (Carlsen e Larson 1996), che agiscono attraverso la stabilizzazione delle membrane lisosomiali contenenti i mediatori chimici, e sono quindi capaci di inibire la liberazione di istamina, ma sono privi di efficacia nelle crisi allergiche in atto.

1.5.2 Immunoterapia specifica

L'immunoterapia allergene-specifica (ITS) costituisce l'unica strategia terapeutica che agisce sui meccanismi patogenetici delle sindromi allergiche sostenute da immunoreazioni IgE-mediate, la cui diagnosi eziologica appaia documentata da test cutanei positivi e/o da test sierologici dimostranti la presenza di IgE specifiche (Frew 1993; Frew 1994; Bousquet e Michel 1994; Malling 1998).

L'ITS viene definita desensibilizzazione o terapia iposensibilizzante specifica in quanto è un approccio mirato a ridurre la sensibilizzazione verso l'allergene rilevante. L'ITS può essere considerata contemporaneamente una terapia a carattere preventivo verso la progressione della gravità dei sintomi, ed una terapia specifica per il trattamento delle sindromi cliniche già instaurate (WHO POSITION PAPER 1998). Sono comunemente impiegati due principali schemi di trattamento, che generalmente prevedono somministrazioni per via sottocutanea: 1) trattamento a

breve termine, nel quale vengono somministrate dosi crescenti di estratto allergenico da ripetere annualmente per più anni consecutivi. Questo sistema è applicato prevalentemente nelle pollinosi, viene iniziato qualche mese prima della fioritura delle piante a cui il soggetto è sensibile e si conclude prima del periodo di pollinazione;

2) trattamento continuo a lungo termine, utilizzato prevalentemente nelle allergopatie non stagionali, che prevede la somministrazione di un estratto allergenico a dosi scalari, con prosecuzione del trattamento a dosi costanti, somministrando periodicamente la dose massima tollerata.

Poiché nel corso dell'ITS possono presentarsi reazioni indesiderate (locali o generalizzate), le Autorità Sanitarie Nazionali ed Europee insieme alle Società Scientifiche competenti hanno elaborato una serie di raccomandazioni per la corretta esecuzione della ITS, in condizioni controllate e da parte di personale medico specializzato (EAACI POSITION PAPER 1993, WHO POSITION PAPER 1998).

Proprio per ridurre la frequenza e l'entità degli effetti indesiderati sono state recentemente introdotte e sperimentate con successo vie di somministrazione diverse dalla classica via sottocutanea, attraverso i tessuti mucosali, come la via orale, sublinguale, inalatoria nasale o bronchiale (Frew 1994; D'Amato et al. 1995; Bousquet 2005; Passalacqua et al. 1998; Morris 1999). I settori in cui l'ITS si è dimostrata particolarmente efficace sono rappresentati dalle sindromi allergiche respiratorie (oculorinite allergica e/o asma bronchiale) indotte da allergeni inalanti (stagionali o aperiodici) e dalle sindromi da ipersensibilità a veleni di imenotteri (api, vespe, calabroni).

I meccanismi d'azione della ITS non sono stati ancora completamente chiariti, sebbene la sua efficacia sia stata ampiamente dimostrata da numerosi studi clinici (Bousquet et al. 1988; Bousquet et al. 1991; Alvarez-Cuesta et al. 1994; D'Amato et al. 1995; Abramson et al. 1995; Adkinson et al. 1997; Nelson et al. 2005; Jayasekera et al. 2007).

Le modificazioni immunologiche indotte dall'ITS consistono in una riduzione delle IgE allergene-specifiche e nella produzione di anticorpi di classe IgG (particolarmente IgG4) (Bjorksten et al. 1986; Bousquet et al. 1985; Leng et al. 1990; Macchia et al. 1991; Nakagawa 1991; Pastorello et al. 1992; Peng et al. 1992; Mastrandrea et al. 1997). La diminuita sintesi di IgE è stata messa in relazione, mediante studi *in vitro*, con l'inibizione della produzione di citochine normalmente in grado di potenziare la risposta IgE (Secrist et al. 1993; Jutel et al. 1995). Le IgG specifiche ad alta affinità per l'allergene prodotte in seguito all'ITS impediscono all'allergene di raggiungere la cellula bersaglio, a livello dell'organo di reazione, inibendo così l'attivazione mastocitaria e la liberazione dei mediatori chimici (Ortolani et al. 1984; Bousquet et al. 1985; Bousquet et al. 1988; Otsuka et al. 1991; Peng et al. 1992). Nella maggior parte dei pazienti che ottengono un beneficio clinico dall'ITS si evidenzia un iniziale aumento delle IgG, successivamente le IgG1, IgG2 e le IgG3 rimangono stazionarie o addirittura

decregono, mentre persiste e si accentua l'incremento delle IgG4 specifiche per l'allergene (Nakagawa 1991).

Altri parametri immunologici di tipo cellulare sono stati associati al positivo andamento dell'ITS, valutato in termini di miglioramento del quadro clinico, diminuzione del consumo di farmaci ad azione sintomatica, riduzione della reattività cutanea e d'organo. Tali parametri includono: la diminuzione dei livelli di IL-4 e IL-5 e l'aumento dell'IFN- γ (Secrist et al. 1993; Jutel et al. 1995), con conseguente minore reclutamento di eosinofili e mastociti (Durham et al. 1991), riduzione della capacità linfoproliferativa verso l'allergene e spostamento dei cloni di linfociti T specifici dal fenotipo Th2 a quello Th1 (Ebner et al. 1997); la riduzione dell'espressione di CD23 sulle cellule B, cioè del recettore a bassa affinità per le IgE (Fc ϵ RII), nei pazienti che traggono beneficio dall'ITS (Jung et al. 1995; Billeri et al. 1997).

Presi nel loro insieme questi dati permettono di delineare un prevalente meccanismo di azione della ITS, rappresentato essenzialmente da uno *switch* da una

prevalente risposta di tipo Th2 ad una prevalente risposta di tipo Th1 (Mohapatra 1996), e accompagnato dalla produzione di citochine di tipo inibitorio, quali l'IL-10 che sopprime la produzione di IgE e promuove quella di IgG4 (Akdis e Blaser 1999).

Importanti progressi nel campo dell'ITS sono stati realizzati negli ultimi anni e molti appaiono realizzabili in un prossimo futuro. Questi approcci mirano ad accrescere l'efficacia della terapia immunologica, riducendone il più possibile le reazioni indesiderate.

I primi riguardano soprattutto, oltre all'impiego crescente delle vie non iniettive, il miglioramento della qualità degli estratti allergenici. Le prospettive più a lungo termine, ancora in fase di sperimentazione principalmente su modelli animali, prevedono l'impiego di allergeni ricombinanti e di peptidi sintetici.

1.6 Allergopatie da Acari

Gli acari appartengono al phylum Artropodi (subphylum Chelicerati), sottoclasse Arachnida, se ne conoscono circa 30.000 specie, in particolare gli acari della polvere domestica appartengono all'ordine Astigmata (60 famiglie circa). Quelle principali sono le famiglie Pyroglyphidae, Acaridae e Glycyphagidae. I generi più comuni sono: *Dermatophagoides*, *Euroglyphus*, *Acarus*, *Tyrophagus*, *Blomia*, *Cheyletus*, *Androlaelaps*. Gli acari della polvere domestica appartengono alla famiglia Piroglifidae e le specie più rilevanti sono *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae*. I Piroglifidi rappresentano infatti il 70-92% degli acari presenti nella polvere raccolta dal pavimento ed oltre il 90% di quelli presenti nel materasso (Maroli et al. 1995).

Il *Dermatophagoides pteronyssinus* e il *Dermatophagoides farinae* sono quindi senz'altro le specie più diffuse e maggiormente studiate. Da un punto di

vista pratico, la reattività crociata tra le due specie è così elevata che le due fonti allergeniche sono sostanzialmente non distinguibili. La caratterizzazione degli allergeni da acaro ha consentito di capire come alle fonti propriamente associate all'acaro *per se* vadano associate le feci che l'acaro stesso libera nell'ambiente e che mostrano un elevato contenuto di molecole allergenicamente importanti. Gli acari, unitamente alle loro spoglie ed escrementi sono abbondanti in materassi, poltrone, tappeti ed altre suppellettili domestiche, ma sono comunemente riscontrati anche in ambienti di lavoro. Si possono così verificare anche negli uffici quei fattori favorenti lo sviluppo e la diffusione di allergeni da acaro tipici delle abitazioni.

Oggi, gli acari sono riconosciuti come la causa più comune di allergie in tutto il mondo, più del 50% dei soggetti allergici è sensibilizzato a questa fonte.

1.6.1 Allergeni degli acari

Gli allergeni di *D. pteronyssinus* e *D. farinae* comprendono proteine o glicoproteine che mostrano un'ampia cross-reattività. Sono stati identificati 19 differenti gruppi di allergeni appartenenti agli acari (Thomas et al. 2004), alcuni dei quali sono anche stati caratterizzati a livello molecolare. Gli allergeni degli acari della polvere appartengono a differenti classi di proteine, dagli enzimi e proteasi, alle proteine dei muscoli o del citoscheletro (Thomas 2004; Weghofer et al. 2008). Gli allergeni maggiori (cioè quegli allergeni riconosciuti dalle IgE di almeno il 50% dei soggetti allergici) delle specie *Dermatophagoides pteronyssinus* e *D. farinae*, sono Der p 1 e Der f 1, glicoproteine con peso molecolare di 25 kD presenti essenzialmente nelle feci, e Der p 2 e Der f 2 con peso molecolare di 14 kD, derivanti dal corpo dell'acaro. Inoltre nel corso del 3rd *International Workshop on Indoor Allergens and Asthma* sono stati proposti dei valori soglia che stabiliscono dei limiti al di sopra dei quali si corre il rischio di sviluppare una sensibilizzazione allergica

oppure lo scatenamento della sintomatologia per coloro che sono già sensibilizzati. Questi valori corrispondono a 2 µg di allergene del gruppo 1 (Der p 1 o Der f 1) per grammo di polvere, come valore soglia teorico per la sensibilizzazione allergica, e 10µg/grammo di polvere, per l'insorgenza di attacchi acuti di asma (Platts-Mills TA et al. 1997).

1.6.2 Caratteristiche cliniche

Dall'analisi delle caratteristiche cliniche dei pazienti allergici agli acari emerge come le affezioni con le quali la patologia si manifesta più frequentemente siano la rinite e l'asma bronchiale entrambe definite "perenni" in accordo con la continuità dei sintomi durante tutto l'anno. La rinite ad andamento discontinuo con episodi prevalenti in periodo autunnale rappresenta sempre il quadro di esordio clinico dell'allergia agli acari. La progressione verso un quadro di rinite ad andamento subcontinuo e poi continuo può verificarsi in tempi spesso ridotti (anche 1-2 anni) ed è in funzione del livello di esposizione agli

allergeni degli acari. In media in circa il 30-40% dei casi si assiste ad una ulteriore evoluzione verso un interessamento delle strutture bronchiali, con forme iniziali di asma episodico fino a quadri di notevole gravità dei sintomi. In questa fase il perpetuarsi della sintomatologia sostenuta da un aumento dell'iper-reattività bronchiale sarebbe sempre legato alla continua esposizione a livelli elevati di allergeni acaridici (Maroli et al. 1995).

