

# RIAP

immunologia  
pediatrica  
rivista  
Allergologia



Organo Ufficiale della Società Italiana di Allergologia ed Immunologia Pediatrica

*Direttore Editoriale e Scientifico*

Alberto E. Tozzi

*Comitato di Redazione*

Giuseppe Baviera, Clementina Canessa, Bianca Lattanzi,  
Marina Macchiaiolo, Umberto Pelosi, Neri Pucci

*Direttore Responsabile*

Patrizia Alma Pacini

*Segreteria Scientifica*

Manuela Moncada

*Editore*

Pacini Editore S.p.A. - Via Gherardesca - 56121 Pisa

*Copyright by*

Società Italiana di Allergologia ed Immunologia Pediatrica



**CONSIGLIO DIRETTIVO SIAIP**

*Presidente*

Luciana Indinnimeo

*Vice Presidente*

Michele Miraglia del Giudice

*Tesoriere*

Iride Dello Iacono

*Consiglieri*

Salvatore Barberi, Iride Dello Iacono, Umberto Pelosi,  
Giuseppe Pingitore, Giampaolo Ricci

*Segretario*

Salvatore Barberi

*Revisori dei conti*

Rachele Antignani, Gian Luigi Marseglia

04

agosto 2012 • anno XXVI



EDITORIALE

In ricordo di Giorgio Bartolozzi

1  
2

ALLERGIE



Le reazioni di ipersensibilità agli antinfiammatori non steroidei

A cura della Commissione Farmaci e Latice della SIAIP

Silvia Caimmi, Fabrizio Franceschini, Carlo Caffarelli, Diego G. Peroni, Giuseppe Crisafulli, Roberto Bernardini

4

La diagnosi di allergia a Bet v 1 e ai suoi omologhi

a cura della Commissione Diagnostica Allergologica della SIAIP

Giovanni Cosimo Indirli, Riccardo Asero, Mauro Calvani, Stefania La Grutta, Neri Pucci



13

PAI

Tubercolosi, vaccinazione con il Bacillo Calmette-Guérin e malattie allergiche: risultati dall'International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Fase Due

Carsten Flohr, Gabriele Nagel, Gudrun Weinmayr, Andrea Kleiner, Hywel C. Williams, Nadia Aït-Khaled, David P. Strachan & the ISAAC Phase Two Study Group

28

IMMUNOLOGIA

Basi genetiche della risposta immune alle vaccinazioni

Fabio Cardinale, Marta Ciofi degli Atti, Giorgio Bartolozzi, Baldassarre Martire, Viviana Moschese, Caterina Rizzo – Per conto delle Commissioni "Immunologia" e "Vaccini" della SIAIP



38

Per la corrispondenza scientifica:  
Alberto E. Tozzi, Manuela Moncada –  
E-mail: redazioneriap@gmail.com

Responsabile pubblicità e iniziative speciali:  
Manuela Mori, Pacini Editore S.p.A. –  
Tel. 050 3130217  
E-mail: mmori@pacinieditore.it

Le fotocopie per uso personale del lettore possono essere effettuate nei limiti del 15% di ciascun fascicolo di periodico dietro pagamento alla SIAE del compenso previsto dall'art. 68, commi 4 e 5, della legge 22 aprile 1941 n. 633.

Le riproduzioni effettuate per finalità di carattere professionale, economico o commerciale o comunque per uso diverso da quello personale possono essere effettuate a seguito di specifica autorizzazione rilasciata da AIDRO, Corso di Porta Romana n. 108, Milano 20122, E-mail: segreteria@aidro.org e sito web: www.aidro.org.

Aut. Trib. di Pisa n. 14/86 dell'11/11/86

Finito di stampare nel mese di Ottobre 2012 presso le Industrie Grafiche della Pacini Editore S.p.A. - Pisa

- Autori stranieri o argomenti internazionali
- Relazione medico-famiglie o punto di vista delle famiglie
- Autore/i di età inferiore a 40 anni
- Revisione sistematica
- Materiale iconografico
- Critical Appraised Topic
- Contributo originale
- Caso clinico
- Commissione SIAIP

Rivista stampata su carta TCF (Total Chlorine Free) e verniciata idro.

## Prof Bartolozzi, siamo rimasti soli!

Mi telefonava di mattina presto, la musica classica in sottofondo, per propormi di scrivere insieme oppure per rispondere a un quesito particolarmente intrigante sulle vaccinazioni insieme a lui. Mi invitava a partecipare a lunghe e popolarissime sessioni congressuali sulle vaccinazioni che tutti i partecipanti seguivano sempre dall'inizio alla fine senza mai stancarsi. Era infaticabile e studiava continuamente, non gli sfuggiva una virgola. Pronto a discutere con passione e a difendere a spada tratta i principi della prevenzione attraverso le vaccinazioni per il bene dei bambini, anche nelle sedi istituzionali come la Commissione Vaccini del Ministero della Salute. Venne a Stoccolma nel 1995 per condividere con l'allora gruppo del Progetto Pertosse la soddisfazione di aver concluso uno studio scientifico italiano sulle vaccinazioni che tutto il mondo avrebbe da quel momento in poi considerato un riferimento.

Ci mancherà per sempre, ma è proprio ora che la sua assenza si fa sentire di più. Nel giro di pochi mesi tanti sembrano essersi schierati proprio contro le vaccinazioni, e quindi contro i bambini. Prima la sentenza di Rimini che riconosce un risarcimento per un bambino con autismo che viene ascritto alla vaccinazione contro morbillo parotite e rosolia contro ogni evidenza scientifica. Poi un'altra notizia recente che ci racconta del risarcimento milionario che una ASL dovrà erogare ad una famiglia di Torino per un caso di "coma da vaccinazione". Ancora, un comitato di consumatori suggerisce al governo di risparmiare sulla vaccinazione contro Hib e pertosse, che viene definita "inutile". Allargando lo sguardo all'Europa, a Madrid la vaccinazione contro lo pneumococco con vaccino coniugato torna ad essere a pagamento per chi vuole praticarla. La crisi economica sta producendo una quantità di gravi effetti collaterali, ma quelli sulla salute potrebbero essere disastrosi. Se passa il concetto che le spese per la prevenzione, e quindi quelle per i vaccini, sono un lusso che non ci possiamo permettere, vuol dire che chi si occupa delle scelte strategiche per la salute non sa che le vaccinazioni sono uno degli interventi con il più alto ritorno dell'investimento.

Rinunciare alle strategie vaccinali consolidate vuol dire condannare alcuni bambini, ma anche alcuni adulti, a malattie evitabili, alle loro complicazioni, e talvolta a morte. Oltre al diritto alla salute e alla vita, che da solo giustifica le strategie vaccinali correnti, è facile capire che il risparmio di ricoveri ospedalieri, di farmaci, di spese indirette associate alla malattia prevenibile supera di gran lunga l'investimento per la strategia vaccinale. E quando si fanno valutazioni economiche sui vaccini, prudentemente, non si considerano altri importanti vantaggi come il mantenimento della produttività delle persone che, in presenza della malattia, avrebbero disabilità fisiche e mentali (pensate al vaccino per Hib, uno di quelli considerati "inutili"), il mantenimento della fertilità della popolazione (i vaccini aumentano infatti la sopravvivenza), e la prevenzione delle resistenze antibiotiche che si può conseguire attraverso le vaccinazioni per malattie batteriche. Contro il principio che la prevenzione sia un lusso che non ci possiamo permettere, proprio in un'epoca nella quale le spese sanitarie non sono più totalmente sostenibili, è proprio sulla prevenzione che bisogna puntare perché costa poco, privilegia la qualità della vita ed ha, appunto, il miglior ritorno di investimento di qualunque altra politica sanitaria. Professor Bartolozzi, noi siamo rimasti soli. Per discutere e combattere contro chi vuole una regressione a principi che, con tutto il rispetto, non si incontrano più neanche nei Paesi in via di sviluppo, ci vuole forza e autorevolezza. Ci vuole passione per la salute dei bambini. Ci vuole l'esperienza di chi ha attraversato decenni nei quali faticosamente il nostro Paese ha guadagnato per la salute della popolazione uno status migliore di tanti altri Paesi. Ci vorrebbe lei per discutere ancora e per far tornare questa materia nel cuore di tutti. Lei sicuramente vorrebbe che noi continuassimo a lavorare per l'interesse primario dei bambini. Lo faremo, ma senza di lei sarà dura.

Alberto E. Tozzi  
redazioneriap@gmail.com

## In ricordo di Giorgio Bartolozzi

Guardo la foto della Commissione Vaccini della SIAIP che accompagna la pubblicazione degli articoli sulla RIAP e mi è davvero difficile pensare al nostro gruppo di lavoro, orfano del suo componente più luminoso. Il Prof. Bartolozzi è stato l'anima di questa Commissione fin dal suo avvio e ci ha accompagnato con competenza e affetto in questa avventura. Se guardo indietro, ripenso ai primi anni '90 quando ho discusso per la prima volta con il Professore i risultati del Progetto Pertosse. Da allora e per gli anni a venire sono cresciuta professionalmente e umanamente grazie a quanto abbiamo potuto fare insieme. La sua curiosità e apertura mentale, l'onestà intellettuale, la capacità di individuare il focus dei problemi e di discutere apertamente ogni criticità sono stati tratti distintivi e speciali. Ora continuiamo da soli, ma la mancanza è grande. Per questo oggi vogliamo ricordarlo con i nostri pensieri e condividerli con quanti hanno avuto l'opportunità di conoscerlo anche attraverso i suoi contributi alla RIAP.

Marta Ciofi degli Atti

Quando il 27 luglio ebbi notizia della scomparsa di Giorgio Bartolozzi, pensai con rimpianto che la lunga serie di appuntamenti con lui in passato alla Commissione Nazionale Vaccini, e poi al Gruppo SIAP ed ai congressi, era terminata: non ci sarebbe stato più il prossimo incontro, al Congresso d'Igiene di Cagliari agli inizi di Ottobre.

Una figura a cui volevo bene, quella di Bartolozzi: pediatra universitario e soprattutto medico dei bambini come lui amava definirsi, a lungo direttore scientifico del Mayer e Direttore della Clinica Pediatrica di Firenze, ricercatore, coltivatore di talenti e divulgatore, oggi Emerito dell'Università, era un conversatore civile e affascinante, mai prevaricatore né fiorentinamente sarcastico verso chi non la pensava come lui, ma rispettoso e soprattutto teso a convincerlo con le prove scientifiche.

Portava con grazia i suoi 86 anni e gli acciacchi che questi comportavano, ma guardava sempre al di là ed in avanti, fresco di mente e di eloquio, sempre pronto con la notizia nuova e desideroso di dividere con gli altri il suo sapere e le sue intuizioni. Sono queste le figure che oggi nell'Università scarseggiano: essere utili agli altri, ancor più che affermarsi. Per questo, soprattutto, a lui si addiceva – si addice – l'antico motto latino, fatto proprio dai Templari: <nos, non nobis domine>.

Gaetano Maria Fara

Per chi, come me, si occupa di malattie infettive e della loro prevenzione, le occasioni per conoscere e frequentare il Prof. Bartolozzi sono state numerose. Era uno dei maggiori esperti di vaccini, dei quali sapeva tutto e, per questo, era richiesto di continuo a partecipare come relatore a prestigiosi congressi e a fare parte delle più diverse Commissioni nazionali in cui questi preparati sono analizzati e discussi. Quello che colpiva di lui, al di là della sua indiscussa competenza da tutti riconosciuta, era la modestia e la simpatia con cui si presentava e portava avanti le sue argomentazioni. Da un esperto non più giovane che da anni si occupa con grandissimo successo di un argomento dando ineguagliabili contributi didattici, ci si aspetta un atteggiamento in qualche modo di sufficienza di fronte a persone più giovani. Il Prof. Bartolozzi, invece, era sempre non solo disponibile ad una discussione aperta su un piano di assoluta parità ma era anche sempre propenso a mettere in discussione le proprie idee, con una modestia assolutamente rara in chi da anni è tra i leader di un settore scientifico. Non ho mai visto né sentito il Prof. Bartolozzi alzare la voce per imporre quanto riteneva giusto ma l'ho sempre visto semplicemente come un assertore di idee documentate e aperto ad una discussione franca e produttiva. Ci mancherà, quindi, non solo come persona di elevata cultura a cui fare riferimento per risolvere dubbi e problemi

ma anche come uomo saggio e disponibile al quale potersi rivolgere in ogni momento per un suggerimento e un consiglio, anche al di fuori del campo strettamente scientifico che poteva accomunare i pediatri interessati alle malattie infettive e alla loro prevenzione. Ci mancherà, però, non solo come scienziato ma anche, se mi è permesso di dirlo, come amico, cosa sicuramente molto più triste ed importante. Il primo appuntamento all'inizio di settembre in cui lo incontravo era l'ICAAC, il principale Congresso internazionale di infettivologia che si tiene negli Stati Uniti. Quando entravo in aula per partecipare alle sessioni sui vaccini il Prof. Bartolozzi era sempre già seduto nelle prime file, insieme alla moglie Professoressa Marianelli. Al termine delle sessioni ci confrontavamo sulle relazioni presentate ed era veramente piacevole e istruttivo sentire i suoi commenti. Quest'anno a San Francisco il Prof. Bartolozzi non ci sarà e sono davvero triste al pensiero di non rivederlo più. Di lui mi resteranno, però, i grandi insegnamenti, tutto ciò che ha scritto e i piacevoli ricordi.

Susanna Esposito

L'attività formativa del prof. Bartolozzi svolta per noi pediatri di famiglia ha costituito una pietra miliare per la nostra pratica quotidiana. Il mio primo incontro con lui è stato un vero e proprio "colpo di fulmine", infondendomi il coraggio di operare scelte, anche contro la cultura dominante, fondate sulla forza della conoscenza scevra da precomprensioni ideologiche e con costante senso critico. Quando mi si presentavano casi particolari gli telefonavo al mattino presto e lui, chiamandomi con affetto "dottorina", mi citava sempre sull'argomento un lavoro recentissimo (aveva tra l'altro una memoria fuori dall'ordinario) su cui decidere con il maggiore fondamento scientifico possibile. È scomparso da poco più di un mese e ho già sperimentato la mancanza del suo pronto, competente e affettuoso consiglio.

Milena Lo Giudice

È molto complesso cercare di tracciare un profilo esaustivo del Prof. Bartolozzi, in poche righe: uomo, clinico e studioso di eccellenza. Tuttavia, il suo percorso di vita non può passare inosservato visto il suo contributo umano e scientifico alla professione medica e pediatrica. I suoi successi professionali e le sue competenze nel campo delle vaccinazioni in età pediatrica, per nostra fortuna, rimarranno nella memoria di tutti grazie alle sue pubblicazioni scientifiche e saranno motivo di stimolo e di studio per tutti i giovani medici che vorranno avvicinarsi alla Pediatria. Ma, soprattutto, nel ricordare il Prof Bartolozzi non si può non soffermarsi sulla sua grande capacità di parlare con i giovani trasmettendo senza alcuna "avarizia intellettuale" tutto il suo sapere e le sue competenze. Elegante, curioso e illuminato, verrà ricordato da tutti come esempio per la sua passione per la professione medica e per le sue doti di grande umanità e disponibilità al dialogo ed al confronto pacato.

Caterina Rizzo

# Le reazioni di ipersensibilità agli antinfiammatori non steroidei

a cura della Commissione Farmaci e Latice della SIAIP

Silvia Caimmi<sup>1</sup>, Fabrizio Franceschini<sup>2</sup>, Carlo Caffarelli<sup>3</sup>, Diego G. Peroni<sup>4</sup>, Giuseppe Crisafulli<sup>5</sup>, Roberto Bernardini<sup>6</sup> (coordinatore)



Parole chiave: ipersensibilità ai farmaci, antinfiammatori non steroidei, aspirina, test di provocazione orale

## Abstract

Le reazioni di ipersensibilità agli antinfiammatori non steroidei (FANS) costituiscono, dopo quelle agli antibiotici, la principale causa di ipersensibilità a farmaci. Le più comuni manifestazioni cliniche coinvolgono il solo tratto respiratorio (rinosinusite, asma) o cutaneo (orticaria e angioedema) o sono generalizzate (anafilassi). I pazienti affetti spesso presentano quadri clinici respiratori o cutanei sottostanti e la concomitante assunzione di FANS può favorire la comparsa di sintomi riferiti a tali quadri clinici. Alcune classi di FANS possono causare tossidermie, che sottendono una base immuno-allergica. Una diagnosi precoce, associata a un'adeguata terapia, una valutazione medica e di uno specialista allergologo sono necessarie al fine di diminuire la morbilità e il rischio di potenziale mortalità, legato a tali reazioni avverse.

## Introduzione

I Farmaci Antinfiammatori Non Steroidei (FANS) rappresentano una categoria di farmaci non correlati chimicamente ma accomunati dalle proprietà terapeutiche antinfiammatorie, analgesiche, antipiretiche e di inibizione piastrinica.

Già nel '400 a.C. Ippocrate considerava le foglie di salice un rimedio per le partorienti alle quali consigliava, per vincere il dolore delle doglie, di bere un infuso di tali foglie o la linfa estratta dalla corteccia dell'albero. Nel 1828 Johann Andreas Buchner, professore di farmacologia, estrasse dalla corteccia del salice un

composto che chiamò salicina; negli anni successivi si dimostrò che nell'organismo la salicina viene trasformata in acido salicilico. Nel 1893 Felix Hoffman, chimico della Bayer, esterificò il gruppo fenolico dell'acido salicilico creando l'acido acetil-salicilico che, testato in trials clinici, dimostrò di presentare la stessa efficacia dell'acido salicilico con meno effetti collaterali. A questo farmaco nel 1899 venne dato il nome di Aspirin ("a" = acetilazione, "spir" = fiore da cui si ricava l'acido salicilico *Ulmeria Spiroea*, "in" = suffisso usato per i farmaci di quell'epoca). Il meccanismo di azione dei FANS è stato scoperto solo nel 1970<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Clinica Pediatrica, Fondazione IRCCS, Policlinico San Matteo, Pavia; <sup>2</sup> UOC Pediatria, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Ospedali Riuniti", Ancona; <sup>3</sup> Clinica Pediatrica, Dipartimento di Pediatria, Università di Parma; <sup>4</sup> Dipartimento di Pediatria, Università di Verona; <sup>5</sup> UO Allergologia, Dipartimento di Pediatria, Università di Messina; <sup>6</sup> UOC Pediatria, Nuovo Ospedale San Giuseppe, Empoli

Oggi i FANS rappresentano i medicinali maggiormente usati nel mondo; molti di essi sono considerati farmaci per automedicazione e risultano pertanto esenti da ricetta medica. È possibile classificare i FANS sia in base alla struttura chimica sia in base alla selettività di azione (Tab. I) <sup>2</sup>.

### Fisiopatologia

Nonostante siano generalmente ben tollerati, i FANS possono provocare una serie di reazioni avverse, distinguibili in effetti collaterali e reazioni di ipersensibilità.

**Gli effetti collaterali** sono reazioni prevedibili, dose dipendenti e riconducibili all'azione farmacologica. Il più comune effetto collaterale dei FANS riguarda la attività lesiva sulla mucosa gastrica, che può provocare nausea, dolore o bruciore epigastrico, ulcere peptiche: è però possibile mitigare tali conseguenze assumendo il farmaco a stomaco pieno o in associazione con antiacidi o gastro-protettori. Altri effetti collaterali dei FANS possono essere nefriti interstiziali, epatiti, anemia. Nei bambini questi farmaci possono determinare, qualora vengano somministrati in concomitanza di infezioni delle prime vie aeree, una rara forma di encefalopatia acuta associata a degenerazione epatica (Sindrome di Reye).

**Le reazioni di ipersensibilità** avvengono in soggetti predisposti, sono imprevedibili e indipendenti dalla dose. L'Accademia Europea di Allergologia e Immunologia Clinica (EAACI) ha suggerito di classificare tali reazioni in ipersensibilità allergica (nei casi in cui si dimostrano anticorpi e/o linfociti T diretti contro il farmaco o i suoi metaboliti) e in ipersensibilità non allergica (qualora i meccanismi sopra descritti non siano implicati) <sup>3</sup>.

**Ipersensibilità non allergica** – Rappresentano le reazioni di ipersensibilità più frequenti e l'esempio tipico è il broncospasmo indotto dall'aspirina <sup>4</sup>. L'insorgenza immediata di tale complicanza dopo l'assunzione del farmaco ha fatto ritenere per molto tempo che fosse in causa una reazione IgE mediata, anche se tale ipotesi contrastava col fatto che la stessa reazione poteva insorgere anche con FANS chimicamente molto diversi tra loro. La scoperta del meccanismo patogenetico della maggior parte delle reazioni di ipersensibilità non allergica è dovuto a Szczeklik, che scoprì che i FANS erano in grado di provocare uno shunt del metabolismo dell'acido arachidonico, inibendo l'attività enzimatica delle ciclossigenasi (COX) e provocando di conseguenza l'aumento della attività delle 5-lipossigenasi. Gli effetti finali sono la diminuita sintesi di prostaglandine (PG) e di trombossani (importanti mediatori

**Tab. I.** Classificazione dei FANS <sup>2</sup>.

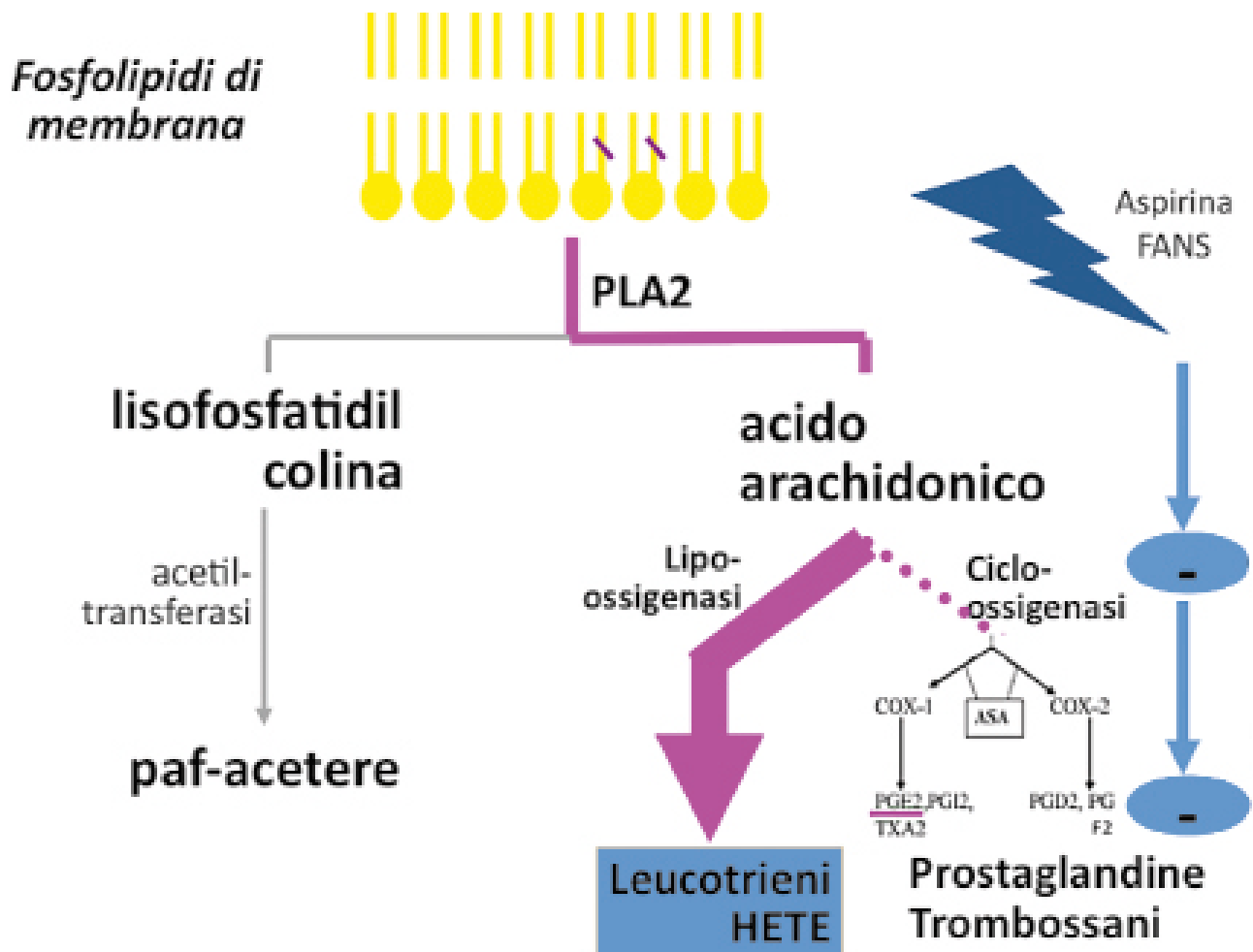
Chimica	
Salicilici	Ac. Acetisalilico, acetilsalato di lisina, diflusina, imidazolo 20H benzoato, benorilato
Pirazolonici	Fenilbutazone, aminofenazone, ossifenilbutazone pirasanone, metamizolo, bumadizone, feprazone
Indolici	Indometacina, glucametacina, proglucometacina, sulindac, tolmetin, oxametacina, protacina
Fenamati (derivati fenil antranilici)	Ac. flufenamico, ac. mefenamico, ac. Meclofenamico, ac. niflumico
Arilpropionici	Ibuprofene, ketoprofene, fenprofene, piroprofene, naprossene, suprofene, flurbiprofene, flumoxaprofene, piroprofene, pirorossene, ac. tiaprofenico, ibuproxan, piperazina propionato
Oxicam	Piroxicam, cinnoxiam, tenoxicam, meloxicam
Para-aminofenolici	Paracetamolo
Aril-acetici	Diclofenac, fentiazac
Piranocarbossilici	Etodolac, ketorolac
Sulfanilamidi	Nimesulide
Coxib	Etoricoxib, celecoxib, lumiracoxib, rofecoxib, valdecoxib
Inibizione delle COX	
COX-1 + COX-2	Piroxicam, indometacina, sulindac, tolmetina, diclofenac, naprossene, ibuprofen, ketoprofen, flubiprofen, ketorolac, fenilbutasone
COX-1 +COX-2 (debole)	Paracetamolo
COX-2 selettivi	Rofecoxib, celecoxib, etoricoxib
COX-2 relativi	Nimesulide, meloxicam

dell'infiammazione) e l'aumentata produzione di leucotrieni <sup>5</sup>. Le COX nell'organismo sono presenti in due differenti isoforme: una forma *costitutiva* (ciclossigenasi 1: COX-1), presente fisiologicamente nella mucosa gastrica, bronchiale, parenchima renale e sangue, e una forma *inducibile* (ciclossigenasi 2: COX-2), la cui produzione viene indotta nei macrofagi, fibroblasti, cellule endoteliali e monociti durante i processi flogistici (Fig. 1). L'acido acetilsalicilico (ASA) inibisce entrambe le COX mediante inattivazione irreversibile e la sua durata d'azione è correlata al turnover di tali enzimi, diverso nei vari tessuti. Gli altri FANS invece inibiscono le COX competitivamente: tale azione è reversibile e in questo caso la durata dell'effetto terapeutico è correlata alla farmacocinetica di ciascun farmaco.

*Ipersensibilità allergica IgE mediata* – Sono rari i casi in cui si riscontrano reazioni di ipersensibilità IgE me-

diata nei riguardi di singoli FANS, anche se in tali occasioni le reazioni possono essere molto gravi. Oltre a poter causare anafilassi, l'aspirina può facilitare l'anafilassi indotta da alimenti, in particolare se scatenata dallo sforzo. Questi effetti potrebbero essere dovuti all'aumentata permeabilità intestinale indotta dal farmaco, che comporta un maggior passaggio degli allergeni alimentari dalla mucosa alla sottomucosa intestinale, ricca di cellule immuno-competenti <sup>6-9</sup>.

*Ipersensibilità allergica non IgE mediata* – Le reazioni ritardate a FANS sono mediate dalla attivazione di meccanismi citotossici di tipo cellulo mediato (tipo IV), di cui sono stati descritti diversi sottotipi (IVa, IVb, IVc and IVd) in base alle cellule effettrici coinvolte nella reazione (monociti, eosinofili, linfociti CD4 o CD8, neutrofili) <sup>10</sup>. La attivazione di cellule T farmaco specifiche comporta sia una attività citotossica nei confronti dei



**Fig. 1.** Meccanismo di azione dell'aspirina e FANS.



cheratinociti, sia una flogosi cutanea, mediata dalla produzione di citochine.

Lo sviluppo di una reazione ritardata prevede una fase iniziale di sensibilizzazione (che dura 3-4 giorni e avviene a livello linfonodale) e altre tre fasi successive: presentazione del peptide antigenico nell'ambito del sistema di istocompatibilità (MHC), attivazione di cellule T in grado di riconoscere il complesso MHC/farmaco, un addizionale segnale di pericolo o di stress cellulare. La necessità di quest'ultimo segnale deriva dalla osservazione che le reazioni di tipo ritardato a farmaci sono molto più frequenti in corso di virusi o di malattie autoimmuni sistemiche <sup>11</sup>. L'interessamento prevalentemente cutaneo durante queste reazioni è dovuto alla frequente espressione da parte delle cellule T attivate del recettore di *homing* cutaneo (CLA: cutaneous lymphocyte associated antigen), che polarizza la reazione immunitaria a livello dell'epidermide.

### Epidemiologia e fattori di rischio

Le reazioni di ipersensibilità immediate a FANS rappresentano la seconda causa più comune di reazioni di ipersensibilità a farmaci, dopo quelle ad antibiotici. La prevalenza di tali reazioni negli adulti va dal 4,3% all'11% nei pazienti con asma e dal 27 al 35% in quelli con orticaria cronica. La prevalenza delle reazioni all'ASA nella popolazione generale va dallo 0,5% all'1,9% e può arrivare al 25% nei pazienti con asma associata a poliposi nasale <sup>12</sup>. I dati epidemiologici per l'età pediatrica non sono molto differenti, in quanto variano dallo 0,3% della popolazione normale al 4% degli atopici, mentre in bambini con asma la prevalenza di reazioni di ipersensibilità indotte da ASA è superiore al 10% <sup>13</sup>. I composti arilacetici sembrano i maggiori responsabili di reazioni anafilattiche, mentre gli inibitori selettivi delle COX-2 rap-

presentano i farmaci più sicuri, essendo in causa solo nello 0.008% dei casi <sup>14</sup>. Non è conosciuta la prevalenza delle reazioni di ipersensibilità ritardate ai FANS.

L'atopia rappresenta il più importante fattore di rischio, sia per l'insorgenza di manifestazioni cutanee quali orticaria e angioedema, sia per le reazioni respiratorie, come l'asma da aspirina (circa un terzo dei soggetti affetti da tale patologia sono atopici). Inoltre si è rilevato che in molti pazienti l'ipersensibilità a FANS si associa alla sensibilizzazione ad acari della polvere e spesso anche all'anafilassi da alimenti contaminati da acari; sembra quindi esistere una *triade* di rischio, costituita dalla presenza di una patologia respiratoria da allergia ad acari della polvere (asma o rinite allergica), ipersensibilità a FANS e reazioni gravi ad alimenti contaminati da acari. Inoltre, l'osservazione che gli enzimi degli acari possiedono in vitro attività inibente le COX-1 ha portato a ipotizzare che nei soggetti con malattie allergiche respiratorie causate dagli acari esista, almeno in alcuni casi, una disregolazione della biosintesi dei leucotrieni <sup>15-17</sup>.

### Quadri clinici

In base all'intervallo temporale tra assunzione del farmaco e insorgenza della sintomatologia, le reazioni di ipersensibilità a FANS possono essere distinte in immediate e ritardate (Tab II) <sup>12</sup>. Le reazioni immediate si verificano da pochi minuti fino a 24 ore dopo l'ingestione del farmaco, quelle ritardate insorgono dopo 24 ore, spesso dopo giorni o settimane dall'assunzione.

