XVIII CONGRESSO NAZIONALE
SIPPS
28 10 2006

La corretta diagnostica allergologica

Giovanni Cavagni

UOC di Allergologia OPBG - Roma

Ospedale Pediatrico Bambino Gesù
I.R.C.C.S. - Roma

Diagnosi allergologica

- Anamnesi accurata
- Esame obiettivo
- Test di provocazione
- Test in vivo
- Test in vitro

LV
NOC
RYAN

1V

Tests "alternativi" per la diagnosi di allergia alimentare

- Test di provocazione e neutralizzazione
- Test citotossico (o Cytotest)
- D.R.I.A. test
- Elettroagopuntura o test elettrodermico
- Kinesiologia applicata
- Biorisonanza

Test di citotossicità o citotossico (o Cytotest)

Consiste nell'aggiunta di un allergene al sangue del paziente con riduzione del numero dei globuli bianchi in caso di allergia all'alimento.

Test di citotossicità o citotossico (o Cytotest)

Tale metodo è stato considerato inattendibile dall'American Academy of Allergy and Immunology, sulla base di vari studi controllati.

Non c'è correlazione tra risultato del test e sintomi e test ripetuti nello stesso paziente danno risultati diversi.

Lieberman P, Crawford L, Bjelland J, Connel B, Rice M. *Controlled study of the cytotoxic food test*. JAMA 231:728, 1974.

TEST CITOTOSSICO

l test eseguito 2 volte ***sullo stesso sangue di una pecora****, rivela la presenza di ntolleranza al rano tenero e duro nel primo campione, e di ntolleranza alla carne di manzo, gnello e in modo ieve all'uovo nel econdo!!*

Congresso Nazionale Unificato di Dermatologia e Venereologia
ADOI-SIDEV

Test citotossico per alimenti in pecora di razza sarda di anni 3

A. Castelli *1, M. C. Greco 1, S. Mazzoli 1, M. Menchini 2, C. Di Leo 2, G. Arnati 1

1 U.O. Dermatologia, Arezzo

2 Istituto di Scienze Dermatologiche, Università degli Studi di Siena

Non è raro imbattersi in pubblicità che promuovono tests atti ad accertare ev tuali intolleranza o "allergie" ad alimenti. Scoprire queste intolleranze ed eli nare dalla dieta l'alimento incriminato, anche per periodi brevi, risolverebbe p blemi quali obesità, cefalee, orticarie, eczemi, meteorismo ed altro anco Questi tests vengono effettuati a volte in centri di estetica con apparecchi a l laser ma più spesso in centri specializzati e su campioni di sangue. I granulo a contatto con gli alimenti si modificano e dal grado di alterazione si stabilisc livello di intolleranza.

La nostra esperienza è consistita nell'inviare ad uno di questi laboratori un ca pione di sangue prelevato in una pecora di razza sarda di anni 3 e messo in provette inviate con nomi diversi. La risposta è stata per la prima provetta intolleranza al grano tenero e duro mentre per la seconda provetta di intoller ze alla carne di manzo, di agnello (sig!), ed in modo lieve all'uovo.

Sarebbe auspicabile che le Società Scientifiche oltre a stilare protocolli di qu ti e attendibilità svolgano azione di controllo nei riguardi di molte forse tro false informazioni

Diagnosi allergologica

- Anamnesi accurata
- Esame obiettivo
- Test di provocazione
- Test in vivo
- **Test in vitro**

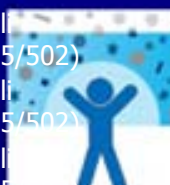
PRINCIPALI SISTEMI IMMUNOENZIMATICI DISPONIBILI IN ITALIA PER LA DETERMINAZIONE DELLE IgE SPECIFICHE

Metodiche basate sulla marcatura anti-IgE

Metodica	*Allergeni a fase solida*	*Anticorpi anti-IgE marcati*	*Substrato*	*Lettura*	*Standardizzazione*
ENEASYS TEM	Adesi a una fase solida in PVC (ACE)	Policlonali, coniugati con ureasi	Urea	Fotometrica	Curve specifiche per famiglie di allergeni
UNICAP	**Adesi ad un derivato di cellulosa attivato con bromuro di cianogeno**	**Mix di policlonali e monoclinali coniugati con b-galattosidasi**	**Metil-umbelliferil-galattoside**	Fluorimetrica	**IgE totali (WHO 75/502)**
FAST	Adesi a micropiastre	Monoclinali, coniugati con fosfatasi alcalina	Metil-umbelliferil-fosfato	Fluorimetrica	IgE totali (WHO 75/502)
HI-TEC	In fase solida, predispensati in tubi	Fosfatasi alcalina	Para-nitrofenilfosfato	Fotometrica	IgE totali (WHO 75/502)
AlaSTAT	In fase liquida	Perossidasi	Tretametilbenzidina	Fotometrica	IgE totali (WHO 75/502)
CLAS	In fase liquida	Perossidasi	Tretametilbenzidina	Fotometrica	IgE totali (WHO 75/502)
Magic Lite SQ	Adesi a particelle paramagnetiche	Monoclonali, coniugati con estere acridinio		Luminometrica	Curva di G6
ACCESS	In fase liquida, adesi a particelle paramagnetiche	Legati a fosfatasi alcalina	Dioxetano	Luminometrica	IgE totali (WHO 75/502)
MATRIX	Pannelli prefissati di allergeni	Coniugati con fosfatasi alcalina	Bromo-cloro-indolil-fosfato	Fotometrica	Curva per ciascun allergene