2. FINALITA' DEL LAVORO

Nella parte introduttiva è stata discussa l'importanza delle malattie allergiche, il loro incremento negli ultimi anni e il conseguente interesse, anche da un punto di vista socio-sanitario, per la diagnosi e la immunoterapia specifica di tali patologie. Come conseguenza, sempre maggiore interesse va assumendo la valutazione della qualità delle preparazioni allergeniche che vengono usate in diagnosi e terapia.

L'analisi della sensibilizzazione ad uno specifico allergene, sia tramite SPT (*Skin Prick Test*), sia con metodi *in vitro* per valutare la presenza di IgE specifiche, è uno strumento primario nella diagnosi allergologica. Per effettuare una diagnosi corretta è fondamentale che l'estratto allergenico applicato contenga una quantità adeguata di tutte le componenti allergeniche rilevanti. Inoltre, la qualità degli estratti allergenici dovrebbe essere identica tra differenti produttori. D'altra parte, la preparazione di estratti allergenici di alta qualità è un

obiettivo difficile. Le Agenzie regolatorie di diversi paesi europei hanno cominciato a chiedere alle aziende produttrici il dosaggio dei livelli di allergene maggiore nei loro prodotti e ci si attende che, in un prossimo futuro questo diventi un requisito per la registrazione. In Europa i produttori riportano la *potency* degli estratti allergenici in unità determinate in base ad uno standard interno della ditta (*in house reference standard*, IHRS), rendendo più difficoltoso comprendere sia l'esatta dose utilizzata sia confrontare la *potency* di estratti prodotti da ditte differenti.

In campo internazionale, sarebbe opportuno esprimere la *potency* di un estratto in microgrammi di allergene maggiore (Van Ree et al. 2005) poiché questo valore sembra correlare con tutti i parametri biologici.

Il nostro studio è stato intrapreso nell'ambito di un progetto di ricerca finanziato dall'AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco) avente come obiettivo la valutazione della qualità degli estratti utilizzati per la diagnosi di patologie allergiche che sono in commercio sul mercato italiano. Le

ditte produttrici sono state informate sull'obiettivo di tale progetto e sono state ufficialmente invitate a contribuire allo studio mediante l'invio del proprio materiale per la diagnosi *in vivo* insieme ad una serie di informazioni sui processi di produzione del materiale stesso. Gli estratti allergenici che abbiamo richiesto sono quelli relativi agli acari (*Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae*), poiché questi rappresentano una delle più importanti fonti allergeniche a livello mondiale.

L'obiettivo di questo studio è dunque quello di effettuare un confronto mediante metodi *in vitro* ed *in vivo* tra gli estratti per la diagnosi di allergia agli acari provenienti da otto importanti ditte Europee, al fine di valutare la qualità di tali estratti e la presenza di eventuali differenze. In secondo luogo, qualora fosse stata riscontrata una certa eterogeneità tra gli estratti stessi, ci si proponeva di valutare l'impatto di questa eterogeneità sulla appropriatezza diagnostica.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Ditte produttrici di estratti allergenici

Per realizzare il nostro studio sono state contattate dieci aziende produttrici di estratti allergenici che vendono i loro prodotti in Italia. Le aziende sono state informate riguardo all'obiettivo che si proponeva questo studio finanziato dall'Agenzia Italiana del Farmaco ed è inoltre stato sottolineato che la partecipazione era su base volontaria. Alle aziende che hanno deciso di aderire allo studio è stato richiesto di fornirci il materiale da loro prodotto per la diagnosi *in vivo* delle allergie da *D. farinae* e *D. pteronyssinus*. I prodotti da noi ricevuti sono stati codificati, come previsto dal *transfer agreement*, infatti nel presente lavoro le aziende vengono identificate tramite un codice (es. ditte da 1 a 8) e non vengono mai citate per nome.

3.2 Determinazione quantitativa delle proteine

Il contenuto proteico totale dei diversi estratti è stato determinato utilizzando il metodo di Bradford (Bradford 1976). Per la curva standard è stata utilizzata la BSA (BIO-RAD Laboratories, Richmond, California, USA) in un intervallo di concentrazioni che andava da 1µg/ml a 25µg/ml. Il metodo è stato convalidato seguendo le linee guida dell'EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) CPMP/ICH/381/95 e CPMP/ICH/281/95 per ciò che concerne l'accuratezza, la precisione, la specificità, la linearità e il range. Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte e ogni punto è stato testato in doppio. La deviazione standard (SD) e il coefficiente di variazione (CV) sono stati calcolati utilizzando il programma GraphPad PRISM (Versione 4).

3.3 Elettroforesi su gel di poliacrilamide in sodio dodecilosfato (SDS-PAGE)

L'elettroforesi è stata effettuata utilizzando la strumentazione e i reagenti della ditta BIO-RAD (BIO-RAD Laboratories, Richmond, California, USA). I gel di poliacrilamide di cm 7.3 x 8.3 sono stati preparati ad una concentrazione del 4% nello stacking gel e del 15% nel separating gel, seguendo il metodo di Laemmli (Laemmli 1970) con alcune modifiche. La corsa elettroforetica è stata effettuata a corrente costante di 15 mA nello stacking gel e di 30 mA nel separating gel, in TRIS-glicina-sodio-dodecil-solfato (SDS) (0.025 M TRIS, 0.192 M glicina, 0.1% SDS, pH 8.2). In parallelo ai campioni da esaminare è stata sottoposta ad elettroforesi una miscela delle seguenti proteine, quali marcatori di peso molecolare (BIO-RAD, SDS-PAGE *Low Molecular Weight Standards*): lisozima (14.4 kDa), tripsina di semi di soia (21.5 kDa), anidrasi carbonica (31 kDa), ovoalbumina (45 kDa), albumina di siero bovino (66.2 kDa), fosforilasi B (97.5 kDa). Dopo l'elettroforesi, le proteine separate nel

gel sono state evidenziate mediante colorazione con Coomassie Blue R-250.

Per l'analisi in SDS-PAGE, 15 µl di ogni estratto sia di *Dermatophagoides farinae* sia di *Dermatophagoides pteronyssinus* sono stati miscelati con pari volume di tampone riducente (Laemmli Sample Buffer e 2-mercaptoetanol nella proporzione di 19:1, BIO-RAD Laboratories). I campioni così preparati, sono stati incubati a 95°C per dieci minuti e quindi depositi in ciascun pozzetto del gel.

3.4 ELISA sandwich

Per valutare la concentrazione degli allergeni maggiori nei singoli estratti sono stati utilizzati i kit ELISA della Indoor Biotechnologies (Charlottesville, VA, USA). Questi kit si avvalgono dell'uso di anticorpi monoclonali specifici per gli allergeni maggiori Der f 1, Der p 1, Mite group 2. Per la realizzazione dei saggi sono state usate le piastre ELISA della Maxi Sorp (NUNC, Roskilde, Danimarck). Per la fase

di adsorbimento le piastre sono state incubate con gli anticorpi monoclonali specifici (6A8, 5H8 e 1D8 per Der f 1, Der p 1, Mite group 2 rispettivamente) diluiti 1/1000 (a partire da una concentrazione iniziale di 2 mg/ml) in tampone carbonato-bicarbonato a pH 9.6, con un volume pari a 100 µl per pozzetto, per una notte a + 4 °C. I pozzetti sono stati successivamente lavati per tre volte con PBS + 0.05% v/v tween 20 a pH 7.4 (PBS/T) e successivamente bloccati con PBS/T-BSA 1% w/v per 30 minuti. Dopo tre lavaggi sono stati aggiunti 100 µl di standard diluiti al raddoppio da 250 a 0.49 ng/ml e i campioni (estratti allergenici) sono stati analizzati alle seguenti diluizioni: 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000 (per effettuare le diluizioni è stato utilizzato il PBS/T), è stata quindi effettuata un'incubazione di un'ora a temperatura ambiente. I pozzetti sono stati lavati tre volte con il tampone PBS/T e si è poi proceduto ad un'incubazione di un'ora a temperatura ambiente con 100 µl di anticorpo monoclonale specifico coniugato con biotina e diluito 1/1000 in 1% BSA-PBS-T. Dopo ulteriori

tre lavaggi sono stati aggiunti 100 µl di streptavidina perossidasi ed è stata effettuata una incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente. Successivamente ai lavaggi si è proceduto allo sviluppo della piastra tramite ABTS (BIO-RAD Laboratories) e successiva lettura allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 405 nm.

Per ogni estratto sono state effettuate tre repliche in giorni distinti. Lo standard è stato dosato in triplicato. I campioni sono stati provati in sei diluizioni diverse, al raddoppio, e dosati in triplicato.

3.5 Skin Prick Test (SPT)

Per valutare l'attività allergenica dei singoli estratti *in vivo* sono stati effettuati degli SPT su pazienti allergici agli acari. I soggetti selezionati per effettuare il test erano dieci persone con storia di allergia agli acari già nota. Tutti i soggetti erano allergici ad entrambi i gruppi di acari, ma poiché ogni estratto è stato saggiato in doppio (gli estratti delle ditte da 1 a 4 sono stati saggiati in doppio sul braccio destro quelli da 5 a 8 in doppio sul braccio sinistro in ogni

paziente), cinque soggetti sono stati sottoposti al test utilizzando gli otto estratti di *D. farinae* e gli altri cinque utilizzando gli otto estratti di *D. pteronyssinus*. L'istamina è stata utilizzata come controllo positivo, mentre come controlli negativi sono state utilizzate le soluzioni in cui si trovavano gli estratti (50% v/v glicerolo/acqua o 0.5% v/v fenolo diluito in acqua). Lo SPT è stato realizzato in cieco, l'identità dei prodotti da provare era infatti sconosciuta ai clinici che hanno effettuato il test. I parametri rilevanti nell'analisi dei pomfi, sono il diametro e l'area del pomfo stesso. Dalla letteratura è reso noto che vengono considerati come reazioni positive all'estratto quelle che danno luogo ad un pomfo con diametro ≥ 3 mm e area ≥ 7 mm² (Dreborg 2001; Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology 1989, European Academy of Allergology and Clinical Immunology 1993). Dopo venti minuti dall'applicazione dell'estratto sulla cute è stata delineata con la penna la circonferenza di ogni pomfo e trasferita su scotch per poter così archiviare il risultato sugli appositi

moduli (Fig. 1). Da questi è stato calcolato il diametro (a mano, facendo la media tra il diametro maggiore ed il diametro minore), e l'area (calcolata tramite il software Quantity One della Bio-Rad dopo acquisizione al densitometro GS-700 Bio-Rad).