### Reazioni immediate

*Malattia respiratoria esacerbata da Aspirina (Aspirin Exacerbated Respiratory Disease: AERD)* – Tale pato-

**Tab. II.** Classificazione delle reazioni di ipersensibilità a FANS (da Kowalski et al., 2011 <sup>12</sup>, mod.).

Reazioni	Clinica	Patogenesi	Patologia associata
Immedieate	Rinite/asma	Inibitori di COX-1, con cross reattività	Asma/rinosinusite, poliposi nasale
	Orticaria/angioedema	Inibitori di COX-1, con cross reattività	Orticaria cronica
	Orticaria/angioedema	Inibitori di COX-1, con cross reattività	Nessuna
	Orticaria/angioedema/anafilassi	IgE mediata, senza cross reattività	Atopia, allergia alimentare o a farmaci
Ritardate	Eruzioni cutanee fisse Esantemi maculo papulari Esantemi bollosi Polmonite Meningite asettica Nefrite Dermatite da contatto	Cellulo mediate (tipo IV, cellule T citotossiche, cellule NK) Indotte da uno o più FANS	Nessuna

logia (definita anche triade di intolleranza all'aspirina, Sindrome di Widal, Sindrome di Samter) è di raro riscontro in età pediatrica. I pazienti affetti presentano storia di asma e/o di rinosinusite cronica, spesso complicata dalla presenza di poliposi nasale (la cosiddetta triade ASA: poliposi nasale, sinusite, asma). La patologia asmatica è generalmente moderata o grave, spesso steroide-dipendente. L'assunzione di aspirina o di altri FANS provoca in un tempo variabile da pochi minuti a qualche ora l'insorgenza di rinorrea, congestione nasale, congiuntivite, seguiti da un aggravamento severo dell'asma, che può richiedere un trattamento d'urgenza. In alcuni casi si associano sintomi cutanei (vampate di calore al volto, orticaria), dolori addominali, ipotensione.

L'approccio diagnostico si basa sul quadro clinico e sul test di provocazione, che può essere effettuato per via orale, nasale, bronchiale o endovenosa. I vari test possiedono analoghi sensibilità (80-90%) ma il test per via orale è considerato il "gold standard", mentre il test per via nasale va riservato ai soggetti affetti da asma severo.

*Orticaria-angioedema in pazienti con orticaria cronica* – Nei pazienti affetti da orticaria cronica la assunzione di FANS può provocare esacerbazioni, anche severe, dell'orticaria, sia nei pazienti in remissione sia soprattutto in quelli con malattia in fase attiva. Il fatto che le riacutizzazioni sono scatenate da FANS COX-1 inibitori porta a ritenere che il meccanismo patogenetico sia analogo a quello descritto per la AERD. Circa il 90% di questi pazienti presenta però positività al test cutaneo con siero o plasma autologo; tale evidenza depone per una associazione tra orticaria cronica, autoimmunità e ipersensibilità all'aspirina<sup>18</sup>.

Per la diagnosi spesso è sufficiente l'anamnesi, ma talvolta è necessario ricorrere al test di provocazione orale, che deve essere eseguito nei periodi di remissione dell'orticaria (se possibile di almeno 1-2 settimane). Rispetto ai pazienti con AERD sono mediamente necessarie dosi più alte di FANS per scatenare le esacerbazioni della malattia. La maggior parte di questi pazienti tollera il paracetamolo.

*Orticaria-angioedema indotto da più di un FANS* – Si tratta di reazioni di orticaria/angioedema indotte da più FANS in pazienti sani, senza storia anamnestica né di orticaria cronica né di altre patologie. L'angioedema facciale rappresenta la più comune manifestazione clinica. Queste reazioni si verificano più spesso in soggetti atopici affetti da rinite e/o asma, e circa

un terzo dei pazienti svilupperà orticaria cronica in futuro<sup>19</sup>. L'osservazione che orticaria e angioedema sono provocati da farmaci che condividono l'azione di inibizione delle COX-1 suggerisce che anche in questo caso sia in causa una reazione di ipersensibilità non allergica. Pertanto, per la diagnosi è spesso sufficiente la storia clinica e solo raramente è necessario il test di provocazione. Naprossene, ibuprofene e diclofenac rappresentano i FANS più spesso in causa: circa l'80% dei pazienti tollera il paracetamolo o la nimesulide.

*Reazioni di ipersensibilità indotte da un singolo FANS* – In alcuni casi reazioni di ipersensibilità immediata possono essere indotte da un singolo FANS, o da molecole tra loro chimicamente correlate. Nella grande maggioranza dei casi sono in causa i pirazoloni; per altri FANS quali diclofenac, paracetamolo, ibuprofene, naprossene esistono solo sporadiche segnalazioni<sup>20</sup>. Si possono osservare orticaria, angioedema, edema laringeo, prurito generalizzato, rinite, broncospasmo e soprattutto anafilassi (ASA e FANS rappresentano i farmaci che causano più frequentemente reazioni anafilattiche). Nonostante alla base vi sia un meccanismo IgE mediato, le IgE specifiche possono essere dimostrate solo raramente, mediante test cutanei o *in vitro*, a causa della loro bassa validità diagnostica. La diagnosi deve essere effettuata con il test di provocazione con il farmaco sospetto; in caso di positività tale test va ripetuto con un farmaco chimicamente diverso per ricercare un'alternativa terapeutica<sup>21</sup>.

### **Reazioni ritardate**

*Eruzioni cutanee fisse* – Sono eruzioni cutanee che tendono a persistere nelle stesse sedi nel tempo e a ricidivare sempre nel medesimo punto ogni volta che si ripete l'assunzione del farmaco responsabile, anche se può aumentare il numero delle aree colpite. Le lesioni sono rappresentate da placche eritemato-edematose rotondeggianti o ovalari spesso iperpigmentate, talora con evoluzione bollosa. Le sedi più comuni sono gli arti (in particolare in sede palmo-plantare), i genitali, le aree perineali; sono possibili localizzazioni mucose. Il meccanismo patogenetico è cellulomediato; nelle zone colpite sono presenti infiltrati perivascolari e dermo-epidermici di cellule T (CD4 e CD8). Gli agenti eziologici più frequenti tra i FANS sono i pirazoloni, anche se possono essere in causa un gran numero di altri composti tra cui nimesulide, paracetamolo, piroxicam. È stata riportata cross reattività tra piroxicam, tenoxicam e droxicam, ma non tra naprossene e altri derivati dell'acido propionico<sup>22</sup>.

*Esantemi maculo papulari* – Rappresentano le più comuni reazioni di ipersensibilità ritardata a FANS, anch'esse mediate da meccanismi T cellulari. Le manifestazioni cliniche sono costituite da *rash* cutanei di tipo scarlattiniforme, rubeoliforme o morbilliforme. Talora si evidenziano eruzioni papulose, più raramente macule estese, policicliche. Le mucose sono in genere rispettate. Le lesioni cutanee possono accompagnarsi a febbre, prurito, eosinofilia, trombocitopenia, leucocitopenia. La distribuzione delle lesioni è per lo più simmetrica coinvolgendo il tronco e le estremità. Ibuprofene, pirazoloni, flurbiprofene rappresentano i FANS più frequentemente in causa <sup>12</sup>.

*Esantemi bollosi* – (S. di Stevens Johnson, S. di Lyell). Si tratta di rari ma gravi quadri cutanei associati ad alta mortalità, che insorgono da una a otto settimane dopo l'assunzione del farmaco. Sono reazioni caratterizzate da ampia necrosi dei cheratinociti, determinata dalla azione dei linfociti T citotossici con attivazione dei recettori di apoptosi (FAS e FAS ligando). I FANS più spesso in causa sono rappresentati dagli oxicam, fenilbutazone e anche gli inibitori della COX-2 <sup>23</sup>.

*Pustolosi esantematosa acuta generalizzata (Acute Generalized Exanthematous Pustolosis: AGEP)* – Si tratta di una rara manifestazione cutanea caratterizzata da pustole sterili disseminate. Generalmente la pustolosi inizia al viso e alle aree flessorie delle pieghe, diventando rapidamente diffusa e complicandosi con febbre, leucocitosi massiva e talora eosinofilia. Le pustole sono intraepidermiche e contengono granulociti neutrofili, circondati da un infiltrato di T linfociti. Sono descritti casi associati a celecoxib e ibuprofene.

*Manifestazioni rare* – Sono possibili casi di meningite asettica, caratterizzata da febbre, dolori addominali, artralgie, *rash* cutanei che insorgono entro poche ore dalla assunzione di un FANS (soprattutto ibuprofene e naprossene). Altra rara manifestazione è rappresentata dalla polmonite da ipersensibilità, caratterizzata da tosse, febbre, infiltrati polmonari ed eosinofilia ematica. Nei casi più gravi è necessaria la terapia steroidea.

---

## Diagnosi

*Test cutanei* – I test cutanei a lettura immediata per i FANS (prick, intradermoreazione) non sono standardizzati e possiedono una sensibilità bassa e variabile

da un farmaco a un altro <sup>24</sup>. Anche i test cutanei a lettura ritardata, (intradermoreazione e patch test), nonostante possiedano un valore diagnostico migliore, non sono validati.

*Test in vitro* – IgE specifiche sieriche per FANS sono state identificate solo in rari casi, per cui non è possibile determinare la sensibilità e la specificità di questo test. Il valore diagnostico del test di liberazione dell'istamina, del test di liberazione dei leucotrieni (CAST: cellular antigen stimulation test) e del test di attivazione dei basofili (BAT), è scarso <sup>25,26</sup>. L'utilità diagnostica dei test in vitro che esplorano le reazioni di ipersensibilità ritardata, quali i test di proliferazione/trasformazione linfocitaria per i FANS non è nota, mentre sembra buona per altri farmaci come beta-lattamici, sulfamidici, antiepilettici e alcuni farmaci anti retro virali <sup>27,28</sup>.

*Test di provocazione orale* – Rappresenta il *gold standard* diagnostico. I test di provocazione possono essere eseguiti sia per la conferma diagnostica di una sospetta reazione di ipersensibilità a un FANS, sia per la ricerca di farmaci alternativi nei pazienti con allergia documentata. Vanno effettuati in ambiente ospedaliero, per via orale nella maggior parte dei casi. Il test consiste nella somministrazione di dosi progressivamente crescenti del farmaco da testare. Nel bambino i dosaggi da utilizzare non sono standardizzati, per cui ci sembra ragionevole soprattutto nel bambino della prima infanzia utilizzare la dose cumulativa standard di 10mg/kg per ASA, paracetamolo e ibuprofene e di 2,5 mg/kg per nimesulide. Il test viene iniziato somministrando 1/10 della dose cumulativa e successivamente si procede con aumenti ogni 30 minuti pari a 2/10 e poi 7/10 della cumulativa. In caso di anamnesi di reazioni anafilattiche si parte da dosi inferiori (pari a 1/100 o a 1/1.000 della dose cumulativa) e si procede con incrementi più gradualmente. Dopo l'ultima dose è necessario tenere il bambino in osservazione per almeno 3 ore. L'anamnesi positiva per angioedema impone un periodo di osservazione più lungo (almeno 6 ore), mentre quella per reazioni asmatiche rende necessario integrare il test con la misurazione della funzionalità respiratoria. Il valore predittivo negativo del test di provocazione orale con FANS è eccellente <sup>29</sup>.

---

## Gestione pratica delle reazioni a FANS

I soggetti con reazioni dimostrate ad ASA o a un altro inibitore della COX-1 dovrebbero evitare tutti i farma-

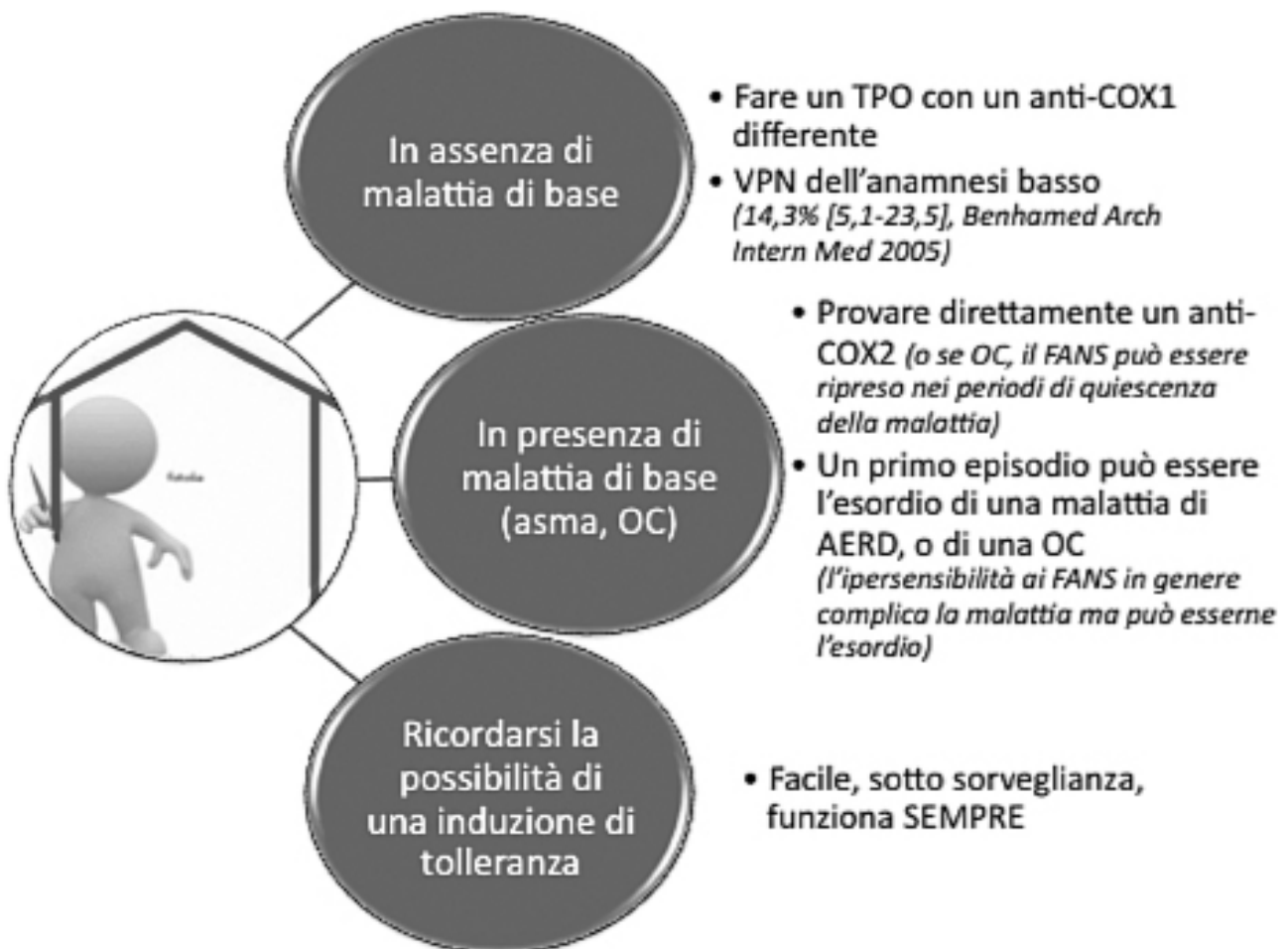
ci ad attività inibente di questo enzima. Tuttavia il fatto che gli inibitori della COX-2 non sono approvati per l'uso in età pediatrica costringe il ricorso all'uso di FANS inibitori relativi delle ciclossigenasi, come paracetamolo, ibuprofene e nimesulide.

Il paracetamolo rappresenta il farmaco maggiormente utilizzato nel bambino, possedendo attività antipiretica e antinfiammatoria (ad alte dosi). Rispetto agli altri FANS possiede solo una debole azione periferica, a livello delle COX-1 e COX-2, mentre la sua principale sede di azione è l'inibizione della COX-3, presente nel sistema nervoso centrale. Per tale peculiarità di azione il paracetamolo causa minori effetti collaterali rispetto agli altri FANS e una bassa incidenza di cross reattività con altri FANS COX-1 inibitori (intorno al 7%)<sup>30</sup>. Va anche considerato che le reazioni di ipersensibilità non IgE mediate al paracetamolo sono dose dipendenti e che, in genere, le basse dosi (5

mg/kg) sono tollerate anche in soggetti con storia clinica di severe reazioni a FANS<sup>31</sup>.

L'ibuprofene è solo raramente causa di reazioni di ipersensibilità, che si manifestano nella maggior parte dei casi con angioedema; in letteratura sono segnalati rarissimi casi di reazioni anafilattiche, mentre risultano più frequenti le reazioni broncospastiche. Per tale motivo i bambini con asma dovrebbero assumere tale farmaco con precauzione. La nimesulide è un farmaco molto usato negli adulti con reazioni ad ASA o altri FANS, in quanto solitamente ben tollerato.

In pazienti in cui sia necessario un trattamento continuativo con FANS (ad esempio in caso di malattie reumatologiche, ischemia coronarica) è possibile ricorrere a metodiche di desensibilizzazione, indicate nei pazienti affetti da AERD o da reazioni di ipersensibilità causate da un singolo FANS. Nella AERD in particolare la desensibilizzazione per ASA non solo



**Fig. 2.** Approccio diagnostico di fronte a sospetta ipersensibilità a FANS. OC = orticaria cronica. TPO = test di provocazione orale

risulta efficace nell'indurre la tolleranza al farmaco e nel migliorare la patologia asmatica o sinusitica di base, ma consente anche al paziente di poter assumere sia l'ASA che i farmaci cross reattivi con esso (cross-desensibilizzazione)<sup>12</sup>. La desensibilizzazione non trova invece indicazione nei pazienti con orticaria cronica esacerbata da FANS e in quelli con orticaria indotta da più di un FANS<sup>32</sup>. Per mantenere la tolleranza sono comunque necessarie assunzioni giornaliere del farmaco, in quanto spesso la tolleranza scompare per interruzioni di somministrazione superiori a 2-5 giorni. Uno schema di comportamento pratico è riportato in Figura 2<sup>33</sup>.

## Bibliografia

- 1 Vane JR, Botting RM. *Mechanism of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs*. Am J Med 1998;104:S2-8.
- 2 Sanchez-Borges M. *NSAID hypersensitivity: respiratory, cutaneous, and generalized anaphylactic symptoms*. Med Clin N Am 2010;94:853-64.
- 3 Johansson SGO, Houihane JOB, Bousquet J. *An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force*. Allergy 2001;56:813-24.
- 4 Corominas M. *Mechanisms implicated in adverse reactions to non-steroidal anti-inflammatory drugs*. Clin Exp Allergy 1998;28:S41-5.
- 5 Kidon MI, Kang LW, Chin CW, et al. *Early presentation with angioedema and urticaria in cross-reactive hypersensitivity to nonsteroidal antiinflammatory drugs among young, asian, atopic children*. Pediatrics 2005;116:e675-80.
- 6 Fujita H, Osuna H, Kanbara T, et al. *Wheat anaphylaxis enhanced by administration of acetylsalicylic acid or by exercise*. Japanese J Allergol 2005;54:1203-7.
- 7 Inomata N, Nakamura K, Yamane Y, et al. *Enhancement of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs and preventive effect of antihistamines and disodium cromoglycate on wheat allergy*. Japanese J Allergol 2006;55:1304-11.
- 8 Vidal C, Bartolome B, Gonzalez-Quintela A, et al. *Prawns, barnacles, and non-steroidal anti-inflammatory drugs: effect modifiers or interaction?* J Investig Allergol Clin Immunol 2007;17:113-8.
- 9 Cant AJ, Gibson P. *Food hypersensitivity made life threatening by ingestion of aspirin*. Br Med J 1984;288:755-6.
- 10 Posadas SJ, Pichler WJ. *Delayed drug hypersensitivity reactions*. Allergy 2007;37:989-99.
- 11 Leyva L, Torres MJ, Posadas S, et al. *Anticonvulsant-induced toxic epidermal necrolysis: monitoring the immune response*. J Allergy Clin Immunol 2000;105:157-65.
- 12 Kowalski LM, Makowska JS, Blanca M, et al. *Hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) – classification, diagnosis and management: review of the EAACI/ENDA and GA2LEN/HANNA*. Allergy 2011;66:818-29.
- 13 Capriles-Beherens E, Caplin J, Sanchez-Borges M. *NSAID facial angioedema in a selected pediatric atopic population*. J Invest Allergol Clin Immunol 2000;10:277-9.
- 14 Quiralte J, Blanco C, Delgado J, et al. *Challenge based clinical patterns of 223 Spanish patients with nonsteroidal anti-inflammatory drug induced reactions*. J Investig Allergol Clin Immunol 2007;35:713-6.
- 15 Sánchez-Borges M, Capriles-Hulett A, Caballero-Fonseca F. *A novel non-IgE-mediated pathway of mite-induced inflammation*. J Allergol Clin Immunol 2010;126:403-4.
- 16 Acevedo N, Vergara C, Mercado D, et al. *The A-444C polymorphism of leukotriene C4 synthase gene is associated with IgE antibodies to dermatophagoides pteronyssinus in a colombian population*. J Allergy Clin Immunol 2007;119:505-7.
- 17 Barrett NA, Maekawa A, Rahman OM, et al. *Dectin-2 recognition of house dust mite triggers cysteinyl leukotriene generation by dendritic cells*. J Immunol 2009;182:1119-28.
- 18 Asero R. *Predictive value of autologous plasma skin test for multiple nonsteroidal anti-inflammatory drug intolerance*. Int Arch Allergy Immunol 2007;144:226-30.
- 19 Asero R. *Intolerance to nonsteroidal anti-inflammatory drugs might precede by years the onset of chronic urticaria*. J Allergy Clin Immunol 2003;111:1095-8.
- 20 Sanchez-Borges M. *Clinical management of nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity*. World Allergy Organiz J 2008;1:29-33.
- 21 Canto MG, Andreu I, Fernandez J, et al. *Selective immediate hypersensitivity reactions to NSAIDs*. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2009;9:294-7.
- 22 Gonzalo MG, Alvarado MI, Fernandez L, et al. *Fixed drug eruption due to naproxen; lack of cross reactivity with other propionic acid derivatives*. Br J Dermatol 2001;144:1291-2.
- 23 Sanchez-Borges M, Capriles-Hullet A, Caballero Fonseca F. *Cutaneous hypersensitivity reactions to inhibitors of cyclooxygenase-2. Results of 302*

- oral provocation test and review of the literature.* Allergy Clinical Immunol Int – J World Allergy Org 2007;19:44-9.
- <sup>24</sup> Del Pozzo MD, Lobera T, Blasco A. *Selective hypersensitivity to diclofenac.* Allergy 2000;55:412-3.
- <sup>25</sup> Gamboa PM, Sanz ML, Caballero MR, et al. *Use of CD63 expression as a marker of in vitro activation and leukotriene determination in metamizol allergic patients.* Allergy 2003;58:312-7.
- <sup>26</sup> De Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, et al. *Non-steroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity syndrome. Clinical findings and in vitro diagnosis.* J Investig Allergol Clin Immunol 2009;19:355-69.
- <sup>27</sup> Pichler WJ, Tilch J. *The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity.* Allergy 2004;59:809-20.
- <sup>28</sup> Rozieres A, Hennino A, Rodet K, et al. *Detection and quantification of drug-specific T cells in penicillin allergy.* Allergy 2009;64:534-42.
- <sup>29</sup> Defrance C, Bousquet PJ, Demoly P. *Evaluating the negative predictive value of provocation tests with nonsteroidal anti-inflammatory drugs.* Allergy 2011;66:1410-4.
- <sup>30</sup> Jenkins C, Costello J, Hodge L. *Systematic review of prevalence of aspirin-induced asthma and its implications for clinical practice.* Br Med J 2004;328:434.
- <sup>31</sup> Kindon MI, Kang LW, Chin CW, et al. *Early presentation with angioedema and urticaria in cross reactive hypersensitivity to non steroidal antiinflammatory drugs among young asian atopic children.* Pediatrics 2005;116:e675-80.
- <sup>32</sup> Berges-Gimeno MP, Martin-Lazaro J. *Allergic reactions to nonsteroidal antiinflammatory drugs: is newer better?* Curr Allergy Asthma Rep 2007;7:35-40.
- <sup>33</sup> Caimmi S, Caimmi D, Bousquet PJ, et al. *How can we better classify NSAID hypersensitivity reactions? – validation from a large database.* Int Allergol Arch 2012;159:306-12.



# La diagnosi di allergia a Bet v 1 e ai suoi omologhi

a cura della Commissione Diagnostica Allergologica della SIAIP

Giovanni Cosimo Indirli<sup>1</sup>, Riccardo Asero<sup>2</sup>, Mauro Calvani<sup>3</sup> (coordinatore), Stefania La Grutta<sup>4,5</sup>, Neri Pucci<sup>5</sup>



Parole chiave: Bet v 1, cross-reattività, sindrome orale allergica

## Abstract

Bet v 1, l'allergene maggiore del polline della betulla, e i suoi omologhi, presenti in altri pollini e alimenti vegetali, fanno parte della famiglia delle Pathogenesis-Related Proteins 10 (PR-10), proteine difensive prodotte in risposta a stimoli infettivi e antibiotici (ormonali, traumatici e climatici). Gli omologhi di Bet v 1 sono l'allergene maggiore dei pollini delle *Fagales* e inducono sintomi respiratori nel periodo invernale primaverile (rinocongiuntivite e/o asma). Altamente cross-reattivi, possono indurre sintomi prolungati per la coesistenza di specie a diverso periodo di pollinazione nella medesima regione, e causare sintomi anche dove la betulla non è presente.

Gli omologhi di Bet v 1 sono presenti anche in diversi alimenti vegetali e possono frequentemente indurre sintomi da ingestione, lievi nella grande maggioranza dei casi (Sindrome Orale Allergica), a causa della scarsa resistenza di queste molecole al calore e alla digestione peptica. Il grado di cross-reattività tra le diverse PR-10 e Bet v 1 dipende fondamentalmente dall'omologia di sequenza primaria aminoacidica ed è maggiore per alcuni alimenti appartenenti alla famiglia delle *Rosaceae* (mela, pera ecc.) e per la nocciola e minore per altri, come le *Apiaceae* (sedano, carota).

La diagnosi può essere sospettata, in presenza di un quadro clinico suggestivo, riscontrando una positività degli SPT per la betulla e per alcuni vegetali e contemporanea negatività per la profilina. La diagnosi di certezza si fonda sulla ricerca delle IgE specifiche per le singole molecole (ove disponibili) mediante CAP system e ISAC microarray.

## Struttura, diffusione in natura ed epidemiologia

Bet v 1 è l'allergene maggiore, tra i 7 conosciuti, del polline della betulla. La pianta appartiene alla classe *magnoliopsida* (dicotiledoni), all'ordine *fagales*, alla specie *betula verrucosa*; Bet v 1 è responsabile di oltre il 95% della reattività IgE-specifica nei pazienti aller-

gici al polline di betulla<sup>1</sup>. Ha un peso molecolare di 17 kD e fa parte, con i suoi omologhi presenti in altri pollini ed alimenti vegetali, della famiglia delle Pathogenesis-Related proteins 10 (PR10) o Bet v 1 - Related Proteins<sup>2</sup>. Queste proteine furono scoperte all'inizio degli anni '70 e la loro produzione fu attribuita ad un meccanismo di difesa messo in atto dai vegetali in

<sup>1</sup> U.O.S. di Allergologia Pediatrica, Ospedale di Copertino (LE), ASL/LE; <sup>2</sup> Ambulatorio di Allergologia, Clinica San Carlo, Paderno Dugnano (MI); <sup>3</sup> UOC di Pediatria e Ematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera S. Camillo Forlanini, Roma; <sup>4</sup> U.O.S. Ambiente e Salute-ARPA Sicilia, IBIM CNR, Palermo; <sup>5</sup> SOD di Immunoallergologia, AOU "A. Meyer", Firenze

gindirli@libero.it

Gli Autori dichiarano di non avere alcun conflitto di interesse rispetto agli argomenti trattati nell'articolo.

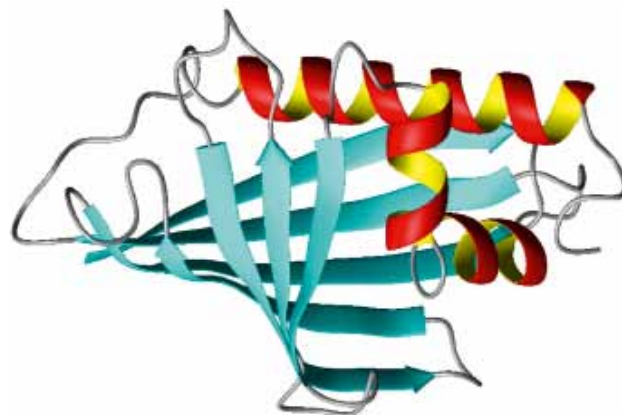
seguito allo stimolo da parte di agenti infettivi virali, fungini o batterici; successivamente è stato dimostrato che anche stress abiotici (ormonali, traumatici o climatici) sono in grado di stimolarne la sintesi. Negli anni '80 è stato coniato il termine "pathogenesis-related proteins" (PRs) ad indicare proteine codificate, ma indotte da situazioni patologiche o "correlate", termine quest'ultimo che indica una origine da stimoli abiotici<sup>3</sup>. Le PRs costituiscono una serie di 14 famiglie, non correlate tra loro, e comprendenti molti allergeni ubiquitari presenti nel regno vegetale.

Le proteine appartenenti alle Bet v 1 sono polipeptidi di 154-160 aminoacidi ampiamente diffuse nel mondo vegetale, ciascuno codificato da numerosi geni (es. almeno 18 geni per Mal d 1)<sup>4</sup>.

La struttura tridimensionale di Bet v 1 e degli omologhi correlati (Fig. 1) è costituita da 7 catene nastriformi antiparallele che si incurvano intorno ad un'elica C-terminale, dove si evidenzia un sito di ripiegamento idrofobico assai simile tra gli allergeni e che ne determina l'elevata cross-reattività nonostante la non sempre alta omologia della sequenza primaria<sup>5</sup>. L'analisi strutturale rivela che questa piega costituisce una struttura cavitaria che attraversa la proteina e che ha funzione di sito di legame per ormoni steroidei vegetali, da cui un possibile ruolo di "carrier" steroideo<sup>6</sup>. Altri studi mostrano però una più ampia specificità delle PR-10 verso una varietà di ligandi biologici tra cui acidi grassi, flavonoidi, citochine, ed anche attività ribonucleasica; complessivamente quindi la funzione di Bet v 1 ed omologhi non è ancora pienamente compresa<sup>7</sup>.

La diffusione nel regno vegetale di Bet v 1 e dei suoi omologhi è ubiquitaria tra i procarioti e gli eucarioti. A seguito della sensibilizzazione primaria all'allergene pollinico della betulla, con il passar del tempo numerosi soggetti possono sviluppare sintomi allergici da ingestione di Bet v 1 related proteins presenti in numerosi frutti, noci e vegetali, come riportato in Tabella I.

Si tratta di proteine relativamente labili al calore e alla digestione acida gastrica (pH) per cui sono considerate allergeni alimentari di II classe; la sintomatologia che ne deriva, pertanto, è solitamente lieve e caratterizzata da prurito o bruciore orale, ovvero da una Sindrome Orale Allergica (SOA). Nel caso in cui il pH della matrice si mantenga neutro il calore non altera la struttura di Bet v 1, come è stato verificato per Pru p 1 della pesca; in tal caso i quadri clinici possono essere gravi<sup>8</sup>, anche se le uniche reazioni serie sono



**Fig. 1.** Struttura tridimensionale di Bet v 1 e degli omologhi correlati PR-10 (spettroscopia di risonanza): la struttura tridimensionale evidenzia un sito di ripiegamento assai simile tra gli allergeni, che ne determina l'elevata cross-reattività delle IgE specifiche<sup>5</sup>.

