

La ricerca scientifica in Allergologia e Immunologia Clinica

La Fondazione Scientifica Mauriziana ha da tempo manifestato sensibilità verso i temi di ricerca in ambito allergologico e immunologico, stante l'elevata prevalenza nella popolazione generale delle malattie allergiche e l'importanza del sistema immunitario nella genesi di molte malattie autoimmuni, l'incidenza delle quali è stimata in aumento negli ultimi decenni.

Nello specifico la Fondazione ha sostenuto negli ultimi 10 anni giovani clinici, quali la dott.ssa Roberta Bergia, la dott.ssa Luisa Bommarito, la dott.ssa Iuliana Badiu, il dr Enrico Heffler e, recentissimamente, la biotecnologa dott.ssa Monica Boita mediante l'approvazione e il sostegno di programmi di ricerca, coordinati dal Prof Giovanni Rolla, direttore della Scuola di Specializzazione in Allergologia e Immunologia Clinica e Responsabile della Struttura di Allergologia e Immunologia Clinica del Mauriziano di Torino.

Qui di seguito vengono riportati i risultati di questi programmi di ricerca, pubblicati su riviste scientifiche internazionali, alla realizzazione dei quali ha contribuito in modo significativo il lavoro svolto dai giovani ricercatori, sostenuti dalla Fondazione.

L'anafilassi

E' la più grave conseguenza che si possa realizzare a seguito del contatto con una sostanza alla quale il soggetto sia allergico. La sua incidenza è stimata intorno a 2 casi ogni 10000 persone /anno, ovvero, tradotto per la popolazione piemontese, circa 8-900 casi di anafilassi all'anno, tra lo 0.5 e l'1% dei quali (cioè da 4 a 9) possono risultare mortali. Le cause più comuni di anafilassi sono rappresentate dalla puntura di imenotteri (api, vespe, calabroni), da cibi (particolarmente latte, uovo e frutta secca nei bambini, crostacei, frutta fresca e frutta secca negli adulti), da farmaci (specie antibiotici del gruppo delle penicilline, ma anche anti-infiammatori) e da mezzo di contrasto per indagini radiologiche.

L'evento scatenante l'anafilassi rimane sconosciuto fino nel 30% dei casi e proprio su questi casi si è sviluppata la ricerca meticolosa del gruppo di giovani allergologi, coordinati dal prof Rolla, portando all'identificazione dell'allergene "nascosto".

Una serie di casi di anafilassi occorso nelle ore notturne in soggetti che abitavano l'ultimo piano di vecchi edifici, dove i piccioni nidificano, ha portato all'individuazione del morso della zecca del piccione come causa dell'anafilassi. Nel siero dei pazienti che avevano lamentato l'anafilassi è stata dimostrata la presenza di anticorpi (IgE specifiche) diretti contro due sostanze presenti nella saliva della zecca (proteine rispettivamente di 22 e 40 kDa). I risultati di questa ricerca sono stati pubblicati sull'International Archives of Allergy and Clinical Immunology.

Una causa insolita di anafilassi, legata alla Processionaria, un bruco che parassita i pini, è stata oggetto di una segnalazione alla prestigiosa rivista The Lancet. Si trattava del caso di un soggetto che aveva manifestato uno shock anafilattico mentre si trovava in un bosco di pini ed era stato prontamente soccorso e salvato dall'intervento del 118. La ricerca della causa della grave anafilassi di questo paziente ha portato ad individuare la presenza nel suo siero di anticorpi (IgE specifiche) per due sostanze contenute negli aculei dei bruchi della processionaria, identificate come proteine del peso rispettivamente di 18 e 90 kDa.

La possibilità che la sensibilizzazione ad un aero-allergene (la forfora del cavallo), solitamente responsabile di sintomi respiratori (rinite, asma) possa essere fattore di rischio di anafilassi è stata documentata da un caso di anafilassi occorso ad una paziente, sensibilizzata alla forfora di cavallo, dopo morso dell'animale. Nel siero della paziente è stata identificata la presenza di IgE specifiche per tre

proteine contenute nella saliva del cavallo, del peso rispettivamente di 18, 25 e 65 kDa. Il caso dimostra che pazienti con allergia al cavallo, anche caratterizzata da lievi manifestazioni cliniche, sono a rischio di anafilassi dopo morso di cavallo, probabilmente legato alla sensibilizzazione verso le lipocaline, contenute nella saliva e presenti anche nella forfora dell'animale. La ricerca è stata pubblicata sulla prestigiosa rivista *Allergy*, organo ufficiale dell'European Academy of Allergy and Immunology.