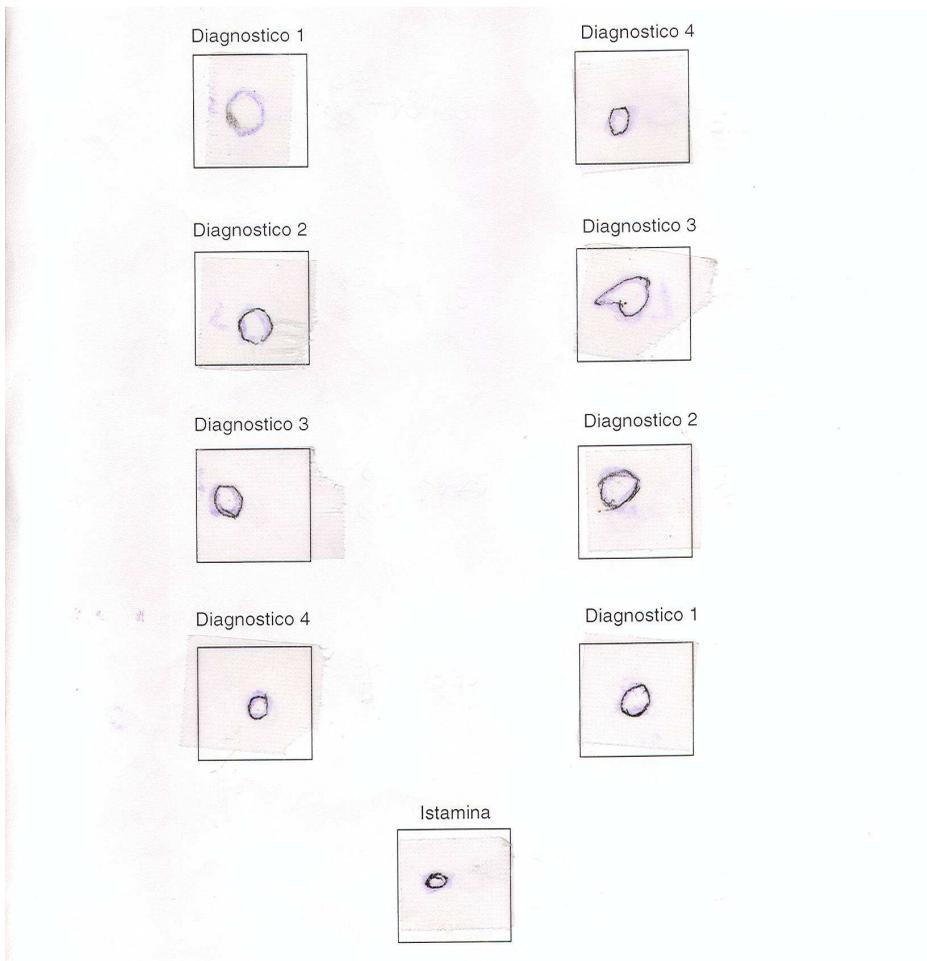


Fig. 1 Skin Prick Test. Modulo per la raccolta e il calcolo dei parametri standardizzati (diametro e area) per la valutazione della positività in SPT.

3.6 Sieri dei soggetti allergici e normali

I sieri impiegati nello studio sono stati ottenuti sia da pazienti allergici agli acari, come determinato precedentemente dal Medico Specialista Allergologo sia attraverso la storia clinica e la positività al test cutaneo (SPT), sia tramite i test *in vitro* per la rilevazione delle IgE specifiche (CAP System, Pharmacia & Upjohn, Uppsala, Sweden). Tutti i soggetti non avevano effettuato immunoterapia specifica e al momento dei prelievi non erano sottoposti a terapia farmacologica.

I sieri impiegati nello studio sono stati ottenuti dagli stessi pazienti sottoposti allo SPT in questo studio per valutare l'attività degli estratti *in vivo*.

I sieri normali, utilizzati come controlli negativi, sono stati prelevati da soggetti definiti sani sulla base della loro negatività per storia clinica, SPT e test *in vitro*.

Dopo il prelievo tutti i sieri sono stati aliquotati e conservati a + 4 °C fino all'uso. Da tutti i soggetti è stato ottenuto il consenso informato all'impiego del loro campione di siero negli studi descritti.

3.7 Immunoblotting con i sieri di pazienti allergici

Per l'analisi in immunoblotting è stata seguita la procedura descritta da Towbin (Towbin et al. 1979) effettuando qualche piccola modifica. Le proteine separate mediante SDS-PAGE, sono state elettroforeticamente trasferite su membrana di PVDF (Amersham Hybond-P, GE Healthcare, Buckinghamshire UK). Il trasferimento è stato effettuato a corrente costante di 55 mA, in tampone 0.025 M TRIS, 0.192 M glicina, 20% metanolo, per tutta la notte. Successivamente la membrana è stata saturata con blocking reagent al 5% (Amersham, GE Healthcare) w/v in PBS + 1% Tween v/v (PBS-T 1%), pH 7.5, per un'ora a temperatura ambiente sotto lenta oscillazione, e successivamente lavata due volte con PBS/T1%. La membrana è stata quindi incubata con i sieri umani, diluiti 1:10 in PBS-T 1%, per un'ora a temperatura ambiente e sotto lenta agitazione.

Dopo sei lavaggi in PBS-T, la membrana è stata incubata per un'ora a temperatura ambiente sotto lenta oscillazione

con un anticorpo anti-IgE umane coniugato con HRP (BioSource, Invitrogen, California, USA) e diluito 1:10000 in PBS/T. Per il rilevamento del legame sono state miscelate le due soluzioni (Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare) denominate soluzione di rilevamento A e B nel rapporto 40:1. L'incubazione è stata effettuata con la soluzione di rilevamento così ottenuta, per 5 minuti a temperatura ambiente. La membrana è stata quindi trasferita nella cassetta per autoradiografia. Le lastre per autoradiografia Amersham Hyperfilm ECL (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) sono state incubate con la membrana per 30 secondi e successivamente trattate con le soluzioni di sviluppo e fissaggio della Kodak (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

4. RISULTATI

4.1 Determinazione quantitativa delle proteine

I risultati dell'analisi in Bradford, sia per quanto riguarda il *Dermatophagoides pteronyssinus* che il *Dermatophagoides farinae*, hanno messo in evidenza una notevole variabilità tra gli estratti delle diverse ditte. Infatti nel caso del *D. pteronyssinus* risulta che la quantità di proteine varia da 27,7 µg proteine/ml di estratto (ditta 7) a 361,1 µg proteine/ml di estratto (ditta 5). Analogamente per il *D. farinae* la concentrazione proteica varia da 20,3 µg/ml (ditta 7) a 353,0 µg/ml (ditta 5) (Tabella 1).

	<i>D. pteronyssinus</i> Media* (CV%) (+/-SD)	<i>D. farinae</i> Media* (CV%) (+/-SD)
Ditta 1	258,5 (1.6%) (+/-4,1)	326,0 (0.7%) (+/-2,2)
Ditta 2	253,0 (1.3%) (+/-3,4)	84,9 (7.5%) (+/-6,3)
Ditta 3	63,8 (6.1%) (+/-3,9)	28,4 (1.9%) (+/-0,5)
Ditta 4	180,5 (0.3%) (+/-0,5)	191,6 (1.2%) (+/-2,3)
Ditta 5	361,1 (1.8%) (+/-6,4)	353,0 (3.0%) (+/-10,5)
Ditta 6	99,8 (9.0%) (+/-9,0)	73,2 (1.5%) (+/-1,1)
Ditta 7	27,7 (20.4%) (+/-5,7)	20,3 (6.8%) (+/-1,4)
Ditta 8	154,8 (3.9%) (+/-6,1)	167,7 (1.6%) (+/-2,8)

Tab. 1 Risultati del dosaggio delle proteine totali negli estratti di *D. pteronyssinus* e *D. farinae* di otto ditte Europee. *I risultati sono espressi in µg di proteina/ml di estratto (dosaggio Bradford OD 595). Volumi dosati: 50 µl per campione. I risultati sono la media di tre differenti determinazioni.

4.2 Analisi elettroforetica degli estratti di *Dermatophagoides farinae* e *Dermatophagoides pteronyssinus* provenienti dalle otto differenti ditte

Per effettuare un confronto tra gli estratti forniti dalle differenti ditte, gli stessi sono stati analizzati in parallelo in SDS-PAGE. In Figura 2 è mostrato il quadro elettroforetico degli otto estratti di *Dermatophagoides pteronyssinus* e in Figura 3 quello di *Dermatophagoides farinae*. Dati presenti in letteratura hanno confermato che un estratto completo di *Dermatophagoides* spp. è costituito da una serie di componenti di diverso peso molecolare, 19 delle quali sono stati riconosciute come allergeni (Thomas et al. 2004). Dall'analisi degli esperimenti in SDS-PAGE si può osservare come l'intensità delle specifiche componenti vari da estratto ad estratto e come in alcuni estratti, sia di *D. pteronyssinus* sia di *D. farinae*, certe componenti siano del tutto assenti. Comunque, in linea generale, i campioni di *D.*

pteronyssinus e di *D. farinae* provenienti dalla stessa azienda si sono dimostrati piuttosto simili.

Gli estratti di *D. pteronyssinus* prodotti dalle ditte 1, 2 e 5 mostrano una intensità tra loro confrontabile, mentre nel caso dell'estratto 8, sebbene siano presenti tutte le bande presenti negli estratti sopra citati, le singole componenti mostrano una minore intensità. Gli estratti 3, 6 e 7 mostrano una intensità tra loro confrontabile, ma le componenti allergeniche appartenenti ai gruppi 2 e 5 sono assenti negli estratti 6 e 7. Il profilo elettroforetico dell'estratto 4 sembrerebbe differente da tutti gli altri e mostra una componente intorno ai 66-68 kDa.

Per ciò che concerne gli estratti di *D. farinae*, quelli provenienti dalle ditte 1 e 5 hanno intensità confrontabili, lo stesso si può dire degli estratti 2 e 8, per ciò che riguarda gli estratti 3, 6 e 7 si può osservare come questi abbiano una intensità tra loro confrontabile sebbene siano assenti le componenti dei gruppi 2 e 5. Anche in questo caso l'estratto prodotto dalla ditta 4 ha una banda prevalente a 66-68 kDa.

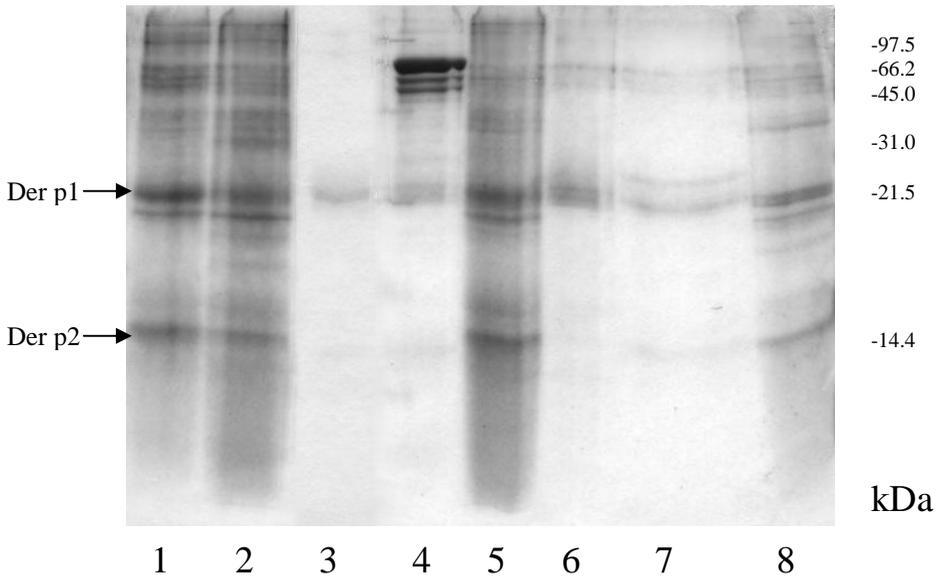


Fig.2 Quadro elettroforetico degli estratti di *Dermatophagoides pteronyssinus* provenienti da otto differenti ditte.