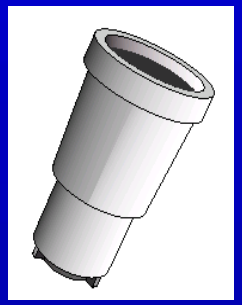
Metodiche basate sulla marcatura dell'allergene

Metodica	*Anti-IgE e fase solida*	*Allergeni marcati*	*Substrato*	*Lettura*	*Standardizzazione*
Immulite	Tubi con biglie coattate con anti-IgE	In fase liquida, coniugati con fosfatasi alcalina	Adamantil-dioxetano fosfato	Luminometrica	
ALLERTE CH	Micropozzetti coattati con anti-IgE	Allergeni in fase liquida biotinilati/streptavidina-perossidasi	Tetrametilbenzidina	Fotometrica	IgE totali (WHO 75/502)
CARLA	Micropozzetti coattati con anti-IgE	Allergeni in fase liquida biotinilati/streptavidina-perossidasi	Tetrametilbenzidina	Fotometrica	IgE totali (WHO 75/502)
REALTEST	Micropozzetti coattati con anti-IgE	Allergeni in fase liquida	Tetrametilbenzidi	Fotometr	IgE totali



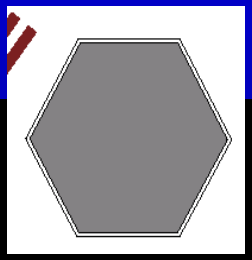
Tecnologia ImmunoCAP:

Pharmacia
CAP System



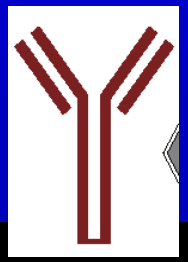
1989

Pharmacia
Phadebas
RAST



1974

Scoperta delle IgE



1967

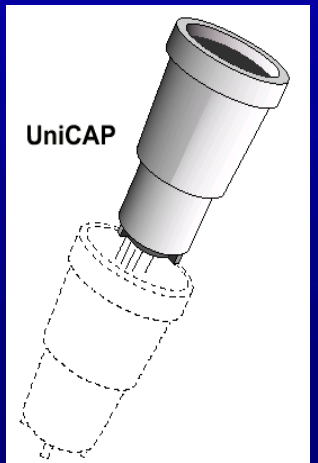
1990

1995

QUALITY CLUB

Pharmacia
Quality CAP

UniCAP
strumentazione
automatica



La Calibrazione WHO

Il CAP è stato il primo test allergologico che ha introdotto il concetto della **diretta taratura dei calibratori** contro il 2° IRP WHO 75/502 per IgE.