L'importanza di una meticolosa anamnesi e di una estesa valutazione delle sensibilizzazioni verso allergeni alimentari è ben documentata dalla descrizione di un caso di anafilassi da grano saraceno, sempre più impiegato dai ristoratori nella preparazione della pizza, ma allergene ancora poco considerato dalla maggior parte degli allergologi. Da questo caso pilota, pubblicato sulla rivista *Journal of Investigation in Allergy and Clinical Immunology*, il gruppo dei giovani allergologi, in particolare il dr Enrico Heffler, sostenuto dalla Fondazione con un co-finanziamento ad un assegno di ricerca del Ministero dell'Università, ha sviluppato una ricerca clinico-laboratoristica, che ha portato alla messa a punto di un algoritmo diagnostico per individuare i casi di anafilassi da grano saraceno. I risultati di questa importante ricerca sono stati pubblicati ancora una volta sulla prestigiosa rivista *Allergy*.

Un caso di anafilassi osservato in una apicultrice durante terapia desensibilizzante specifica ha consentito di dimostrare una aumentata produzione di ossido nitrico (NO) durante l'anafilassi nell'uomo (l'osservazione è stata pubblicata su *Annals of Allergy Asthma and Immunology*). Un aumentata produzione di NO per sovraregolazione dell'enzima eNOS da parte dei mediatori dell'anafilassi era stato dimostrato nel topo. L'osservazione che NO possa essere un mediatore dell'anafilassi, particolarmente della ipotensione talora refrattaria che caratterizza le forme più gravi di anafilassi, può avere riflessi terapeutici importanti e innovativi, come dimostrerebbero le osservazioni sull'azione benefica della somministrazione di blue di metilene (inibitore della funzione di NO) in alcuni casi di shock anafilattico da mezzo di contrasto iodato, refrattario all'adrenalina, osservato in alcuni pazienti.

Rapporto tra infiammazione delle alte vie aeree e infiammazione bronchiale nella patologia rinitica, sinusitica e asmatica.

La relazione tra rinite e asma è stata oggetto di intensa ricerca, che ha portato al concetto di considerare le due patologie come espressione di un'unica sindrome, la malattia respiratoria unificata ("united airway disease"). Questa sindrome ha un ampio spettro di gravità, ad un estremo la rinite isolata, all'altro estremo l'asma grave con rinosinusite. La misura della concentrazione del monossido di azoto nell'aria espirata (FENO) è proposto come marker non invasivo dell'infiammazione delle vie aeree nell'asma e la sua misura si è dimostrata utile anche nell'individuare i pazienti asmatici sia in soggetti a rischio di asma sia nella popolazione generale.

Come è noto, tra i pazienti rinitici, i sintomi come la tosse ed anche il sibilo toracico, sono particolarmente frequenti, ma non sempre si accompagnano alle alterazioni della funzionalità respiratoria tipiche dell'asma (ostruzione delle vie aeree reversibile e/o iperreattività delle vie aeree). Le ricerche condotte presso la Struttura di Allergologia e Immunologia Clinica del Mauriziano dal gruppo di giovani ricercatori coordinati dal Prof Rolla e in parte sostenuti dalla Fondazione, hanno permesso di stabilire che la misura del FENO può essere impiegata per diagnosticare l'asma nei pazienti rinitici con sintomi simil-asmatici con una sensibilità del 78% utilizzando il cut-off di 36 ppb, e un valore predittivo negativo dell'82% (ricerca pubblicata su *Respiratory Medicine* nel 2006). In particolare, un valore di FENO < 25 ppb registrato in un

paziente rinitico che lamenti sintomi simil-asmatici esclude virtualmente la diagnosi di asma, facendo risparmiare la necessità di effettuare un test di provocazione bronchiale.

Una attenta valutazione della patologia nasale può predire il tipo di coinvolgimento delle vie aeree inferiori come dimostrato da ricerche condotte dallo stesso gruppo e pubblicate sulla rivista internazionale Chest . In 108 pazienti affetti da rinite persistente, il livello di FENO e la prevalenza di diagnosi di asma erano significativamente maggiori nei pazienti con rinite persistente allergica o con rinosinusite cronica , rispetto ai pazienti con rinite non allergica. Il grado di associazione tra rinite e flogosi delle vie aeree inferiori dipende pertanto dal tipo di affezione delle vie aeree superiori, in particolare la rinite allergica e la rinosinusite cronica , associata o meno ad atopia, sono le due patologie nasali che più si associano all'asma e alla flogosi delle vie aeree inferiori.