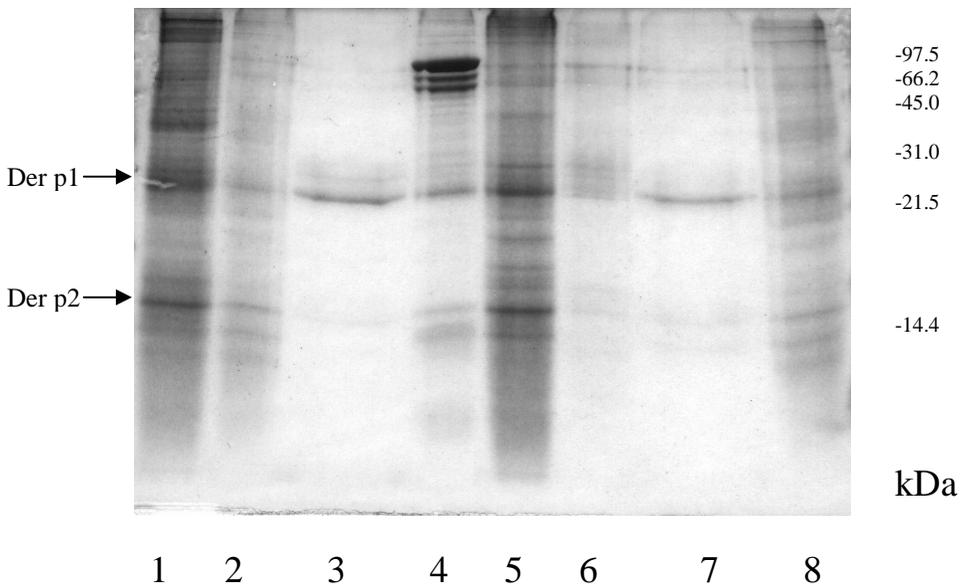


Fig.3 Quadro elettroforetico degli estratti di *Dermatophagoides farinae* provenienti da otto differenti ditte.

Quindi, in generale, possiamo affermare che gli allergeni di gruppo 1 (Der p1 e Der f1, 25 kDa) anche se in concentrazioni molto variabili da ditta a ditta sono presenti in tutti gli estratti analizzati, per gli allergeni di gruppo 2 (Der p2 e Der f2, 14 kDa) la banda relativa a questo allergene non è percettibile negli estratti delle ditte 3, 6 e 7. Per quello che riguarda le altre componenti la situazione è ancora più eterogenea. La banda intorno ai 66-68 kDa presente negli estratti sia di *D. pteronyssinus* che di *D. farinae* provenienti dalla ditta 4 non è un allergene degli acari e, in base a dati presenti in letteratura, presumibilmente rappresenta la sieralbumina.

4.3 Dosaggio degli allergeni maggiori - ELISA sandwich

L'utilizzo di appositi kit ELISA sandwich ci ha permesso di valutare in parallelo, e quindi di confrontare,

la concentrazione degli allergeni maggiori all'interno dei diversi estratti. Dall'analisi relativa agli allergeni del gruppo 1 è emerso che negli estratti di *D. pteronyssinus* la concentrazione di Der p 1 varia da 9.6 a 36.2 µg/ml (Tab.2), mentre per quello che riguarda gli estratti di *D. farinae* i dati mostrano concentrazioni di Der f 1 distribuite in un intervallo che va da 26.5 a 196.1 µg/ml (Tab. 2).

Per ciò che concerne gli allergeni del gruppo 2 abbiamo osservato come negli estratti di *D. farinae*, Der f 2 sia riscontrabile in concentrazioni che variano da 1.3 a 10.4 µg/ml (Tab. 3). Mentre negli estratti di *D. pteroyissinus* la concentrazione di Der p 2 ha un intervallo più ampio che va da 0.7 a 31.7 µg/ml (Tab. 3).

	Dosaggio del Der f 1 nel Dermatophagoides farinae*	Dosaggio del Der p 1 nel Dermatophagoides pteronissinus*
Ditta 1	122.9 (+/-17.3)	36.2 (+/-5.7)
Ditta 2	36.5 (+/-3.8)	9.6 (+/-1.7)
Ditta 3	196.1 (+/-7.7)	-
Ditta 4	115.7 (+/-26.9)	12.2 (+/-2.4)
Ditta 5	190.4 (+/-26.5)	22.6 (+/-2.3)
Ditta 6	59.1 (+/-1.7)	20.4 (+/-2.8)
Ditta 7	114.0 (+/-11.1)	12.8 (+/-2.2)
Ditta 8	26.5 (+/-6.8)	15.7 (+/-2.1)

Tab. 2 Risultati del dosaggio degli allergeni maggiori del gruppo 1. I risultati sono espressi in µg/ml (dosaggio ELISA OD 405 nm).

	Dosaggio del Der f 2 nel Dermatophagoides farinae*	Dosaggio del Der p 2 nel Dermatophagoides pteronissinus*
Ditta 1	3.8 (+/-1.1)	31.7 (+/-7.6)
Ditta 2	3.3 (+/-0.5)	8.5 (+/-1.0)
Ditta 3	1.3 (+/-0.2)	6.1 (+/-0.01)
Ditta 4	2.9 (+/-1.1)	1.3 (+/-0.1)
Ditta 5	10.4 (+/-2.1)	23.4 (+/-1.0)
Ditta 6	1.5 (+/-0.2)	0.7 (+/-0.1)
Ditta 7	2.0 (+/-0.2)	2.4 (+/-0.7)
Ditta 8	4.0 (+/-0.4)	2.6 (+/-0.3)

Tab. 3 Risultati del dosaggio degli allergeni maggiori del gruppo 2. I risultati sono espressi in $\mu\text{g/ml}$ (dosaggio ELISA OD 405 nm).

4.4 Skin Prick Test (SPT)

Al fine di valutare l'attività allergenica dei singoli estratti *in vivo* sono stati effettuati gli Skin Prick Test. Per questa ragione sono stati richiamati, presso i medici allergologi, soggetti con storia di allergia agli acari precedentemente diagnosticata. Cinque soggetti sono stati analizzati con gli otto estratti di *D. farinae* e cinque soggetti con gli otto di *D. pteronyssinus*. Dopo aver registrato i risultati dello SPT come precedentemente descritto in “Materiali e Metodi”, abbiamo proceduto al calcolo del diametro dei pomfi dei pazienti manualmente e dell'area tramite acquisizione con il densitometro. In tabella 4 sono mostrate le medie dei diametri (poiché ogni valore è la media di due determinazioni) dei pomfi dei cinque pazienti valutati con il *D. farinae* e in tabella 5 le medie delle aree dei pomfi stessi. Gli analoghi dati ottenuti dai pomfi dei cinque soggetti testati con il *D. pteronyssinus* sono mostrate in Tab. 6 e 7. Per ciascun paziente, sia la media del diametro che la media dell'area dei singoli estratti varia con

l'estratto utilizzato, per cui la reattività di tali estratti è estremamente eterogenea. Come è mostrato nelle tabelle 4, 5, 6 e 7, in 2 pazienti analizzati con il *D. farinae* e in 4 pazienti con il *D. pteronyssinus*, alcuni estratti danno una reazione inferiore alla soglia standard di positività per cui devono essere ritenuti negativi.

<i>D. farinae</i>	CE 478/06	TM 50/07	DS 140/02	GL 1992/07	DG 1533/05
	Diametro (mm) media	Diametro (mm) media	Diametro (mm) media	Diametro (mm) media	Diametro (mm) media
Istamina braccio Dx	5	3.5	4.5	4.0	6.0
Ditta 1	10.2	7.5	9.0	2.7	10.2
Ditta 2	9.1	5.2	7.5	3.8	6.1
Ditta 3	10.1	2.6	5.4	3.7	6.2
Ditta 4	8.0	4.0	9.5	1.1	6.3
Istamina braccio Sx	4.5	3.7	4.7	3	6.7
Ditta 5	11.2	3.2	8.1	1.2	7.7
Ditta 6	7.5	0.5	6.8	1.5	7.0
Ditta 7	7.2	3.1	5.6	1.2	8.3
Ditta 8	9.1	4.8	7.9	2.6	6.5

Tab. 4 Risultati dello SPT effettuato con *D. farinae*.

In tabella sono riportati le medie dei diametri dei pomfi dei cinque pazienti valutati con gli otto estratti relativi a *D. farinae*. Sono da considerarsi positivi i pomfi con diametro ≥ 3 mm. I valori sotto la soglia standard per la positività sono evidenziati dal carattere grassetto.

<i>D. farinae</i>	CE 478/06	TM 50/07	DS 1404/02	GL 1992/07	DG 1533/05
	Area (mm ²) Media				
Istamina braccio Dx	21.5	9.3	13.2	11.4	27.7
Ditta 1	68.1	47.6	53.6	10.4	80.6
Ditta 2	68.7	21.4	50.2	11.0	33.0
Ditta 3	63.2	7.0	23.1	9.9	31.0.
Ditta 4	50.4	12.0	76.8	2.25	35.7
Istamina braccio Sx	19.5	7.7	14.9	7.3	36.6
Ditta 5	104.3	12.7	49.3	3.10	60.1
Ditta 6	48.9	0.7	37.7	4.2	52.5
Ditta 7	43.7	9.5	29.2	1.6	61.3
Ditta 8	77.2	18.0	47.9	6.0	39.1

Tab. 5 Risultati dello SPT effettuato con *D. farinae*.

In tabella sono riportati le medie delle aree dei pomfi dei cinque pazienti valutati con gli otto estratti relativi a *D. farinae*. Sono da considerarsi positivi i pomfi con un'area ≥ 7 mm². I valori sotto la soglia standard per la positività sono evidenziati dal carattere grassetto.

<i>D.pteronyssinus</i>	FS 882/06	MI 1124/00	CP 599/03	GA 751/03	PV 322/07
	Diametro (mm) media	Diametro (mm) media	Diametro (mm) media	Diametro (mm) media	Diametro (mm) media
Istamina braccio Dx	3.5	3.2	3.5	6.0	4.0
Ditta 1	4.7	6.6	5.2	5.2	5.6
Ditta 2	3.7	7.0	7.1	1.0	5.6
Ditta 3	4.1	7.6	5.5	3.5	3.6
Ditta 4	2.6	4.1	5.0	1.0	1.7
Istamina braccio Sx	6.0	4.2	3.5	3.5	4.2
Ditta 5	4.2	7.3	6.2	4.2	5.6
Ditta 6	3.8	6.0	2.7	2.5	4.5
Ditta 7	4.0	6.3	0.0	1.7	2.0
Ditta 8	4.3	9.3	4.5	2.8	5.45

Tab. 6 Risultati dello SPT effettuato con *D. pteronyssinus*. In tabella sono riportati le medie dei diametri dei pomfi dei cinque pazienti valutati con gli otto estratti relativi a *D. pteronyssinus*. Sono da considerarsi positivi i pomfi con diametro ≥ 3 mm. I valori sotto la soglia standard per la positività sono evidenziati dal carattere grassetto.

<i>D. pteronyssinus</i>	FS 882/06	MI 1124/00	CP 599/03	GA 751/03	PV 322/07
	Area (mm ²) media				
Istamina braccio Dx	11.5	6.15	9.5	23.3	12.6
Ditta 1	21.3	29.7	30.0	23.2	28.3
Ditta 2	11.7	36.9	44.1	2.25	26.7
Ditta 3	14.7	38.1	24.2	12.6	11.1
Ditta 4	6.4	13.7	23.6	1.3	3.5
Istamina braccio Sx	25.7	13.8	14.4	7.4	16.6
Ditta 5	16.5	41.8	25.9	15.6	29.2
Ditta 6	10.2	24.8	6.9	6.9	14.9
Ditta 7	17.3	36.9	0.0	5.0	6.6
Ditta 8	19.0	63.5	17.5	11.5	24.1

Tab. 7 Risultati dello SPT effettuato con *D. pteronyssinus*. In tabella sono riportati le medie delle aree dei pomfi dei cinque pazienti valutati con gli otto estratti relativi a *D. pteronyssinus*. Sono da considerarsi positivi i pomfi con un'area ≥ 7 mm². I valori sotto la soglia standard per la positività sono evidenziati dal carattere grassetto.