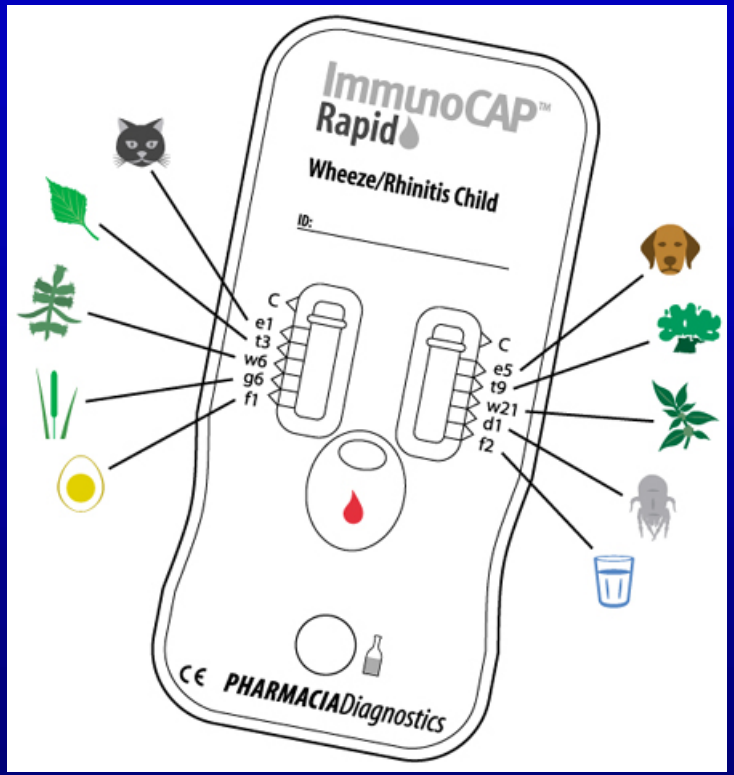
ImmunoCAP™ Rapid Wheeze/Rhinitis child

10 allergeni per profilo

~ 20 min test

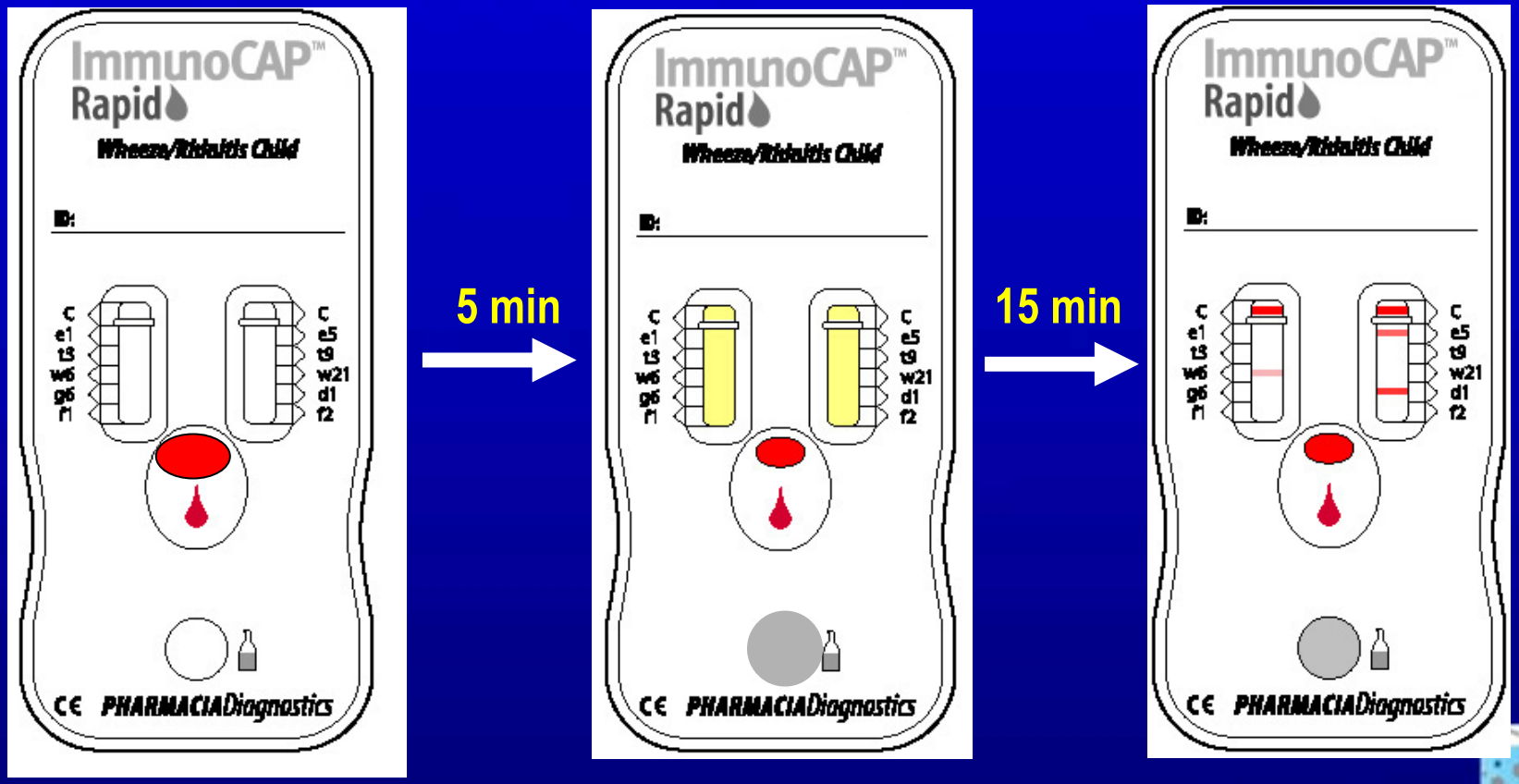
Risultato qualitativo

110 µl sangue intero



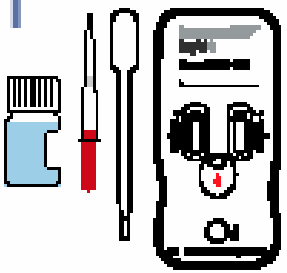
e1	Epitelio e forfora di gatto
t3	Betulla
w6	Assenzio
g6	Coda di topo
f1	Albume
e5	Forfora di cane
t9	Olivo
w21	Parietaria
d1	Acaro
f2	Latte

Test timing


ImmunoCAP™
Rapid
Wheeze/Rhinitis Child
ID:
5 min
15 min
CE PHARMACIADiagnostics

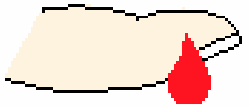
Test: procedura

1



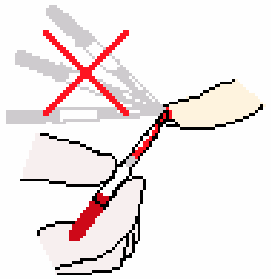
Reagents and material provided.

2



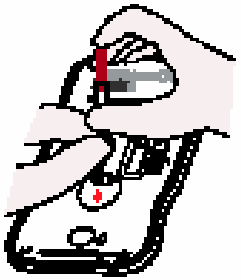
Patient's finger should be warm.
Use a lancet which gives a good blood-flow.
Prick the fingertip.

3



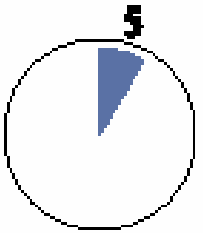
Collect blood in the supplied Blood Sampling Device by placing the device in a downward angel. Do not cover the hole in the end of the plunger.

4



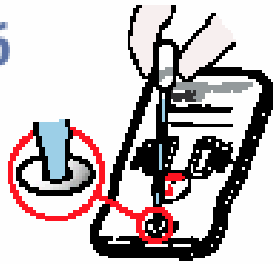
Place the Assay Device horizontally. Add the blood to the sample well by gently pressing the plunger with a finger covering the hole in the plunger.