Studiando la misura di ossido nitrico nasale (metodica innovativa), lo stesso gruppo ha dimostrato che valori molto bassi di NO nasale sono predittivi di rinosinusite cronica con polipi (dati pubblicati sulla rivista Annals of Allergy Asthma Immunology). Il risultato può avere importanti ricadute pratiche nella diagnosi e nel follow-up del paziente con rinosinusite cronica, in quanto la metodica è molto semplice e del tutto non invasiva. Il monitoraggio di NO nasale è stato proposto come parametro obiettivo di risposta alla terapia medica e chirurgica della rinosinusite cronica con polipi (è osservabile un aumento in caso di miglioramento).

I giovani ricercatori clinici, in particolare la dott.ssa Iuliana Badiu, supportata dalla Fondazione con contratto a progetto, hanno dimostrato come nei pazienti con asma allergico l'esposizione all'allergene (nello studio era rappresentato dal gatto), anche di breve durata, causa una infiammazione delle vie aeree che raggiunge la massima intensità 24 ore dopo l'esposizione all'allergene stesso. L'osservazione è stata realizzata mediante la misura seriata della concentrazione di ossido nitrico nell'aria espirata , la citologia dell'espettorato (ricerca degli eosinofili) e la misura della concentrazione dei mediatori dell'infiammazione (prostaglandine e leucotrieni) e dello stress ossidativo (8-isoprostano) nel condensato, ottenuto raffreddando l'aria espirata dei soggetti. I risultati di questa importante ricerca sono stati pubblicati su due importanti riviste, Clinical and Experimental Allergy ed European Journal of Clinical Investigation.

La sindrome di Churg Strauss (poliangite eosinofila granulomatosa)

Negli ultimi anni l'attività clinica della Struttura di Allergologia e Immunologia Clinica, connessa alla Rete regionale per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi e la terapia delle malattie rare ha consentito di poter condurre studi sulla patogenesi della sindrome di Churg-Strauss (CSS), malattia rara caratterizzata da una vasculite dei piccoli vasi, che causa gravi manifestazioni cliniche, tra le quali le più frequenti sono asma, rinosinusite con polipi, aumento degli eosinofili, polineuropatia, infiltrati polmonari, perforazione intestinale, compromissione cardiaca e manifestazioni cutanee. I giovani ricercatori, coordinati dal Prof Rolla , tra i quali si sono distinti soprattutto il dr Giuseppe Guida e la dott.ssa Monica Boita, quest'ultima fruitrice di un cofinanziamento da parte della Fondazione di un assegno di ricerca finanziato dal Ministero dell'Università, hanno prodotto importanti osservazioni sulla patogenesi di questa grave malattia. Essi hanno identificato nei pazienti affetti da CSS l'espansione oligoclonale dei linfociti T, in particolare dei linfociti CD8+, caratterizzati da un fenotipo cosiddetto "effector memory", in grado cioè di colonizzare i tessuti sede di infiammazione. L'espansione clonale di questi linfociti CD8+/Vbeta+ potrebbe rivelarsi un utile marker di malattia. I risultati di questa ricerca sono stati pubblicati sulla rivista internazionale Clinical Immunology.

I problemi clinici connessi con la diagnosi della CSS , specie nelle sue forme iniziali non conclamate, sono stati discussi da due giovani ricercatori , il dr Heffler e il dr Guida . e dal Prof Rolla in un editoriale pubblicato sulla rivista Expert Review in Clinical Immunology . Un esempio di come il clinico debba essere particolarmente attento alle manifestazioni extra-respiratorie dei pazienti asmatici è fornito dalla descrizione di un caso di CSS, inizialmente presentatosi con dolore radicolare scambiato per discopatia (rivelatosi poi essere mononeurite multiplex), quindi, in rapida successione, lamentando colecistite alitiasica (vasculite della colecisti) e perforazione ileale da vasculite intestinale. I giovani clinici, tra i quali la dr.ssa Roberta Bergia, già fruitrice di un contratto a progetto della Fondazione, hanno contribuito alla discussione e descrizione meticolosa del caso, pubblicato sulla prestigiosa rivista Annals of Allergy Asthma and Immunology.

Più recentemente il ruolo funzionale dei linfociti CD8+ nella sindrome di Churg Strauss è stata valutata analizzando l'espressione di membrana di marker citotossici (NKG2D and CD107a) in una ricerca alla quale hanno contribuito in modo determinante i giovani ricercatori dr Guida e Monica Boita e pubblicata sulla rivista Clinical and Experimental Rheumatology.