4.5 Immunoblotting con anticorpi IgE umani

La reattività allergenica dei sedici estratti in esame (otto di *D. pteronyssinus* e otto di *D. farinae*) è stata saggiata in immunoblotting utilizzando i sieri dei pazienti allergici precedentemente sottoposti allo Skin Prick Test.

In base ai risultati ottenuti abbiamo deciso di riportare due situazioni esemplificative nelle Figure 4 e 5. Per ciò che riguarda le ditte 1, 2, 5, 8 quasi tutti gli allergeni delle due specie di *Dermatophagoides spp* sono stati riconosciuti dal paziente CP 599/03 (Figura 4), sebbene si manifesti una maggiore reattività con l'estratto della ditta 1. Le ditte 6 e 7, che in SPT avevano mostrato un risultato negativo non mostrano alcuna reattività verso gli allergeni maggiori (gruppo 1 e 2).

In Figura 5 è mostrata la reattività del siero del paziente MI 1124/00 che ha una prevalente reattività verso l'allergene maggiore di gruppo 2. Questa componente viene infatti riconosciuta dagli estratti provenienti dalle



Fig. 4 Immunoblotting. Il siero del paziente CP 599/03 mostra una reattività completa riconoscendo la maggior parte degli allergeni appartenenti alle *Dermatophagoides spp.* sebbene sia presente una certa eterogeneità dovuta all'estratto utilizzato.

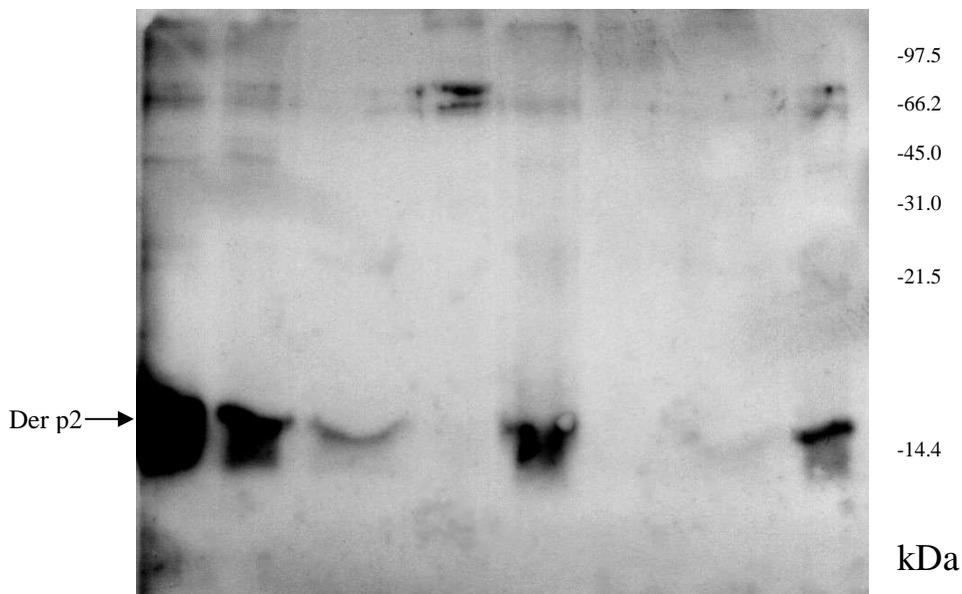


Fig. 5 Immunoblotting. Il siero del paziente MI 1124/00 mostra una prevalente reattività verso l'allergene maggiore di gruppo 2. Tale componente è presente solo in alcuni degli estratti analizzati.

ditte 1, 2, 3, 5 e 8, sebbene sia evidente una maggiore reattività verso l'estratto proveniente dalla ditta 1. Lo SPT di questo soggetto è risultato comunque positivo con tutti gli estratti analizzati, e l'intensità della reazione si è mostrata variabile in relazione all'estratto.

5. CONCLUSIONI

L'allergia agli acari è una patologia molto diffusa, nei paesi con clima caldo umido gli acari sono pressoché ubiquitari e circa il 50% dei soggetti allergici risulta sensibilizzata ai loro allergeni. È stato dimostrato che l'esposizione e la sensibilizzazione agli acari della polvere sono le principali cause di asma allergico [Platts-Mills et al. 1997a, Platts-Mills et al. 1997b]. Per gli acari è infatti evidente una relazione causale tra l'esposizione ad essi e lo sviluppo dell'asma (Illi et al. 2006; Bemt et al. 2006). Di conseguenza una corretta diagnosi e, successivamente una adeguata immunoterapia, costituiscono una buona base di partenza per limitare il più possibile gli eventuali danni legati all'esacerbazione dell'asma stesso.

Gli estratti allergenici che vengono utilizzati attualmente per effettuare la diagnosi ed eventualmente la successiva immunoterapia, sono miscele complesse di materiale biologico costituito da molecole allergeniche ed altre non allergeniche. Sebbene negli ultimi decenni siano stati fatti notevoli progressi nel campo della standardizzazione degli

estratti allergenici tuttora sussistono dei problemi relativi alla qualità degli estratti stessi. Allo stesso tempo sono anche stati prodotti numerosi allergeni ricombinanti identici, per proprietà e struttura, agli omologhi nativi. Queste molecole potrebbero potenzialmente essere usate per la diagnosi e la terapia delle patologie allergiche, tuttavia nella pratica clinica vengono ancora utilizzati gli estratti allergenici naturali.

E' importante sottolineare che un estratto in cui non siano presenti tutte le componenti allergiche potrebbe essere inadeguato ai fini diagnostici. Infatti, nelle patologie allergiche, i soggetti allergici possono mostrare reattività verso una o più componenti dell'estratto, e qualora venisse usato un diagnostico nel quale non fosse presente la molecola allergica contenente l'epitopo verso cui il soggetto in esame è sensibilizzato, risulta evidente come il risultato della diagnosi vada a palesarsi in una falsa negatività.

È altresì importante rimarcare che ciascuna ditta produttrice utilizza differenti metodi interni di

standardizzazione e calcola la *potency* dell'estratto sulla base di una propria preparazione di riferimento. Ne consegue che i risultati ottenuti sono riportati in unità specifiche tra loro discordanti e questo comporta che gli stessi prodotti provenienti da differenti ditte non possano essere confrontati tra loro.

Per queste ragioni abbiamo deciso di realizzare uno studio che ci permettesse di valutare la qualità degli estratti allergenici di acari di otto importanti ditte Europee i cui prodotti sono in commercio in Italia e vengono utilizzati di routine nella pratica della diagnosi allergologica per effettuare gli Skin Prick Test.

In prima analisi abbiamo valutato la concentrazione delle proteine totali negli estratti che ci sono stati inviati dalle ditte produttrici e i risultati ottenuti hanno messo in evidenza una notevole variabilità tra gli estratti delle diverse ditte sia per il *D. pteronyssinus* che per il *D. farinae*. Infatti abbiamo rilevato una variazione in termini di contenuto totale di proteine di tredici volte tra gli otto estratti di *D. pteronyssinus*, e di diciotto per ciò che

riguarda *D. farinae*. Questo dato ci ha fornito un primo segnale sulla quantità di materiale presente negli estratti esaminati, mettendo quindi in evidenza che a livello di proteine totali sussisteva una consistente eterogeneità tra i diversi estratti.

Successivamente, al fine di valutare il quadro elettroforetico degli estratti, abbiamo effettuato una serie di analisi in SDS-PAGE. Questi esperimenti ci hanno consentito di confermare dal punto di vista qualitativo l'eterogeneità esistente tra i diversi estratti. Infatti abbiamo potuto osservare come molecole importanti corrispondenti agli allergeni dei gruppi 2 e 5 fossero assenti negli estratti di *D. farinae* e *D. pteronyssinus* provenienti dalle ditte 6 e 7 e per ciò che concerne il *D. farinae* anche nell'estratto fornito dalla ditta 3. Gli allergeni appartenenti al gruppo 10 (tropomiosina, 37 kDa) sembrano essere sotto rappresentati nella maggior parte degli estratti, mentre per tutte le altre componenti la situazione è addirittura più eterogenea, con diverse componenti del tutto assenti nella maggior parte degli

estratti. La non elevatissima sensibilità che ha la colorazione con blu di Coomassie potrebbe giustificare l'assenza di rilevamento di queste componenti qualora queste fossero presenti in basse concentrazioni, tuttavia i notevoli problemi di eterogeneità tra le varie componenti dei diversi estratti permangono.

Poiché uno dei criteri di accettazione della qualità degli estratti è la valutazione della presenza nell'estratto delle componenti di maggiore importanza allergologica, abbiamo ritenuto che il passo successivo da effettuare in questo studio fosse proprio la determinazione quantitativa degli allergeni maggiori nei singoli estratti. Questa valutazione, effettuata tramite dei kit commerciali basati sul sistema ELISA *sandwich*, ha evidenziato, per ciò che concerne gli allergeni del gruppo 1, che sebbene negli estratti di *D. pteronyssinus* il contenuto proteico dei vari estratti sia abbastanza eterogeneo, la concentrazione di Der p 1 risulta invece meno eterogenea. D'altra parte per quanto riguarda gli estratti di *D. farinae* i dati mostrano una concentrazione di Der f 1 più eterogenea rispetto a

Der p 1 e mediamente con valori più elevati. Dobbiamo sottolineare che negli esperimenti ELISA abbiamo rilevato una sovrastima della concentrazione del Der f 1 negli estratti provenienti da due ditte (3 e 7), probabilmente questo fenomeno è dovuto ad una probabile formazione di aggregati di questo allergene. L'elevata eterogeneità della concentrazione di Der f 1 nei diversi estratti non risulta comunque inficiata da questo fenomeno, sussistendo comunque negli estratti provenienti dalle altre ditte. Per quanto riguarda gli allergeni del gruppo 2 abbiamo osservato come negli estratti di *D. farinae* la concentrazione di Der f 2 risulti relativamente omogenea e non particolarmente elevata, mentre negli estratti di *D. pteronyssinus* la concentrazione di Der p 2 risulta più elevata rispetto a Der f 2 e più eterogenea.

Questa serie di esperimenti ha quindi ulteriormente sottolineato l'elevata eterogeneità tra i singoli estratti e, per questa ragione, abbiamo ritenuto opportuno che fosse importante valutare la reattività delle IgE dei soggetti allergici verso questi prodotti tramite esperimenti *in vitro*,

e l'attività allergenica mediante esperimenti *in vivo*, al fine di comprendere quanto le differenze osservate tra gli estratti fossero rilevanti dal punto di vista allergologico.