5



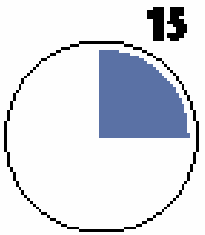
Set a timer to 5 minutes.

6



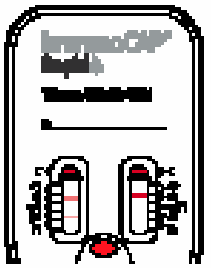
After 5 minutes: Add 0.5 ml of Developer Solution to the well marked with a bottle. Use the Pipette provided and place the tip down into the well during the addition.

7



Set a timer to 15 minutes. A pink-red colour will appear in both control zones (C) during this time.

8



Read the results after the 15 minutes. A positive test result is seen as a pink-red line next to the specific allergen code.

9 *Examples of positive test results*

The colour representing a positive test result may differ in intensity from slightly pink to dark red.

Trials clinici

Studio Multicentrico
Spagna/Svezia
Retrospettico
121 pazienti positivi x almeno 1 allergene
Manuscript submitted Jan 2006

Dr. G. Hedlin Karolinska University Hospital, Stockholm
Dr. G. Lilja Sachs' Children's Hospital Stockholm,
Dr. L. Nordvall University Children's Hospital, Uppsala
Dr. F. Toledan Hospital Clinico Universitario, Salamanca
Dr. A.N.Garcia Hospital La Fe-Materno Infantil, Valencia

Studio Multicentrico
Italia
Prospettico
150 pazienti con sintomi respiratori
Ongoing study, preliminary data

Prof. A. Ugazio , G. Cavagni Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma
Prof. A. Fiocchi Osp. Macedonio Melloni, Milano

Trial: Phadia

Obiettivo:

Valutazione delle performance cliniche del prodotto ImmunoCAP™

Rapid Wheeze/Rhinitis Child

Studio Multicentrico Italia

Ospedale Pediatrico
Bambino Gesù Roma
A. G. U gazio , G. Cavagni

Ospedale Macedonio
Melloni Milano
A. Fiocchi

Obiettivo dello studio

- ***Mostrare la performance clinica del test ImmunoCAP™ Rapid Wheeze/Rhinitis Child***

Investigatori / Medici:

Studio condotto da specialisti, pediatri allergologi

Pazienti:

150 Pazienti (0-18 anni) con sintomi di wheeze/asthma e/o rinite

Disegno del trial

Pazienti inclusi in accordo con Criteri di Inclusione/Esclusione

Diagnosi del medico

1. Storia Clinica
2. Esame fisico
3. Risultato SPT

Diagnosi per paziente
Diagnosi per allergene

POSITIVO | NEGATIVO | INCERTO

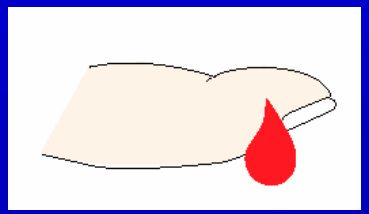
Confronto con risultato test: ImmunoCAP Rapid

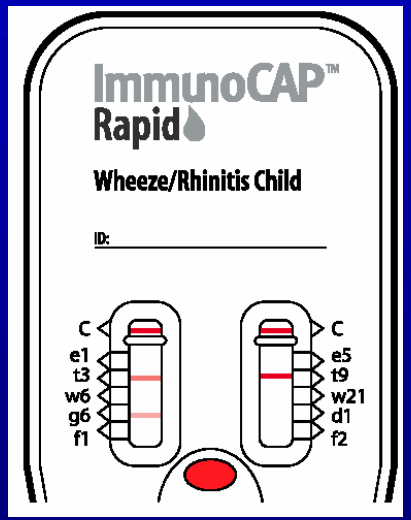
Diagnosi per paziente
Diagnosi per allergene

POSITIVO | NEGATIVO

ImmunoCAP™ Rapid

Eseguito dall'infermiera





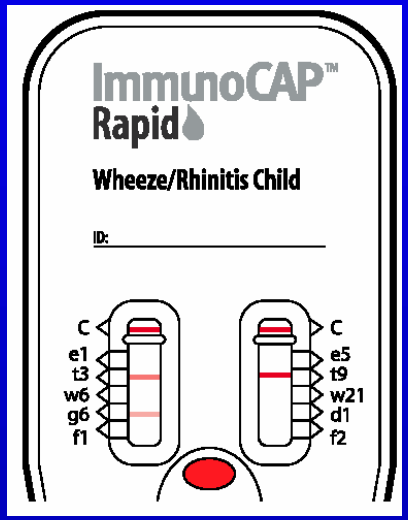
ID Paziente

Top Secret

Top Secret

Risultati del test sconosciuti al medico

Risultati pazienti



*Dati preliminari, 10 Marzo 2006

Centro	N. Pazienti arruolati
Milano	41
Roma	85
Total	126

Diagnosi del medico:

23 = dubbia

POSITIVA = 86 pazienti

NEGATIVA = 17 pazienti

95% concordanza 100%

Risultato ImmunoCAP Rapid

POSITIVO = 82 pazienti

NEGATIVO= 17 pazienti

Stesso dato in Svezia
96% concordanza

% Concordanza tra diagnosi medico e Test ImmunoCAP rapid per ogni allergene

Allergeni	Concordanza	
e1 (Gatto)	*92%	93%
t3 (Betulla)	n.v	91%
w6 (Assenzio)	n.v	94%
g6 (Coda di topo)	*85%	90%
f1 (Uovo)	n.v	93%
e5 (Cane)	n.v.	74%
t9 (Olivo)	*93%	92%
w21 (Parietaria)	*94%	96%
d1 (Acaro)	*93%	89%
f2 (Latte)	n.v.	95%
Totale	***91%**	**91%**

Concordanza nel trial retrospettico Spagna/Svezia

*Preliminare data

Conclusioni

- Lo studio mostra un ottimo valore di concordanza tra il test ImmunoCAP™ Rapid Wheeze/Rhinitis Child e la Diagnosi Clinica del Medico
- I risultati ottenuti (definitivi studio Spagna-Svezia, preliminari per studio italiano) autorizzano l'uso del test ImmunoCAP™ Rapid Wheeze/Rhinitis Child per diagnosi differenziale di allergia in bambini con sintomi respiratori
- I dati preliminari dello studio italiano indicano una quasi completa concordanza con quelli dello studio Spagnolo/Svedese
- Il test è di facile eseguizione, il che lo rende un buono strumento per il primo livello di indagine, riproducibile e standardizzato.
- Risultato in 20 minuti, può consentire anche al Pediatra di famiglia di stabilire interventi appropriati mentre il paziente è ancora in ambulatorio.

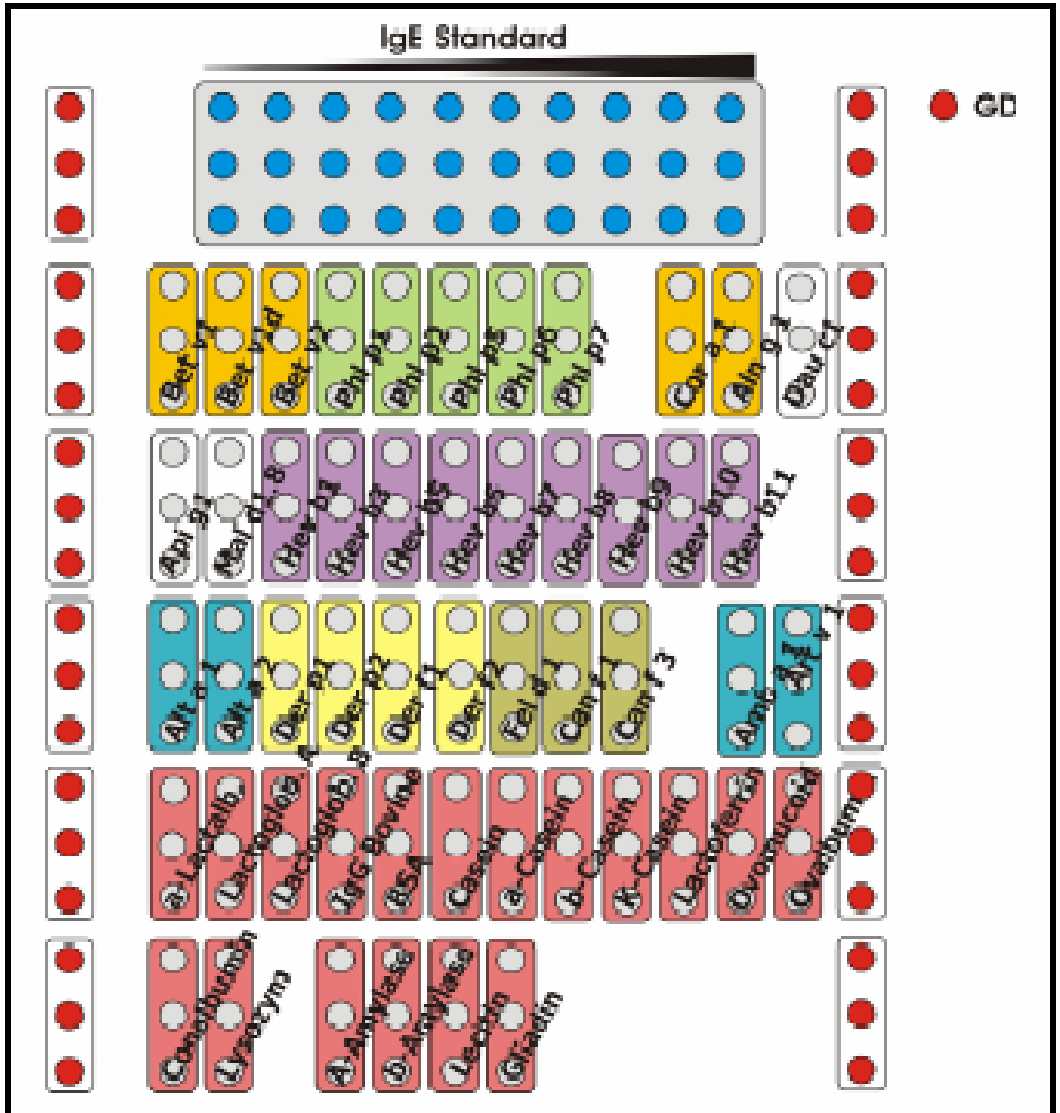
Microarray

- Un panel di molecole allergeniche ricombinanti o purificate vengono
- incubate con il siero del paziente in esame
- permettendo l'identificazione a livello molecolare del profilo anticorpale IgE del paziente stesso.