**Tab. I.** Bet v 1 e proteine Bet v 1 omologhe.

ALLERGENE	ORIGINE	ESPOSIZIONE
Act c 8	Kiwi (p. gialla)	Ingestione
Act d 8	Kiwi (p. verde)	Ingestione
Api g 1	Sedano	Ingestione
Ara h 8	Arachide	Ingestione
Dau c 1	Carota	Ingestione
Fra a 1	Fragola	Ingestione
Gly m 4	Soia	Ingestione
Lyc e 4	Pomodoro	Ingestione
Mal d 1	Mela	Ingestione
Pru ar 1	Albicocca	Ingestione
Pru av 1	Ciliegia	Ingestione
Pru p 1	Pesca	Ingestione
Pyr c 1	Pera	Ingestione
Rub l 1	Lampone	Ingestione
Vig r 1	Fagioli mungo	Ingestione
Aln g 1	Ontano	Inalazione
Bet v 1	Betulla	Inalazione
Car b 1	Carpino	Inalazione
Fag s 1	Faggio	Inalazione
Que a 1	Quercia	Inalazione
Cas s 1	Castagno/a	Inalazione/Ingestione
Cor a 1	Nocciolo/a	Inalazione/Ingestione

riportate solo per la soia. Questo fenomeno mette in risalto la rilevanza dell'effetto matrice sull'allergenicità di certe proteine. In condizioni di pH acido (intorno a 3), invece, anche una cottura a basse temperature (25°C) è in grado di produrre una denaturazione rapida e irreversibile della struttura proteica<sup>4</sup>. In Tabella I sono riportati la Bet v 1 e gli omologhi cross-reattivi delle piante e degli alimenti, questi ultimi appartenenti



Bet v 1 fa parte della famiglia delle Pathogenesis-Related proteins 10 (PR10) o Bet v 1 - Related Proteins. Il termine “pathogenesis-related proteins” (PRs) indica proteine codificate, ma indotte da situazioni patologiche o “correlate”.

alla famiglia delle *Rosaceae* (mela, pera, pesca, ciliegia, albicocca, fragola), delle *Fabaceae* (soia, arachide, fagiolo) e delle *Apiaceae* (sedano e carota).

### Cross-reattività e vie di sensibilizzazione

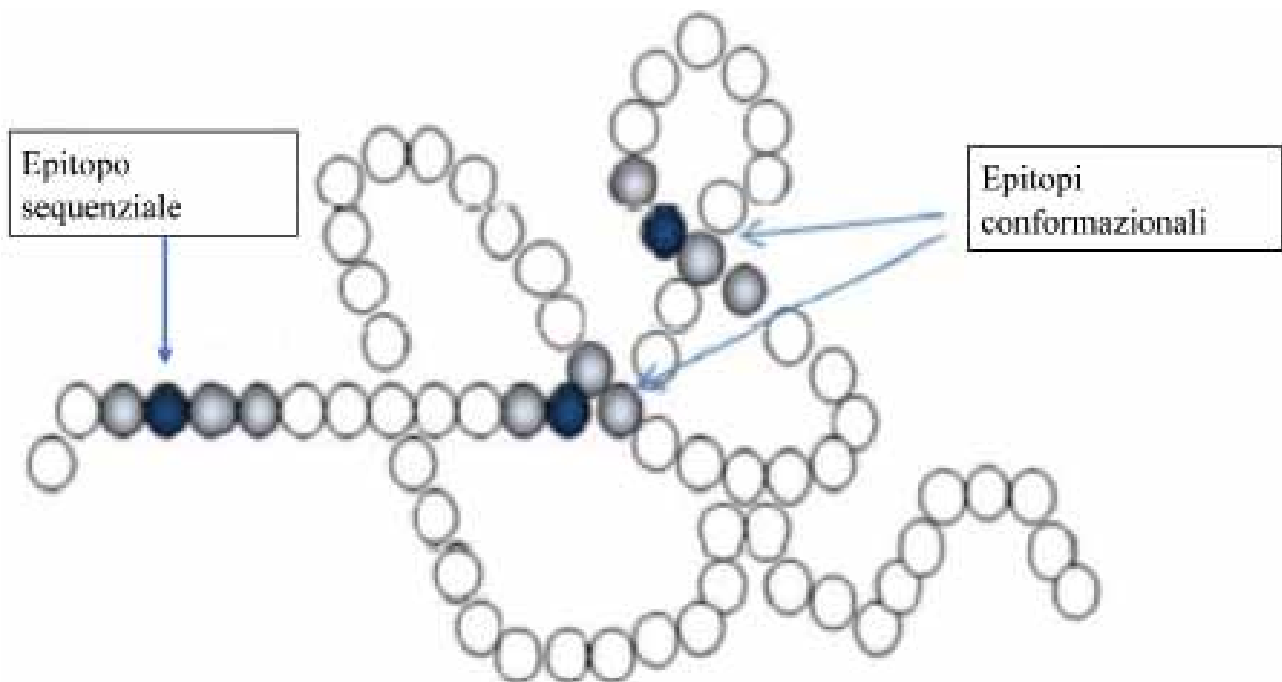
**Cross-reattività.** Il fenomeno della Cross-reattività (CR), si verifica quando una risposta adattativa immune a un particolare antigene causa reattività nei confronti di altri antigeni che sono strutturalmente correlati all'antigene induttore. La CR rappresenta

un vantaggio nei meccanismi di difesa nei confronti degli agenti infettivi, ma produce effetti negativi in alcune malattie immunologiche, principalmente quelle autoimmuni, e nelle malattie allergiche.

La reazione tra l'antigene e l'anticorpo è basata sulla complementarità spaziale dell'Epitopo dell'antigene con l'Idiotipo anticorpale.

Gli Epitopi, che sono costituiti da frammenti di 5-7 aminoacidi, possono essere lineari o conformazionali, sebbene questi ultimi siano più frequenti e variabili<sup>9</sup>. Una molecola allergenica può avere epitopi lineari costituiti da una specifica sequenza aminoacidica lungo la sua struttura primaria ed epitopi conformazionali generati dal ripiegamento della proteina e costituiti da aminoacidi che sono distanti nella struttura primaria, ma vicini l'uno all'altro quando la molecola è ripiegata (Fig. 2)<sup>10</sup>.

Il concetto di Omologia tra molecole antigeniche si fonda sul fatto che la somiglianza nelle sequenze aminoacidiche tra le molecole deriva dalla loro origine comune; esse pertanto condividono le stesse funzioni e devono conservare gli stessi ripiegamenti nella loro struttura terziaria<sup>9</sup>. Le Linee Guida per la predizione dell'allergenicità dell'Organizzazione Mondiale della Sanità precisano che una proteina può essere considerata capace di cross-reattività con altri allergeni, se condivide con essi almeno un 35% di similarità di



**Fig. 2.** Epitopi conformazionali e sequenziali.

sequenza in un frammento di 80 aminoacidi o una completa identità in un peptide di 6-8 aminoacidi <sup>11</sup>. Sembra che il fenomeno della CR si verifichi con frequenza tra proteine che condividono un'identità di sequenza > al 70%, mentre si verifichi più raramente tra quelle che presentano un'identità < al 50% <sup>12</sup>.

Le sindromi riconducibili a fenomeni di CR sono state descritte tra specie vicine filogeneticamente, nelle quali sembra che quanto maggiore è la vicinanza tassonomica tanto maggiore è la probabilità di CR, ma anche tra specie filogeneticamente distanti. In quest'ultimo caso, gli allergeni responsabili sono usualmente proteine omologhe appartenenti a specifiche famiglie di molecole che sono altamente conservate da un pun-

to di vista evolutivo e che, data la loro presenza molto diffusa tra gli organismi, sono state indicate con il termine di Panallergeni <sup>9</sup>. L'allergia alimentare associata alle pollinosi si sviluppa come conseguenza di caratteristiche condivise a livello della struttura primaria e terziaria delle proteine coinvolte <sup>12</sup>. Un'alta omologia nella sequenza primaria risulta in strutture tridimensionali omologhe e, pertanto, potenzialmente in fenomeni di cross-reattività <sup>13</sup>.

**Nel caso dell'allergia agli alimenti** correlata al polline della betulla, essa è considerata la conseguenza di una cross-reattività immunologica tra gli allergeni del polline della betulla e le proteine degli alimenti strutturalmente correlate. È dovuta, nella stragrande

	Allergome Code	Description	Code	Score	E Value	% Identity
1	82	Bet v 1	uniprot:Q23751	327.0	2.0E-91	100.0
237	464	Mal s 1	uniprot:Q4VPL0	202.0	7.0E-54	60.0
238	1316	Pru av 1.0101	uniprot:Q24248	200.0	3.0E-53	59.0
242	602	Pru p 1	uniprot:B6CQ85	195.0	1.0E-51	58.0
240	3985	Pru du 1	uniprot:B6CQ55	198.0	1.0E-52	60.0
245	3446	Pru ar 1.0101	uniprot:Q50001	194.0	2.0E-51	58.0
109	237	Cor a 1.0201	uniprot:Q39453	273.0	2.0E-75	81.0

**Fig. 3.** Omologia di sequenza tra Bet v 1 e Bet v 1-like delle Rosaceae e della Nocciola.

	Allergome Code	Description	Code	Score	E Value	% Identity
1	41	Api a 1.0101	uniprot:P49372	309.0	3.0E-86	100.0
42	113	Bet v 1.1801	uniprot:Q39427	129.0	4.0E-32	43.0

	Allergome Code	Description	Code	Score	E Value	% Identity
1	267	Des s 1	uniprot:Q89303	314.0	1.0E-87	100.0
43	88	Bet v 1	uniprot:Q9LEP0	129.0	4.0E-32	45.0

**Fig. 4.** Omologia di sequenza tra Bet v 1-like di alcuni vegetali e Bet v 1.

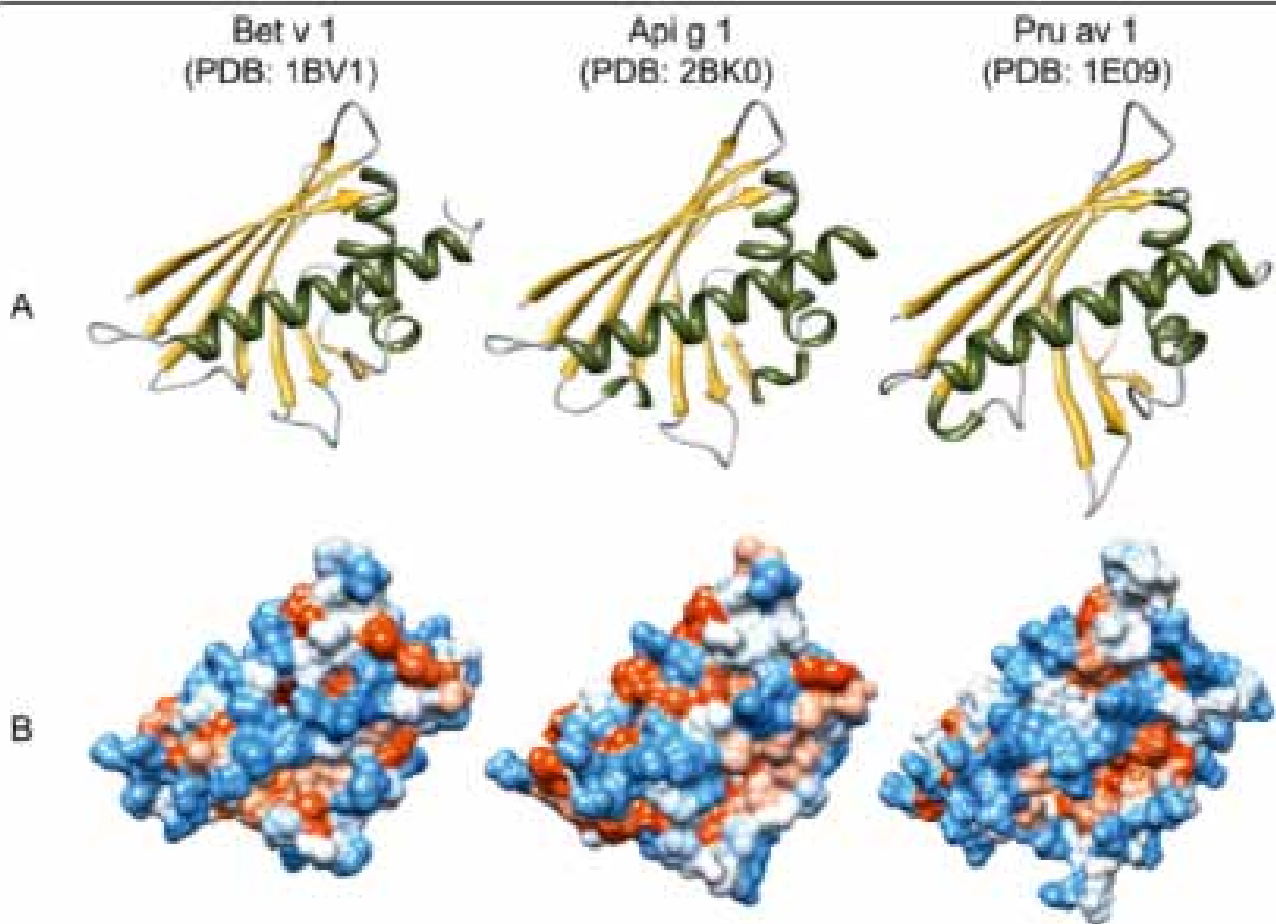
maggioranza dei casi, alla cross-reattività tra le IgE dirette contro l'allergene maggiore della betulla, Bet v 1, e proteine omologhe identificate in differenti frutti con nocciolo, come la mela (Mal d 1), la ciliegia (Pru av 1) e la pera (Pyr c 1), ma anche nella nocciola (Cor a 1), nel sedano (Api g 1), nella carota (Dau c 1), nella soia (Gly m 4), nell'arachide (Ara h 8), nel Kiwi (Act d 8) e in altri alimenti <sup>14</sup>.

L'alta similarità di sequenza tra le proteine Bet v 1 correlate, anche tra specie tassonomicamente piuttosto distanti, e la similarità delle strutture tridimensionali tra queste proteine giustifica la cross-reattività IgE mediata che esita nelle sindromi polline-alimento, configuranti alcune volte quadri clinici rilevanti <sup>4</sup> (Figg. 3, 4) <sup>15</sup> (Fig. 5) <sup>16</sup>.

La cross-reattività tra Bet v 1 e le proteine alimentari omologhe correla con la similarità nella loro struttura proteica primaria. Di conseguenza, gli anticorpi IgE specifici per Bet v 1 reagiscono preferenzialmente con

gli allergeni omologhi dei frutti delle Rosaceae che presentano una similarità di sequenza aminoacidica variabile dal 56 al 59% con Bet v 1, mentre reagiscono meno frequentemente con le proteine omologhe presenti nei vegetali della famiglia delle Apiaceae che condividono dal 37 al 41% di similarità nella sequenza primaria. Uno studio che ha analizzato la reattività delle IgE nei confronti degli allergeni alimentari di 50 pazienti Bet v 1 positivi, ha evidenziato che il 99% cross-reagiva con Mal d 1, il 93% con Cor a 1, il 59% con Api g 1 e il 38% con Dau c 1 <sup>17</sup>.

In generale le IgE prodotte nei confronti di Bet v 1 hanno uno spettro di cross-reattività più limitato nei confronti degli allergeni alimentari rispetto a quelle dirette contro le profiline. In uno studio del 2002, gli Autori riscontravano che la sensibilizzazione a Bet v 1 era associata a quella nei confronti di mela, pesca, nocciola e, più debolmente, della carota, mentre la sensibilizzazione alle profiline era associata alla



**Fig. 5.** Struttura tridimensionale di Bet v 1 e di proteine alimentari omologhe (Bet v 1-like). Gli elementi della struttura secondaria (Fig.A) sono visualizzati in verde ( $\alpha$ -helices), in giallo ( $\beta$ -sheets) e in grigio (loops and turns).

presenza di RAST positività nei confronti di tutti gli alimenti vegetali investigati (14 alimenti), eccetto la pesca, il melone e la mela <sup>18</sup>.

La cross-reattività tra Bet v 1 e le molecole omologhe contenute negli alimenti vegetali non è assoluta né obbligatoria. In uno studio su un numeroso campione di pazienti (283) con evidenza clinica di ipersensibilità al polline di betulla, Asero et al. dimostravano che il 15% dei pazienti non sviluppava SOA dopo 15 o più anni di follow-up. Tutti i pazienti con SOA all'inizio dello studio presentavano Prick by Prick con mela Golden Delicious e/o con nocciola positivo mentre, nella fase prospettica dello studio, solo pochissimi pazienti senza SOA all'ingresso e con SPT negativi con i suddetti alimenti, sviluppava SOA. Questi dati dimostravano che un sottogruppo di pazienti allergici alla betulla produceva IgE che non cross-reagiscono con gli allergeni degli alimenti vegetali e che, pertanto, non presenterà mai SOA <sup>19</sup>.

Anche il grado di cross-reattività tra le Bet v 1-like degli alimenti che le contengono è molto variabile. In uno studio cross-sectional su 196 pazienti con allergia al polline della betulla e con sindrome allergica orale, Asero trovava 195 (99,5%) pazienti con SOA causata dalla mela e/o dalla nocciola e 51 (26%) pazienti con SOA causata da uno o più vegetali della famiglia delle *Apiaceae* (sedano, carota e finocchio). Solo 1 (0,5%) paziente presentava sintomatologia dopo ingestione di sedano, carota e finocchio in assenza di evidenza clinica, sierologica e a livello di SPTs di ipersensibilità alla mela o alla nocciola. In definitiva, i pazienti con ipersensibilità alla betulla presentavano allergia alla mela e alla nocciola molto più frequentemente rispetto all'allergia alle *Apiaceae*; inoltre, era molto comune trovare pazienti con allergia alla mela e/o alla nocciola in assenza di ipersensibilità alle *Apiaceae* mentre la situazione opposta era estremamente rara (1 paziente/196). Questo dato, insieme alla osservazione che il RAST per sedano e carota viene fortemente inibito da parte dell'estratto di mela, dimostra che mentre la maggior parte degli epitopi della *Apiaceae* cross-reagiscono con quelli della mela, solo alcuni determinanti delle mela cross-reagiscono con quelli della *Apiaceae*. La sensibilizzazione al sedano, alla carota e al finocchio mostrava una netta tendenza a verificarsi insieme, dimostrando che i determinanti antigenici di questi vegetali, botanicamente correlati, sono fortemente cross-reattivi <sup>20</sup>.

Questo dato trovava conferma nei risultati di un lavoro sperimentale in cui veniva isolato e caratterizzato

**In generale le IgE prodotte nei confronti di Bet v 1 hanno uno spettro di cross-reattività più limitato nei confronti degli allergeni alimentari rispetto a quelle dirette contro le profiline.**

dal punto di vista molecolare l'omologo Bet v 1 della carota (*Daucus carota*), cioè il Dau c 1, e le sue isoforme Dau c 1.1, 1.2 e 1.3. Dau c1.1 dimostrava una identità di sequenza aminoacidica dell'81% con Api g 1, la Bet v1-like nonché allergene maggiore del sedano, del 60% con la proteina inducibile dai patogeni del prezzemolo PcPR1, del 38% con Bet v 1 e del 39% con Mal d 1 (Tab. II).

Questi risultati confermano che l'identità di sequenza è maggiore tra piante botanicamente correlate (carota, sedano e prezzemolo appartengono alla famiglia delle *Apiaceae*), mentre è inferiore tra famiglie botanicamente distanti (betulla→*Fagaceae* e mela→*Rosaceae*) <sup>21</sup>.

In un altro interessante lavoro sperimentale, utilizzando piccole molecole chiamate "Mimotopes" che sono in grado di imitare epitopi discontinui della molecola proteica e che competono con la proteina nativa per il legame con l'anticorpo, gli Autori riuscivano a mappare la localizzazione delle aree di superficie che probabilmente contengono i siti di legame delle IgE di Bet v 1 e di altre 3 proteine omologhe (Gly m 4, Ara h

**Tab. II.** Comparazione della sequenza aminoacidica di Dau c 1 con quella di CR 16 (proteina della radice di carota), di Api g 1 (allergene maggiore del sedano), di PcPR1 (pathogenesis-related protein del prezzemolo), di Bet v 1 (allergene maggiore della betulla) e di Mal d 1 (allergene maggiore della mela)<sup>22</sup>.

Proteina	Identità di Sequenza (%)
CR16	98
Api g 1	81
Pc PR1	60
Bet v 1	38
Mal d 1	39

8 e Pru av 1). Le aree mappate, così come il risultato dei test di cross-inibizione, dimostravano un più alto grado di similarità di Bet v 1 con Pru av 1, rispetto a Gly m 4 e Ara h 8 e ciò in accordo con la maggiore identità di sequenza tra Bet v 1 e le Bet v 1-like dei frutti, come Pru av 1, che tra Bet v 1 e gli omologhi dei legumi che giustifica, probabilmente, il minor grado di cross-reattività tra le IgE prodotte nei confronti di Bet v 1 e questi ultimi. Infine gli esperimenti di cross-inibizione con metodo ELISA dimostravano anche che non vi erano epitopi addizionali sugli allergeni alimentari al di là di quelli cross-reattivi con Bet v 1<sup>22</sup>.

La cross-reattività tra Bet v 1 e le molecole Bet v 1-like è stata studiata, oltre che relativamente alle IgE, anche a livello T-cellulare con dimostrazioni di rilevanti differenze tra i 2 fenomeni.

Importanti risultati "in vitro" e "in vivo" sembrano dimostrare che la cottura degli alimenti determina la perdita della capacità degli allergeni Bet v 1-like di legarsi alle IgE e di quella di indurre la liberazione di mediatori da parte dei basofili, ma non della possibilità di attivare le cellule T Bet v 1-specifiche. I risultati "in vitro" sembrano essere confermati da quelli "in vivo", in quanto pazienti allergici al polline di betulla con dermatite atopica che presentano sintomi immediati (OAS) e peggioramento tardivo della loro dermatite (nelle 24 ore successive) al DBPCFC con alimenti crudi (sedano e carota), non presentano più sintomi immediati al DBPCFC con alimento cotto, ma ripresentano un peggioramento significativo dello SCORAD della dermatite atopica.

In definitiva, gli alimenti cotti correlati al polline della betulla inducono un'attivazione T-cellulare e sintomi mediati da reazioni T-cellulari come gli alimenti crudi e queste reazioni si verificano anche in assenza di legame con le IgE e di reazioni ad esso correlate: in pazienti con dermatite atopica la reazione immune risultante può anche manifestarsi come una reazione eczematosa ritardata (manifestazioni, comunque, mai descritte negli adulti). Pertanto, la convinzione che gli alimenti Bet v 1 correlati possano essere consumati cotti, senza conseguenze dal punto di vista allergologico andrebbe, alla luce di questi risultati, riconsiderata anche perché l'assunzione di piccole quantità di allergene cotto, pur in assenza di sintomi, potrebbe portare all'attivazione di cellule-T polline-specifiche di tipo T<sub>H</sub>2 anche al di fuori della stagione pollinica e quindi mantenere una produzione perenne di IgE.

Un risultato simile si ottiene usando l'allergene della mela (Mal d 1), del sedano (Api g 1) e della nocciola

(Cor a 1) dopo incubazione con pepsina e successivamente con tripsina al fine di ottenere una degradazione di queste proteine simile a quella che si verifica a livello gastro-intestinale. L'esposizione alle proteasi gastro-intestinali abolisce completamente la capacità dei suddetti allergeni di legarsi alle IgE, ma non quella di stimolare le cellule T Bet v 1-specifiche.

Questo interessante risultato può dipendere dal fatto che gli epitopi IgE di queste proteine sono di tipo conformazionale e dipendono dalla loro struttura proteica terziaria (sono sensibili alla degradazione enzimatica e alla cottura), mentre gli epitopi T-cellulari sono brevi peptidi lineari che sopravvivono alla degradazione gastro-intestinale e alla cottura<sup>23</sup>.

**In ambito respiratorio** le Bet v 1-like rappresentano allergeni maggiori dei pollini di alberi appartenenti all'ordine delle Fagales. La cross-reattività tra i pollini di queste piante è dimostrata dal fatto che l'allergia alle Fagales e la sensibilizzazione a Bet v 1 può essere riscontrata anche in aree dove la Betulla non è presente per l'esposizione e la sensibilizzazione ad altre specie di Fagales. In uno studio effettuato in un'area geografica intorno alla città di Roma, dove la Betulla non è presente, veniva riscontrata una positività dello SPT nei confronti di almeno uno degli estratti di polline di Fagales testati (Betulla, Nocciolo e Quercia) nel 25,5% di 2573 pazienti pollinosici. La reattività nei confronti del polline della Betulla e della Quercia si presentava, in quasi tutti i casi, associata ad almeno 1 delle altre 2 specie e la maggior parte dei pazienti presentava un co-riconoscimento di tutte e 3 le specie di Fagales (66% dei casi) e risultava sensibilizzata anche a quasi tutte le altre specie di Fagales testate (Ontano = Betulaceae; Carpino = Corylaceae; Faggio e Castagno = Fagaceae). Si riscontrava, però, una quota di pazienti monosensibilizzati al Nocciolo (13,5% degli SPT positivi ad esso) che proveniva in gran parte da un'area a nord di Roma con intensa coltivazione della pianta e che mostrava co-riconoscimento solo del polline del Carpino che appartiene anch'esso, come il Nocciolo, alla famiglia delle Corylaceae. Lo studio dimostra che, a causa della intensa cross-reattività, la sensibilizzazione nei confronti delle Fagales tende a presentarsi in maniera omogeneamente raggruppata anche in aree dove la betulla è assente. L'alta esposizione al polline del Nocciolo può indurre sensibilizzazione primaria ad allergeni non Bet v 1-correlati presenti in questo polline e in quello di piante ad esso tassonomicamente vicine<sup>24 25</sup>. Di notevole interesse sono i dati sulla cross-reattività delle Bet v 1-like dei pollini, provenienti da

**Tab. III.** Bet v 1 analoghi negli alimenti e negli inalanti e possibilità diagnostiche.

Allergeni alimentari	Fonte allergenica	Molecola allergenica	CAP system	ISAC 112
Apiales Apium graveolens	Sedano	Api g 1	X	X
• Daucus carota	Carota	Dau c 1		
	Prezzemolo	Pet c 1		
Ericales Actinidia chinensis	Kiwi gold	Act c 8		
• Actinidia deliciosa	Kiwi	Act d 8	X	X
		Act d 11		
Fabales Arachis hypogaea	Arachidi	Ara h 8	X	X
• Glycine max	Soia	Gly m 4	X	X
• Vigna radiata		Vig r 1		
Fagales Corylus avellana	Nocciola	Cor a 1	X	X
Rosales Fragaria ananassa	Fragola	Fra a 1		
• Malus domestica	Mela	Mal d 1		X
• Prunus armeniaca	Albicocca	Pru ar 1		
• Prunus avium	Ciliegia	Pru av 1		
• Prunus persica	Pesca	Pru p 1	X	X
• Pyrus communis	Pera	Pyr c 1		
• Rubus idaeus	Lampone	Rub i 1		
Asparagaceae	Asparago	Asp a 0 17 kd		
Aeroallergeni				
	Ontano	rAln g 1		X
	Betulla	rBet v 1	X	X
	Nocciolo	rCor a 1		X
	Carpino bianco	Car b 1		
	Carpino nero	Ost c 1		
	Castagno	Cas s 1		
	Quercia	Que a 1		
	Faggio	Fag s 1		
	Tarassaco	Tar o 18kd		

Da Hauser et al., 2008 <sup>12</sup>, mod. (Da [www.allergome.org](http://www.allergome.org))

lavori che hanno utilizzato particolari metodiche di laboratorio. In uno studio multicentrico effettuato su 102 pazienti provenienti da diversi paesi (Svezia, Francia, Austria e Svizzera), allergici al polline delle Fagales si dimostrava, con l'uso del CAP quantitativo, che le IgE dirette contro il polline di Betulla riconoscevano nel 99% dei casi Bet v 1 e nel 14,7% dei casi Bet v 2, a riprova che l'allergia nei confronti della Betulla è determinata prevalentemente da sensibilizzazione nei confronti di Bet v 1. Il polline di Betulla appariva essere il sensibilizzante più potente, poiché la totalità dei sieri conteneva IgE nei confronti dell'estratto di

Betulla o di Bet v 1 naturale o ricombinante, mentre diversi sieri non presentavano IgE nei confronti degli estratti di polline delle altre Fagales, in relazione alla distanza tassonomica dalla Betulla. Inoltre, i valori del CAP quantitativo erano molto più alti per l'estratto di Betulla, rispetto a quelli degli estratti di polline delle altre Fagales, dimostrando che il polline di Betulla è, di gran lunga, la sorgente preminente di epitopi IgE. Questo potrebbe permettere l'utilizzo di r Bet v 1 e rBet v 2 per la diagnosi e l'immunoterapia dei pazienti allergici al polline delle Fagales, in sostituzione degli estratti <sup>26</sup>.



Dati ulteriori sulla cross-reattività e sulla capacità di indurre sensibilizzazione da parte delle molecole Bet v 1-like ci provengono da un recentissimo studio effettuato su pazienti provenienti da 3 aree geografiche distinte (Vienna, area con prevalenza della Betulla; Genova, area con prevalenza dell'Ontano, e di diverse specie delle Coryloideae e delle Fagaceae; Roma, area priva di Betulla e con prevalenza di Fagaceae, soprattutto Quercia, seguite dalle Coryloideae e dall'Ontano). L'allergia alle Fagales si manifesta prevalentemente come allergia al polline della Famiglia delle Betulaceae che, a sua volta, comprende le sub-Famiglie delle Betuloideae (generi Betulla e Ontano) delle Coryloideae (generi Nocciolo, Carpino, Carpino nero) e dell'Ostryopsis (comprendente 3 specie strettamente correlate al nocciolo e al Carpino nero) e al polline della famiglia delle Fagaceae (Faggio, Quercia e Castagno) (Tab. IV). Per lungo tempo si è ritenuto che la suddetta allergia sia dovuta ad un'iniziale sensibilizzazione a Bet v 1, l'allergene maggiore della Betulla, ma molte evidenze dimostrano che l'attività allergenica di alcune molecole Bet v 1-like sia stata sottostimata. In questo lavoro si dimostrava che gli allergeni Bet v 1-like delle Betuloideae e delle Coryloideae possono determinare la produzione di IgE con differente specificità, mentre le reazioni allergiche nei confronti delle Fagaceae sono il risultato di reazio-

## La cross-reattività tra Bet v 1 e le molecole Bet v 1-like è stata studiata, oltre che relativamente alle IgE, anche a livello T-cellulare con dimostrazioni di rilevanti differenze tra i 2 fenomeni.

ni cross-reattive. Attraverso esperimenti di cross-inibizione effettuati con metodo Elisa e attraverso l'utilizzazione dell'ISAC microarray, si riusciva a dimostrare che le molecole allergeniche delle Betuloideae e delle Coryloideae condividono circa il 75% degli epitopi allergenici, mentre il 25% sono esclusivi delle rispettive sub-Famiglie; gli epitopi delle molecole allergeniche delle Fagaceae appaiono essere completamente cross-reattivi con quelli delle suddette sub-Famiglie e questo risultato era indipendente dall'area geografica di provenienza del siero utilizzato. Questi dati dimostrano che l'allergia alle Fagales può essere iniziata da un'indipendente sensibilizzazione nei confronti

di membri delle Betuloideae e delle Coryloideae, mentre quella nei confronti delle Fagaceae sembra essere il risultato di anticorpi cross-reattivi diretti primariamente verso componenti della Famiglia delle Betulaceae (Betuloideae e Coryloideae)<sup>27</sup>.