Per quanto riguarda l'attività dei singoli estratti *in vivo*, soggetti con allergia agli acari precedentemente diagnosticata sono stati richiamati presso gli studi medici e sono stati sottoposti a SPT. Tra questi c'erano sia soggetti con una forte reattività agli allergeni degli acari, sia pazienti cosiddetti *borderline*, cioè soggetti che mostrano una reattività di moderata entità per gli allergeni verso cui sono sensibilizzati. Gli Skin Prick Test sono stati condotti dai clinici nelle stesse condizioni da loro adottate durante l'abituale attività, questo al fine di riprodurre nel modo più fedele possibile quello che accade realmente durante la diagnosi dei pazienti. E' stato possibile effettuare un confronto tra le varie ditte poiché su ogni soggetto sono stati valutati o gli otto estratti di *D. farinae* o gli otto estratti di *D. pteronyssinus*. In particolare per valutare la positività delle reazioni abbiamo preso in considerazione parametri ufficialmente accettati ed utilizzati a livello

internazionale come il diametro e l'area del pomfo (Dreborg 2001). Per quanto riguarda i cinque soggetti sui quali sono stati valutati gli estratti di *D. pteronyssinus*, abbiamo potuto osservare che solo per un paziente tutti e otto gli estratti erano in grado di indurre una reazione positiva (seppure di entità variabile). Per quello che riguarda gli altri soggetti alcuni estratti non erano in grado di indurre una risposta positiva. Una situazione analoga si è presentata per *D. farinae*. In questo caso tre dei cinque soggetti mostravano reazioni positive con tutti gli estratti, seppure con una sostanziale variabilità. Nei due pazienti rimanenti alcuni estratti non erano in grado di indurre una reazione positiva. Questi dati dimostrano chiaramente come il principale problema, a parte la variabilità, sia la mancanza di una risposta positiva. Ne discende dunque che alcuni estratti non sono adatti per effettuare la diagnosi di allergia alle specie di *Dermatophagoides* spp., in particolar modo in quei soggetti che hanno una reattività *borderline*.

I soggetti sui quali è stato effettuato lo SPT sono anche stati sottoposti ad un prelievo di sangue, i sieri così ottenuti sono stati utilizzati per effettuare una serie di esperimenti in immunoblotting. Come ci aspettavamo questi esperimenti ci hanno confermato l'eterogeneità esistente tra gli estratti. E' importante sottolineare che spesso i risultati negativi ottenuti con lo Skin Prick Test si riflettevano in un'assenza di reattività tra IgE dei pazienti e gli allergeni maggiori del gruppo 1 o 2 in immunoblotting, sebbene questo non sempre si verifici. Infatti nel caso del paziente MI 1124/00, il quale mostra una reattività prevalente verso l'allergene maggiore di gruppo 2, questa componente viene riconosciuta in immunoblotting solo negli estratti di alcune ditte, mentre lo SPT di questo soggetto è risultato positivo con tutti gli estratti provati. Va comunque sottolineato che agli estratti in cui la componente del gruppo 2 era assente in immunoblotting, corrispondeva comunque una minore reattività in SPT . I nostri risultati hanno quindi messo in evidenza la variabilità esistente tra gli estratti comunemente utilizzati

per la diagnosi allergologica. Questa variabilità può essere generata da molteplici cause come il materiale di partenza utilizzato dalle ditte che può essere diverso ed i differenti processi di estrazione dal materiale grezzo. Qualunque sia la causa, il problema legato all'assenza di appropriatezza diagnostica rispetto ad una fonte di allergia importante come gli acari, dovrebbe destare una certa attenzione nel mondo scientifico relativo al settore allergologico.

Allo stato attuale, i criteri principali di standardizzazione di un preparato per diagnosi o per immunoterapia specifica si basano sulla conoscenza della qualità del materiale di partenza, della composizione dell'estratto in termini di presenza degli allergeni maggiori e minori principali, e sulla riproducibilità da lotto a lotto valutata sulla base delle caratteristiche biochimiche (*consistency*) ed immunochimiche (*potency*) rispetto ad un *in-house reference product* (IHRP). E' evidente però come una riproducibilità relativa ad uno standard di riferimento interno non possa garantire una situazione di confrontabilità tra estratti di ditte diverse, poiché ognuno

fa riferimento allo standard interno della ditta da cui viene prodotto. Come abbiamo dimostrato nel presente lavoro, questa situazione si traduce nella produzione di estratti estremamente eterogenei dal punto di vista qualitativo, che non sempre consentono una diagnosi appropriata.

In conclusione possiamo affermare che gli estratti per la diagnosi per l'allergia agli acari attualmente in commercio non sono sicuramente tra loro equivalenti e che l'utilizzo di alcuni di essi può portare, tramite risultati falsi negativi, a non diagnosticare la patologia, con la possibilità di conseguenze anche gravi per i soggetti non correttamente diagnosticati. Esistono infatti relazioni dirette tra l'allergia agli acari e patologie severe come l'asma (Platts-Mills et al. 1997a, Platts-Mills et al. 1997b), che se non presa in tempo può dar luogo ad esacerbazioni che inficiano gravemente la qualità della vita dei soggetti che ne sono affetti.

Un altro aspetto da sottolineare riguarda il problema degli estratti per immunoterapia, che dai nostri dati preliminari presentano gli stessi problemi di eterogeneità. In questo

caso si corre il rischio di sottoporre il paziente ad un *trial* immunoterapeutico che potrebbe non funzionare a causa della mancanza di molecole importanti nell'estratto.

E' quindi necessario che in tutti i paesi europei, Italia compresa, vengano effettuati degli opportuni controlli sugli estratti allergenici utilizzati per la diagnosi *in vivo* da parte delle Agenzie Regolatorie, come succede per gli altri farmaci immunologici quali i vaccini. Questo soprattutto in virtù del fatto che esistono delle leggi e delle normative nella Comunità Europea che definiscono gli allergeni prodotti medicinali immunologici (2001/83/EC), e in Italia vige sia il decreto legislativo del 24 aprile 2006, n. 219 - attuazione della direttiva 2001/83/EC (e successive modifiche) sia la direttiva 2003/94/EC (GU n.142 del 21/6/2006-Suppl Ordinario n.153) che definisce gli allergeni "medicinali".

ABSTRACT

Background: Assessment of sensitisation by allergen specific IgE testing or skin prick testing is a primary tool in routine clinical diagnosis of allergy. To perform a correct diagnosis, it is critical that the allergen reagent applied contains an adequate amount of all relevant allergen components.

Objective: To compare mite allergen extracts for diagnosis (*Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae*) from eight different manufacturers by *in vitro* and *in vivo* methods.

Methods: Ten manufacturers were officially requested to participate our project funded by Italian Agency of Medicines. Eight companies gave their consent and sent their products for *in vivo* diagnosis. Each extracts was analysed for total protein content by Bradford, major allergens content (Der f 1, Der p 1, Mite group 2) by ELISA. Furthermore protein profile was evaluated by SDS-PAGE and allergen profile by immunoblotting with

mites allergic sera. Skin prick test was set up to evaluate the *in vivo* biological activity of the extracts.

Results: As regard *D. pteronyssinus* the protein amount ranged from 27,7 µg protein/ml extract to 361,1 µg protein/ml extract. Similarly, for *D. farinae* protein concentration ranged from 20,3 µg protein/ml extract to 353,0 µg protein/ml extract. Major allergens amount in the individual extracts was also analysed. Der f 1 ranged from 26.5 µg allergen/ml extract to 196.1 µg allergen/ml and Der p 1 from 9.6 µg/ml to 36.2 µg/ml. The concentration of mite group 2 in the individual extracts was in general lower than group 1. Mite group 2 in *D. pteronyssinus* ranged from 9.6 µg allergen/ml of extracts to 31.7 µg allergen/ml of extracts, and in *D. farinae* from 1.3 to 10.4. SDS-PAGE analysis showed that some components are absent in *D. pteronyssinus* and *D. farinae* extracts from most manufacturers. Similarly, immunoblotting analysis showed a heterogeneous allergen profile when the same serum was used, and sometimes no-reactivity against the major allergens was detected. In the same way, skin prick

test with the individual patients showed a heterogeneous reactivity of the same extract from different company and sometimes no-reactivity was detected.

Conclusion: Both total protein and major allergens' analysis showed a heterogeneous amount of allergen/s between the same extracts from different manufacturers. The protein profile confirmed this heterogeneity. Allergen analysis further confirmed these data, suggesting that, for some of the sera tested, the absence of major and minor allergens strongly affects the *in vivo* diagnosis.

Key words: House Dust Mite allergy, Der f 1, Der p 1, Mite g 2, allergy diagnosis, mite extracts.

ABSTRACT

Introduzione: La diagnosi per le patologie allergiche si basa principalmente sulla valutazione della sensibilizzazione tramite Skin Prick Test e tramite la presenza di IgE specifiche. Per effettuare una diagnosi corretta è quindi necessario che gli estratti utilizzati contengano quantità adeguate di tutte le componenti allergeniche rilevanti.

Obiettivo: Confrontare gli estratti allergenici per la diagnosi delle allergie agli acari (*Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae*) provenienti da otto ditte produttrici tramite metodiche *in vitro* ed *in vivo*.

Metodi: E' stato richiesto ufficialmente a dieci ditte che vendono in Italia i loro prodotti per la diagnosi di malattie allergiche di partecipare al nostro progetto finanziato dall'Agenzia Italiana del Farmaco. Otto ditte hanno dato il loro consenso e hanno spedito i loro prodotti per la diagnosi *in vivo*. Gli estratti sono stati analizzati per il contenuto di proteine totali tramite il metodo di Bradford e

per il dosaggio degli allergeni maggiori (Der f 1, Der p 1, Mite group 2) tramite ELISA. Inoltre abbiamo valutato il profilo proteico in SDS-PAGE e quello allergenico mediante immunoblotting utilizzando il siero di pazienti allergici agli acari. Sono stati inoltre effettuati Skin Prick Test al fine di valutare l'attività biologica degli estratti *in vivo*.

Risultati: La quantità di proteine presenti negli estratti di *D. pteronyssinus* varia a seconda della ditta esaminata da 27,7 µg di proteine/ml di estratto a 361,1 µg di proteine/ml di estratto. Analogamente, per quanto riguarda il *D. farinae* la concentrazione di proteine varia da 20,3 µg di proteine/ml di estratto a 353,0 µg di proteine/ml di estratto. E' stata valutata anche la concentrazione degli allergeni maggiori negli estratti. Der f 1 era presente in un intervallo tra 26.5 µg di allergene/ml di estratto e 196.1 µg di allergene/ml e Der p 1 tra 9.6 µg/ml e 36.2 µg/ml. La concentrazione del gruppo 2 nei singoli estratti è risultata generalmente inferiore rispetto al gruppo 1. Il gruppo 2 in *D. pteronyssinus* è presente in un intervallo tra 9.6 µg di

allergene/ml di estratto e 31.7 µg di allergene/ml di estratto, e in *D. farinae* da 1.3 a 10.4.

L'analisi in SDS-PAGE ha mostrato che alcune componenti sono assenti sia negli estratti di *D. pteronyssinus* sia di *D. farinae*. Le analisi in immunoblotting hanno mostrato un'ampia eterogeneità tra i diversi estratti rilevando in alcuni casi l'assenza degli allergeni maggiori. Analogamente, i dati relativi agli Skin Prick Test hanno mostrato una notevole eterogeneità in quanto i pazienti sottoposti a questo test hanno mostrato una positività con alcuni estratti ma non con altri.

Conclusioni: L'analisi quantitativa delle proteine totali e il dosaggio degli allergeni maggiori hanno evidenziato una notevole eterogeneità sia nella presenza che nella concentrazione degli allergeni negli estratti provenienti dalle differenti ditte. L'analisi del profilo proteico e allergologico hanno confermato questi dati. In conclusione possiamo affermare che gli estratti per la diagnosi per l'allergia agli acari attualmente in commercio non sono sicuramente tra loro equivalenti e che l'utilizzo di alcuni

di essi può portare, tramite risultati falsi negativi, a non diagnosticare la patologia in modo appropriato.

Parole chiave: Allergia agli acari della polvere, Der f 1, Der p 1, Mite g 2, diagnosi allergologica, estratti allergenici di acari.