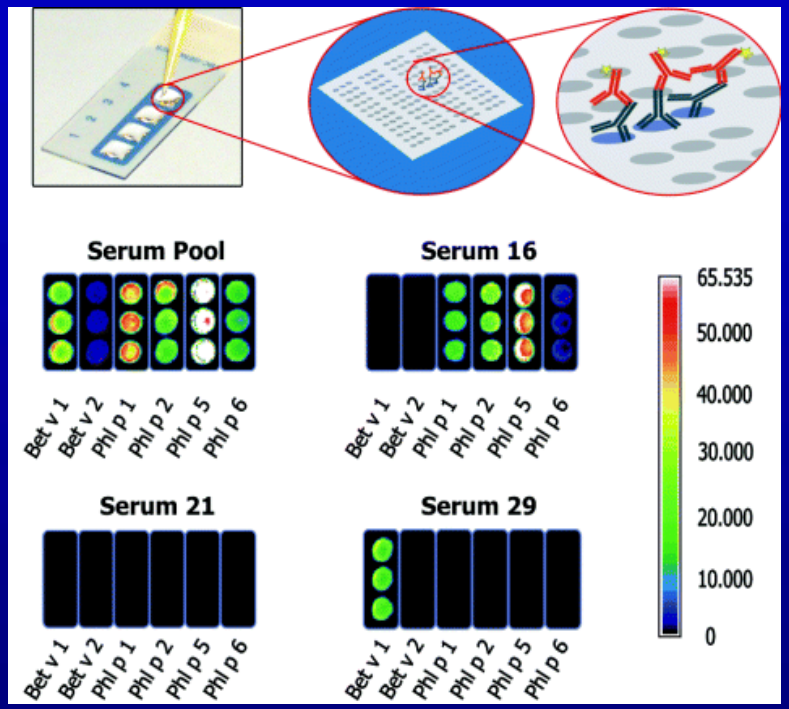
Microarray

- Il test utilizza come supporto un normale vetrino portaoggetti opportunamente trattato al quale sono coniugate in modo ordinato ed altamente riproducibile singole molecole allergeniche.
- Manualità ridotta
- Esecuzione facile relativamente rapida (5 ore)

Esempio chip microarray allergologi



Allergen Microarrays: metodica



Stazione di ibridazione

Microarray scanner per vetrini

ISAC Immuno Solid-phase Allergen Chip

ISAC® CRD 51

os d 4 (Alpha-Lactalbumin)
os d 5 (b-Lactoglobulin A)
os d 5 (b-Lactoglobulin B)
os d 7 (IgG bovine)
os d 8 (Casein)
lpha-Casein
eta-Casein
appa-Casein
os d Lactoferrin
os d 6 (Bovine Serum Albumin)

Grass Pollen	Timothy Grass	*Phleum pratense*	rPhl p 1
			rPhl p 2
			rPhl p 5
			rPhl p 6
			rPhl p 7
	Ragweed	*Ambrosia artemisiifolia*	rAmb a 1
	Mugwort	*Artemisia vulgaris*	rArt v 1
Tree Pollen	Hazel	*Coryllus avellana*	rCor a 1
	Alder	*Alnus glutinosa*	rAln g 1
	Birch	*Betula verrucosa*	rBet v 1a
			rBet v 1d
			rBet v 2
Animals	Dog	*Canis familaris*	Can f 1
			Can f 3
	Cat	*Felis domesticus*	Fel d 1
Insects	Mite	*Dermatophagoides pteronyssinus*	Der p 1
			Der p 2
	Mite	*Dermatophagoides farinae*	Der f 1
			Der f 2
Moulds	Alternaria	*Alternaria alternata*	rAlt a 1
			rAlt a 2
Latex	Latex	*Hevea brasiliensis*	rHev b 1
			rHev b 3
			rHev b 5
			rHev b 6
			rHev b 7
			rHev b 8
			rHev b 9
			rHev b 10
			rHev b 11
Food	Milk	*Bos domesticus*	Bos d 4 (Alpha-Lactalbumin)
			Bos d 5 (b-Lactoglobulin A)
			Bos d 5 (b-Lactoglobulin B)
			Bos d 7 (IgG bovine)
			Bos d 8 (Casein)
			Alpha-Casein
			Beta-Casein
			Kappa-Casein
			Bos d Lactoferrin
			Bos d 6 (Bovine Serum Albumin)
	Egg	*Gallus domesticus*	Gal d 1 (Ovomucoid)
			Gal d 2 (Egg white albumin / Ovalbu
			Gal d 3 (Conalbumin)
			Gal d 4 (Lysozym)
	Carrot	*Daucus carrota*	rDau c 1
	Celery	*Apis graveolens*	rApi g 1
	Apple	*Malus domesticus*	rMal d 1
	Barley	*Hordeum vulgare*	Alpha Amylase
			Beta Amylase
	Wheat	*Triticum sp.*	Tri a 18 (Lectin / Agglutinin)