### **Vie di sensibilizzazione.**

La maggior parte dei soggetti con SOA (Sindrome Orale Allergica), e quindi anche quelli in cui la manifestazione clinica è legata alla sensibilizzazione alle Bet v 1-like, presenta contemporaneamente un'allergia ai pollini. Diversi dati sperimentali e clinici dimostrano che, in questi casi, i sensibilizzanti primari sono gli allergeni pollinici e che la via di sensibilizzazione è quella

**Tab. IV.** Classificazione delle piante appartenenti all'ordine delle Fagales.

Famiglia	Sottofamiglia	Genere
Nothofagales	Famiglia del Faggio meridionale	Faggio meridionale
Fagaceae	Famiglia del Faggio	Faggio
		Quercia
		Castagno
Juglandaceae	Famiglia del Noce	Noce
Myricaceae	Famiglia del Bayberry	Myrica
Rhoipteleaceae	Famiglia del Rhoiptelea	Roiptelea - equisetolo
Ticodendraceae	Famiglia del Ticodendron	Ticodendro
Betulaceae	Famiglia della Betulla	Betulla
		Ontano
	Famiglia delle Coryloideae	Nocciolo
		Carpino
		Carpino nero
	Famiglia delle Ostryopsis	3 Specie strettamente correlate al nocciolo e al carpino nero
Casuarinaceae	Famiglia della Quercia	Quercia

Da Hauser et al., 2011<sup>27</sup>, mod.

inalatoria. Alcune prove a conferma di ciò, derivano dal fatto che la pollinosi precede la comparsa dei sintomi indotti dagli alimenti <sup>9</sup>, che molti pazienti presentano sintomi più severi di allergia alimentare durante la stagione pollinica e che la maggior parte degli allergeni cross-reattivi sono più abbondantemente espressi nei pollini che nei tessuti somatici delle piante <sup>29</sup>. Nel caso delle Bet v 1-like, la sensibilità al calore e agli enzimi digestivi, almeno nella grande maggioranza dei casi, porta a classificarle come allergeni alimentari di classe II, con gli allergeni pollinici che si comportano come sensibilizzanti e come induttori di anticorpi IgE cross-reattivi <sup>12</sup>. Un lavoro sperimentale effettuato su 71 pazienti con SOA tramite analisi di inibizione "in vitro", si proponeva, appunto, di determinare le molecole sensibilizzanti primarie, partendo dall'assunto che queste conteranno la maggior parte, se non tutti, gli epitopi rilevanti per le IgE, mentre gli allergeni secondari conteranno meno epitopi IgE. Gli autori preincubavano i sieri di 5 pazienti rappresentativi con allergia al polline di betulla e sensibilizzazione clinicamente rilevante ad almeno un alimento vegetale tra mela, carota e sedano, con rBet v 1 o con gli allergeni maggiori Bet v 1-like della mela (rMal d 1), della carota (rDau c 1) e del sedano (rApi g 1) e verificavano (esperimenti di Western blots e di RAST-inibizione) che il pre-assorbimento dei sieri con rBet v 1 inibiva completamente il legame al Bet v 1 naturale, mentre la preincubazione con gli allergeni alimentari ricombinanti riduceva debolmente o non riduceva affatto il legame a questo. D'altra parte, la preincubazione dei sieri con una combinazione di rBet v 1 e rBet v 2 portava ad un'alta inibizione di legame delle IgE agli estratti degli alimenti (RAST-inibizione quantitativi). I dati sperimentali che una combinazione di rBet v 1 e rBet v 2 contiene la maggior parte degli epitopi presenti sugli allergeni alimentari, mentre questi, nella forma ricombinante, poco inibiscono il legame delle IgE agli allergeni della Betulla fornisce evidenza di una sensibilizzazione primaria per via inalatoria <sup>28</sup>. Un altro studio si proponeva di individuare il sensibilizzante primario in caso di allergia alla mela in 389 pazienti provenienti da 4 paesi europei (Italia, Olanda, Austria e Spagna), tutti con storia clinica di allergia alla mela e SPT positivi alla mela fresca Golden Delicious che sembra essere la varietà più ricca di Bet v 1-like. La specie pollinica clinicamente rilevante, in questi pazienti, differiva nei diversi paesi, essendo il polline di betulla prevalente in Italia, Austria e Olanda, e il polline di graminacee in Spagna; in tutti e 4 i paesi, comunque, l'allergia al polline precedeva tem-

**La maggior parte dei soggetti con SOA (Sindrome Orale Allergica), e quindi anche quelli in cui la manifestazione clinica è legata alla sensibilizzazione alle Bet v 1-like, presenta contemporaneamente un'allergia ai pollini.**

poralmente quella alla mela. In Italia, Austria e Olanda il principale allergene molecolare coinvolto era il Mal d 1, con valori di sIgE al RAST significativamente superiore rispetto a quelli nei confronti di Mal d 2, Mal d 3 e Mal d 4 e con una percentuale di pazienti con valori di sIgE pari o superiore a 1.0 IU/ml. significativamente superiore a quella che tali valori presentavano per Mal d 2, Mal d 3 e Mal d 4. Le risposte IgE nei confronti di mela, betulla, Mal d 1 e Bet v 1 erano fortemente correlate, ma quelle per il polline di betulla e di Bet v 1 erano significativamente più alte. Questi risultati supportano la teoria che pazienti provenienti da aree ricche di alberi di betulla divengono allergici al suo polline e al suo allergene maggiore Bet v 1 attraverso le vie respiratorie e che l'allergia alla mela si sviluppa successivamente come risultato della cross-reattività tra Bet v 1 e Mal d 1 <sup>29</sup>.

---

### **Gli aspetti clinici**

La rino-congiuntivite e l'asma allergico sono le manifestazioni cliniche più frequenti nel Nord e Centro Europa e nel Nord America conseguenti alla sensibilizzazione a Bet v 1 e, nelle regioni dove la betulla non c'è, alla sensibilizzazione primaria nei confronti degli omologhi di Bet v 1 del nocciolo e dell'ontano. È noto da tempo che i pazienti con allergia alla betulla possono sviluppare, oltre ai sintomi stagionali delle vie respiratorie, reazioni immediate per frutta e verdura. Questa sindrome betulla – frutta - verdura è caratterizzata, nella sede di contatto con gli alimenti, da sintomi locali come il prurito delle labbra, della lingua e della gola, talvolta accompagnato da gonfiore delle labbra e della lingua che configurano il quadro della SOA.



Occasionalmente possono verificarsi gravi reazioni sistemiche IgE - mediate come l'orticaria o lo shock anafilattico (al momento descritte solo per la soia). Kleine-Tebbe et al., già nel 2002 avevano evidenziato che la maggior parte dei 20 pazienti allergici alla betulla (17/20) presentava gravi reazioni sistemiche con comparsa di sintomi orofaringei e facciali dopo 20 minuti dall'ingestione di prodotti contenenti proteine della soia, suggerendo una CR tra IgE specifiche per Bet v 1 e proteine omologhe come la proteina SAM22-PR10. In questi soggetti erano presenti allergia alla betulla insieme con SOA da mela (12/20) o da nocciola (11/20) ed alti livelli di IgE specifiche per Bet v 1<sup>30</sup>. Successivamente, lo studio di Ballmer-Weber ha riscontrato casi di anafilassi: 2 nella storia clinica o 7 su 21 pazienti al challenge con contemporanea presenza di IgE specifiche per rBet v1 e rGly m 4, con una mediana di classe CAP rispettivamente di 2 e 4. In questa casistica i soggetti primariamente sensibilizzati ad entrambe le proteine omologhe, a differenza dei mono-sensibili a rGly m 4, mostrano una minore probabilità di reazioni sistemiche severe. Nell'intero gruppo in studio, la SOA costituisce il quadro clinico più frequentemente espresso dai pazienti, seguito da angioedema, orticaria, sintomatologia gastrointestinale (nausea, vomito) e respiratoria (disfonia, dispnea) e neurologica (vertigini)<sup>31</sup>. I risultati dello studio di Geroldinger-Simic et al., ottenuti mediante utilizzo di un questionario standardizzato su 225 pazienti con allergia alla betulla, mostrano i dati di prevalenza dei principali sintomi cibo-indotti ed i trigger della sindrome betulla - frutta - verdura, evidenziando che il 73% dei soggetti aveva manifestazioni cliniche da allergia alimentare. In particolare, il prurito nella cavità orale era il sintomo maggiormente prevalente (89%), seguito da rinite (58,2%), congiuntivite (57,6%), edema delle labbra (50,6%), sensazione di costrizione alla gola (50,8%), prurito alle orecchie (36,7%), dispnea (28,5%), crampi (18,4%), mentre altri sintomi come nausea (9,5%), orticaria (15,2%) e caduta della pressione arteriosa (8,9%) erano meno frequenti. Inoltre, ben il 70% dei soggetti riferiva che l'allergia alimentare era iniziata successivamente alla pollinosi ed il 44% aveva un peggioramento dei sintomi cibo-indotti durante il periodo di pollinazione della betulla. Tra gli alimenti trigger, la mela e la nocciola erano quelli più frequentemente riferiti, rispettivamente nell'80 e nel 59% dei casi. Inoltre, l'evidenza di allergia alimentare correlava prevalentemente con la reattività IgE verso Bet v 1, piuttosto che verso Bet v 2, e nei soggetti che

tolleravano gli alimenti vi era un riscontro di un più elevato rapporto IgG4/IgE specifiche per Mal d 1 e Cor a 1, rBet v 1 omologhi, a supporto della funzione bloccante delle IgG4 specifiche nei confronti delle IgE specifiche leganti gli allergeni alimentari<sup>14</sup>.

Nei pazienti con allergia al kiwi la SOA è l'aspetto clinico più comune nei pazienti pollinosici con sensibilizzazione a Bet v 1 e nei quali, oltre alla rinite allergica, nel 60% dei casi è presente asma stagionale, a conferma che entrambi gli allergeni (omologhi delle Bet v 1 e Profilina) sono importanti nell'allergia al kiwi correlata ai pollini, mentre la sensibilizzazione nei confronti di Act d 1 (Actinidina) risulta importante nei soggetti monoallergici al kiwi, nei quali i sintomi sono spesso più severi<sup>32</sup>. La recente descrizione dell'allergene Act d 11 del kiwi, come primo membro della famiglia di proteine MLP/RRP (ripening-related protein family), conferma che un meccanismo di co-riconoscimento IgE con gli allergeni appartenenti alla famiglia PR-10 comprendente la Bet v 1 è alla base della CR tra queste proteine ed ha un ruolo determinante per la comparsa delle manifestazioni cliniche nei pazienti con sensibilizzazione verso più sorgenti che condividono molecole allergeniche<sup>33</sup>. Asero et al. in un ampio studio retrospettivo hanno riportato che la presenza di SOA, nel 15% dei pazienti allergici alla betulla, è significativamente associata con le manifestazioni asmatiche e respiratorie più severe e a un più elevato livello di sensibilizzazione (più elevati livelli di IgE specifiche per betulla) rispetto ai pazienti allergici senza SOA; inoltre, nei pazienti con SOA i sintomi iniziano e si mantengono durante la pollinazione della betulla<sup>34</sup>.

Come già detto, la rino-congiuntivite costituisce uno degli aspetti clinici più caratteristici della sensibilizzazione a Bet v 1, anche se è necessario considerare che nei pollinosici il pattern di sensibilizzazione può risentire di variazioni geografiche. In tal senso, i dati di Vereda et al. evidenziano che, sul totale di 28 pazienti con IgE per entrambe rBet v 1 e rAra h 8, la maggior parte (23) erano Svedesi, 5 Americani e 1 Spagnolo, così come il coefficiente di correlazione tra IgE verso rBet v 1 e rAra h 8 era di 0,91 (P <,0001) nei pazienti svedesi in confronto con un valore di 0,76 (P <,0001) nell'intero gruppo in studio (115 pazienti)<sup>35</sup>. Molto recentemente, oltre alle variazioni geografiche, i risultati dello studio di Sekerková et al. nei soggetti pollinosici mostrano che l'età può rappresentare un fattore condizionante la diversa specificità degli anticorpi IgE indotti dagli allergeni della betulla. Il riscontro di una maggiore frequenza di positività a Bet

## La rino-congiuntivite costituisce uno degli aspetti clinici più caratteristici della sensibilizzazione a Bet v 1, anche se è necessario considerare che nei pollinosici il pattern di sensibilizzazione può risentire di variazioni geografiche.

v 2 nei bambini rispetto agli adulti sottolinea che nei primi vi è un maggior numero di soggetti allergici che non reagisce esclusivamente all'allergene maggiore e ipotizza un andamento età dipendente delle IgE allergene specifiche <sup>36</sup>. Il profilo della sensibilizzazione età dipendente è stato da poco descritto in un gruppo di bambini con sintomi da allergia alla nocciola, evidenziando che in quelli di età prescolare e scolare con riferita reazione sistemica vi era sensibilizzazione a Bet v 1 rispettivamente nel 29% e nel 67% dei casi, mentre i pazienti con SOA, indipendentemente dal gruppo di età, erano tutti sensibilizzati a Bet v 1 <sup>37</sup>.

### La diagnosi

La Betulla appartiene alla famiglia delle Betulaceae dell'ordine delle Fagales. Questo comprende 8 famiglie, alcune delle quali sono suddivise ulteriormente in sottofamiglie (Tab. IV). Poiché la pollinosi da Betulla è una delle più diffuse nel nord europa, essa è stata molto studiata e in passato si è ritenuto che l'allergene della betulla costituisse il sensibilizzante primario, e che le sensibilizzazioni per le altre Fagales potessero costituire delle sensibilizzazioni secondarie. In realtà, come già detto nel capitolo sulla cross-reattività, anche altre Fagales possono costituire i sensibilizzanti primari, in specie in alcune zone dell'Italia centro meridionale, dove vi sono poche betulle e invece predomina la diffusione del Nocciolo e della Quercia. In queste zone circa il 15% dei soggetti possono essere sensibilizzati alle Fagales, in particolare al nocciolo, senza esserlo alla betulla. Nello studio da cui provengono questi dati, la sindrome allergica orale alla assunzione della mela e della nocciola era presente nel 19% di soggetti con multipla sensibilizzazione alle

Fagales, mentre nessuno la presentava nei confronti della carota o del sedano. In particolare nessuno dei soggetti monosensibilizzati al Nocciolo presentava una sindrome allergica orale alla ingestione della nocciola, suggerendo la assenza di una relazione tra la allergia alla pianta e quella alla noce <sup>24</sup>.

La diagnosi di allergia alle Fagales deve essere sospettata nelle pollinosi invernali e primaverili, dato che il periodo di impollinazione delle Betuloideae va da metà gennaio a giugno, con picchi nel periodo febbraio-aprile al nord, e da metà gennaio a maggio al centro sud, con picchi a febbraio-marzo. Le corylaceae hanno un periodo di impollinazione simile con picco nel mese di aprile <sup>38</sup>.

La allergia alla betulla deve essere ricercata soprattutto nei bambini più grandi e negli adolescenti, oltre che ovviamente negli adulti, in quanto segue alla sensibilizzazione nei confronti dell'allergene maggiore dei pollini della betulla, il Bet v 1 (l'età media di sensibilizzazione ex novo in una zona a nord di Milano è di 38 anni <sup>39</sup>). La Bet v 1 e le proteine omologhe sono espresse in particolare in alcuni tessuti, quali i pollini maturi (ad es. betulla), i frutti maturi (mela, pera, ciliegia e altri membri delle rosacee), radici e bulbi (carota e sedano) e vecchie foglie <sup>4</sup>. La diagnosi di allergia alle Bet v 1 deve essere ricercata in tutti coloro che presentino sintomi alla assunzione di alcune frutta verdura o noci, in specie se manifestano sintomi di una rinite primaverile, ma anche in sua assenza: è infatti possibile essere sensibilizzati alla betulla, avere sintomi orali/gastrointestinali, ma non avere rinite primaverile <sup>40</sup>. La sintomatologia, come già detto, è di solito costituita dalla sindrome allergica orale, ovvero la comparsa di prurito della lingua, della bocca e del palato, talora accompagnata da edema della lingua e del palato, ma più di rado, e solo con alcuni alimenti (la soia <sup>30</sup>), è stata segnalata la possibilità di sviluppare anche reazioni più importanti, quali orticaria, asma o anafilassi.

In generale nei soggetti allergici alla betulla è più comune riscontrare la SOA nei confronti della mela e della nocciola. Meno frequente, e quasi sempre associata a quella della mela e della nocciola, è la allergia per le apiaceae (sedano, carota e prezzemolo) <sup>20</sup>. Descritta, anche, la SOA da kiwi legata ad allergia nei confronti delle Bet v 1-like del frutto <sup>33</sup>.

Una sindrome allergica orale in seguito alla assunzione di frutta o verdura o noci non è tuttavia attribuibile solo alle Bet v 1: altre molecole come le profiline o le Thaumatin like protein possono determinare lo stesso quadro clinico <sup>41</sup>.

La soia è il solo alimento verso cui è descritta la possibilità di manifestare la allergia alle Bet v 1 con sintomi più gravi della sindrome allergica orale. La allergia alla soia di solito si manifesta nei primi anni di vita, e in quel caso le molecole sensibilizzanti sono la Gly m 5 e la Gly m 6. tuttavia può insorgere anche in seguito alla sensibilizzazione alla betulla, e in questo caso la molecola responsabile è il Gly m 4. Allora il quadro clinico può essere non solo quello della sindrome allergica orale, ma anche disturbi cronici o recidivanti come diarrea o dolori addominali o orticaria recidivante o prurito cronico. Alcuni autori hanno dimostrato che eliminare in questi casi la soia porta alla scomparsa dei sintomi, ma alla reintroduzione può seguire una reazione acuta, talora anche con anafilassi. La possibilità di avere sintomi cronici è stata attribuita alla attivazione dei recettori a bassa attività delle IgE sugli eosinofili o alla attivazione

In generale nei soggetti allergici alla betulla è più comune riscontrare la SOA nei confronti della mela e della nocciola. La soia è il solo alimento verso cui è descritta la possibilità di manifestare la allergia alle Bet v 1 con sintomi più gravi della sindrome allergica orale.

#### SCHEDA CONCLUSIVA: COSA È UTILE SAPERE SULLE BET V 1 NELLA PRATICA CLINICA

##### 1) Why: perché è importante conoscere le Bet v 1?

L'allergene maggiore del polline della betulla (Bet v 1) e/o di altri alberi dell'ordine delle *Fagales* induce sintomi respiratori nasali e/o bronchiali nel periodo invernale e primaverile. I suoi omologhi negli alimenti vegetali possono essere causa di allergia alimentare.

##### 2) Who: in chi posso riscontrare allergia alle PR-10?

- Soggetti con sintomi respiratori da Gennaio a Giugno,
- Soggetti con Sindrome Orale Allergica conseguente all'ingestione di alimenti vegetali (soprattutto mela e altre *Rosaceae*), nocciola, *Apiaceae* (sedano, carota) e *Fabaceae* (soia, arachide, fagiolo).

##### 3) When: quando ricercare l'allergia alle PR-10?

Nei pazienti che presentino le caratteristiche cliniche suddette, con lievi sintomi alimentari locali (Sindrome Orale Allergica), con l'unica eccezione della soia (Gly m 4) che può essere causa di sintomi sistemici.

##### 4) What: che cosa cercare? L'importanza della cross-reattività.

In ambito respiratorio, cercare la sensibilizzazione a PR-10 se la sintomatologia respiratoria si prolunga per diversi mesi (da Gennaio a Giugno). La ricerca di IgE specifiche per Bet v 1 e i suoi omologhi è utile anche dove la betulla non sia presente per ragioni climatiche, per la possibile presenza di altri membri della stessa famiglia botanica (nocciolo, faggio, castagno, quercia, carpino).

In ambito alimentare, nei soggetti con Sindrome Orale Allergica da frutta e/o verdura, è utile la ricerca delle IgE sia verso Bet v 1 omologhe dell'alimento per la conferma diagnostica, che verso gli alimenti contenenti molecole cross-reattive, al fine di programmare altri interventi diagnostici (Test di Provocazione Orale) e di fornire consigli dietetici.

##### 5) Which: quali sono i mezzi diagnostici in uso.

Su circa venti alimenti contenenti molecole allergeniche Bet v 1-simili, è attualmente possibile dosare le IgE specifiche solo nei confronti delle PR-10 di sedano (*Api g 1*), kiwi (*Act d 8*), arachide (*Ara h 8*), soia (*Gly m 4*), nocciola (*Cor a 1*) e pesca (*Pru p 1*) mediante CAP system, e della mela (*Mal d 1*) mediante l'ISAC microarray.

Su 9 fonti allergeniche respiratorie contenenti PR-10, la ricerca della IgE specifiche è attualmente possibile solo nei confronti degli omologhi di betulla (Bet v 1) con CAP e ISAC, ontano (*Aln g 1*) e nocciolo (*Cor a 1*) mediante ISAC.

linfocitaria e la mancanza di sintomi acuti alla cronica ingestione che porterebbe alla deplezione di mediatori delle mast cellule. In questi casi gli SPT con estratti commerciali sono spesso molto positivi per la betulla ma spesso negativi per la soia, mentre risulta positivo il PbP con la farina di soia o con bevande di soia <sup>42</sup>.

L'elenco degli alimenti che contengono Bet v 1 like e le rispettive molecole è illustrato nella Tabella III. Dei circa venti alimenti a oggi conosciuti contenenti molecole allergeniche Bet v 1 simili, è possibile la determinazione di IgE specifiche solo nei confronti delle Bet v 1 del sedano, del kiwi, delle arachidi, della soia, della nocciola e della pesca mediante il CAP system e oltre a queste anche verso le Bet v 1 della mela mediante il test di microarray proteomico (ISAC). Per quanto riguarda gli inalanti, molecole allergeniche di tipo Bet v 1 sono presenti in 9 fonti allergeniche, e di queste è possibile la ricerca delle IgE specifiche verso le singole molecole allergeniche Bet v 1 solo nei confronti della betulla (con CAP e ISAC) e verso le Bet v 1 dell'ontano e del nocciolo (con ISAC).

## Bibliografia

- Allergen nomenclature : <http://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=129>
- Hauser M, Egger M, Welner M et al. *Molecular properties of plant food allergens: a current classification into protein families*. Open Immunol J 2008;1:1-12.
- Edreva A. *Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years*. Gen Appl Plant Physiology 2005;31:105-24.
- Hoffmann-Sommergruber K, Mills ENC. *Food allergen protein families and their structural characteristics and application in component-resolved diagnosis: new data from the EuroPrevall project*. Anal Bioanal Chem 2009;395:25-35.
- Schweimer K., Sticht H, Nerkamp J, et al. *NMR spectroscopy reveals common structural features of the birch pollen allergen Bet v 1 and the cherry allergen Pru a 1*. Appl Magn Reson 1999;17:449-64.
- Marković-Housley Z, Degano M, Lamba D, et al. *Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the mayor birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier*. J Mol Biol 2003;325:123-33.
- Park CJ, Kim KJ, Shin R, et al. *Pathogenesis-related protein 10 isolated from ot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway*. Plant J 2004;37:186-98.
- Gaier S, Marsh J, Oberhuber C, et al. *Purification and structural stability of the peach allergens Pru p 1 and Pru p 3*. Mol Nutr Food Res 2008;52(Supp 2):S220-S229.
- Garcia BE, Lisazo MT. *Cross-reactivity syndromes in food allergy*. J Invest Allergol Clin Immunol 2011;21:162-70.
- Alessandri C, Zennaro D, Zaffiro A, et al. *Molecular allergology approach to allergic diseases in the paediatric age*. Ital J Pediatr 2009;35:29-41.
- WHO. Codex and Hoc Intergovernmental Task Force on Foods Derived from Biotechnology. *Joint FAO/WHO food standards program*. Yokohama: World Health Organization, 2003. <http://www.codexalimentarius.net/>.
- Hauser M, Egger M, Wallner M, et al. *Molecular properties of plant food allergens: a current classification into protein families*. The Open Immunology Journal 2008;1:1-12.
- Aalberse RC, Akkerdeas JH, van Ree R. *Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens*. Allergy 2001;56:478-90.
- Geroldinger Simic M, Zelniker T, Aberer W, et al. *Birch pollen-related food allergy: Clinical aspects and the role of allergen-specific IgE and IgG<sub>4</sub> antibodies*. J Allergy Clin Immunol 2011;127:616-22.
- [www.allergome.org](http://www.allergome.org) (sito web di diagnostica molecolare).
- Hauser M, Roulias A, Ferreira F, et al. *Panallergens and their impact on the allergic patient*. Allergy Asthma Clin Immunol 2010;6:1-14.
- Bohle B. *The impact of pollen-related food allergens on pollen allergy*. Allergy 2007;62:3-10.
- Wensing M, Akkerdaas JH, van Leeuwen WA, et al. *IgE to Bet v 1 and profilin: Cross-reactivity patterns and clinical relevance*. J Allergy Clin Immunol 2002;110: 435-42.
- Asero R, Massironi F, Velati C. *Detection of prognostic factors for oral allergy syndrome in patients with birch pollen hypersensitivity*. J Allergy Clin Immunol 1996;97:611-6.
- Asero R. *Relevance of pollen-specific IgE levels to the development of Apiaceae hypersensitivity in patients with birch pollen allergy*. Allergy 1997;52:560-4.
- Hoffmann-Sommergruber K, O'Riordain G, Ahorn H, et al. *Molecular characterization of Dau c 1, the Bet v 1 homologous protein from carrot and its cross-reactivity with Bet v 1 and Api g 1*. Clin Exp Allergy 1999;29:840-7.

- <sup>22</sup> Mittag D, Batori V, Neudecker P, et al. A novel approach for investigation of specific and cross-reactive IgE epitopes on Bet v 1 and homologous food allergens in individual patients. *Molecular Immunology* 2006;43:268-78.
- <sup>23</sup> Bohle B, Zwölfer B, Heratizadeh A, et al. Cooking birch pollen-related food: Divergent consequences for IgE- and T cell-mediated reactivity in vitro and in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:242-9.
- <sup>24</sup> Mari A, Wallner M, Ferreira F. Fagales pollen sensitization in a birch-free area: a respiratory cohort survey using Fagales pollen extracts and birch recombinant allergens (rBet v 1, rBet v 2, r Bet v 4). *Clin Exp Allergy* 2003;33:1419-28.
- <sup>25</sup> Mari A. Multiple pollen sensitization: a molecular approach to the diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;125:57-65.
- <sup>26</sup> Niederberger V, Pauli G, Grönlund H, et al. Recombinant birch pollen allergens (rBet v 1 and rBet v 2) contain most of the IgE epitopes present in birch, alder, hornbeam, hazel, and oak pollen: a quantitative IgE inhibition study with sera from different populations. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:579-91.
- <sup>27</sup> Hauser M, Asam C, Himly M, et al. Bet v 1-like pollen allergens of multiple Fagales species can sensitize atopic individuals. *Clin Exp Allergy* 2011;41:1804-14.
- <sup>28</sup> Kazemi-Shirazi L, Pauli G, Purohit A, et al. Quantitative IgE inhibition experiments with purified recombinant allergens indicate pollen-derived allergens as the sensitizing agents responsible for many forms of plant food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999;105:116-25.
- <sup>29</sup> Fernández-Rivas M, Bolhaar S, González-Mancebo E, et al. Apple allergy across Europe: How allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:481-8.
- <sup>30</sup> Kleine-Tebbe J, Vogel L, Crowell DN, et al. Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1-related PR-10 protein in soybean, SAM22. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:797-804.
- <sup>31</sup> Ballmer-Weber BK, Holzhauser T, Scibilia J, et al. Clinical characteristics of soybean allergy in Europe: a double-blind, placebo-controlled food challenge study. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1489-96.
- <sup>32</sup> Bublin M, Pfister M, Radauer C, et al. Component-resolved diagnosis of kiwifruit allergy with purified natural and recombinant kiwifruit allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:687-94.
- <sup>33</sup> D'Avino R, Bernardi ML, Wallner M, et al. Kiwifruit Act d 11 is the first member of the ripening-related protein family identified as an allergen. *Allergy* 2011;66:870-7.
- <sup>34</sup> Asero R, Massironi F, Velati C. Detection of prognostic factors for oral allergy syndrome in patients with birch pollen hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:611-6.
- <sup>35</sup> Vereda A, van Hage M, Ahlstedt S, et al. Peanut allergy: Clinical and immunologic differences among patients from 3 different geographic regions. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:603-7.
- <sup>36</sup> Sekercová A, Poláčková M. Detection of Bet v1, Bet v2 and Bet v4 specific IgE antibodies in the sera of children and adult patients allergic to birch pollen: evaluation of different IgE reactivity profiles depending on age and local sensitization. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;154:278-85.
- <sup>37</sup> De Knop KJ, Verweij MM, Grimmelikhuijsen M, et al. Age-related sensitization profiles for hazelnut (*Corylus avellana*) in a birch-endemic region. *Pediatr Allergy Immunol* 2011;22(1 Pt 2):e139-49.
- <sup>38</sup> Associazione Italiana di Aerobiologia. Calendario pollinico da: [www.ilpolline.it](http://www.ilpolline.it), Accesso del 29 gennaio 2012.
- <sup>39</sup> Asero R. Birch and ragweed pollinosis north of Milan: a model to investigate the effects of exposure to "new" airborne allergens. *Allergy* 2002;57:1063-6.
- <sup>40</sup> Rashid RS, Smith KA, Nambiar KZ, et al. Pollen-food syndrome is related to Bet v 1/PR-10 protein sensitization, but not all patients have spring rhinitis. *Allergy* 2011;66:1391-6.
- <sup>41</sup> Webber CM, Enland RW. Oral allergy syndrome: a clinical, diagnostic and therapeutic challenge. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010;104:101-8.
- <sup>42</sup> De Swert LFA, Gadisseur R, Siolander S, et al. Secondary soy allergy in children with birch pollen allergy may cause both chronic and acute symptoms. *Pediatr Allergy Immunol* 2012;23:117-23.



# Tubercolosi, vaccinazione con il Bacillo Calmette-Guérin e malattie allergiche: risultati dall'International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Fase Due

Carsten Flohr<sup>1</sup>, Gabriele Nagel<sup>2</sup>, Gudrun Weinmayr<sup>2</sup>, Andrea Kleiner<sup>2</sup>, Hywel C. Williams<sup>3</sup>, Nadia Ait-Khaled<sup>4</sup>, David P. Strachan<sup>5</sup> & the ISAAC Phase Two Study Group\*

<sup>1</sup> Department of Paediatric Allergy & Dermatology, St John's Institute of Dermatology, St Thomas' Hospital and King's College London, London, UK; <sup>2</sup> Institute of Epidemiology and Medical Biometry, University of Ulm, Ulm, Germany; <sup>3</sup> Centre for Evidence Based Dermatology, University of Nottingham, Nottingham, UK; <sup>4</sup> International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (The Union), Cheraga, Algeria; <sup>5</sup> Division of Community Health Sciences, St. George's University of London, London, UK

## Parole chiave

tubercolosi; bacillo Calmette-Guérin; asma; malattia allergica; eczema.

## Abstract

Alcuni studi hanno suggerito un effetto protettivo dell'infezione micobatterica (TB) sul rischio di malattia allergica, ma pochi studi hanno esaminato l'associazione tra le due. Pertanto abbiamo investigato se la malattia tubercolare e la vaccinazione con il bacillo Calmette-Guérin (BCG) nelle fasi iniziali della vita proteggano contro la malattia allergica. Le informazioni sui sintomi di malattia allergica, sulla malattia tubercolare pregressa, e sulla vaccinazione BCG così come sui potenziali fattori confondenti erano raccolte tramite questionari rivolti ai genitori da un set casualmente selezionato di 23901 bambini di età tra gli 8 e i 12 anni in 20 centri sia nei paesi sviluppati che in quelli in via di sviluppo. I bambini erano anche esaminati fisicamente per l'eczema flessurale e sottoposti a skin prick test. Sono stati calcolati gli odds ratio (OR) complessivi e gli intervalli di confidenza (CIs) al 95%, usando modelli di meta-analisi random effects. C'erano 245 (1,0%) casi riportati di malattia tubercolare, e il 66,3% (15857) di tutti i bambini avevano ricevuto il vaccino BCG. L'asma, la febbre da fieno e i sintomi di eczema flessurale nell'anno passato così come l'eczema flessurale all'esame della pelle erano tutti positivamente correlati a una storia di TB (OR aggiustati complessivi 'wheeze nell'anno passato' = 2,27, 95% CI 1,52-3,41; OR aggiustati complessivi 'sintomi di febbre da fieno nell'ultimo anno' = 2,23, 1,22-4,09; OR aggiustati complessivi 'sintomi di eczema flessurale nell'ultimo anno' = 3,21, 2,01-5,12; OR aggiustati complessivi 'eczema flessurale all'esame della pelle' = 4,04, 1,71-9,56). Stime di rischio anche più elevate sono state osservate per l'asma grave e per i sintomi di eczema [OR aggiustato = 4,02 (2,17-7,47) e OR aggiustato = 6,31 (2,19-18,17), rispettivamente]. Non c'era una associazione significativa tra TB pregressa e positività allo skin prick test (OR aggiustato complessivo = 1,32, 0,87-2,02). La vaccinazione BCG durante il primo anno di vita non era associata con nessuno degli outcomes di malattia allergica. Abbiamo riscontrato una uniforme associazione positiva tra TB e tutti gli outcomes di malattia allergica, incluso l'eczema all'esame della pelle. Dal momento che questo era uno studio trasversale, non è chiaro se questa associazione positiva è attribuibile a una relazione causale, e sono necessari ulteriori studi longitudinali.