6. BIBLIOGRAFIA

- ◆ **Aalberse RC** (2000). Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol*; 106 (2): 228-237.
- ◆ **Abbas AK, Murphy KM, Sher A** (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-93.
- ◆ **Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM** (1995). Is allergen immunotherapy effective in asthma? A meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Resp Care Med*; 151: 969.
- ◆ **Adkinson NF** (1980). The radioallergosorbent test: uses and abuses. *J Allergy Clin Immunol*; 65(1): 1-4.
- ◆ **Adkinson NF, Eggleston PA, Eney D, Goldstein EO, Schuberth KC, Bacon JR, Hamilton RG, Weiss ME, Arshad H, Meinert CL, Tonascia J, Wheeler B** (1997). A controlled trial of

immunotherapy for asthma in allergic children. *N Engl J Med*; 336: 324-31.

- ◆ **Akdis CA, Blaser K** (1999). IL-10 induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokine: two key steps in specific immunotherapy. *FASEB J*; 13: 603.
- ◆ **Alvarez-Cuesta E, Cuesta-Herranz J, Puyana-Ruiz J, Cuesta-Herranz C, Blanco-Quiros A** (1994). Monoclonal antibody-standardized cat extract immunotherapy: risk-benefit effects from a double-blind placebo study. *J Allergy Clin Immunol*; 93: 556.
- ◆ **Antico A** (2000). Environmental factor and allergy airway diseases. *Aerobiologia*; 16: 321-9.
- ◆ **Aubier M** (2000). Air pollution and allergic asthma. *Rev Mal Respir*; 17 (1 Pt 2) : 159-65.
- ◆ **Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K** (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*; 18: 767-811.

- ◆ **Bemt L, Vries MP, Knapen L, Jansen M, Goossens M, Muris JW, Schayck CP** (2006). Influence of mattress characteristics on house dust mite allergen concentration. *Clin Exp Allergy*. Feb;36(2):233-7.
- ◆ **Bernstein JA** (2004). Health effects of air pollution. *J Allergy Clin Immunol*; 114 (5): 1116-1123.
- ◆ **Billeri L, De Franchis G, Zancanaro F, Plebani M** (1997). FcεRII/CD23 expression and flogosis markers in allergic patients receiving immunotherapy. *Allergy*; 52 (suppl. 37): 707.
- ◆ **Bjorksten B, Muller C, Broberger U, Alhstedt S, Dreborg A, Johansson SGO, Juto P, Lanner A** (1986). Clinical and immunological effects of oral immunotherapy with a standardized Birch pollen extract. *Allergy*; 41: 290.
- ◆ **Bousquet J** (2005). Sublingual immunotherapy: from proven prevention to putative rapid relief of allergic symptoms. *Allergy*; 60(1): 1-3.

- ◆ **Bousquet J, Becker WM, Hejjaoui A, Chanal I, Lebel B, Dhivert H, Michel FB (1991).** Differences in clinical and immunologic reactivity of patients allergic to grass pollens and to multiple-pollen species. II. Efficacy of a double-blind, placebo-controlled, specific immunotherapy with standardized extract. *J Allergy Clin Immunol*; 88 (1): 43-53.
- ◆ **Bousquet J, Calvayrac P, Guerin B, Hejjaoui A, Dhivert H, Hewitt B, Michel FB (1985).** Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. I. In vivo and in vitro parameters after a short course of treatment. *J Allergy Clin Immunol*; 76 (5): 734-44.
- ◆ **Bousquet J, Lehrer S, Lowenstein H, Norman PS, De Weck AL (1994).** Special report from the IUIS/WHO Allergen Standardization Committee. *Allergy and Clinical Immunology News*, 6: 33-62.
- ◆ **Bousquet J, Maasch HJ, Martinot B, Hejjaoui A, Wahl R, Michel FB (1988).** Double-blind,

placebo-controlled immunotherapy with mixed Grass-pollen allergoids. II. Comparison between parameters assessing the efficacy of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 82: 439.

- ◆ **Bousquet J, Michel FB** (1994). Specific immunotherapy in asthma: is it effective? *J Allergy Clin Immunol*; 94(1): 1-11.
- ◆ **Bradford MM** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- ◆ **Burney PGJ** (1997). Epidemiologic trends. In: Barnes PJ, Grunstein MM, Leff AR, Woolcock AJ (eds) *Asthma*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp35-47.
- ◆ **Carlsen KH, Larsson K** (1996). The efficacy of inhaled disodium cromoglycate and glucocorticosteroids. *Clin Exp Allergy*; 26 (Suppl.4): 8.

- ◆ **Chandra KR** (1997). Five-year follow-up of high-risk infants with family history of allergy who were exclusively breast-fed or fed partial whey hydrolysate, soy, and conventional cow's milk formulas; *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 24: 442-6.
- ◆ **Chapman MD, Smith AM, Vailes LD, Arruda LK, Dhanaraj V, Pomès A** (2000). Recombinant allergens for diagnosis and Therapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*, 106: 409-18.
- ◆ **Costa JJ, Weller PF, Galli SJ** (1997). The cells of the allergic response: mast cells, basophils, and eosinophils. *JAMA*. Dec 10;278(22):1815-22. Review.
- ◆ **Croner S, Kjellman NIN** (1990). Development of atopic disease in relation to family history and cord blood IgE levels: 11- year follow-up in 1654 children. *Pediatr Allergy Immunol*; 1: 14-20.
- ◆ **D'Amato G, Lobefalo G, Liccardi G, Cazzola M** (1995). A double-blind, placebo-controlled trial of

local nasal immunotherapy in allergic rhinitis to Parietaria pollen. Clin Exp Allergy; 25: 141.

- ◆ **De Marco R, Locatelli F, Sunyer J, Burney P and the European Community Respiratory Healt Survey** (2000). Differences in incidence of reported asthma related to age in men and in women. Am J Respir Crit Care Med; 162: 68-74.
- ◆ **De Swert LFA** (1999). Risk factors for allergy. Eur J Pediatr; 158: 89-94.
- ◆ **De Vos C** (1991). H₁-antagonist and inhibitors of eosinophil accumulation. Clin Exp Allergy, 21: 277.
- ◆ **Deinhofer K, Sevcik H, Balic N, Harwanegg C, Hiller R, Rumpold H, et al** (2004). Microarrayed allergens for IgE profiling. Methods; 32: 249-254.
- ◆ **Devalia JL, Rusznak C, Herdman MJ, Trigg CJ, Tarraf H, Davies RJ** (1994). Effect of nitrogen dioxide and sulphur dioxide on the airway response of mild asthmatic patient to allergen inhalation. Lancet; 344: 1668-71.

- ◆ **Diaz-Sanchez D** (1997). The role of diesel exhaust particles and their associated polyaromatic hydrocarbons in the induction of allergy airway disease. *Allergy*; 52 (suppl 38): 52-6.
- ◆ **Dreborg S** (2001). Skin testing in allergen standardization and research. *Immunol Allergy Clin of North America*:21 (2): 329-354.
- ◆ **Du Buske LM** (1996). Clinical comparison of histamine H1-receptor antagonist drugs. *J Allergy Clin Immunol*; 98 (Suppl. 5): S 3071.
- ◆ **Durham SR, Varney V, Gaga M, Frew AJ, Jacobson M, KayAB** (1991). Immunotherapy and allergic inflammation. *Clin Exp Allergy*; 21 Suppl 1: 206-210.
- ◆ **EAACI Position paper: Immunotherapy** (1993). Malling HJ, Weeke B. eds. *Allergy*; 48: 7.
- ◆ **Ebner C, Siemann U, Bohle B, Willheim M, Wiedermann U, Schenk S, Klotz F, Ebner H, Kraft D, Scheiner O** (1997). Immunological changes during specific immunotherapy of glass

pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from Th2 to Th1 in T-cell clones specific for Phl p1, a major grass pollen allergen. *Clin Exp Allergy*; 27: 1007-1015.

- ◆ **Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerweght LS, De Clerck LS, Stevens WJ** (2004). In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clin Exp Allergy*; 34: 332-339.
- ◆ **European Academy of Allergology and Clinical Immunology**. Allergen standardization and skin tests (position paper). *Allergy*: 1993, 48: 48-82.
- ◆ **EUROPEAN ALLERGY WHITE PAPER** (1997). Allergic disease as a public health problem in Europe. The UCB Institute of Allergy.
- ◆ **Fitchette-Lainé AC, Gomord V, Cabanes M, Michalski JC, Macary MS, Foucher B, Cavalier B, Hawes C, Lerouge P, Faye L** (1997). N-glycans harboring the Lewis a epitope are expressed at the surface of plant cell. *The Plant Journal*, 12: 1411-1417.

- ◆ **Focke M, Marth K, Flicker S, Valenta R** (2008). Heterogeneity of commercial timothy grass pollen extracts. *Clin Exp Allergy*. 2008 Aug;38(8):1400-8. Epub Jun 28.
- ◆ **Fötisch K, Altmann F, Hausteiner D, Vieths S** (1999). Involvement of Carbohydrate Epitopes in IgE Response of Celery-Allergic Patients. *Int Arch Allergy Immunol*, 120: 30-42.
- ◆ **Fötisch K, Vieths S** (2001). N- and O-linked oligosaccharides of allergenic glycoproteins. *Glycoconjugate Journal*, 18: 373-390.
- ◆ **Frew AJ** (1993). Injection immunotherapy. *Br Med J*; 307: 919-923.
- ◆ **Frew AJ** (1994). Conventional and alternative allergen immunotherapy: Do they work? Are they safe? *Clin Exp Allergy*; 24(5): 416-422.
- ◆ **Fuhlbrigge A, Weiss S** (1997). Domestic gas appliances and lung diseases. *Thorax* 52 (suppl. 3): 558-62.

- ◆ **Garret MH, Hooper MA, Hooper BM, Rayment PR, Abramson MJ** (1999). Increased risk of allergy in children due to formaldehyde exposure in home. *Allergy*; 54: 330-7.
- ◆ **Golden DB** (2004). Patterns of anaphylaxis: acute and late phase features of allergic reactions. *Novartis Found Symp*; 257: 101-110.
- ◆ **Holt PG** (2004). The role of genetic and environmental factors in the development of T-cell mediated allergic diseases in early life. *Paediatr Respir Rev*; 5 (Suppl A): S 27-30.
- ◆ **Illi S, von Mutius E, Lau S, Niggemann B, Gruber C, Wahn U** (2006). Multicentre Allergy Study (MAS) group. Perennial allergen sensitization early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study. *Lancet*. 2006 Aug 26;368(9537):763-70.
- ◆ **Indiveri F** (1993). New aspects of glucocorticoid therapy in immunological disorder. *Eur J Clin Pharmacol*; 45 (Suppl.1).

- ◆ **Ishizaka K, Ishizaka T** (1970). Biological function of IgE antibodies and mechanisms of reaginic hypersensitivity. *Clin Exp Immunol*, 6: 25-31.
- ◆ **Jarvis D, Chinn S, Luezyinka C, Burney P** (1996). Association of respiratory symptoms and lung function in young adults with use of domestic gas appliances. *Lancet*; 347: 426-31.
- ◆ **Jayasekera NP, Toma TP, Williams A, Rajakulasingam K** (2007). Mechanisms of immunotherapy in allergic rhinitis. *Biomed Pharmacother. Jan*;61(1):29-33.
- ◆ **Jorres R, Nowak D, Magnussen H** (1996). Effects of ozone exposure on allergen responsiveness in subjects with asthma or rhinitis. *Am J Respir Care Med*; 153: 56-64.
- ◆ **Jung CM, Prinz JC, Rieber EP, Ring J** (1995). A reduction of allergen-induced FcεRI/ CD23 expression on peripheral B cells correlated with successful hyposensitization in grass pollinosis. *J Allergy Clin Immunol*; 95: 77-78.