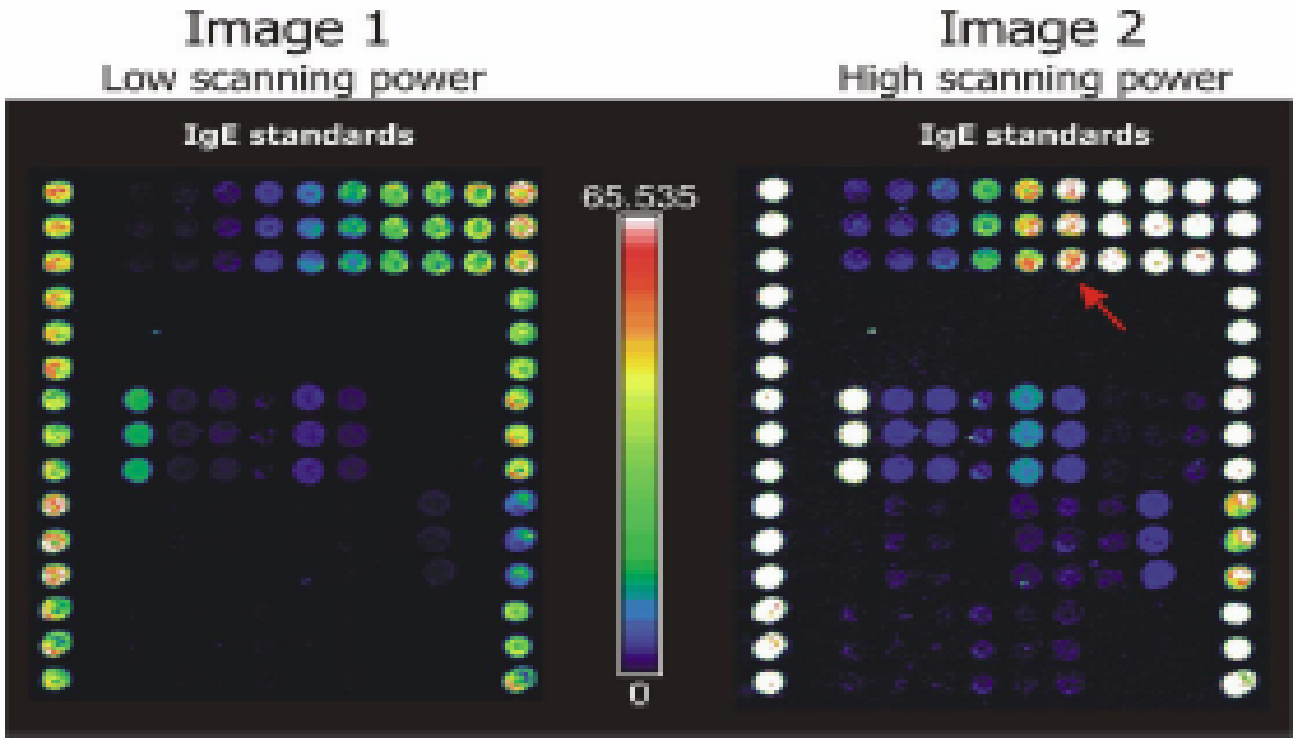
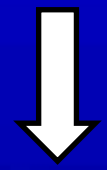


Fig. 2. Example of an ISAC® microarray image scanned at two different scan settings. The left image (Image 1) was scanned with low laser power settings. Accordingly, the image does not include any saturated pixels (white), including the IgE standard triplicates. Due to the reduced scan power only a part of the IgE concentration series is visible. The right image (Image 2) was scanned with increased laser power settings, to ensure that half of the IgE standard calibration curve triplicates appear saturated. A red arrow indicates the first of the saturate IgE triplicates.

Microarrays versus CAP system

- IgE specifiche contro molteplici antigeni
- Ridotte quantità di siero



- Uso di allergeni ricombinanti (vs estratti)
- Analisi degli epitopi (lineari) della risposta IgE

l'applicazione dei protein microarrays in Pediatria

un avanzamento verso un' "Allergologia Molecolare" propedeutica all'introduzione di innovative immunoterapie.

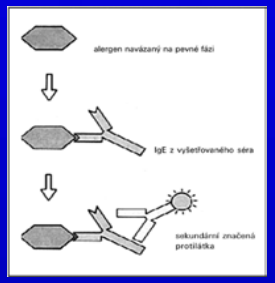
questi esami vanno visti come test di 3° livello, per approfondire la diagnostica di particolari sottogruppi di pazienti già sottoposti ai test immunoenzimatici classici di difficile interpretazione.

RAST
1 ml

1974

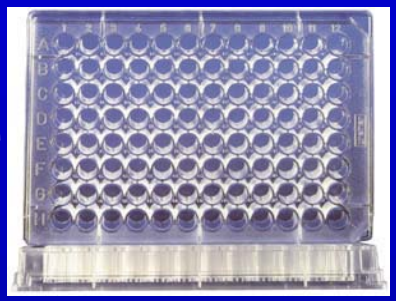
ml = 1 test

Estratti non standardizzati



Phadebas RAST
50-150 µl

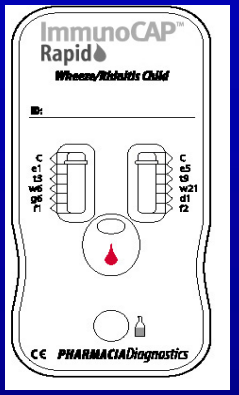
Estratti standardizzati



ELISA (96-wells)
50-150 µl

Prime molecole da DNA ricombinante

Immuno-CAP
50 µl

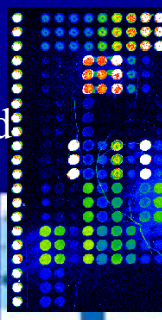


ImmunoCAP™ Rapid
110µ s.i.

standardizzazione
miniaturizzazione
ed automazione
del dosaggio per le IgE specifiche

2006

20 µl = >100 test



Microarray

Il futuro della diagnostica allergologica

dipenderà dal poter disporre di una **diagnostica standardizzata e riproducibile:**

- gli **SPT** e ancor di più gli **APT** senza queste caratteristiche rischiano di farci **perdere l'accreditamento** quando sarà necessario.