Negli ultimi decenni abbiamo assistito a un aumento drammatico delle patologie allergiche nei paesi industrializzati, accompagnato da un declino nell'esposizione a malattie infettive prima molto diffuse, come i parassiti elminti e le infezioni pediatriche virali e batteriche (1-3). In questo contesto, alcuni hanno suggerito che l'infezione da *Mycobacterium tuberculosis* potrebbe avere un effetto protettivo diretto sul rischio di malattia allergica. Inizialmente l'idea di un effetto protettivo dell'infezione micobatterica sulle malattie allergiche e sulla sensibilizzazione allergica è venuta da uno studio condotto su bambini giapponesi in una popolazione in cui era presente un programma universale di test di screening alla tubercolina e di vaccinazione con il bacillo Calmette-Guérin (BCG); tale studio mostrava una forte associazione inversa tra l'ipersensibilità ritardata al *M. tuberculosis* e le manifestazioni cliniche della malattia allergica (4). Altri due studi trasversali realizzati in Giappone e in Sudafrica hanno osservato una riduzione simile nei sintomi di malattia allergica in bambini con risposte positive alla tubercolina (5, 6). Tuttavia, tutti gli studi successivi sulle risposte alla tubercolina non hanno confermato questi risultati (7-20). Una recente revisione sistematica ha anche analizzato l'associazione tra vaccinazione BCG e condizioni atopiche e non ha trovato un effetto protettivo convincente sulla sensibilizzazione allergica, sull'eczema o sulla febbre da fieno, ma non esclude una potenziale piccola riduzione dell'asma (21-25). È stato fatto un solo trial controllato randomizzato in cui la vaccinazione BCG alla nascita veniva usata come potenziale metodo per prevenire l'asma, ma questo non ha mostrato un effetto protettivo significativo (OR = 0,61, 0,28-1,31) (26).

La mancanza di una associazione convincente tra la vaccinazione BCG e le malattie allergiche è sorprendente, dal momento che modelli murini suggeriscono con forza che l'infezione da BCG può sopprimere la sensibilizzazione allergica, e l'eosinofilia e l'iper reattività indotte dall'esposizione ad allergeni respiratori, in parte grazie all'induzione di cellule regolatorie T (27-29). Cionondimeno, gli interventi terapeutici con BCG e con micobatteri non patogeni negli esseri umani con provate malattie allergiche sono stati deludenti (30).

Fino a questo momento, poco è stato fatto sulla associazione tra tubercolosi (TB) e malattia allergica. Di tre studi ecologici due hanno suggerito una relazione inversa tra i tassi di notifica di TB e le prevalenze di malattia allergica nella popolazione (31-33). Inoltre, un grande studio caso-controllo su una popolazione adulta finlandese ha suggerito che la malattia tubercolare in età

pediatrica potrebbe proteggere le donne dalle malattie allergiche. Tuttavia, il trend opposto è stato osservato negli uomini (34), e finora non è stato realizzato alcuno studio di popolazione in età pediatrica sulla potenziale associazione tra TB e malattia allergica.

Quindi abbiamo studiato l'associazione tra vaccinazione BCG, TB e malattie allergiche tra gli studenti di età pediatrica che hanno partecipato all'*International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC) Fase Due. In accordo con la nomenclatura del World Allergy Organization, usiamo il termine "eczema" per tutti i significati associati ("eczema atopico", "dermatite atopica"). Ci riferiamo alla malattia tubercolare come a "TB" e alla tubercolosi latente come a "infezione da TB".

## Metodi

Il razionale e i metodi di ISAAC Fase Due sono stati descritti in dettaglio altrove (36). Brevemente e in riferimento a questo testo, ISAAC Fase Due è stato condotto su bambini di 8-12 anni di età per valutare la prevalenza e i fattori di rischio della malattia allergica tra e all'interno di popolazioni. Ai centri dello studio è stato richiesto di selezionare in modo randomizzato almeno 10 scuole da un campione di scuole in una data area geografica, e sono stati invitati a partecipare bambini (n ≥ 1000 per centro) che frequentavano classi in cui vi era una maggioranza di bambini tra i 9 e gli 11 anni di età.

Dopo aver ottenuto i consensi scritti, i dati sono stati raccolti attraverso questionari, rivolti ai genitori, sui sintomi di asma, rinite e eczema, identici a quelli usati per bambini di 6-7 anni di età nell'ISAAC Fase Uno (37). Le domande relative ai sintomi di asma erano le seguenti: "Il tuo bambino ha mai avuto wheezing o fischio o sibili?" (yes/no = "sintomi di asma"), e "Il tuo bambino ha avuto wheezing o fischio o sibili negli ultimi 12 mesi?" (yes/no = "sintomi di asma nell'anno passato"). In caso di sintomi di asma nell'anno passato, ai genitori venivano fatte altre domande relative alla gravità dei sintomi: "Quanti attacchi di wheezing ha avuto il tuo bambino negli ultimi 12 mesi?" (nessuno, 1-3, 4-12, più di 12), "Negli ultimi 12 mesi, quanto spesso, mediamente, il sonno del tuo bambino è stato disturbato da un episodio di wheezing?" (mai, meno di una notte a settimana, una o più notti a settimana), e "Negli ultimi 12 mesi, è capitato che il wheezing fosse grave abbastanza da limitare l'espressione verbale di tuo figlio a solamente una o due parole alla volta tra un respiro e l'altro?" (si/no). Tutti i bambini con 4 o più episodi di wheezing negli ultimi 12 mesi, disturbi del sonno almeno una notte a settimana

o limitazioni di espressione sono stati classificati “con wheezing grave nell’ultimo anno”.

Per la rinite, ai genitori partecipanti era chiesto: “Il tuo bambino ha mai avuto problemi di starnuti, di naso che cola o di naso chiuso, in momenti in cui non aveva un raffreddore o una influenza?” (si/no = “sintomi di rinite”), e “Negli ultimi 12 mesi, il tuo bambino ha avuto problemi di starnuti, di naso che cola o di naso chiuso, in momenti in cui non aveva un raffreddore o una influenza?” (si/no = “sintomi di rinite nell’ultimo anno”). Le domande relative all’eczema erano le seguenti: “Il tuo bambino ha mai avuto un rash pruriginoso intermittente per almeno 6 mesi?” (si/no = “sintomi di eczema”), e “Il tuo bambino ha mai avuto un rash pruriginoso negli ultimi 12 mesi?” (si/no = “sintomi di eczema negli ultimi 12 mesi”), e “Questo episodio di prurito ha riguardato, in un momento qualsiasi, uno dei seguenti punti del corpo: piega dei gomiti, zona dietro alle ginocchia, zona davanti alle caviglie, sotto i glutei, o zona attorno al collo, alle orecchie, o agli occhi?” (si/no = “eczema flessurale nell’ultimo anno”). Se la risposta era positiva, ai genitori veniva chiesto anche a che età si era presentato per la prima volta questo episodio di prurito (età inferiore ai due anni, tra i due e i 4 anni di età, a 5 anni di età o più). La gravità dell’eczema veniva assegnata chiedendo “A un certo punto nel corso degli ultimi 12 mesi questo rash pruriginoso si è risolto completamente?” (“eczema persistente flessurale nell’ultimo anno”) e “Negli ultimi 12 mesi, quanto spesso, in media, il tuo bambino è stato sveglio di notte a causa di questo rash pruriginoso?” (“mai, meno di una notte a settimana, una o più notti a settimana”). Tutti i bambini con sintomi di eczema persistente o disturbi del sonno per una o più notti a settimana sono stati classificati come “con sintomi di eczema flessurale grave nell’ultimo anno”. Infine, ai genitori veniva chiesto se il loro bambino aveva mai avuto l’eczema (“eczema”).

Per quanto riguarda la TB e la vaccinazione BCG, ai genitori veniva chiesto “Il tuo bambino ha mai avuto una delle seguenti malattie? ... Tubercolosi? (si/no), e “Il tuo bambino è stato vaccinato contro tubercolosi/BCG?” (si/no). Se la risposta era “sì”, ai genitori veniva chiesta anche l’età in anni del bambino al momento della TB e della vaccinazione. Dove non specificamente indicato, usiamo il termine “TB” per la malattia tubercolare, per esempio TB con sintomi clinici, come accertato dal questionario ISAAC, mentre “infezione da TB” è il termine usato comunemente per la tubercolosi latente.

I bambini sono anche stati visitati per l’eczema flessurale nelle seguenti cinque aree del corpo: (i) attorno agli oc-

chi, (ii) al collo, (iii) sui gomiti, (iv) dietro le ginocchia, (v) nella parte anteriore delle caviglie. I partecipanti sono stati definiti con eczema flessurale se avevano un tipico rash eritematoso flessurale con cambiamento della superficie (per esempio desquamazione fine, vescicole, esudato, con croste o con lichenificazione) (<http://www.nottingham.ac.uk/dermatology/eczema/contents.html>, ultimo accesso 16 novembre 2011). Tutte le persone che hanno lavorato nello studio sono state prima formate e quindi testate formalmente sulla capacità di riconoscere l’eczema flessurale, attraverso l’uso di un manuale e di immagini fotografiche sviluppate specificamente per questo scopo (33, 34). I bambini hanno anche eseguito uno skin prick test per i seguenti sei allergeni comuni: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, pelo di gatto, *Alternaria tenuis*, alberi misti, e pollini di graminacee, così come istamina (10 mg/ml) e soluzione fisiologica di controllo (tutte ALK, Hørsholm, Denmark). Ai centri partecipanti allo studio era permesso di aggiungere allergeni di rilevanza locale. In 15 centri venivano testati degli allergeni aggiuntivi che includevano quelli di scarafaggi, cane, cavallo, oliva, *Parietaria officinalis*, erbe miste, mix di alberi locali, muffe miste, e *Cladosporium*. Una goccia di ogni allergene e di entrambe le soluzioni di controllo era posizionata sulla parte volare dell’avanbraccio sinistro, che veniva forato verticalmente usando delle lancette ALK di 1 mm. Le reazioni erano registrate dopo 15 minuti e considerate positive se il diametro medio del pomfo era di almeno 3 mm più grande di quello provocato dalla fisiologica (32). Veniva definito atopia il fatto di avere almeno uno skin prick test positivo a uno qualsiasi degli allergeni testati.

In seguito all’inserimento dei dati raccolti nei singoli centri, i dati sono stati spediti al Centro di Coordinamento di ISAAC Fase Due presso l’Università di Ulm (Germania) per i controlli sulla consistenza e l’analisi statistica. Gli odds ratio grezzi per TB pregressa e per vaccinazione BCG (esposizione) e gli outcomes di malattia allergica sono stati calcolati con intervalli di confidenza al 95%. Nei casi in cui i centri avevano studiato sottocampioni stratificati (approssimativamente 100 bambini con e 100 bambini senza wheeze nell’anno precedente (32), venivano calcolati i tassi di prevalenza e gli ORs pesati (40). Come confondenti abbiamo considerato l’età, il sesso, il numero di fratelli e sorelle, la condivisione della camera da letto (come indicatore di affollamento e di condizioni di vita), e come marker surrogato di condizioni socio-economiche, la storia delle malattie allergiche dei genitori, e l’educazione materna. Abbiamo anche esplorato l’effetto della gra-



**Tab. I.** Tabella riassuntiva con il numero di bambini arruolati partecipanti in ogni centro partecipante e i rispettivi outcomes di frequenza di malattia allergica, di vaccinazione BCG, e di malattia tubercolare (TB).

Paese	Centro	N	Wheeze			Rinocongiuntivite			Eczema flessurale nell'anno passato			Eczema flessurale all'esame della pelle			Vaccinazione BCG			Malattia tubercolare (TB)		
			%	95% CI	nell'anno passato	%	95% CI	nell'anno passato	%	95% CI	%	95% CI	%	95% CI	%	95% CI	%	95% CI	%	95% CI
Albania	Tirana	771	4,4	3,1-5,6	6,7	5,2-8,2	5,8	4,4-7,3	2,4	1,5-3,4	53,3	49,8-56,7	1,8	1,0-2,7						
	Uruguayana	1968	25,6	23,7-27,6	21,0	19,2-22,8	11,5	10,1-13,0	-	-	99,7	99,5-100,0	0,3	0,0-0,5						
Cina	Guangzhou	2119	3,2	2,6-3,8	7,0	6,1-7,8	1,3	0,9-1,7	0,7	0,2-1,3	94,7	93,8-95,6	0,2	0,0-0,3						
	Pichincha	870	0,8	0,2-1,4	1,5	0,7-2,2	1,8	0,9-2,7	4,5	3,1-5,8	88,1	86,0-90,3	0,0	-						
Georgia	Tbilisi	481	9,2	7,4-11,1	7,0	5,4-8,6	6,2	4,6-7,8	14,0	8,2-19,7	90,2	88,2-92,2	2,6	1,2-3,9						
Grecia	Atene	985	5,6	4,2-7,1	4,8	3,5-6,2	7,4	5,8-9,1	1,3	0,6-2,0	76,0	73,4-78,7	1,1	0,5-1,8						
Grecia	Thessaloniki	1009	8,4	6,7-10,1	7,0	5,5-8,6	5,1	3,8-6,5	1,4	0,7-2,1	90,1	88,2-91,9	0,9	0,3-1,5						
India	Mumbai	1647	6,1	4,9-7,3	4,9	3,9-6,0	4,4	3,4-5,3	1,1	0,6-1,6	87,9	86,3-89,5	3,5	2,6-4,4						
Islanda	Reykjavik	944	9,2	7,3-11,0	11,2	9,2-13,3	22,2	19,5-24,8	8,8	6,6-11,1	26,5	23,7-29,3	0,5	0,1-1,0						
Lettonia	Riga	736	6,9	5,3-8,6	8,5	6,7-10,4	9,5	7,5-11,4	6,4	4,2-8,5	96,0	94,6-97,3	0,1	0,0-0,4						
Nuova Zelanda	Hawkes Bay	1223	21,9	19,7-24,1	22,3	20,0-24,5	13,8	11,9-15,7	8,2	6,7-9,7	24,2	21,8-26,6	0,6	0,2-1,0						
Norvegia	Tromsø	3714	14,0	12,9-15,2	12,6	11,5-13,7	20,8	19,5-22,1	10,5	8,2-12,9	25,2	23,8-26,6	0,2	0,0-0,3						
Palestina	Ramallah	284	8,8	7,6-9,9	6,9	5,9-8,0	7,5	6,4-8,6	2,8	0,5-5,2	67,6	61,9-73,3	1,4	0,0-2,8						
Spagna	Almeria	635	15,5	13,4-17,7	24,5	22,0-27,1	10,0	8,2-11,7	1,9	1,1-2,7	27,9	24,6-31,2	2,0	1,1-2,9						
Spagna	Cartagena	665	11,9	10,2-13,6	15,4	13,5-17,4	7,1	5,7-8,4	0,9	0,4-1,5	54,1	50,5-57,6	1,1	0,5-1,7						
Spagna	Madrid	522	11,6	9,6-13,7	18,7	16,2-21,2	13,1	10,9-15,2	3,2	1,8-4,5	48,5	44,6-52,4	0,9	0,2-1,6						
Spagna	Valencia	718	9,1	7,6-10,7	12,6	10,8-14,3	8,7	7,1-10,2	3,7	2,6-4,7	34,0	30,6-37,3	0,5	0,1-0,9						
Turchia	Ankara	1797	10,9	9,8-12,0	11,8	10,6-13,0	5,4	4,5-6,2	1,4	1,0-1,9	96,3	95,6-97,0	2,9	2,1-3,7						
Gran Bretagna	West Sussex	640	16,2	13,9-18,4	16,2	13,9-18,4	14,6	12,5-16,8	6,7	5,1-8,3	16,5	13,7-19,4	0,3	0,0-0,6						

**Tab. II.** Odds ratio (OR) in pool stimati per l'associazione tra tubercolosi progressa (TB), vaccinazione BCG, e outcomes di allergia.

Outcome	Tutti i bambini			Atopici *		Non atopici *	
	OR grezzo (95% CI)	OR aggiustato ** (95% CI)	OR grezzo (95% CI)	OR aggiustato ** (95% CI)	OR grezzo (95% CI)	OR aggiustato ** (95% CI)	
<b>Vaccinazione BCG ≤ 1 anno ***</b>							
Wheeze anno passato	1,00 (0,85–1,17)	1,01 (0,84–1,22)	1,10 (0,82–1,48)	1,20 (0,86–1,67)	1,06 (0,80–1,40)	1,09 (0,80–1,47)	
Wheeze grave anno passato	0,97 (0,72–1,31)	1,04 (0,76–1,42)	1,08 (0,64–1,84)	1,13 (0,64–1,97)	1,24 (0,64–2,41)	1,00 (0,58–1,72)	
Sintomi di febbre da fieno anno passato	1,08 (0,93–1,25)	1,02 (0,86–1,21)	1,32 (0,99–1,75)	1,24 (0,90–1,70)	0,94 (0,71–1,25)	0,88 (0,64–1,21)	
Sintomi di eczema flessurale anno passato	1,10 (0,82–1,47)	1,08 (0,83–1,42)	1,14 (0,73–1,80)	1,10 (0,65–1,85)	1,07 (0,76–1,53)	0,97 (0,68–1,38)	
Sintomi di eczema flessurale grave anno passato	1,29 (0,92–1,81)	1,26 (0,87–1,83)	1,89 (0,95–3,75)	1,71 (0,54–5,41)	1,16 (0,65–2,09)	1,19 (0,63–2,25)	
Eczema flessurale all'esame della pelle	1,08 (0,74–1,58)	0,95 (0,63–1,43)	1,98 (0,76–5,15)	1,53 (0,59–3,94)	1,15 (0,63–2,12)	1,04 (0,56–1,94)	
Positività dello Skin prick test	1,01 (0,87–1,17)	0,97 (0,83–1,14)	-	-	-	-	
<b>Vaccinazione BCG &gt; 1 anno ***</b>							
Wheeze anno passato	1,17 (0,95–1,46)	1,08 (0,85–1,37)	1,37 (0,94–2,00)	1,07 (0,69–1,65)	<b>1,37 (1,00–1,87)</b>	1,30 (0,92–1,85)	
Wheeze grave anno passato	1,53 (1,05–2,22)	1,33 (0,89–1,99)	<b>2,06 (1,14–3,71)</b>	1,61 (0,82–3,15)	2,01 (0,99–4,10)	1,54 (0,65–3,64)	
Sintomi di febbre da fieno anno passato	0,91 (0,75–1,09)	0,93 (0,75–1,15)	0,89 (0,62–1,27)	0,81 (0,55–1,20)	1,02 (0,75–1,40)	1,04 (0,74–1,47)	
Sintomi di eczema flessurale anno passato	1,01 (0,79–1,29)	1,04 (0,80–1,35)	0,88 (0,51–1,52)	0,92 (0,51–1,67)	1,06 (0,77–1,47)	1,10 (0,78–1,56)	
Sintomi di eczema flessurale grave anno passato	1,09 (0,72–1,65)	1,16 (0,74–1,82)	1,32 (0,38–4,56)	1,81 (0,56–5,80)	1,44 (0,81–2,55)	1,41 (0,77–2,58)	
Eczema flessurale all'esame della pelle	<b>1,77 (1,10–2,83)</b>	<b>1,82 (1,14–2,91)</b>	1,40 (0,56–3,45)	1,16 (0,50–2,68)	<b>2,76 (1,57–4,84)</b>	<b>2,94 (1,61–5,37)</b>	
Positività dello Skin prick test	1,06 (0,90–1,25)	1,14 (0,87–1,50)	-	-	-	-	
<b>Malattia tubercolare progressa***</b>							
Wheeze anno passato	<b>2,24 (1,56–3,21)</b>	<b>2,27 (1,52–3,41)</b>	2,08 (0,92–4,72)	2,57 (0,97–6,82)	<b>2,63 (1,62–4,28)</b>	<b>2,65 (1,57–4,49)</b>	
Wheeze grave anno passato	<b>3,25 (1,85–5,73)</b>	<b>4,02 (2,17–7,47)</b>	2,90 (0,53–15,75)	4,98 (0,94–26,46)	<b>4,42 (1,96–9,97)</b>	<b>3,76 (1,22–11,02)</b>	
Sintomi di febbre da fieno anno passato	<b>2,46 (1,65–3,66)</b>	<b>2,23 (1,22–4,09)</b>	1,41 (0,57–3,45)	1,24 (0,36–4,32)	<b>4,04 (2,52–6,46)</b>	<b>4,38 (2,51–7,65)</b>	
Sintomi di eczema flessurale anno passato	<b>2,91 (1,91–4,44)</b>	<b>3,21 (2,01–5,12)</b>	3,02 (0,60–15,14)	2,88 (0,51–16,27)	<b>3,47 (2,12–5,67)</b>	<b>4,02 (2,35–6,86)</b>	
Sintomi di eczema flessurale grave anno passato	<b>4,47 (2,09–9,59)</b>	<b>6,31 (2,19–18,17)</b>	<b>6,21 (1,14–33,91)</b>	<b>6,75 (1,06–42,80)</b>	<b>4,75 (2,11–10,71)</b>	<b>5,98 (2,38–15,03)</b>	
Eczema flessurale all'esame della pelle	<b>4,25 (1,89–9,59)</b>	<b>4,04 (1,71–9,56)</b>	<b>6,21 (1,14–33,91)</b>	<b>6,88 (2,35–20,12)</b>	<b>6,02 (2,17–16,71)</b>	<b>6,88 (2,35–20,12)</b>	
Positività dello Skin prick test	1,16 (0,81–1,65)	1,32 (0,87–2,02)	-	-	-	-	

\* Non c'era interazione significativa tra vaccinazione BCG/TB progressa e positività dello skin prick test sugli outcomes di allergia (eccetto per febbre da fieno e TB), rendendo la stratificazione per stato dell'atopia largamente non necessaria. \*\* Gli ORs erano aggiustati per età, sesso, condivisione della camera da letto (come marker dello stato socio-economico e dell'affollamento), e numero di fratelli. \*\*\* Le stime di rischio in relazione alla vaccinazione BCG/TB erano ulteriormente aggiustate sia per vaccinazione BCG sia per TB.

vità dei sintomi e l'età di inizio dell'eczema. Le analisi statistiche sono state eseguite con il software statistico SAS versione 9.1. (SAS Institute Ltd, Cary, NC, USA). Tutti i centri dello studio hanno ottenuto l'approvazione dei rispettivi comitati etici. Abbiamo seguito le linee guida STROBE sui report di studi epidemiologici (41).

## Risultati

I dati sono stati raccolti in 20 centri con un numero totale di 23901 bambini di 8-12 anni di età, di cui il 50,5% erano femmine. La copertura della vaccinazione BCG era variabile tra il 16,5% in West Sussex (Gran Bretagna) e il 99,7% a Uruguaiiana (Brasile). Complessivamente, ci sono stati 245 (1,0%) casi riportati di TB, e il 66,3% (15857) di tutti i bambini ha ricevuto il vaccino BCG. Le prevalenze più basse di TB sono state riportate a Pichincha (Ecuador) e a Riga (Lettonia) con 0% e 0,1% rispettivamente, e le più alte a Mumbai (India) con il 3,5%. Per maggiori dettagli su TB, vaccinazione BCG e valori di prevalenza della malattia allergica, vedere la tabella riassuntiva numero 1.

### Vaccinazione BCG e rischio di malattia allergica

Complessivamente non c'è associazione tra vaccinazione BCG sotto l'anno di età e gli outcome di malattia allergica sia nell'analisi grezza che in quella aggiustata, e la stratificazione per lo stato di atopia non ha cambiato in modo apprezzabile queste stime di rischio (Tabella 2). La situazione è molto simile in caso di vaccinazione BCG effettuata dopo il primo anno di vita, eccetto per una associazione positiva tra eczema flessurale all'esame della cute e vaccinazione BCG tardiva (OR aggiustato = 1,82, 95% IC 1,14–2,91), che è anche più forte nel sottogruppo non atopico (OR aggiustato = 2,94, 1,61–5,37; Tabella 2). La gravità dei sintomi e l'età di inizio dell'eczema non modificavano queste stime di rischio.

### TB e rischio di malattia allergica

Come per la TB pregressa, c'è una associazione positiva universale con tutti gli outcome di malattia allergica, con odds ratio aggiustati tra 2,23 e 4,04 (Tabella 2). Le stime di rischio erano anche più alte per "wheezing grave nell'anno passato" (OR aggiustato = 4,02, 2,17–7,47) e "sintomi gravi di eczema flessurale nell'anno passato" (OR aggiustato = 6,31, 2,19–18,17; Tabella 2). Fatta eccezione per l'eczema flessurale all'esame della cute, le associazioni erano più forti nei bambini non

atopici confrontati con quelli con almeno uno skin prick test positivo, anche se lo skin prick test non era di per sé associato alla TB pregressa (OR aggiustato = 1,32; 0,87–2,02; Tabella 2). Restringendo l'analisi solo ai bambini che avevano anche ricevuto il vaccino BCG o nei quali l'eczema era insorto dopo i due anni di età, le stime di rischio non cambiavano in modo apprezzabile.

## Discussione

Non abbiamo trovato una protezione della vaccinazione BCG sull'asma, sulla rinite o sull'eczema, mentre abbiamo trovato evidenze a supporto di una associazione positiva tra TB e malattia allergica. Questo effetto è stato anche più rilevante nei bambini con asma e sintomi di eczema gravi così come in quelli con eczema flessurale all'esame della cute. L'effetto persisteva dopo un aggiustamento per fattori confondenti ed era presente allo stesso modo nei paesi sviluppati e in quelli in via di sviluppo. Come nel caso del nostro studio, una recente revisione sistematica non ha trovato una associazione significativa tra vaccinazione BCG precoce, eczema e febbre da fieno, anche se non poteva essere esclusa una piccola riduzione nel rischio di asma (20-25). Nonostante due su tre studi ecologici suggeriscano una relazione inversa tra tassi di notifica di TB e prevalenze di malattia allergica, questi studi non permettono di esaminare associazioni su un piano individuale o aggiustamenti per confondenti ambientali (30-32). È interessante che l'unico altro studio che indaga la malattia tubercolare suggerisca anche una associazione positiva tra TB durante l'infanzia e asma successivo, sebbene solo negli uomini, mentre l'opposto era riscontrato nelle donne se la TB era comparsa entro i 16 anni. Questo era uno studio di popolazione caso-controllo tra adulti finlandesi, comprendente 1162 individui di 20 anni di età, o inferiore, che erano stati inseriti nel Registro Nazionale Finlandese della TB. In questo studio era incluso un numero uguale di controlli appaiati per età e per sesso, scelti dal Registro di Popolazione dell'Istituto di Assicurazione Sociale Finlandese (33). I partecipanti erano seguiti per una media di 30 anni. Il focus principale dello studio era l'asma (diagnosi basata puramente sull'uso di farmaci per l'asma). Non erano riportate separatamente le altre malattie allergiche, e non veniva fatta distinzione tra asma atopico e non atopico. Questa è una omissione importante, dal momento che sta diventando sempre più chiaro che asma atopico e non atopico rappresentano due fenotipi distinti. Mentre noi abbiamo stratificato il nostro campione per sensibilizzazione allergica, non c'era alcun suggerimento che l'effetto della vaccinazione BCG e della TB fosse significativamente differente

negli individui sensibilizzati rispetto a quelli non atopici. A parte lo skin prick test, una chiara forza del nostro studio è che ISAAC Fase Due fornisce un set di dati molto ampio basato sulla popolazione, e la mancanza di potenza statistica non è quindi una spiegazione probabile per l'assenza di un effetto protettivo della vaccinazione BCG e della TB sugli outcomes di malattia allergica. ISAAC Fase Due usa metodi validati standardizzati in tutti i centri di studio e rigidi controlli di qualità per accertare i segni fisici di eczema flessurale e per determinare la sensibilizzazione della cute. Questo assicura una comparabilità diretta di risultati tra centri e garantisce il raggruppamento dei dati delle stime di rischio attraverso le popolazioni in studio.

Uno svantaggio del nostro set di dati è la mancanza di dati oggettivi relativi alle esposizioni di interesse. Ad esempio, il protocollo operativo di ISAAC Fase Due non includeva l'esame fisico per cicatrici da BCG. Se è probabile che dalla nostra domanda su TB pregressa sia stata rilevata la malattia quando clinicamente significativa, casi subclinici, molto più comuni, (infezione latente da TB) si sono verificati senza essere notati. Fare i test della tubercolina o l'esame di rilascio dell'interferon-gamma non era fattibile data la dimensione di questo studio. Come per qualsiasi altro studio trasversale, ci sono anche dei difetti inevitabili legati al disegno dello studio. Le informazioni sulle esposizioni e gli outcomes derivati dal questionario sono stati raccolti retrospettivamente, basandosi sul ricontatto dei genitori. È possibile che i genitori di un bambino con allergia respiratoria abbiano attribuito in modo scorretto alla TB sintomi respiratori nelle fasi iniziali della vita o, più probabilmente, che i genitori dei bambini con asma, febbre da fieno, o eczema ricordassero o pensassero che il loro bambino aveva avuto TB, che potrebbe giustificare con qualcuna delle associazioni viste, in particolare con il wheezing. Comunque, questo non spiegherebbe la forte associazione positiva con l'eczema flessurale all'esame della pelle. Un ricordo non adeguato può anche non spiegare l'associazione positiva trovata in questo studio, ma se presente, potrebbe implicare che la reale associazione tra TB, BCG e malattie allergiche è perfino maggiore. Vale la pena considerare se l'infezione micobatterica clinica, piuttosto che quella, molto più comune, latente, possa favorire una infiammazione del tessuto bersaglio di allergia o viceversa. Come discusso sopra, l'argomento a favore di un effetto protettivo delle risposte immuni generate sia col vaccino BCG e sia a causa di *M. tuberculosis* è incentrato sulla sovra-espressione di cellule Th1 e le loro citochine e sugli effetti a lungo termine

che potrebbero avere, deviando il sistema immunitario dalla infiammazione Th2 driven, come l'asma o l'eczema. Certamente la ricerca su animali suggerisce che il vaccino BCG è in grado di sopprimere l'infiammazione allergica di tessuto (27-29). Tuttavia, l'immunità adattiva a TB appare più complessa e non del tutto compresa, dal momento che coinvolge cellule Th2 e Th17, così come la modulazione attraverso le cellule T regolatorie (42). Mentre le cellule T regolatorie producono principalmente citochine antinfiammatorie, come IL-10 e transforming growth factor-beta, la sovra espressione delle cellule Th2 e Th17 è anche coinvolta nella patogenesi dell'asma, della febbre da fieno e dell'eczema, fornendo potenzialmente una spiegazione del perché la TB pregressa possa aumentare il rischio di e la gravità della patologia allergica. Ugualmente, l'infiammazione allergica dei tessuti potrebbe peggiorare la TB stabilizzata o rendere gli individui più suscettibili all'infezione. Dal momento che questo era uno studio cross-sectional, non siamo stati in grado di esaminare la relazione temporale tra TB e malattia allergica e sono richiesti ulteriori studi longitudinali. Ad esempio, sarebbe importante esaminare l'impatto dell'esposizione micobatterica perinatale sul rischio di malattia allergica in fasi successive della vita, dato che esiste evidenza a supporto di un effetto protettivo dell'infezione da parassita elminta durante la gravidanza sullo sviluppo dell'eczema nei figli (43-45).