- ◆ **Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D, Urwyler A, Dahinder C, Muller UR** (1995). Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN- γ secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol*; 154: 4187-94.
- ◆ **Kainka-Stanicke E, Behrendt H, Friedrichs KH, Tomingas R** (1998). Morphological alteration of pollen and spores induced by airborne pollutants: observation from two different polluted areas in West Germany. *Allergy*; 43 (suppl.7): 57.
- ◆ **Knox RB, Suphioglu C, Taylor P, Peng JL, Bursill LA** (1996). Asthma and air pollution: major grass pollen allergen binds to diesel exhaust particles (DECP). *J Allergy Clin Immunol*; 97: 378.
- ◆ **Kremer B** (2004). Quality of life scales in allergic rhinitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*; 4 (3): 171-176.

- ◆ **Krzyzanowski M, Quackenboss JJ, Lebowitz MD** (1990). Chronic respiratory effect of indoor formaldehyde exposure. *Environ Res*; 52: 117-25.
- ◆ **Laemmli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-5.
- ◆ **Leng X, Fu YX, Ye ST, Duan SQ** (1990). A double-blind trial of oral immunotherapy for *Artemisia* pollen asthma, with evaluation of bronchial response to pollen allergen and serum-specific IgE antibody. *Ann Allergy*; 64: 27-31.
- ◆ **Linneberg A, Nielsen NH, Madse F, Frolund L, Dirksen A, Jorgense T** (2000). Increasing prevalence of specific IgE to aeroallergen in an adult population: two cross-sectional surveys 8 years apart: the Copenhagen Allergy Study. *J Allergy Clin Immunol*, 106: 247-52.
- ◆ **Luehr C, Carlson J, Esch B, Peltre G** (1995). Measurement of IgE levels specific to individual

allergenic proteins without using purified proteins.
Allergy; 50 (Suppl. 26): 249.

- ◆ **Macchia L, Caiaffa MF, Di Felice G, Pini C, Bariletto G, Strada S, Tursi A** (1991). Change in skin reactivity, specific IgE and IgG levels after one year of immunotherapy in olive pollinosis. Allergy; 46(6): 410-408.
- ◆ **Malling HJ** (1993). Methods of skin testing. Allergy; 47: 55.
- ◆ **Malling HJ** (1998). Immunotherapy as an effective tool in allergy treatment. Allergy; 53: 461-472.
- ◆ **Maroli M e Mari A** (1995). Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, n. 3, vol. 31 pp. 343-350.
- ◆ **Mastrandrea F, Serio G, Minardi A, Coradduzza G, Rossi N, Scarcia G, Mainetta G, Iacobelli A, Lamanna C, Tursi A** (1997). IgE responses to *Dermatophagoides pteronyssinus* native major allergens Der p1 and Der p2 during long-term specific immunotherapy. Allergy; 52: 1115.

- ◆ **Meltzer EO** (1991). Comparative safety of H1-antihistamines. *Ann Allergy*; 67: 625.
- ◆ **Mohapatra SS** (1996). An integrated approach to immune deviation and the prevention of allergies and asthma. *Allergy Clinical Immunology*; 164-8.
- ◆ **Molfino NA, Wright SC, Katz I, Tarlo S, Silverman F, McClean PA, Szalai JP, Raizenne M, Slutsky AS, Zamel N** (1991). Effects of low concentration of ozone on inhaled allergen responses in asthmatic subjects. *Lancet*; 338: 199-203.
- ◆ **Morris DL** (1999). WHO position paper on oral (sublingual) immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol*; 83(5): 423-424.
- ◆ **Nakagawa T** (1991). The role of IgG subclass antibodies in the clinical response to immunotherapy in allergic disease. *Clin Exp*; 21(3): 289-296

- ◆ **Nelson HS** (2005). Advances in upperairways diseases and allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*; 115 (4): 676-684
- ◆ **Nicolai T, Bellach B, Mutius EV, Thefeld W, Hoffmeister H** (1997). Increased prevalence of sensitization against aeroallergens in adults in West compared with East Germany. *Clin Exp Allergy*; 27: 886-92.
- ◆ **O'Connell EJ** (2004). The burden of atopy and asthma in children. *Allergy* ; 59 (Suppl.78): 7-11.
- ◆ **Ortolani C, Pastorello EA, Moss RB, Hsu YP, Restuccia M, Joppolo G, Madonna A, Cornelli U, Halpern G, Zanussi C** (1984). Grass-pollen immunotherapy: a single year double-blind, placebo-controlled study in patients with grass pollen-induced asthma and rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*; 73: 283-90.
- ◆ **Osman M** (2003). Therapeutic implications of sex difference in asthma and atopy. *Arch Dis Child*:88 (7): 587-590.

- ◆ **Otsuka H, Mezawa A, Ohnishi M, Okubo K, Seki H, and Okuda M** (1991). Changes in nasal metachromatic cells during allergen immunotherapy. *Clin Exp Allergy*; 21: 115-20.
- ◆ **Passalacqua G, Albano M, Fregonese L, Riccio A, Pronzano C, Mela GS, Canonica GW** (1998). Randomised controlled trial of local allergoid immunotherapy on allergic inflammation in mite-induced rhinoconjunctivitis. *Lancet*; 351: 629-632.
- ◆ **Pastorello EA** (1993). Skin tests for diagnosis of IgE-mediated allergy. *Allergy*; 48: 57.
- ◆ **Pastorello EA, Pravettoni V, Incorvaia C, Mambretti M, Franck E, Wahl R, Zanussi C** (1992). Clinical and immunological effects of immunotherapy with alum-absorbed grass allergoid in grass -pollen-induced hay fever. *Allergy*; 47: 281-90.
- ◆ **Peng ZK, Naclerio RM, Norman PS, Adkinson NF Jr** (1992). Quantitative IgE-subclass and IgG-subclass responses during and after long-term

ragweed immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*; 89 (2): 519-29.

- ◆ **Platts-Mills TA, Sporik RB, Chapman MD, Heymann PW** (1997). The role of domestic allergens. *Ciba Found Symp.*; 206:173-85; discussion 185-9. Review.
- ◆ **Platts-Mills TA, Vervloet D, Thomas WR, Aalberse RC, Chapman MD** (1997). Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. *J Allergy Clin Immunol*; 100:S2-24.
- ◆ **Prescott SL** (2003). Early origins of allergic diseases: a review of processes and influences during early immune development. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*; 3 (2): 125-132.
- ◆ **Puc M** (2003). Characterisation of pollen allergens. *Ann Agric Environ Med*; 10:143–149.
- ◆ **Romagnani S** (1994). Regulation of the development of type 2 helper cells in allergy. *Curr Opin Immunol*; 6: 838-46.

- ◆ **Romagnani S** (2000). The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*; 105: 399-408.
- ◆ **Rudack C, Sachse F, Jorg S** (2003). Aeroallergens becoming more significant for allergic rhinitis. *HNO*; 51 (9): 694-703.
- ◆ **Rusznak C, Devalia JL, Davies RJ** (1996). The airway response of asthmatic subjects to inhaled allergen after exposure to pollutants. *Thorax*; 51: 1105-8.
- ◆ **Schmid-Grendelmeir P, Cramer R** (2001). Recombinant Allergens for Skin Testing. *Int Arch Allergy Immunol*, 125: 96-111.
- ◆ **Schoenwetter WF, Dupclay L Jr, Appajosyula S, Botteman MF, Pasb CL** (2004). Economic impact and quality-of-life burden of allergic rhinitis. *Curr Med Res Opin*, 20 (3): 305-317.
- ◆ **Sears MR, Holdaway MD, Flannery EM, Herbison GP, Silvia PA** (1996). Parenteral and neonatal risk factors for atopy, airway hyper-

responsiveness and asthma. Arch Dis Child; 75(5): 392-8.

- ◆ **Secrist H, Chelen CJ, Wen Y, Marshall JD, Umetsu DT** (1993) Allergen immunotherapy decreases IL-4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. J Exp Med; 178(6): 2123-30.
- ◆ **Shea KM, Truckner RT, Weber RW, Peden DB** (2008). Climate change and allergic disease. J Allergy Clin Immunol. Sep;122(3):443-53
- ◆ **Sporik R, Holgate S, Platts-Mills T, Cogswell J** (1990). Exposure to house dust mite allergen (Der p 1) and the development of asthma in childhood. A prospective study. New Engl J Med; 323: 502-7.
- ◆ **Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology** (1989). Skin tests used in type I allergy testing (position paper). Allergy: 44 (suppl):1-59.
- ◆ **Takenaka H, Zhang K, Diaz-Sanchez D, Tsien A, Saxon A** (1995). Enhanced human IgE production

results from exposure to the aromatic hydrocarbons from diesel exhaust: Direct effects on B-cell IgE production. *J Allergy Clin Immunol*; 95: 103-15

- ◆ **Thomas WR, Smith WA, Hales BJ** (2004). The allergenic specificities of the house dust mite. *Chang Gung Med J*. Aug;27(8):563-9.
- ◆ **Toogood JH** (1998). Side effects of inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol*; 102: 705.
- ◆ **Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979). Electrophoretic transpher of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 76: 4350-4.
- ◆ **Tunncliffe WS, Burge PS, Ayres JG** (1994). Effect of domestic concentration of nitrogen dioxide on airway responses to inhaled allergen in asthmatic patients. *Lancet*; 344: 1733-6.

- ◆ **Upham JW, Holt PG** (2005). Environment and development of atopy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. Apr;5(2):167-72.
- ◆ **Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Grönlund H** (1999). The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy*, 29: 896-904.
- ◆ **van Ree R, Dorpema JW, Vieths S** (2005). Allergy vaccines: a need for standardisation in mass units of major allergen. *Pharmeuropa Bio. Sep*; (1):27-30.
- ◆ **Von Hertzen LC** (1998). The hygiene hypothesis in the development of atopy and asthma-still a matter of controversy? *Q J Med*; 91: 767-71.
- ◆ **Von Mutius E, Schmid S** (2006). The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe. *Allergy*. Apr;61(4):407-13.

- ◆ **Wardlow AJ** (1993). The role of air pollution in asthma. *Clin Exp Allergy*; 23: 81-96.
- ◆ **Weghofer M, Dall'Antonia Y, Grote M, Stöcklinger A, Kneidinger M, Balic N, Krauth MT, Fernández-Caldas E, Thomas WR, van Hage M, Vieths S, Spitzauer S, Horak F, Svergun DI, Konarev PV, Valent P, Thalhamer J, Keller W, Valenta R, Vrtala S** (2008). Characterization of Der p 21, a new important allergen derived from the gut of house dust mites. *Allergy*. Jun;63(6):758-67.
- ◆ **WHO Position Paper** (1998). Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic disease. J. Bousquet, Lockey RF, Malling HJ eds. *Allergy*; 53 (Suppl. 44).
- ◆ **Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL** (2001). The germless theory of allergic diseases: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol*; 1 (1): 69-75.

- ◆ **Wright AL** (2005). The epidemiology of atopic child: who is at risk for what? *J Allergy Immunol*; 113 (1 Suppl): S2-7.
- ◆ **Zeiger RS** (1993). Development and prevention of allergic disease in childhood. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW eds. *Allergy principles and practice*, vol 2. Mosby, St Louis, Missouri; pp 1137-1172.