- **Test in vitro validati** dalla **standardizzazione** e **riproducibilità** devono entrare nella pratica clinica avvallati da **maneggevolezza, semplicità, convenienza.**

Senza significative innovazioni diagnostiche e il ricorso sempre più frequente a pratiche irrazionali si va ad intaccare la qualità di vita del bambino sostanzialmente sano

ci dovremmo impegnare con maggior convinzione e determinazione alla realizzazione degli obiettivi di qualità dell'assistenza nel suo complesso al bambino basandoci

solo su prove provate!

cavagni@opbg.net

Storia delle IgEs CAP

1967 Scoperta Immunoglobuline IgE

1971 Allergon, leader mondiale per la produzione di allergene (materiale grezzo)

1972 Test Phadebas® IgE

1974 Test Phadebas RAST®

1986 Test Phadiatop®

1989 Pharmacia CAP System™

1995 UniCAP® 100

2001 UniCAP® 1000 – Introduzione di un sistema automatico per test IgE su larga scala

2002 Phadiatop® Infant – Primo test di atopia per piccoli bambini

2002 Più di 500 differenti allergeni disponibili

2003 Nuovo brand – ImmunoCAP™

2004 ImmunoCAP™ 250 – Qualità ed automazione nei laboratori di media routine

Disegno del trial

Pazienti inclusi in accordo con
Criteri di Inclusione/Esclusione

↓

Storia Clinica
Esame fisico
Risultato SPT

↓

POSITIVO
NEGATIVO
INCERTO

Italia

Diagnosi Finale (per allergene)

↓

New ImmunoCAP results

POSITIVO
NEGATIVO
INCERTO

Conferma della diagnosi finale (per allergene)

Unresolved issues in genomic research

- Scientific issues
- Experimental design
- Experimental comparability
- Data analysis procedures
- Data sharing
- Effective networking
- User groups
- Consensus working groups
- Ethical issues
- Informed consent
- Biobanks
- Communication of relevant information to subjects and families
- Legal issues
- Intellectual property
- Patents
- Patient's confidentiality
- Health insurances
- Protection of patient in the workplace
- Worldwide regulatory frameworks
- EU regulatory frameworks
- National and local regulatory frameworks

e future of microarray technology: networking the genome search. .

Ambrosio, L., Gatta, S. Bonini. Allergy 2005: 60: 1219–1226

I VANTAGGI DEL MICROARRAY

- One shot genome wide expression analysis
- Rapid comparison between two states (control/diseased, untretead/treated and wild type/knockout)
- Exploration of new biological systems in a hypotheses generating rather than hypotheses testing fashion (_fishing_ experiments)
- Identification of markers to elucidate molecular mechanisms (signatures) underlying biological events and diseases
- Rapid molecular disease classification for more accurate molecular diagnostic, prognostic and targeted treatment

e future of microarray technology: networking the genome search.

I VANTAGGI DEL MICROARRAY

- One shot genome wide expression analysis
- Rapid comparison between two states (control/diseased, untretead/treated and wild type/knockout)
- Exploration of new biological systems in a hypotheses generating rather than hypotheses testing fashion (_fishing_ experiments)
- Identificatione di markers to elucidate molecular mechanisms (signatures) underlying biological events and diseases
- Rapida classificazione di malattia molecolare per una trattamento miratoe prognostico basato su un'accurata diagnosi molecolare

he future of microarray technology: networking the genome search.

GLI SVANTAGGI DEL MICROARRAY

- Restricted access to the technology (experiments still exprehensive to perform)
- Not yet approved as diagnostic tool by regulatory bodies
- Not a stand alone technique (need validation/confirmation tests)
- Skilled technical personnel needed (including biostatistician/bioinformatician for data analysis)
- Data derived from different platforms difficult to compare
- Data comparability difficult from one array version to the next
- Data obtained only partially used and published
- Data repositories and data sharing still not fully implemented
- Ethical and legal issues when dealing with patient samples

e future of microarray technology: networking the genome search.

Microarrays: innovazione

1)offre risultati riferiti alla reazione contro numerose singole molecole allergeniche (e non piu' miscele o estratti);

2)utilizza minimi volumi di siero (20 microlitri) da un prelievo di sangue capillare e minimi volumi di reattivi, con ridotti costi per singola determinazione; 3) facilita la verifica di diversi isotipi anticorpali; 4) apre prospettive allo studio di specificità epitopiche B. La disponibilità nella fase solida di singole molecole allergeniche purificate o ottenute con la tecnologia del DNA ricombinante permette di discriminare i soggetti polisensibili "veri" reattivi a molti distinti allergeni, da quelli "falsi", reattivi contro i cosiddetti pan-allergeni. Ad esempio, un