## Ringraziamenti

Vorremmo ringraziare tutti i bambini, genitori, insegnanti, lavoratori sul campo, e lavoratori dei laboratori per la loro partecipazione. ALK ha fornito gratuitamente reagenti per il lavoro sul campo in diversi paesi a basso reddito.

## Fondi

Il coordinamento e le analisi del laboratorio centrale del centro europeo sono state supportate dal Quinto programma Quadro della Commissione Europea, Bruxelles, Belgio (QLK4-CT-1999-01288). Pharmacia Diagnostics (Uppsala, Svezia) ha fatto reagenti disponibili al costo nominale. CF ha ottenuto un NIHR Clinician Scientist Award. Il punto di vista espresso in questa pubblicazione è quello degli autori e non necessariamente quello del NHS, del National Institute for Health Research o del UK Department of Health.

## Conflitto di interesse

Gli autori dichiarano di non avere conflitti di interesse.

## Bibliografia

1. Bach JF. *The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases.* N Engl J Med 2002; 347: 911–20.
2. Flohr C, Pascoe D, Williams HC. *Atopic dermatitis and the 'hygiene hypothesis': too clean to be true?* Br J Dermatol 2005; 152: 202–16.
3. Strachan DP. *Hay fever, hygiene and household size.* Br Med J 1989; 299: 1259–60.
4. Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. *The inverse association between tuberculin responses and atopic disorders.* Science 1997; 275: 77–9.
5. Miyake Y, Arakawa M, Tanaka K, Sasaki S, Ohya Y. *Tuberculin reactivity and allergic disorders in schoolchildren, Okinawa, Japan.* Clin Exp Allergy 2007; 38: 486–92.
6. Obihara CC, Kimpen JLL, Gie RP, et al. *Mycobacterium tuberculosis infection may protect against allergy in a tuberculosis endemic area.* Clin Exp Allergy 2006; 36: 70–6.
7. Strannegard IL, Larsson LO, Wennergren G, Strannegard O. *Prevalence of allergy in children in relation to prior BCG vaccination and infection with atypical mycobacteria.* Allergy 1998; 53: 249–54.
8. Yilmaz M, Bingol G, Altintas D, Kendirli SG. *Correlation between atopic diseases and tuberculin responses.* Allergy 2000; 55: 664–7.
9. Omenaas E, Jentoft HF, Vollmer WM, Buist AS, Gulsvik A. *Absence of relationship between tuberculin reactivity and atopy in BCG vaccinated young adults.* Thorax 2000; 55: 454–8.
10. Kroger L, Korppi M, Pelkonen J, Pietikainen M, Katila ML. *Development of tuberculin reactivity and sensitization to M. scrofulaceum and M. fortuitum in children BCG-vaccinated at birth.* Eur Respir J 2000; 15: 382–7.
11. Wong GW, Hui DS, Tam CM, et al. *Asthma, atopy and tuberculin responses in Chinese schoolchildren in Hong Kong.* Thorax 2001; 56: 770–3.
12. Gruber C, Kulig M, Bergmann R, Guggenmoos-Holzmann I, Wahn U; MAS-90 Study Group. *Delayed hypersensitivity to tuberculin, total immunoglobulin E, specific sensitization, and atopic manifestation in longitudinally followed early Bacille Calmette–Guerin-vaccinated and non-vaccinated children.* Pediatrics 2001; 107: e36.
13. Jentoft HF, Omenaas E, Eide GE, Gulsvik A. *Absence of relationship between tuberculin reactivity and asthmatic symptoms, level of FEV1 and bronchial responsiveness in BCG vaccinated young adults.* Allergy 2002; 57: 336–40.
14. Pahari A, Welch S, Lingam S. *BCG, tuberculin skin-test results and asthma prevalence in school children in North London.* Indian Pediatr 2002; 39: 254–8.
15. Jang AS, Son MH. *The association of airway hyperresponsiveness and tuberculin responses.* Allergy 2002; 57: 341–5.
16. Ozmen S, Tomac N, Uysal A, Arslan Z, Kuyucu N, Yoney A. *Tuberculin responses in children with allergic diseases.* Allergy 2002; 57: 1059–62.
17. Ota M, Van der Sende MAB, Walraven GEL. *Absence of association between delayed type hypersensitivity to tuberculin and atopy in children in The Gambia.* Clin Exp Allergy 2003; 33: 731–6.
18. Garcia-Marcos L, Suarez-Varela MM, Canflanca IM, et al. *BCG immunization at birth and atopic diseases in a homogeneous population of Spanish schoolchildren.* Int Arch Allergy Immunol 2005; 137:303–9.
19. Eifan AO, Akkoc T, Ozdemir C, Bahceciler NN, Barlan IB. *No association between tuberculin skin test and atopy in a bacillus Calmette–Gue´rin vaccinated birth cohort.* Pediatr Allergy Immunol 2009; 20: 545–50.
20. Bremner SA, Carey IM, De Wilde S, et al. *Timing of routine immunisations and subsequent hay fever risk.* Arch Dis Child 2005; 90: 567–73.
21. Alm JS, Lilja G, Pershagen G, Scheynius A. *Early BCG vaccination and development of atopy.* Lancet 1997; 350: 400–3.
22. Gruber C, Meinschmidt G, Bergmann R, Wahn U, Stark K. *Is early BCG vaccination associated with less atopic disease? An epidemiological study in German preschool children with different ethnic backgrounds.* Pediatr Allergy Immunol 2002; 13: 177–81.
23. Krause TG, Hviid A, Koch A, et al. *BCG vaccination and risk of atopy.* JAMA 2003;289: 1012–5.
24. Mohrenschlager M, Haberl VM, Kramer U, Behrendt H, Ring J. *Early BCG and pertussis vaccination and atopic diseases in 5- to 7-year-old preschool children from Augsburg, Germany: results from the MIRIAM Study.* Pediatr Allergy Immunol 2007; 18: 5–9.
25. Arnoldussen DL, Linehan M, Sheikh A. *BCG vaccination and allergy: a systematic review and meta-analysis.* J Allergy Clin Immunol 2011; 127: 246–53.
26. Steenhuis TJ, van Aalderen WM, Bloksma N, et al. *Bacille-Calmette Guerin vaccination and the development of allergic disease in children: a randomized, prospective, single-blind study.* Clin Exp Allergy 2008; 38: 79–85.
27. Rook GAW, Hamelmann EH, Brunet LR. *Mycobacteria and allergies.* Immunobiology 2007; 212: 461–73.
28. Barlan I, Bahceciler NN, Akdis M, Akdis CA. *Bacillus Calmette–Gue´rin, Mycobacterium bovis, as an immunomodulator in atopic diseases.* Immunol Allergy Clin North Am 2006; 26: 365–77.
29. Han ER, Choi IS, Eom SH, Kim HJ. *Preventive effects of mycobacteria and their culture supernatants against asthma development in BALB/c mice.* Allergy Asthma Immunol Res 2010; 2: 34–40.
30. Obihara CC, Bollen CW, Beyers N, Kimpen JLL. *Mycobacterial infection and atopy in childhood: a systematic review.* Pediatr Allergy Immunol 2007; 18: 551–9.
31. Von Mutius E, Pearce N, Beasley R, et al. *International patterns of tuberculosis and the prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and eczema.* Thorax 2000; 55: 449–53.
32. Shirtcliffe P, Weatherall M, Beasley



- R; *International Study of Asthma and Allergies in Childhood. An inverse correlation between estimated tuberculosis notification rates and asthma symptoms*. *Respirology* 2002; 7: 153–5.
33. Solé D, Camelo-Nunes IC, Wandalsen GF, et al. *Ecological correlation among prevalence of asthma symptoms, rhinoconjunctivitis and atopic eczema with notifications of tuberculosis and measles in the Brazilian population*. *Pediatr Allergy Immunol* 2005; 16: 582–6.
  34. Von Hertzen L, Klaukka T, Mattila H, Haahtela T. *Mycobacterium tuberculosis infection and the subsequent development of asthma and allergic conditions*. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1211–4.
  35. Johansson SGO, Bieber T, Dahl R, et al. *Revised nomenclature for allergy for global use. Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organisation, October 2003*. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 832–6.
  36. Weiland SK, Björkstén B, Brunekreef B, Cookson WO, von Mutius E, Strachan DP. *Phase II of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC II): rationale and methods*. *Eur Respir J* 2004; 24: 406–12.
  37. Williams H, Robertson C, Stewart A, et al. *Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood*. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 125–38.
  38. Chambless LE, Boyle KE. *Maximum likelihood methods for complex sample data: logistic regression and discrete proportional hazards models*. *Commun Stat Theory Methods* 1985; 14: 1377–92.
  39. Pfeffermann D. *The role of sampling weights when modeling survey data*. *Int Stat Rev* 1993; 61: 317–37.
  40. Normand SL. *Meta-analysis: formulating, evaluating, combining, and reporting*. *Stat Med* 1999; 18: 321–59.
  41. Von Elm E, Altman DG, Egger M, et al. *The strengthening of reporting of observational studies in epidemiology statement: guidelines for reporting observational studies*. *Lancet* 2007; 370: 1453–7.
  42. Dheda K, Schwander SK, Zhu B, Van Zyl-Smit RN, Zhang Y. *The immunology of tuberculosis: from bench to bedside*. *Respirology* 2010; 15: 433–50.
  43. Flohr C, Quinnell RQ, Britton J. *Do helminth parasites protect against atopy and allergic disease?* *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 20–32.
  44. Mpairwe H, Webb EL, Muhangi L, et al. *Anthelmintic treatment during pregnancy is associated with increased risk of infantile eczema: randomised-controlled trial results*. *Pediatr Allergy Immunol* 2011; 22: 305–12.
  45. Elliott AM, Mpairwe H, Quigley MA, et al. *Helminth infection during pregnancy and development of infantile eczema*. *JAMA* 2005; 294: 2032–4.

## Appendice

Il Gruppo di Studio di ISAAC Fase Due è composto da: Centro di Coordinamento e Dati di ISAAC Fase Due (Institute of Epidemiology, University of Ulm, Germany): G. Büchele, J. Genuneit, A. Kleiner, G. Nagel, G. Weinmayr.

### Principal Investigators e team scientifico

Tirana, Albania: A. Priftanji, A. Shkurti, J. Simenati, E. Grabocka, K. Shyti, S. Agolli, A. Gurakuqi. Uruguay, Brazil: R.T. Stein, M. Urrutia de Pereira, M.H. Jones, P.M. Pitrez. Pichincha province, Ecuador: P.J Cooper, M. Chico. Beijing, China: Y.Z. Chen. Guangzhou, China: N.S. Zhong. HongKong, China: C. Lai, G. Wong. Tallinn, Estland: M.-A. Riikjärv, T. Annus. Créteil, France: I. Annesi-Maesano. Tbilisi, Georgia: M. Gotua, M. Rukhadze, T. Abramidze, I. Kvachadze, L. Karsanidze, M. Kiladze, N. Dolidze. Dresden, Germany: W. Leupold, U. Keil, E. von Mutius, S.K. Weiland (deceased). Munich, Germany: E. von Mutius, U. Keil, S. Weiland (deceased). Kintampo, Ghana: P.Arthur (deceased), E. Addo-Yobo. Athens, Greece:

C. Gratzou, C. Priftis, A. Papadopoulou, C. Katsardis. Thessaloniki, Greece: J. Tsanakas, E. Hatziagorou, F. Kirvassilis. Reykjavik, Iceland: M. Clausen. Mumbai, India: J.R. Shah, R.S. Mathur, R.P. Khubchandani, S. Mantri. Rome, Italy: F. Forastiere, R. Di Domenicantonio, M. De Sario, S. Sammarro, R. Pistelli, M.G. Serra, G. Corbo, C.A. Perucci. Riga, Latvia: V. Svabe, D. Sebre, G. Casno, I. Novikova, L. Bagrade. Utrecht, the Netherlands: B. Brunekreef, D. Schram, G. Doekes, P.H.N. Jansen-van Vliet, N.A.H. Janssen, F.J.H. Aarts, G. de Meer. Hawkes Bay, New Zealand: J. Crane, K. Wickens, D. Barry. Tromsø, Norway: W. Nystad, R. Bolle, E. Lund. Ramallah, Palestine: N. El-Sharif, B. Nemery, F. Barghuthy, S. Abu Huij, M. Qlebo. Almeria, Spain: J. Batlles Garrido, T. Rubi Ruiz, A. Bonillo Perales, Y. Gonzalez Jiménez, J. Aguirre Rodriguez, J. Momblan de Cabo, A. Losilla Maldonado, M. Daza Torres. Cartagena, Spain: L. Garcia-Marcos, A. Martinez Torres, J.J. Guillén Pérez, A. Piñana López, S. Castejon Robles. Madrid, Spain: G. Garcia Hernandez, A. Martinez Gimeno, A.L. Moro Rodríguez, C. Luna Paredes, I. Gonzalez Gil. Valencia, Spain: M.M. Morales Suarez-Varela, A. Llopis González, A. Escribano Montaner, M. Tallon Guerola. Linköping, Sweden: L.

Bråbäck, M. Kjellman, L. Nilsson, X-M. Mai. Östersund, Sweden: L. Bråbäck, A. Sandin. Ankara, Turkey: Y. Saraçlar, S. Kuyucu, A. Tuncer, C. Saçkesen, V. Sumbuloglu, P. Geyik, C. Kocabas. West Sussex, UK: D. Strachan, B. Kaur.

#### **Comitato di direzione di ISAAC**

N. Aït-Khaled (Paris, France), H.R. Anderson (London, UK), M.I. Asher (Auckland, New Zealand), R. Beasley (Wellington, New Zealand), B. Björkstén (Stockholm, Sweden), B. Brunekreef (Utrecht, the Netherlands), J. Crane (Wellington, New Zealand), P. Ellwood (Auck-

land, New Zealand), C. Flohr (London, UK), S. Foliaki (Wellington, New Zealand), F. Forastiere (Rome, Italy), L. García-Marcos (Murcia, Spain), U. Keil (Münster, Germany), C. Lai (Hong Kong, China), J. Mallol (Santiago, Chile), E. Mitchell (Auckland, New Zealand), S. Montefort (Malta), E. von Mutius (Munich, Germany), J. Odhiambo (Nairobi, Kenya), N. Pearce (Wellington, New Zealand), C. Robertson (Melbourne, Australia), A. Stewart (Auckland, New Zealand), D. Strachan (London, UK), S.K. Weiland (Ulm, Germany; deceased), G. Weinmayr (Ulm, Germany), H. Williams (Nottingham, UK), G. Wong (Hong Kong, China).

# Basi genetiche della risposta immune alle vaccinazioni

Fabio Cardinale<sup>1</sup> (coordinatore), Marta Ciofi degli Atti<sup>2</sup> (coordinatore),  
Giorgio Bartolozzi<sup>3</sup>, Baldassarre Martire<sup>4</sup>, Viviana Moschese<sup>5</sup>, Caterina Rizzo<sup>6</sup>  
Per conto delle Commissioni "Immunologia" e "Vaccini" della SIAIP



Parole chiave: vaccinazioni, polimorfismi, immunità innata

## Abstract

Numerose evidenze di ordine sia epidemiologico che sperimentale sottolineano l'importanza della genetica nella risposta immune alle vaccinazioni. Moltissimi sono infatti i determinanti immunogenetici della risposta biologica ai vaccini e, pertanto, polimorfismi a carico di alcuni di questi geni svolgono un ruolo nel condizionare l'entità, il tipo e la durata di questa risposta. È verosimile che in un prossimo futuro si giunga allo sviluppo di vaccini sempre più efficaci e a misura di individuo.

## Introduzione

Numerose evidenze scientifiche attestano che i vaccini rappresentano uno degli strumenti di prevenzione più efficaci disponibili. Il CDC di Atlanta ha recentemente inserito l'espansione delle politiche vaccinali in tutto il mondo tra le 10 maggiori conquiste in tema di salute pubblica dell'ultimo decennio<sup>1</sup> stimando, solo negli USA, una riduzione della mortalità per malattie infettive di circa 42.000 casi e della morbilità di più di 20 milioni di casi per ogni coorte di bambini vaccinati secondo il calendario vaccinale vigente nel Nord America<sup>2</sup>.

Le basi scientifiche su cui si fondano le strategie di immunizzazione riguardano sia l'epidemiologia delle

malattie prevenibili da vaccino (*vaccine preventable diseases*, VPD) e sia i dati di immunogenicità, efficacia e sicurezza dei vaccini, valutati prima dell'autorizzazione alla vendita e dopo la loro introduzione in commercio, attraverso i dati di farmacovigilanza raccolti. Poiché le vaccinazioni rappresentano uno strumento preventivo di utilizzo globale, proposto in seguito a specifiche raccomandazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), esse vengono virtualmente estese a tutta la popolazione mondiale. Pertanto, i sistemi di sorveglianza che raccolgono i dati di farmacovigilanza sulle vaccinazioni rappresentano una fonte di informazione solida e attendibile sui possibili problemi di efficacia e sicurezza di

<sup>1</sup> Struttura Complessa di Medicina e Pneumo-Allergoimmunologia Pediatrica, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Policlinico-Giovanni XXIII", Bari; <sup>2</sup> Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; <sup>3</sup> Ospedale Meyer, Università di Firenze; <sup>4</sup> Dipartimento di Biomedicina dell'Età Evolutiva, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Policlinico-Giovanni XXIII", Bari; <sup>5</sup> Policlinico Tor Vergata, Università Tor Vergata, Roma; <sup>6</sup> Reparto Epidemiologia Malattie Infettive, CNESPS, ISS, Roma

Ha partecipato alla stesura del lavoro anche la Dott.ssa Maria Felicia Mastrototaro, Scuola di Specializzazione in Pediatria, Università di Bari

fabiocardinale@libero.it

Gli Autori dichiarano di non avere alcun conflitto di interesse rispetto agli argomenti trattati nell'articolo.



questi prodotti. Come accade per qualunque farmaco, nessun vaccino ha un'efficacia del 100% e tutti i vaccini possono causare reazioni avverse. Per quanto riguarda l'efficacia, è noto ad esempio come dopo la prima dose di vaccino antimorbillo, il 2-5% circa dei vaccinati non sviluppi un'adeguata risposta immune. Dopo la somministrazione della seconda dose, il 90% circa dei non rispondenti alla prima dose mostra una adeguata protezione immunologica. La somministrazione di due dosi di vaccino MPR consente quindi di ridurre la proporzione di non rispondenti all'1% dei vaccinati. La condizione di "non-responder" alla vaccinazione è d'altra parte ben documentata anche per il vaccino anti epatite B <sup>3</sup>.

Per quanto riguarda la sicurezza, un'adeguata anamnesi prevaccinale consente di identificare le precauzioni e controindicazioni alla somministrazione dei vaccini, riducendo il rischio di reazioni avverse gravi. Alcune di queste, tuttavia, non sono prevedibili in base all'anamnesi. Le reazioni anafilattiche ad esempio, sono un evento estremamente raro (< 1 caso per 1.000.000), ma sempre possibile.

Ancora oggi, gran parte del successo avuto dalla programmazione delle politiche vaccinali poggia sul paradigma "one size fits all" (in pratica lo stesso vaccino è efficace per tutti). In letteratura, comunque, sono riportati numerosi fattori in grado di influenzare la risposta immune, soprattutto anticorpale, alle vaccinazioni, tra cui l'età, il sesso, l'etnia, malattie intercorrenti, il BMI, la qualità e la quantità di antigeni presenti nel vaccino e la stessa via di somministrazione <sup>4,5</sup>. Fattori epigenetici capaci di modulare la funzionalità del sistema immune possono a loro volta svolgere un ruolo nelle risposte vaccinali, come dimostrato per i figli di fumatori <sup>6</sup>.

Tra questi, un peso sicuramente rilevante occupa la genetica della risposta immune <sup>7</sup>, in analogia con quanto accade per le infezioni. È noto ad esempio che possono esistere importanti differenze tra i due sessi per quanto concerne la risposta immunologica nei confronti dei vaccini virali, essendo generalmente riscontrabile nel sesso femminile una più robusta risposta anticorpale verso la maggior parte dei vaccini rispetto al sesso maschile <sup>8</sup>.

Si va quindi sempre più espandendo la ricerca delle basi genetiche della risposta immune delle vaccinazioni, e possibilmente anche del legame tra genetica e reattogenicità dei vaccini. Come immaginabile, il miglior esempio del peso posseduto dalla genetica nella risposta individuale alle vaccinazioni è offerto

dagli studi sui gemelli (vedi oltre). Un contributo determinante comunque alle conoscenze in questo campo è venuto dai progressi compiuti negli ultimi anni nel sequenziamento del genoma umano e nella identificazione di varianti genetiche (*Single Nucleotide Polymorphisms* o SNPs) di geni dell'immunità innata e adattativa in grado di condizionare l'entità e il tipo di risposta immune del soggetto vaccinato.

Sulla scorta di ciò, in analogia con la farmacogenetica e la farmacogenomica, è stato coniato negli ultimi anni il termine di "vaccinomics", per indicare l'insieme dei geni in grado di influenzare la risposta immune ai vaccini <sup>4,9</sup>. Numerosi sono i determinanti immunogenetici implicati nella risposta dell'individuo alle vaccinazioni e, tra questi, un ruolo di grande rilievo è svolto dal complesso maggiore di istocompatibilità (HLA), dai recettori trans-membrana dell'immunità innata, in primis i Toll-like receptors (TLRs), dai recettori per i virus e le vitamine, dalle citochine, nonché dalla cascata del complemento. Gran parte della letteratura in questo campo è frutto del lavoro dei ricercatori della Mayo Clinic dell'Università di Rochester, negli USA. In questo articolo verranno quindi presentate le evidenze ad oggi desumibili dalla letteratura scientifica su questo nuovo e intrigante aspetto della immunologia e della vaccinologia.

---

### **Basi biologiche della risposta immune alle vaccinazioni**

Obiettivo principale dei vaccini è di indurre una memoria immunologica di lunga durata che sia in grado di rispondere velocemente alle infezioni. Questo obiettivo è raggiunto attraverso l'attivazione del sistema immunitario adattativo, caratterizzato dalla capacità di riconoscere in maniera specifica e per lungo tempo gli

**Si va espandendo la ricerca nel campo della vaccinomics, che riguarda le basi genetiche della risposta immune delle vaccinazioni e il legame tra genetica e reattogenicità dei vaccini.**

antigeni. Tuttavia la risposta adattativa è a sua volta influenzata dal sistema immunitario innato, a sua volta contraddistinto dalla limitata specificità della risposta immune e dalla assenza di memoria immunologica <sup>10</sup>. L'attivazione dei recettori del sistema immunitario innato modula il "microambiente immunogenico" grazie al quale le cellule presentanti l'antigene e le cellule T CD4<sup>+</sup> influenzano la risposta adattativa.

Come riportato da Robbins e Plotkin <sup>11</sup>, la maggioranza dei vaccini attualmente utilizzati stimola la produzione di anticorpi nel siero o a livello delle superfici mucose, al fine di bloccare l'azione dei patogeni. La protezione a lungo termine richiede però la persistenza di un adeguato titolo anticorpale e/o la produzione di cellule di memoria capaci di rapida riattivazione a seguito della esposizione microbica. Nonostante il ruolo apparentemente predominante dei linfociti B, le cellule T sono essenziali nell'indurre la produzione di anticorpi ad alta affinità e la memoria immunologica <sup>12</sup>. La natura del vaccino influenza direttamente il tipo di effettori immunologici coinvolti. I polisaccaridi (PS) capsulari determinano una risposta di tipo prevalentemente B cellulare, considerata classicamente come T-indipendente, anche se numerose evidenze supportano un possibile coinvolgimento delle cellule T CD4<sup>+</sup> <sup>13</sup>. La coniugazione dei PS batterici con proteine carrier determina una risposta anticorpale T-dipendente conseguente all'attivazione delle cellule T CD4<sup>+</sup> <sup>14</sup>. La caratteristica principale di tale risposta è quella di indurre la produzione di anticorpi a elevata affinità e una memoria immunologica di lunga durata. L'induzione della risposta B e T cellulare antigene-specifica richiede l'attivazione delle cellule presentanti l'antigene (APCs), in particolare delle cellule dendritiche (DCs), mediante segnali co-stimolatori di attivazione delle cellule T naïve.

Infatti, le DCs esprimono una serie di recettori che riconoscono sequenze antigeniche proprie dei patogeni, che non sono presenti negli antigeni del self e che vengono immediatamente riconosciuti come estranei. Attraverso tali recettori, tra i quali giocano un ruolo fondamentale i Toll-like receptors (TLRs), le cellule dell'ospite vengono attivate <sup>12</sup> e inducono così la maturazione delle DCs che migrano attraverso le vie linfatiche di drenaggio. In assenza di tali segnali le DCs restano immature e le cellule T naïve che vengono a contatto con esse non si differenziano in cellule effettrici, ma diventano cellule T CD4<sup>+</sup> regolatorie che garantiscono la tolleranza immunologica <sup>12</sup>. I vaccini a virus vivi attenuati attivano efficacemen-

te il sistema immunitario innato grazie al riconoscimento di strutture molecolari antigeniche associate ai patogeni, note come PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*, v. oltre), da parte dei *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), cioè i recettori dell'immunità innata dell'ospite. Dopo la somministrazione, i vaccini vivi vengono a essere disseminati all'interno della rete vascolare e raggiungono i tessuti periferici in maniera molto simile a quanto avviene durante l'infezione naturale. Pertanto le DCs vengono attivate in più siti dell'organismo e migrano nei rispettivi linfonodi di drenaggio dando origine a molteplici foci di attivazione delle cellule B e T; il che spiega la loro elevata immunogenicità e la scarsa importanza del sito di somministrazione del vaccino <sup>12</sup>. Al contrario, nei vaccini a virus uccisi, che pur contengono i PRRs, l'assenza della replicazione microbica rende l'attivazione indotta dalla vaccinazione più limitata, sia nel tempo che nello spazio, e strettamente dipendente dai componenti del sistema innato localizzati a livello del sito di iniezione, che per questo motivo diventa fondamentale. La risposta immunitaria primitiva ai vaccini a virus ucciso può essere considerata quindi essenzialmente focale e unilaterale <sup>12</sup> e richiede la presenza di adiuvanti che promuovono il reclutamento delle APCs nel sito di vaccinazione aumentando il rilascio dell'antigene alle APCs o attivando le stesse al fine di produrre citochine e segnali di attivazione per le cellule T <sup>15</sup>. Le cellule B sono attivate all'interno dei linfonodi raggiunti dagli antigeni del vaccino per diffusione e/o in associazione alle DCs mature. Gli antigeni proteici attivano sia le cellule B che le cellule T, e inducono la differenziazione delle cellule B in plasmacellule o cellule B della memoria all'interno di strutture specifiche rappresentate dai centri germinativi (CG). Gli antigeni PS che determinano una risposta di tipo T-indipendente, non portano alla formazione del CG ma inducono una risposta anticorpale più debole e di breve durata che non genera quindi una memoria <sup>12</sup>. Nella risposta del CG, al contrario, la cellula B, dopo aver ricevuto segnali di attivazione e di sopravvivenza sia dalle DC follicolari che dalle cellule T *helper* (Th), va incontro a una espansione clonale, proliferando massivamente e dando inizio ai fenomeni di ricombinazione di classe e maturazione di affinità, con conseguente produzione di anticorpi a elevata capacità di legare l'antigene. L'interazione tra le cellule B, le DCs follicolari e le cellule Th porta alla selezione dei linfociti B con più elevata affinità per l'antigene che si differenziano in plasmacellule produttrici di Ig ad alta affinità o cellule

B di memoria (Bmem). Lo sviluppo del CG richiede circa 2 settimane; pertanto gli anticorpi IgG a elevata affinità compaiono in circolo solo 10-14 giorni dopo l'immunizzazione. La reazione del CG termina dopo 3-6 settimane <sup>16</sup>.

Gli antigeni PS batterici rilasciati nel sito di inoculo raggiungono attraverso il circolo sanguigno la zona marginale splenica e linfonodale, un'area ricca di macrofagi in grado di esibire un set unico di recettori scavenger. Qui i PS batterici legano le cellule B della zona marginale che si attivano nei foci extrafollicolari <sup>17</sup>. Nelle settimane successive le cellule B si differenziano in plasmacellule, con conseguente produzione di Ig ad affinità intermedia che mostrano alcune mutazioni somatiche nella loro regione variabile <sup>18</sup>. Si ritiene che l'immunizzazione con antigeni PS possa attivare le cellule Bmem che sono state precedentemente a contatto con degli antigeni cross-reagenti con i polisaccaridi batterici che hanno determinato una risposta di centro germinativo <sup>19</sup>. Una possibile alternativa è che le cellule B mem CD27<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> che compaiono nel sangue in risposta alla immunizzazione con antigeni polisaccaridici possano ricircolare nella zona marginale splenica dove potrebbero andare incontro al riarrangiamento e alla mutazione delle Ig in assenza della interazione con le cellule T. Questa ipotesi concorda con il fatto che i vaccini polisaccaridici sono scarsamente immunogeni nei bambini con meno di 2 anni di età, prima della maturazione della zona marginale splenica <sup>20</sup>.

Le plasmacellule antigene-specifiche che si sviluppano in seguito alla vaccinazione hanno una breve emivita; per questo motivo il titolo anticorpale declina con il tempo. Tuttavia alcune plasmacellule che si differenziano all'interno dei CG acquisiscono la capacità di migrare all'interno di nicchie contenute nel midollo osseo dove sono in grado di sopravvivere, grazie a specifiche cellule stromali, e di produrre anticorpi per lungo tempo <sup>21</sup>. La natura del vaccino gioca un ruolo cruciale: solo i vaccini vivi attenuati producono una risposta anticorpale che dura per decenni anche in assenza di ulteriori esposizioni all'antigene e di riattivazione della memoria immunologica. Questo potrebbe riflettere la persistenza in vivo degli antigeni virali che continuamente stimolano la risposta delle cellule B, anche se altri meccanismi possono essere implicati <sup>12</sup>. La dose antigenica è un altro importante determinante della risposta delle cellule B di memoria. Al momento del *priming* una elevata concentrazione di antigene favorisce l'induzione delle plasmacellule; al contrario,

basse dosi portano prevalentemente alla creazione della memoria immunologica e pertanto, una bassa concentrazione di antigene è preferita quando non è richiesta una rapida protezione <sup>22</sup>. Titoli residui di anticorpi anti-vaccino presenti al momento del *booster* influenzano direttamente la risposta alla vaccinazione. Di regola la risposta secondaria ai vaccini vivi attenuati è limitata a causa della presenza degli anticorpi neutralizzanti che limitano la carica virale prima della proliferazione in vivo. Anche la risposta ai vaccini a virus ucciso è influenzata negativamente dalla concentrazione anticorpale residua. Questi anticorpi infatti portano alla formazione di immunocomplessi che limitano la disponibilità antigenica per il legame con le cellule B. Le cellule B di memoria sopravvivono per lungo tempo anche in assenza della riesposizione all'antigene <sup>12</sup>.

La risposta delle cellule T è di breve durata e la maggior parte delle cellule T effettrici (> 90%) muore per apoptosi in pochi giorni. Per questo motivo la memoria immunologica è essenziale per l'efficacia del vaccino. Le cellule T della memoria possono persistere per lungo tempo anche in assenza dell'esposizione all'antigene <sup>12</sup>. La quantità delle cellule T memoria dipende dalla iniziale espansione delle cellule T. Questa dipende dalla quantità di antigene presente durante l'immunizzazione primaria <sup>23</sup>. Per questo motivo i vaccini uccisi o a subunità, non contenendo sufficienti quantità di antigene, necessitano degli adiuvanti o di dosi *booster* <sup>12</sup>. Sono stati individuati due tipi di cellule T di memoria in base al fenotipo e alla loro funzione. Le cellule T effettrici della memoria (Tem) circolano attraverso gli organi non linfoidi alla ricerca della presenza di specifici peptidi microbici. Queste cellule posseggono una elevata attività citotossica nei confronti delle cellule infettate. Al contrario, le cellule T della memoria centrale (Tcm) si trovano preferenzialmente negli organi linfoidi della milza, posseggono un limitato potere citotossico, ma una elevata capacità proliferativa. Il loro ruolo è quello di riconoscere le cellule dendritiche attivate e di andare incontro a una massiva proliferazione per produrre una elevata quantità di cellule effettrici <sup>24</sup>. La persistenza dell'antigene controlla la proporzione delle cellule Tcm e delle Tem: le Tem diventano predominanti quando vi è persistenza dell'antigene, come nelle infezioni croniche <sup>25</sup>. Attraverso il supporto di citochine come la IL-15 e la IL-17 le cellule T della memoria possono persistere per lungo tempo anche in assenza dell'antigene <sup>26</sup>.

## Principali determinanti immunogenetici della risposta immune alle vaccinazioni: HLA, citochine, TLRs

La variabilità della risposta immune dell'ospite è garantita dall'elevatissimo numero di geni implicati (si stima che i geni coinvolti nella risposta immune innata e adattativa codifichino per più di  $10^{12}$  molecole tra cui immunoglobuline, citochine, lo stesso TCR, ecc.) e dalla estrema diversità degli aplotipi HLA ( $> 10^{13}$ ). Il sistema immunitario riconosce i patogeni e genera una risposta di difesa ben coordinata a seguito del riconoscimento di agenti microbici e strutture molecolari del *non self*. A sua volta questa capacità di riconoscimento dipende dalla abilità delle APCs (ovvero cellule dendritiche, macrofagi, monociti e linfociti B) di legarlo e presentare i peptidi nel contesto di specifiche molecole geneticamente determinate. A livello delle APCs, infatti, l'antigene fagocitato viene sottoposto a degradazione enzimatica all'interno degli endosomi, all'interno dei quali vengono espresse anche le molecole di HLA di classe II. A livello degli endosomi viene a formarsi un complesso molecolare HLA di classe II - peptide che viene successivamente espresso sul-

La natura del vaccino influenza il tipo di effettori immunologici coinvolti: i polisaccaridi (PS) capsulari determinano una risposta di tipo prevalentemente B cellulare, considerata classicamente come T-indipendente; la coniugazione dei PS batterici con proteine *carrier* determina una risposta anticorpale T-dipendente conseguente all'attivazione delle cellule T CD4<sup>+</sup>.

la superficie cellulare, venendo riconosciuto solo da cellule T CD4<sup>+</sup> in grado di esprimere il TCR specifico per quel determinato peptide. Tuttavia, questo processo (primo segnale) da solo non è sufficiente per attivare e far proliferare il linfocita T; perché questo accada è essenziale che al primo segnale si accompagnino altri segnali di attivazione (secondo segnale), determinati da molecole con funzione co-stimolatoria (quali il CD28, CD40L, CD40 e altre) favorevoli l'attivazione della cellula CD4<sup>+</sup>. Grazie al secondo segnale, infatti, vengono attivati quei meccanismi che determinano l'attivazione, la proliferazione e la produzione di citochine da parte dei linfociti T che rappresenta il passaggio indispensabile per l'induzione di una risposta anticorpale protettiva.

La regione HLA, situata sul braccio corto del cromosoma 6, rappresenta la regione maggiormente variabile del genoma umano e contiene circa 200 geni, molti dei quali coinvolti nella presentazione degli antigeni. I geni HLA svolgono un ruolo fondamentale nel determinare la risposta immunitaria delle cellule T agli antigeni<sup>27</sup>. Le molecole di classe I, classicamente responsabili della presentazione degli antigeni alle cellule T CD8<sup>+</sup>, sono codificate dai geni ubicati a livello dei loci HLA di tipo A, B e C, i quali permettono la induzione e il mantenimento della risposta effettrice cellulo-mediata. Le molecole di classe II, invece, consentono la presentazione dei peptidi esogeni alle cellule T CD4<sup>+</sup>, vengono codificate dai loci HLA-DR, -DQ e -DP e stimolano le risposte anticorpali. I loci HLA risultano estremamente polimorfi: ciò permette una presentazione efficace e il riconoscimento di un repertorio incredibilmente ampio di antigeni estranei. Comunque essi non sono i soli determinanti della variabilità della risposta immunitaria ai vaccini che, secondo la "Immune Response Network Theory", è in realtà il risultato cumulativo della espressione di molteplici geni dell'ospite e della loro interazione ed è, in via del tutto teorica, prevedibile<sup>28</sup>.

La produzione delle citochine dalle cellule T è a sua volta essenziale per la regolazione dell'immunità cellulare e anticorpale ai vaccini. I linfociti CD4<sup>+</sup> sono convenzionalmente suddivisi in almeno tre grandi sottopopolazioni: le cellule Th1, che favoriscono l'immunità cellulare attraverso la produzione di specifiche citochine (INF- $\gamma$ , IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$ ), le cellule Th2, che producono le citochine necessarie per lo sviluppo della immunità anticorpale (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13) e le cellule Th17, produttrici di citochine come la IL-17 essenziali per l'attivazione del neutrofilo e lo svilup-

po delle risposte immuni nei confronti dei patogeni extracellulari e dei miceti. Vista l'importanza delle citochine e dei loro recettori nel guidare la risposta immunitaria, i polimorfismi nei geni codificanti per tali proteine sono stati ampiamente oggetto di studio ed è stato osservato che influenzano in maniera significativa la risposta alle vaccinazioni e la suscettibilità allo sviluppo delle patologie infettive.

Inoltre, i vaccini composti da virus vivi, come avviene nel corso dell'infezione naturale, si legano a specifici recettori dell'immunità innata presenti sulla superficie cellulare o all'interno della cellula stessa, sia nel citosol che nel compartimento endosomico. Polimorfismi nei geni di questi recettori possono quindi comprensibilmente contribuire ulteriormente alla grande variabilità individuale nella risposta alle vaccinazioni. I TLRs rappresentano una famiglia di recettori composta da circa una dozzina di molecole, costituite da eterodimeri variamente combinati tra di loro, e presenti tanto sulla membrana delle cellule nucleate quanto nel compartimento endosomico delle stesse cellule. Ogni TLR presenta una specificità di legame con determinati PAMPs, rappresentate da strutture molecolari proprie degli agenti microbici (come il peptidoglicano, i beta-glucani, i lipoarabinomannani, l'RNA o il DNA virale, etc.) e non rappresentate sulle cellule eucariote. Essi, analogamente ad altri recettori presenti nel citosol delle cellule (es. i *NOD-like receptors*), giocano un ruolo essenziale nel riconoscimento da parte del sistema immune innato dei patogeni e nel guidare la risposta immune adattativa ed è quindi immaginabile che varianti genetiche di questi recettori possano svolgere un ruolo nel condizionare l'entità e il tipo della risposta immune anche verso i vaccini <sup>29</sup>.

### **Ruolo dei fattori genetici nella risposta immune alle vaccinazioni: le evidenze offerte dai twin studies**

Gli studi su popolazioni di gemelli offrono una opportunità unica per valutare il ruolo dei determinanti genetici nella variabilità della risposta immune alle vaccinazioni, in quanto consentono di discriminare tra fattori ambientali e fattori genetici e di quantificare il contributo della "ereditabilità" nella risposta immune, definita come il rapporto tra varianza genetica e varianza totale. Modelli di studio basati su coppie di gemelli mono- o dizigoti, di sesso diverso, o di gemelli cresciuti in ambienti diversi, offrono inoltre la possibilità di valutare l'impatto dei determinan-

**La regione HLA, situata sul braccio corto del cromosoma 6, contiene circa 200 geni, molti dei quali svolgono un ruolo fondamentale nel determinare la risposta immunitaria delle cellule T agli antigeni.**

ti ambientali in termini di esposizione antigenica. In uno studio condotto da Tan et al. <sup>30</sup> su 120 coppie di gemelli, di cui 45 monozigoti, che avevano ricevuto 1 o 2 dosi di vaccino MPR (Morbilli, Parotite e Rosolia), veniva calcolato che la varianza del livello di anticorpi vaccinali dovuta presumibilmente a fattori genetici era di 0,49 per il morbillo, 0,54 per la parotite e 0,13 per la rosolia, con una ereditabilità rispettivamente del 88,5% per il morbillo, e del 39% e 46% per la parotite e la rosolia. Questi dati indicano che la risposta immune al morbillo è in gran parte geneticamente determinata, più di quanto lo sia quella per gli altri due virus. Gli stessi autori hanno successivamente effettuato una revisione sistematica degli studi condotti su coorti di gemelli, aventi come oggetto il ruolo dei fattori genetici e ambientali sulla variabilità della risposta immune alle vaccinazioni, gli eventi avversi e le complicazioni vaccinali <sup>31</sup>. Tre in particolare erano studi in cross-over randomizzati in doppio cieco e controllati con placebo: il primo condotto da Hohler et al. <sup>32</sup> su 202 coppie di gemelli mono- e dizigoti vaccinati per l'epatite B ha dimostrato una significativa correlazione della risposta immune anti HBsAg con il sesso femminile, la dizigosità e l'allele per il locus HLA-DRB1, individuando una ereditabilità della risposta anti-epatite B di 0.61. Gli stessi autori hanno poi dimostrato che soggetti con il polimorfismo ACC (-1082, -819 e -592) del promoter dell'IL-10 avevano un titolo anti-HBsAg doppio rispetto ai soggetti senza questo aplotipo, con una influenza genetica del 27% sulla risposta anticorpale. Lo stesso polimorfismo risultava invece influenzare negativamente la risposta all'epatite A <sup>33</sup>. In un'altra coorte di 207 coppie di gemelli reclutati nel Gambia, è stata osservata una elevata ereditarietà della risposta anticorpale verso il vaccino per l'epatite B



(77%), per la polio orale (60%), per la difterite (49%) e per il tetano (44%). Analogamente, significativi livelli di ereditarietà furono dimostrati per la risposta citochinica IFN- $\gamma$ - e IL-13-mediata verso i vaccini per tetano, pertosse e BCG (39-65%)<sup>34</sup>. Questi dati indicano che altri geni, anche al di fuori del sistema HLA, esercitano un forte controllo sulla risposta B-cellulare ai vaccini durante i primi mesi di vita. In un studio successivo di follow-up sulla stessa coorte<sup>35</sup>, è stata poi analizzata la risposta al tetano, al morbillo e agli antigeni ambientali (valutati come livelli di IgG totali), all'età di 5 e 12 mesi, comparando coppie di gemelli monozigoti e dizigoti. I livelli della risposta anticorpale all'antigene morbillare risultarono più alti nei gemelli monozigoti all'età di 12 mesi, con una ereditabilità del 62%, mentre non furono rilevati significativi determinanti genetici nella risposta al tetano e agli antigeni ambientali. Inoltre il titolo di anticorpi anti-tossoidi tetanico ad alta avidità e l'indice di avidità anticorpale, non differiva in maniera significativa nei due gruppi di gemelli mono- e dizigoti. Questi dati sembrano suggerire un controllo genetico soprattutto sulla fase precoce della risposta anticorpale, mentre i determinanti ambientali influenzerebbero prevalentemente la persistenza e l'avidità della risposta immune ai vaccini.

## Fattori genetici coinvolti nella risposta immune alle vaccinazioni

### Vaccinazione anti-Morbillo Parotite Rosolia

Diversi studi di vaccinomica hanno esplorato la relazione tra genetica e risposta immune alla vaccinazione Morbillo Parotite Rosolia (MPR)<sup>6</sup>. La risposta immune umorale e cellulare indotta dalla vaccinazione con virus vivi attenuati, come il vaccino MPR, rappresenta un processo complesso e articolato in più passaggi. Il virus vaccinale attenuato deve per prima cosa venir riconosciuto dai suoi recettori cellulari (SLAM e CD46), e attivare i TLRs o altri sensori intracellulari della cellula infettata che innescano la risposta immune innata e preparano quella adattiva (anticorpale e cellulare). Dopo la presentazione degli antigeni da parte delle molecole HLA, si assiste all'attivazione dei geni che codificano per le citochine e i loro recettori, con conseguente produzione di specifici set di citochine con funzione di messaggeri intracellulari per stimolare le risposte immuni Th1 e Th2. Variazioni individuali in ognuno dei geni coinvolti in questo processo è probabile che abbia un effetto sulla risposta immune alla

vaccinazione. Studi sui gemelli dimostrano il peso della genetica nella risposta immune al vaccino MPR, in particolare l'anti-morbillo<sup>30</sup>. Per quanto riguarda l'associazione con l'HLA, alcuni studi hanno dimostrato un'associazione tra specifici aplotipi di geni HLA di classe I e II e variazioni dei titoli anticorpali dopo la somministrazione della prima dose di vaccino anti-morbillo<sup>36-38</sup>. In particolare, gli alleli di classe II *DRB1\*03*, *DQA1\*0201* e di classe I *B8*, *B13* and *B44* sono risultati associati con livelli inferiori di anticorpi antimorbillo in bambini sani in età scolare. In generale, la diversificazione in eterozigosi nell'ambito dei geni dell'HLA sembra generare risposte immuni più efficienti nei confronti dei patogeni e, molto probabilmente, anche nei confronti dei vaccini<sup>39</sup>. In caso di omozigosi, è stato dimostrato ad esempio che la mancanza di variabilità degli alleli HLA è associata con diminuiti livelli di anticorpi anti-morbillo dopo dose singola, con un rischio di mancata risposta immune alla vaccinazione che aumenta all'aumentare dell'omozigosi. Infatti, bambini omozigoti per almeno un locus HLA sembrano avere una probabilità circa doppia di risultare sieronegativi rispetto agli eterozigoti, mentre bambini omozigoti per  $\geq 4$  loci avrebbero una probabilità fino a 4-5,5 volte maggiore. Il ruolo del complesso HLA è stato esplorato anche per quanto riguarda l'immunogenicità indotta da due dosi di MPR. Infatti, dopo somministrazione di due dosi di vaccino, l'omozigosi per specifici loci HLA o l'omozigosi globale non è risultata associata a una minore risposta immune in termini di produzione di alcune citochine implicate nella risposta verso il morbillo quali IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10 e IL-12p40<sup>40</sup>. Tale risultato suggerisce che una eventuale limitazione genetica possa essere superata da dosi ripetute o più elevate di vaccino. Gli aplotipi con la più forte evidenza di associazione con una minore risposta anticorpale, dopo somministrazione di due dosi, sono risultati essere *DRB1\*07-DQB1\*02-DPB1\*02* e *DRB1\*07-DQB1\*03-DPB1\*04*. Gli aplotipi *A\*26-Cw\*12-B\*38* sono invece risultati significativamente associati con una elevata risposta umorale (livelli anticorpali) e cellulosa-mediata (proliferazione linfocitaria) verso la componente anti-parotite<sup>40</sup>. I supertipi *B44* and *B58* erano fortemente associati con ridotti livelli anticorpali al morbillo, mentre il più comune supertipo *B7* era associato con una risposta anticorpale al morbillo più elevata. Per il vaccino contro la parotite, è stato evidenziato che l'allele *HLA-DQB1\*0303* era associato con titoli anticorpali specifici più bassi; dopo vaccino



MPR, il supertipo B62 suggeriva invece un'associazione con una più elevata linfoproliferazione specifica per la parotite <sup>41 42</sup>. Inoltre, gli alleli DRB1, DQA1 e DQB1 erano associati con variazioni significative nelle risposte immuni linfoproliferative al vaccino anti-parotite <sup>41</sup>. È stato anche dimostrato che gli alleli HLA-A (\*2402 e \*6801) erano associati con minori livelli secretivi di IFN- $\gamma$  indotto dal vaccino in risposta agli antigeni della rosolia <sup>43</sup>. Gli alleli di classe I HLA-A (\*0101, \*3101), HLA-C (\*0303, \*0501), classe II HLA-DRB1 (\*0301, \*1501) e HLA-DQB1 (\*0201, \*0303 e \*0602) erano invece significativamente associati con variazioni nella secrezione di IFN- $\gamma$  indotta *in vitro* dal virus del morbillo <sup>44 45</sup>. Gli studi sopracitati hanno quindi evidenziato che le risposte immuni umorali (anticorpi) e cellulari (linfoproliferazione e secrezione di citochine) al vaccino MPR sono influenzate da polimorfismi dei geni HLA.

È possibile che altri geni coinvolti nella risposta immune o altri geni al momento non ancora noti influenzino l'immunità al vaccino MPR, in maniera ancora più importante rispetto al complesso HLA. Vi sono infatti dati che mostrano come specifici polimorfismi (SNPs) a carico dei geni per la IL-10 e IL-12RB2 siano associati con ridotte risposte anticorpali e cellulomediata verso il vaccino antimorbillo, mentre specifici SNPs nel gene dell'IL-2 sarebbero associati con risposte anticorpali e cellulomediata amplificate <sup>46</sup>. Sono state riscontrate anche associazioni significative tra i polimorfismi del gene IL-4R e i livelli di IL-4 morbillo-specifiche (alleli maggiori per quattro SNPs erano associati con minori livelli di IL-4) <sup>47</sup>, indicando che i polimorfismi dei geni che codificano per le citochine e i loro recettori possono costituire un fattore importante nello sviluppo dell'immunità nei confronti del vaccino per questo virus.

Altri lavori hanno dimostrato il ruolo esercitato dai geni codificanti per i recettori del virus del morbillo, SLAM e CD46 <sup>48</sup>. A questo riguardo, è stato osservato che un'aumentata rappresentazione di alleli minori rs3796504 and rs164288 nel gene SLAM si associa a livelli significativamente ridotti di anticorpi specifici per morbillo. In particolare, il SNP rs3796504 sarebbe causa della modifica di un aminoacido, tale probabilmente da comportare una diversa conformazione del recettore, rendendolo inadatto al legame con l'emoagglutinina del virus. Invece, la presenza di uno specifico allele [allele minore C per il SNP intronico (rs11118580)] nel gene CD46 è risultata associarsi a una diminuzione dei livelli anticorpali.

## Vaccinazione anti-influenzale

I virus dell'influenza sono classificati in tipo A, B e C sulla base dell'antigenicità delle proteine del core. I virus dell'influenza A sono ulteriormente suddivisi in sottotipi a seconda degli antigeni di superficie emogglutinina (HA) e neuroamminidasi (NA). Tali antigeni (HA ed NA) codificano per glicoproteine espresse sulla doppia membrana lipidica che riveste il capsido proteico, a sua volta avvolgente il core virale, contenente l'RNA a filamento singolo. Inoltre, la membrana lipidica dei virus influenzali di tipo A contiene alcune molecole di una piccola proteina di membrana chiamata M2.

Per quanto riguarda la risposta immune verso il virus dell'influenza, la presenza di anticorpi circolanti diretti verso le glicoproteine di superficie HA ed NA sembra sufficiente per proteggere l'ospite nei confronti tanto dell'infezione quanto della malattia influenzale <sup>49</sup>. L'importanza della risposta immune mediata dai linfociti T citotossici è meno chiara, sebbene essa sembri contribuire a ridurre la severità dell'infezione, determinando una importante diminuzione dei tassi di morbilità e mortalità <sup>50-52</sup>. Studi compiuti su casistiche di soggetti deceduti per infezione da virus influenzale negli ultimi 100 anni negli USA hanno comunque evidenziato l'importanza della genetica nel predisporre a forme più severe di influenza stagionale e pandemica <sup>53 54</sup>. Inoltre, recentemente, è stata ipotizzata la presenza di differenze nella risposta immune all'influenza tra maschi e femmine che provocherebbe nelle donne una maggiore attività del *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B) e delle citochine, chemochine e del TNF- $\alpha$  rispetto agli uomini, causando una maggiore predisposizione delle donne a forme di malattia influenzale più severa <sup>55</sup>. Tutto questo è ulteriormente confermato dalla maggiore risposta anticorpale nelle donne rispetto agli uomini nella risposta immune al vaccino antinfluenzale stagionale <sup>56 57</sup>. I meccanismi che mediano le differenze di genere nella risposta anticorpale al vaccino antinfluenzale non sono ancora completamente noti e non sono stati sufficientemente investigati <sup>55</sup>.

In generale, la risposta immune indotta dalla somministrazione del vaccino anti-influenzale, anche nei soggetti sani, sembra essere estremamente eterogenea. Tuttavia, nonostante la grande mole di studi disponibili in letteratura pochi studi hanno focalizzato l'attenzione sulla genetica della risposta immune all'influenza o alla vaccinazione antinfluenzale <sup>58</sup>. Alcuni lavori hanno dimostrato l'importanza dei geni

dell'HLA nella risposta immune al vaccino anti-influenzale trivalente a subunità. Una maggiore frequenza di HLA-DRB1\*0701 e una ridotta frequenza di HLA-DQB1\*0603-9/14 è stata trovata in soggetti *non-responders* a questo tipo di vaccino rispetto al gruppo di controllo caratterizzato da soggetti responsivi al vaccino<sup>59</sup>. Lo stesso studio ha evidenziato una maggiore frequenza dell'allele HLA-DQB1\*0303 (che è parte dell'aplotipo HLA-DRB1\*07-) tra i *non-responders* alla vaccinazione antinfluenzale, dati questi di particolare rilevanza perché potrebbero aiutare a identificare i soggetti che non sono protetti dalle attuali strategie vaccinali<sup>60</sup>. È stata anche valutata l'associazione fra polimorfismi dell'HLA e sierconversione (test di inibizione dell'emoagglutinina, HI) anticorpale specifica H1 per il vaccino antinfluenzale in soggetti sani di età compresa fra 18 e 40 anni. Alcuni loci HLA-A, B e C sono risultati associati con la presenza di variazioni nel titolo anticorpale rilevato dopo la vaccinazione antinfluenzale. Tuttavia i risultati ottenuti vanno considerati con cautela a causa della mancanza di significatività statistica<sup>59</sup>. Gli stessi autori hanno esplorato la risposta immune verso la componente antigenica H3 del vaccino antinfluenzale trivalente a subunità, rilevata tramite HI, non rilevando un'associazione tra i loci HLA-A, B e C e risposta immune. Anche in questo caso, comunque, la scarsa numerosità del campione e la mancanza di potere statistico per identificare l'associazione tra titolo anticorpale e presenza di polimorfismi genetici non ha permesso di confermare tale ipotesi. Dati preliminari suggerirebbero un'associazione anche tra SNPs di geni codificanti per alcune citochine e loro recettori e sierconversione verso la componente H1 del vaccino antinfluenzale, mostrando una certa tendenza a una risposta dose-allele mediata. Nello stesso studio è stata dimostrata una associazione statisticamente significativa fra presenza di SNPs nelle citochine e risposta umorale alla componente H3 del vaccino<sup>59</sup>.

### Vaccinazione anti-epatite B

L'infezione da virus dell'epatite B rappresenta un problema di rilevanza mondiale che la globalizzazione e i flussi migratori hanno acuito in maniera significativa: oltre 2 miliardi di persone sono infette dal virus e di questi più di 350 milioni diventano portatori cronici. Ogni anno più di mezzo milione di persone contrae una infezione acuta o cronica da HBV e questa può, in molti casi, progredire in cirrosi epatica e carcinoma

## Studi compiuti su casistiche di soggetti deceduti per infezione da virus influenzale hanno evidenziato l'importanza della genetica nel predisporre a forme più severe di influenza stagionale e pandemica.

epato-cellulare. La vaccinazione rappresenta un efficace strumento di prevenzione dell'infezione, e programmi di vaccinazione di massa sono stati adottati da oltre 150 paesi in tutto il mondo, prima fra tutti l'Italia. Tuttavia la risposta immune al vaccino presenta una enorme variabilità interindividuale, e circa il 5-10% dei soggetti adulti sani vaccinati non produce livelli anticorpali protettivi<sup>61</sup>.

Per quanto riguarda l'HLA, i dati più consistenti riguardano gli alleli 1, 11 e 15 del DRB1 che correlano con alti livelli di anticorpi anti-HBsAg, mentre gli alleli HLA DR3, DR4 e DR7 sono stati associati a una mancata risposta protettiva<sup>62-64</sup>. Tuttavia, come dimostrato dagli studi sui gemelli, gran parte della ereditabilità della risposta immune al vaccino anti-epatite B nell'infanzia è determinata da geni non appartenenti al sistema HLA.

In uno studio condotto su un'ampia popolazione di bambini del Gambia vaccinata per HBV, analizzando 715 SNPs di 133 geni candidati al di fuori dei loci HLA, è stata dimostrata una significativa associazione tra picco di anticorpi anti-HBsAg e un singolo polimorfismo R719T del gene ITGAL<sup>65</sup>. Questo gene sembra regolare i processi di adesione tra granulociti ed endotelio, l'attività T citotossica, e il killing anticorpo-dipendente. Gli stessi autori hanno poi identificato una stretta correlazione tra livelli di anticorpi anti-HBsAg e aplotipi di ben 5 geni: due molecole costimolatorie (CD44 e CD58); una proteina (il CDC42) implicata nella trasmissione di segnali intracellulari implicati nei processi di migrazione, endocitosi e regolazione del ciclo cellulare; infine il recettore per la IL-1 (IL1R1) e la IL-19, a loro volta coinvolti in molteplici meccanismi della risposta infiammatoria<sup>66</sup>.

Altri lavori hanno dimostrato un'associazione tra varianti polimorfiche del gene IL-1B e del promotore del

## Gran parte della ereditabilità della risposta immune al vaccino anti-epatite B nell'infanzia è determinata da geni non appartenenti al sistema HLA.

gene della IL-10 e livelli più alti di anticorpi anti-HBsAg e risposta proliferativa T cellulare dopo vaccinazione con HBV<sup>33,67</sup>. Anche il gene FOXP1, codificante per un fattore di trascrizione coinvolto nello sviluppo delle cellule B mature, sembra correlare positivamente con una risposta protettiva verso l'HBV<sup>68</sup>.

Per quanto riguarda i TLRs, un recente studio cinese ha analizzato la frequenza di 53 SNPs all'interno di 21 geni candidati in una popolazione di 46 soggetti responders e 24 non responders alla vaccinazione anti-epatite B. Il lavoro ha dimostrato l'esistenza di una correlazione tra polimorfismi del TLR2, oltre che dei geni di alcune citochine e loro recettori (rs3804100, rs2243248, rs1805015, e rs1295686, rispettivamente, nei geni di TLR2, IL-4, IL-4RA e IL-13), e immunizzazione dopo vaccinazione anti-HBV<sup>69</sup>. Nello stesso lavoro gli autori osservavano un'associazione tra presenza di alcuni SNPs (rs1143633 e rs1143627) del gene IL-1B e status di *non responder* alla vaccinazione.

### Altre vaccinazioni

Molto meno è noto riguardo ai fattori che regolano la risposta immune nei confronti di altri vaccini. Per quanto riguarda i vaccini polisaccaridici è noto ad esempio che gli indiani nord-americani e le popolazioni indigene dell'Alaska elaborano risposte anticorpali difettive nei confronti dell'*Haemophilus influenzae* di tipo b e dello pneumococco<sup>70,71</sup>. Studi di poco successivi hanno dimostrato il ruolo nelle risposte anticorpali specifiche verso antigeni microbici di specifici allotipi genetici (Km e Gm) delle immunoglobuline<sup>72</sup>. Analogamente, studi compiuti su popolazioni europee, risalenti già agli anni '90, avevano dimostrato una stretta correlazione tipo-specifica tra gemelli monozigoti nelle risposte anticorpali IgG e IgG2-mediate nei confronti del polisaccaride pneumococcico<sup>73</sup>.

Invece, per quanto concerne antigeni proteici come quelli dei tossoidi vaccinali, uno studio su gemelli monozigoti di etnia africana ha riportato una significativa ereditarietà, non HLA correlata, nei titoli anticorpali e nella produzione di alcune citochine (IFN- $\gamma$  e IL-13) nei confronti non solo dell'epatite B e del virus polio orale, ma anche del tetano e della difterite<sup>34</sup>. Al contrario, geni mappanti entro i loci HLA di classi II risulterebbero implicati nella risposta al BCG<sup>34</sup>. Un altro studio compiuto negli USA su 141 bambini sani vaccinati secondo le normali schedule nordamericane ha dimostrato una significativa correlazione tra polimorfismi del gene dell'IL-10 e dell'IL-4R $\alpha$  e titoli anticorpali, rispettivamente, anti-difterite e anti-tetano (74). Nello stesso lavoro gli autori osservavano che gli stessi SNPs dell'IL-4R $\alpha$  erano associati con le risposte anticorpali nei confronti del vaccino pneumococcico coniugato (PCV7). Inoltre, i titoli anticorpali verso il PCV7 erano a loro volta influenzati anche da SNPs a carico di geni della IL-10, IL-12 e IL-13.

Per quanto riguarda la vaccinazione anti-pertosse, alcuni autori hanno osservato, in un'ampia popolazione di bambini vaccinati con il vaccino cellulare, una significativa correlazione tra titolo IgG anti-tossina della *B. Pertussis* e diversi SNPs a carico del complesso CD14/TLR4 e altre molecole implicate nel *signalling* a valle di questi recettori, tra cui, in particolare, TOLLIP<sup>75</sup>.

Un peso determinante sembra avere la genetica anche per la risposta immune nei confronti della vaccinazione per il vaiolo e la febbre gialla<sup>6,76</sup>. Come è noto, l'eradicazione del vaiolo in tutto il mondo risale agli anni '80 e successivamente alla sua certificazione la vaccinazione è stata sospesa. In assenza di rischio di infezione, infatti, la vaccinazione non offre vantaggi superiori rispetto al possibile rischio di eventi avversi. Tuttavia, il potenziale utilizzo di questi virus come strumento di bioterrorismo e la presenza di ampie fasce di popolazione prive al giorno d'oggi di copertura vaccinale, hanno rinnovato negli ultimi anni l'interesse verso questo vaccino e i fattori che ne regolano la risposta da parte del sistema immune. Il gruppo della Mayo Clinic ha quindi dimostrato una associazione tra SNPs a carico del gene della IL-18 o del suo recettore e livelli anticorpali post-vaccinali verso questo virus in individui di razza caucasica o africana<sup>77</sup>. Studi dello stesso team di ricercatori hanno osservato in coorti di giovani adulti una stretta correlazione tra risposte anticorpali verso il virus del vaiolo ed entità della risposta citochinica di tipo Th-1 (IL-2, IFN- $\gamma$ , ma anche

Per la vaccinazione anti-pertosse, alcuni autori hanno osservato una significativa correlazione tra titolo IgG anti-tossina della *B. Pertussis* e diversi SNPs a carico del complesso CD14/TLR4 e altre molecole implicate nel *signalling* a valle di questi recettori, tra cui, in particolare, TOLLIP.

IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-12) verso lo stesso virus, lasciando ipotizzare che varianti genetiche in grado di modulare la quantità di citochine prodotte possano modificare la risposta immune verso il vaccino<sup>78</sup>. Ricerche anche di altri gruppi hanno indicato in una molecola implicata nel *signalling* intracellulare da parte delle vitamine A e D, nota come RXRA (*Retinoid X Receptor  $\alpha$* ), un altro gene in grado di modulare le risposte anticorpali verso il virus del vaiolo<sup>79</sup>.

#### Ulteriori prospettive. Il possibile ruolo della genetica nelle reazioni avverse ai vaccini: la "adversomica"

È ben noto come la percezione dei benefici delle vaccinazioni sia indebolita proprio dai successi raggiunti dalle politiche vaccinali. Si dice infatti spesso che i vaccini sono le principali vittime dei loro successi. Infatti, con il diminuire della frequenza delle malattie prevenute, si perde la percezione della loro pericolosità. Contemporaneamente, aumentano in alcune fasce di popolazione i dubbi sulla sicurezza dei vaccini, e quindi sul loro rapporto rischio/beneficio<sup>80</sup>. La prevenzione delle reazioni avverse gravi a vaccino è ad oggi basata sull'anamnesi pre-vaccinale, mirata a identificare condizioni di aumentato rischio in cui le vaccinazioni sono controindicate. Un esempio di maggior rischio, geneticamente determinato, di insorgenza di reazioni avverse ad alcune vaccinazioni è rappresentato dalla agammaglobulinemia X-linked (XLA), patologia genetica che comporta un deficit del-

la risposta immune, che quindi controindica la somministrazione di vaccini vivi attenuati, quali l'antipolio orale. A parte le sindromi da immunodeficit primitivo, non sono ad oggi note altre condizioni geneticamente determinate che costituiscono un determinante di reazioni avverse a vaccino<sup>81</sup>. Esistono tuttavia iniziali evidenze del ruolo svolto da fattori di ordine genetico nel condizionare la probabilità di sviluppare reazioni indesiderate alle vaccinazioni<sup>82</sup>. Ad esempio, alcuni eventi avversi potenzialmente causati da vaccini contenenti virus vivi attenuati, possono essere legati alla intrinseca attività replicativa del virus e, pertanto, alla suscettibilità di per sé dell'individuo alle infezioni<sup>83</sup>. A questo proposito è documentato che individui appartenenti ad alcune etnie, come gli Amerindi, presentano una particolare frequenza e intensità di reazioni febbrili (> 40°C) dopo vaccinazione anti-morbillo<sup>84</sup>. È possibile che l'entità e la frequenza di simili reazioni sia da ascrivere a polimorfismi di citochine della fase acuta<sup>6 85</sup>, in analogia con quanto dimostrato per il vaccino del vaiolo (vedi oltre). Nelle due settimane successive alla prima vaccinazione antimorbillo, il 5%-15% dei vaccinati presenta febbre > 39,4°C<sup>86</sup>. Una parte minore di questi sviluppa anche una convulsione febbrile. In particolare, l'incidenza di convulsioni febbrili nelle due settimane seguenti la prima vaccinazione MPR è pari a 1,56/1.000 vaccinati<sup>87</sup>. La probabilità di avere convulsioni febbrili nelle due settimane dopo la vaccinazione MPR è circa 4 volte maggiore nei fratelli di bambini con anamnesi di convulsioni febbrili (3,97/1.000) e circa 20 volte superiore nei bambini con una storia personale di convulsioni febbrili (19,47/1.000)<sup>87</sup>. Poiché la suscettibilità alle convulsioni febbrili è a sua volta geneticamente determinata<sup>88</sup> e, tra i geni di suscettibilità, figurano anche quelli codificanti per citochine della fase acuta<sup>89</sup>, è plausibile che anche la probabilità di sviluppare convulsioni febbrili dopo vaccinazione MPR sia condizionata dagli stessi geni di suscettibilità<sup>80</sup>. Per quanto riguarda la trombocitopenia, si stima un rischio di 1 caso ogni 40.000 vaccinati entro due mesi dalla prima dose di MPR, rispetto a circa 1 caso ogni 3.000 pazienti con morbillo. È stato d'altra parte recentemente documentato come il 76% dei casi di trombocitopenia idiopatica autoimmune (ITP) nei bambini tra 12 e 23 mesi di età sia temporalmente correlato con la vaccinazione MPR<sup>90</sup>. L'identificazione di un'associazione genetica tra MPR e ITP sarebbe quindi molto importante per mettere a punto eventuali strategie preventive o nuovi vaccini<sup>82</sup>.

Il vaccino più studiato per quanto riguarda il possibile ruolo della genetica nell'insorgenza di effetti collaterali è quello contro il vaiolo <sup>81 83 91</sup>. Per questo vaccino, si stima una probabilità di complicanze severe intorno a 1/14.000, la più frequente delle quali è la miopericardite. Alcuni lavori hanno dimostrato un'associazione tra frequenza di reazioni avverse al vaccino per il vaiolo e risposta immunitaria dell'ospite. I ricercatori della Vanderbilt University statunitense hanno dimostrato una maggior frequenza di reazioni febbrili, linfadenopatia e rash generalizzato dopo vaccinazione anti-vaiolosa in individui che presentavano aumentati livelli ematici di alcune citochine (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-5 e IL-10) dopo la somministrazione del vaccino <sup>92</sup>. Lo stesso gruppo, in un lavoro successivo, dimostrava un'associazione tra reazioni sistemiche al vaccino e livelli post-vaccinali di G-CSF, *stem cell factor*, CXCL9, *intercellular adhesion molecule-1*, eotassina e inibitore tissutale delle metalloproteinasi-2 <sup>93</sup>. Un altro team di ricercatori ha invece dimostrato un'associazione tra eventi febbrili dopo vaccinazione per il vaiolo e specifici aplotipi dei geni codificanti per la IL-1, IL-18 e IL-4 <sup>92</sup>. Uno studio ancora successivo ha dimostrato, in due popolazioni indipendenti di volontari vaccinati per il vaiolo, un'associazione significativa tra reazioni locali o sistemiche al vaccino e polimorfismi del gene della metilen-tetraidrofolico-reduttasi (MTHFR), un enzima implicato nelle reazioni a svariati agenti farmacologici, e dell'*interferon regulator factor 1* (IRF1) <sup>94</sup>. Pertanto, la probabilità di sviluppare reazioni febbrili sistemiche dopo vaccinazione per il vaiolo sembra correlata con l'entità e il pattern di citochine e altri fattori solubili prodotti dai fibroblasti e dalle cellule immunocompetenti del ricevente, a sua volta geneticamente determinata.

Per quanto riguarda il vaccino per la febbre gialla, è stato invece documentato un caso di malattia viscerotropica associato a prolungata viremia, successiva a vaccinazione, in un paziente con un polimorfismo a carico del recettore per le chemochine, il CCR5, e del suo ligando, il RANTES <sup>96</sup>.

Un discorso a parte merita il rapporto tra reazioni da ipersensibilità ai vaccini e atopia. Studi compiuti da autori Giapponesi hanno dimostrato ad esempio una significativa correlazione tra risposte IgE-mediate alla gelatina, un comune stabilizzante presente in alcuni vaccini, e specifici aplotipi HLA <sup>97 98</sup>. Ad oggi, peraltro, non esistono dimostrazioni di una maggiore incidenza di reazioni avverse alle vaccinazioni nella popolazione degli atopici in generale. È stata invece

**A parte le sindromi da immunodeficit primitivo, non sono ad oggi note altre condizioni geneticamente determinate che costituiscono un determinante di reazioni avverse a vaccino, ma vi sono iniziali evidenze del ruolo svolto da fattori genetici nel condizionare la probabilità di reazioni indesiderate alle vaccinazioni.**

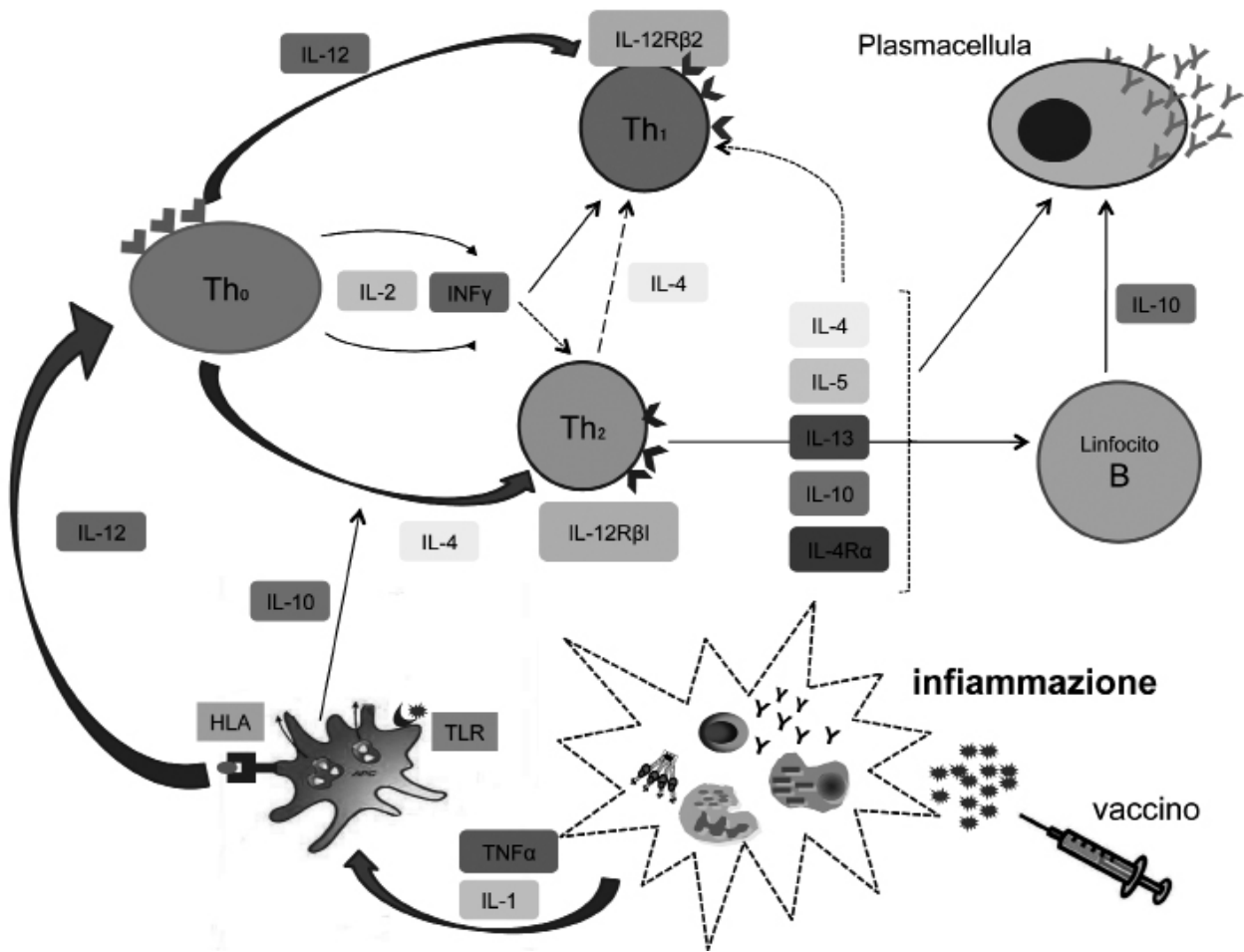
riportata una maggior frequenza di reazioni locali accentuate (diametro > 50 mm) dopo vaccinazione con una dose booster di DTP acellulare (DTPa) in bambini che avevano precedentemente ricevuto il ciclo di base con DTPa, ed erano caratterizzati da un pattern di risposta anticorpale di tipo Th-2 verso gli antigeni vaccinali <sup>99</sup>.

---

## Conclusioni

Lo studio del ruolo della genetica della risposta immune alle vaccinazioni offre prospettive stimolanti sia al miglioramento delle conoscenze riguardo le basi biologiche della protezione indotta dai vaccini, che all'avvio di percorsi sempre più personalizzati nel campo della prevenzione delle malattie infettive <sup>100</sup>. È possibile che in futuro le migliori conoscenze sulla genetica della risposta alle vaccinazioni possano condurre in casi selezionati ad approcci individuali, basati ad esempio su schedule vaccinali con alte dosi o su nuovi vaccini. È anche verosimile che ciò possa condurre in un prossimo futuro a ottenere significativi risparmi in termini di risorse economiche investite nelle politiche vaccinali, grazie alla identificazione di individui geneticamente *non-responder* o *low-responder* e all'adozione di protocolli e strumenti sempre più disegnati sul singolo individuo <sup>101 102</sup>.





**Fig. 1.** Rappresentazione schematica dei principali determinanti della risposta immune alle vaccinazioni e dei geni potenzialmente implicati.

È quindi auspicabile che questo campo di ricerche trovi un crescente interesse da parte di infettivologi, microbiologi, immunologi, pediatri ed epidemiologi, nonché delle stesse aziende produttrici di vaccini, in un sinergismo di azione volto a sviluppare vaccini sempre più efficaci e, al tempo stesso, sempre più sicuri.

## Bibliografia

- 1 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Ten great public health achievements-Worldwide, 2001-2010*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2011;60:814-8.
- 2 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Ten great public health achievements-United States, 2001-2010*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2011;60:619-23.

- 3 Alper CA, Kruskal MS, Marcus-Bagley D, et al. *Genetic prediction of nonresponse to hepatitis B vaccine*. N Engl J Med 1989;321:708-12.
- 4 Poland GA, Ovsyannikova IG, Jacobson RM. *Vaccine immunogenetics: bedside to bench to population*. Vaccine 2008;26:6183-8.
- 5 Poland GA, Ovsyannikova IG, Jacobson RM. *Application of pharmacogenomics to vaccines*. Pharmacogenomics 2009;10:837-52.
- 6 Baynam G, Khoo SK, Rowe J, et al. *Parental smoking impairs vaccine responses in children with atopic genotypes*. J Allergy Clin Immunol 2007;119:366-74.
- 7 Poland GA, Ovsyannikova IG, Kennedy RB. *Vaccinomics and a new paradigm for the development of preventive vaccines against viral infections*. OMICS 2011;15:625-36.
- 8 Klein SL, Jedlicka A, Pekosz A. *The Xs and Y of immune responses to viral vaccines*. Lancet Infect Dis 2010;10:338-49.



- <sup>9</sup> Poland GA, Kennedy RB, Ovsyannikova IG. *Vaccinomics and personalized vaccinology: is science leading us toward a new path of directed vaccine development and discovery?* PLoS Pathogens 2011;7:e1002344.
- <sup>10</sup> Palm NW, Medzhitov R. *Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity.* Immunol Rev 2009; 227:221-33.
- <sup>11</sup> Plotkin SA. *Vaccines: correlates of vaccine-induced immunity.* Clin Infect Dis 2008;47:401-8.
- <sup>12</sup> Siegrist CA. *Vaccine immunology.* In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA. *Vaccines, 5th ed.* China: Saunders 2008, pp. 17-36.
- <sup>13</sup> Jeurissen A, Billiau AD, Moens L, et al. *CD4<sup>+</sup> T lymphocytes expressing CD40 ligand help the IgM antibody response to soluble pneumococcal polysaccharides via an intermediate cell type.* J Immunol 2006;176:529-36.
- <sup>14</sup> Pollard AJ, Perret KP, Beverley PC. *Maintaining protection against invasive bacteria with protein-polysaccharide conjugate vaccines.* Nat Rev Immunol 2009;9:213-20.
- <sup>15</sup> McKee AS, MacLeod MKL, Kappler JW, et al. *Immune mechanism of protection: can adjuvants rise to the challenge?* BMC Biology 2010;8:37.
- <sup>16</sup> Flehmig B, Staedele H, Xueref C, et al. *Early appearance of neutralizing antibodies after vaccination with an inactivated hepatitis A vaccine.* J Infect 1997;35:37-40.
- <sup>17</sup> MacLennan IC, Toellner KM, Cunningham AF, et al. *Extrafollicular antibody responses.* Immunol Rev 2003;194:8-18.
- <sup>18</sup> Zhou J, Lottenbach KR, Berenkamp SJ, et al. *Somatic hypermutation and diverse immunoglobulin gene usage in the human antibody response to the capsular polysaccharide of Streptococcus pneumoniae type 6B.* Infect Immun 2004;72:3505-14.
- <sup>19</sup> Vinuesa CG, Sze DM, Cook MC, et al. *Recirculating and germinal center B cells differentiate into cells responsive to polysaccharide antigens.* Eur J Immunol 2003;33:297-305.
- <sup>20</sup> Weller S, Reynaud CA, Weill JC. *Vaccination against encapsulated bacteria in humans: paradoxes.* Trends Immunol 2005;26:85-89.
- <sup>21</sup> Shapiro-Shelef M, Calame K. *Regulation of plasma-cell development.* Nat Rev Immunol 2005;5:230-242.
- <sup>22</sup> Ahman H, Kayhty H, Vuorela A, et al. *Dose dependency of antibody response in infants and children to pneumococcal polysaccharides conjugated to tetanus toxoid.* Vaccine 1999;17:2726-32.
- <sup>23</sup> Wherrey EJ, Puorro KA, Porgador A, et al. *The induction of virus-specific CTL as a function of increasing epitope expression: response rise steadily until excessively high levels of epitope are attained.* J Immunol 1999;163:3735-45.
- <sup>24</sup> Huehn J, Siegmund K, Hamann A. *Migration rules: functional properties of naïve and effector/memory-like regulatory T cell subsets.* Curr Opin Immunol 2005;293:89-114.
- <sup>25</sup> Robinson HL, Amara RR. *T cell vaccines for microbial infections.* Nat Med 2005;11:S25-S32.
- <sup>26</sup> Marsden VS, Kappler JW, Marrack PC. *Homeostasis of the memory T cell pool.* Int Arch Allergy Immunol 2006;139:63-74.
- <sup>27</sup> Sinha P, Snyder JA, Kim EY, et al. *The major histocompatibility complex haplotypes dictate and the background genes fine-tune the dominant versus the cryptic response profile of a T-cell determinant within a native antigen: relevance to disease susceptibility and vaccination.* Scand J Immunol 2007;65:158-65.
- <sup>28</sup> Poland GA, Ovsyannikova IG, Jacobson RM, et al. *Heterogeneity in vaccine immune response: the role of immunogenetics and the emerging field of vaccinomics.* Clin Pharmacol Ther 2007;82:653-64.
- <sup>29</sup> Ovsyannikova IG, Poland GA. *Vaccinomics: current findings, challenges and novel approaches for vaccine development.* AAPS J 2011;13:438-44.
- <sup>30</sup> Tan P-L, Jacobson RM, Poland GA, et al. *Twin studies of immunogenicity - determining the genetic contribution to vaccine failure.* Vaccine 2001;19:2434-9.
- <sup>31</sup> Jacobson RM, Ovsyannikova IG, Targonski PV, et al. *Studies of twins in vaccinology.* Vaccine 2007;25:3160-4.
- <sup>32</sup> Hohler T, Reuss E, Evers N, et al. *Differential genetic determination of immune responsiveness to hepatitis B surface antigen and to hepatitis A virus: a vaccination study in twins.* Lancet 2002;360:991-5.
- <sup>33</sup> Hohler T, Reuss E, Freitag CM, et al. *A functional polymorphism in the IL-10 promoter influences the response after vaccination with HBsAg and hepatitis A.* Hepatology 2005;42:72-6.
- <sup>34</sup> Newport MJ, Goetghebuer T, Weiss HA, et al. *Genetic regulation of immune responses to vaccines in early life.* Genes Immun 2004;5:122-9.
- <sup>35</sup> Marchant A, Pihlgren M, Goetghebuer T, et al. *Predominant influence of environmental determinants on the persistence and avidity maturation of antibody responses to vaccines in infants.* J Infect Dis 2006;193:1598-605.
- <sup>36</sup> Poland GA, Ovsyannikova IG, Jacobson RM, et al. *Identification of an association between HLA class II alleles and low antibody levels after measles immunization.* Vaccine 2001;20:430-8.

- 37 Jacobson RM, Poland GA, Vierkant RA, et al. *The association of class I HLA alleles and antibody levels following a single dose of measles vaccine.* Hum Immunol 2003;64:103-9.
- 38 Ovsyannikova IG, Jacobson RM, Vierkant RA, et al. *Associations between human leukocyte antigen (HLA) alleles and very high levels of measles antibody following vaccination.* Vaccine 2004;22:1914-20.
- 39 Thursz MR, Thomas HC, Greenwood BM, et al. *Heterozygote advantage for HLA class-II type in hepatitis B virus infection.* Nat Genet 1997;17:11-2.
- 40 St Sauver JL, Ovsyannikova IG, Jacobson RM, et al. *Associations between human leukocyte antigen homozygosity and antibody levels to measles vaccine.* J Infect Dis 2002;185:1545-9.
- 41 Ovsyannikova IG, Dhiman N, Jacobson RM, et al. *HLA homozygosity does not adversely effects measles vaccine-induced cytokine responses.* Virology 2007;364:87-94.
- 42 Ovsyannikova IG, Jacobson RM, Dhiman N, et al. *Human leukocyte antigen and cytokine receptor gene polymorphisms associated with heterogeneous immune responses to mumps viral vaccine.* Pediatrics 2008;121:E1091-E1099.
- 43 Ovsyannikova IG, Jacobson RM, Vierkant RA, et al. *HLA supertypes and immune responses to measles-mumps-rubella viral vaccine: findings and implications for vaccine design.* Vaccine 2007;25:3090-100.
- 44 Ovsyannikova IG, Jacobson RM, Ryan JE, et al. *Relationship between HLA polymorphisms and  $\gamma$ -interferon and interleukin-10 cytokine production in healthy individuals after rubella vaccination.* Clin Vaccine Immunol 2007;14:115-22.
- 45 Ovsyannikova IG, Jacobson RM, Ryan JE, et al. *HLA class II alleles and measles virus-specific cytokine immune response following two doses of measles vaccine.* Immunogenetics 2005;56:798-07.
- 46 Ovsyannikova IG, Ryan JE, Vierkant RA, et al. *Immunologic significance of HLA class I genes in measles virus-specific IFN- $\gamma$  and IL-4 cytokine immune responses.* Immunogenetics 2005;57:828-36.
- 47 Dhiman N, Ovsyannikova IG, Cunningham JM, et al. *Associations between measles vaccine immunity and single nucleotide polymorphisms in cytokine and cytokine receptor genes.* J. Infect Dis 2007;195:21-9.
- 48 Ovsyannikova IG, Haralambieva IH, Vierkant RA, et al. *The Association of CD46, SLAM and CD209 cellular receptor gene SNPs with variations in measles vaccine-induced immune responses: a replication study and examination of novel polymorphisms.* Hum Hered 2011;72:206-23.
- 49 Brydak LB, Roszkowska-Blaim M, Machala M, et al. *Antibody response to influenza immunization in two consecutive epidemic seasons in patients with renal diseases.* Vaccine 2000;18:3280-6.
- 50 Belshe RB, Gruber WC, Mendelman PM, et al. *Correlates of immune protection induced by live, attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine.* J Infect Dis 2000;181:1133-7.
- 51 Hikono H, Kohlmeier JE, Ely KH, et al. *T-cell memory and recall responses to respiratory virus infections.* Immunol Rev 2006;211:119-32.
- 52 Flynn KJ, Belz GT, Altman JD, et al. *Virus-specific CD8+ T cells in primary and secondary influenza pneumonia.* Immunity 1998;8:683-91.
- 53 Mubareka S, Palese P. *Human genes and influenza.* J Infect Dis 2008;197:1-3.
- 54 Albright FS, Orlando P, Pavia AT, et al. *Evidence for a heritable predisposition to death due to influenza.* J Infect Dis 2008;197:18-24.
- 55 Klein SL, Hodgson A, Robinson DP. *Mechanisms of sex disparities in influenza pathogenesis.* Journal of Leukocyte Biology 2012;doi:10.1189/jlb.0811427
- 56 Engler RJ, Nelson MR, Klote MM, et al. *Half- vs full-dose trivalent inactivated influenza vaccine (2004-2005): age, dose, and sex effects on immune responses.* Arch Intern Med 2008;168:2405-14.
- 57 Beyer WE, Palache AM, Kerstens R, et al. *Gender differences in local and systemic reactions to inactivated influenza vaccine, established by a meta-analysis of fourteen independent studies.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996;15:65-70.
- 58 Poland GA, Ovsyannikova IG, Jacobson RM. *Immunogenetics of seasonal influenza vaccine response.* Vaccine 2008;26(Suppl 4):D35-D40.
- 59 Gelder CM, Lambkin R, Hart KW, et al. *Associations between human leukocyte antigens and non-responsiveness to influenza vaccine.* J Infect Dis 2002;185:114-7.
- 60 Lambkin R, Novelli P, Oxford J, et al. *Human genetics and responses to influenza vaccination: clinical implications.* Am J Pharmacogenomics 2004;4:293-8.
- 61 Zuckerman JN. *Protective efficacy, immunotherapeutic potential, and safety of hepatitis B vaccines.* J Med Virol 2006;78:169-77.
- 62 Vidan-Jeras B, Brinovec V, Jurca B, et al. *The contribution of HLA-Class II antigens in humoral non-response and delayed response to HBsAg vaccination.* Pflugers Arch 2000;440:R188-9.
- 63 Milich DR, Leroux-Roels GG. *Immunogenetics of the response to HBsAg vaccination.* Autoimmun Rev 2003;2:248-57.

- <sup>64</sup> Thursz M. *MHC and the viral hepatitises*. QJM 2001;94:287-91
- <sup>65</sup> Hennig BJ, Fielding K, Broxholme J, et al. *Host genetic factors and vaccine-induced immunity to hepatitis B virus infection*. PLoS One 2008;3:e1898.
- <sup>66</sup> Ryckman KK, Fielding K, Hill AV, et al. *Host genetic factors and vaccine-induced immunity to HBV infection: haplotype analysis*. PLoS One 2010;5:e12273.
- <sup>67</sup> Yucesoy B, Sleijffers A, Kashon M, et al. *IL-1 beta gene polymorphisms influence hepatitis B vaccination*. Vaccine 2002;20:3193-6.
- <sup>68</sup> Davila S, Froeling FE, Tan A, et al. *New genetic associations detected in a host response study to hepatitis B vaccine*. Genes Immun 2010;11:232-8.
- <sup>69</sup> Chen J, Liang Z, Lu F, et al. *Toll-like receptors and cytokines/cytokine receptors polymorphisms associate with non-response to hepatitis B vaccine*. Vaccine 2011;17;29:706-11.
- <sup>70</sup> Siber GR, Santosham M, Reid GR, et al. *Impaired antibody response to Haemophilus influenzae type b polysaccharide and low IgG2 and IgG4 concentrations in Apache children*. N Engl J Med 1990;323:1387-92.
- <sup>71</sup> Ward J, Brennenan G, Letson GW, et al. *The Alaska H. Influenzae vaccine study group. Limited efficacy of a Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine in Alaska native infants*. N Engl J Med 1990;323:1393-401.
- <sup>72</sup> Goldblatt D, Scadding GK, Lund VJ, et al. *Association of Gm allotypes with the antibody response*. J Immunol 1994;153:5316-20.
- <sup>73</sup> Konradsen HB, Henriksen J, Wachmann H, et al. *The influence of genetic factors on the immune response as judged by pneumococcal vaccination of mono- and dizygotic Caucasian twins*. Clin Exp Immunol 1993;92:532-6.
- <sup>74</sup> Yucesoy B, Johnson VJ, Fluharty K, et al. *Influence of cytokine gene variations on immunization to childhood vaccines*. Vaccine 2009;27:6991-7.
- <sup>75</sup> Kimman TG, Banus S, Reijmerink N, et al. *Association of interacting genes in the Toll-like receptor signaling pathway and the antibody response to pertussis vaccination*. PLoS One 2008;3:e3665.
- <sup>76</sup> Querec TD, Akondy RS, Lee EK, et al. *Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans*. Nat Immunol 2009;10:116-25.
- <sup>77</sup> Haralambieva IH, Ovsyannikova IG, Dhiman N, et al. *Common SNPs/haplotypes in IL18R1 and IL18 genes are associated with variations in humoral immunity to smallpox vaccination in Caucasians and African Americans*. J Infect Dis 2011;204:433-41.
- <sup>78</sup> Umlauf BJ, Ovsyannikova IG, Haralambieva IH, et al. *Correlations between vaccinia-specific immune responses within a cohort of armed forces members*. Viral Immunol 2011;24:415-20.
- <sup>79</sup> Davis NA, Crowe JE Jr, Pajewski NM. *Surfing a genetic association interaction network to identify modulators of antibody response to smallpox vaccine*. Genes Immun 2010;11:630-6
- <sup>80</sup> Poland GA, Jacobson RM. *The age-old struggle against the antivaccinationists*. N Engl J Med 2011;364:97-9.
- <sup>81</sup> Crowe JE. *Genetic predisposition for adverse events after vaccination*. J Infect Dis 2007;196:176-7.
- <sup>82</sup> Poland GA, Ovsyannikova IG, Jacobson RM. *Personalized vaccines: the emerging field of vaccinomics*. Expert Opin Biol Ther 2008;8:1659-67.
- <sup>83</sup> Poland GA, Ovsyannikova IG, Jacobson RM. *Adversomics: the emerging field of vaccine adverse event immunogenetics*. Pediatr Infect Dis J 2009;28:431-2.
- <sup>84</sup> Black FL, Hierholzer W, Woodall JP, et al. *Intensified reactions to measles vaccine in unexposed populations of American Indians*. J Infect Dis 1971;124:306-17.
- <sup>85</sup> Stanley SL, Frey SE, Taillon-Miller P, et al. *The immunogenetics of smallpox vaccination*. J Infect Dis 2007;196:212-9.
- <sup>86</sup> Usonis V, Bakasenas V, Kaufhold A, et al. *Reactogenicity and immunogenicity of a new live attenuated combined measles, mumps and rubella vaccine in healthy children*. Pediatr Infect Dis J 1999;18:42-8.
- <sup>87</sup> Vestergaard M, Hviid A, Madsen KM, et al. *MMR vaccination and febrile seizures: evaluation of susceptible subgroups and long-term prognosis*. JAMA 2004;292:351-7.
- <sup>88</sup> Nakayama J, Arinami T. *Molecular genetics of febrile seizures*. Epilepsy Res 2006;70(Suppl. 1):S190-8.
- <sup>89</sup> Nur BG, Kahramaner Z, Duman O. *Interleukin-6 gene polymorphism in febrile seizures*. Pediatr Neurol 2012;46:36-8.
- <sup>90</sup> France EK, Glanz J, Xu S, et al. *Risk of immune thrombocytopenic purpura*. Pediatrics 2008;121:e687-e692.
- <sup>91</sup> Halsell JS, Riddle JR, Atwood JE, et al. *Myopericarditis following smallpox vaccination among vaccinia-naive US military personnel*. JAMA 2003;289:3283-9.
- <sup>92</sup> Rock MT, Yoder SM, Talbot TR, et al. *Adverse events after smallpox immunizations are associated with alterations in systemic cytokine levels*. J Infect Dis 2004;189:1401-10.
- <sup>93</sup> McKinney BA, Reif DM, Rock MT, et al. *Cytokine expression patterns associated with systemic adverse events following smallpox immunization*. J Infect Dis 2006;194:444-53.

- <sup>94</sup> Stanley SL Jr, Frey SE, Taillon-Miller P, et al. *The immunogenetics of smallpox vaccination*. J Infect Dis 2007;196:212-9.
- <sup>95</sup> Reif DM, McKinney BA, Motsinger AA, et al. *Genetic basis for adverse events after smallpox vaccination*. J Infect Dis 2008;198:1-7.
- <sup>96</sup> Pulendran B, Miller J, Querec TD, et al. *Case of yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease with prolonged viremia, robust adaptive immune responses, and polymorphisms in CCR5 and RANTES genes*. J Infect Dis 2008;198:500-7.
- <sup>97</sup> Kumagai T, Yamanaka T, Wataya Y, et al. *A strong association between HLA-DR9 and gelatin allergy in the Japanese population*. Vaccine 2001;19:3273-6.
- <sup>98</sup> Sakaguchi M, Nakayama T, Kaku H, et al. *Analysis of HLA in children with gelatin allergy*. Tissue Antigens 2002;59:412-6.
- <sup>99</sup> Rowe J, Yerkowich ST, Richmond P, et al. *Th2-associated local reactions to the acellular diphtheria-tetanus-pertussis vaccine in 4- to 6-year-old children*. Infect Immun 2005;73:8130-5.
- <sup>100</sup> Brady MT. *Immunization recommendations for children with metabolic disorders: more data would help*. Pediatrics 2006;118:810-3.
- <sup>101</sup> Rinaudo CD, Telford JL, Rappuoli R, et al. *Vaccinology in the genome era*. J Clin Invest 2009;119:2515-25.
- <sup>102</sup> Poland GA, Kennedy RB, Ovsyannikova IG. *Vaccinomics and personalized vaccinology: is science leading us toward a new path of directed vaccine development and discovery?* PLoS Pathogens 2011;7:e1002344.