Bibliografia

Anafilassi

- Rolla G, Nebiolo F, Marsico P, Guida G, Bigo P, Riva G, Zanotta S. Allergy to pigeon tick (Argas reflexus): demonstration of specific IgE-binding components. Int Arch Allergy Immunol. 2004 Dec;135(4):293-5.
- Rolla G, Nebiolo F, Guida G, Marsico P, Riva G, Zanotta S. Cotton wool in pine trees. Lancet. 2003 Jan 4;361(9351):44.
- Guida G, Nebiolo F, Heffler E, Bergia R, Rolla G. Anaphylaxis after a horse bite. Allergy. 2005 Aug;60(8):1088-9.
- Heffler E, Guida G, Badiu I, Nebiolo F, Rolla G. Anaphylaxis after eating Italian pizza containing buckwheat as the hidden food allergen. J Investig Allergol Clin Immunol. 2007;17(4):261-3.
- Heffler E, Nebiolo F, Asero R, Guida G, Badiu I, Pizzimenti S, Marchese C, Amato S, Mistrello G, Canaletti F, Rolla G. Clinical manifestations, co-sensitizations, and immunoblotting profiles of buckwheat-allergic patients. Allergy. 2011 Feb;66(2):264-70.
- Rolla G, Nebiolo F, Guida G, Heffler E, Bommarito L, Bergia R. Level of exhaled nitric oxide during human anaphylaxis. Ann Allergy Asthma Immunol. 2006 Aug;97(2):264-5.

Rapporto tra infiammazione delle alte vie aeree e infiammazione bronchiale nella patologia rinitica, sinusitica e asmatica.

- Rolla G, Guida G, Heffler E, Badiu I, Bommarito L, De Stefani A, Usai A, Cosseddu D, Nebiolo F, Bucca C. Diagnostic classification of persistent rhinitis and its relationship to exhaled nitric oxide and asthma: a clinical study of a consecutive series of patients. Chest. 2007 May;131(5):1345-52.
- Heffler E, Guida G, Marsico P, Bergia R, Bommarito L, Ferrero N, Nebiolo F, De Stefani A, Usai A, Bucca C, Rolla G. Exhaled nitric oxide as a diagnostic test for asthma in rhinitic patients with asthmatic symptoms. Respir Med. 2006 Nov;100(11):1981-7.

- Rolla G, Malinovski A, Badiu I, Heffler E, Petrarulo M, Bucca C, Brussino L. The increase in exhaled NO following allergen challenge is not associated with airway acidification. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(4):411-6
- Brussino L, Badiu I, Sciascia S, Bugiani M, Heffler E, Guida G, Malinovski A, Bucca C, Rolla G. Oxidative stress and airway inflammation after allergen challenge evaluated by exhaled breath condensate analysis. *Clin Exp Allergy*. 2010 Nov;40(11):1642-7.
- Guida G, Rolla G, Badiu I, Marsico P, Pizzimenti S, Bommarito L, De Stefani A, Usai A, Bugiani M, Malinovski A, Bucca C, Heffler E. Determinants of exhaled nitric oxide in chronic rhinosinusitis. *Chest*. 2010 Mar;137(3):658-64.
- Rolla G, Heffler E, Bommarito L, Guida G, Badiu I, Bergia R, Marsico P, Pizzimenti S, Nebiolo F. Exhaled nitric oxide in persistent rhinitis with or without lower airway involvement: a review of the literature. *J Breath Res*. 2007 Dec;1(2):024003.
- Bommarito L, Guida G, Heffler E, Badiu I, Nebiolo F, Usai A, De Stefani A, Rolla G. Nasal nitric oxide concentration in suspected chronic rhinosinusitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008 Oct;101(4):358-62.

La sindrome di Churg Strauss (vasculite eosinofila granulomatosa)

- Guida G, Vallario A, Stella S, Boita M, Circosta P, Mariani S, Prato G, Heffler E, Bergia R, Sottile A, Rolla G, Cignetti A. Clonal CD8+ TCR-Vbeta expanded populations with effector memory phenotype in Churg Strauss syndrome. *Clin Immunol*. 2008 Jul;128(1):94-102.
- Rolla G, Guida G, Heffler E. Churg-Strauss syndrome: still a clinical challenge. *Expert Rev Clin Immunol*. 2007 Nov;3(6):833-7.
- Rolla G, Tartaglia N, Motta M, Ferrero N, Bergia R, Guida G, Heffler E. Warning nonrespiratory symptoms in asthma: catastrophic abdominal involvement in a case of Churg-Strauss syndrome. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2007 Jun;98(6):595-7.
- Boita M, Rolla G, Mallone R, Martinuzzi E, Heffler E, Circosta P, Elia AR, Cignetti A, Caillat-Zucman S, de Menthon M, Guida G. Expression of NKG2D and CD107 in CD8(+) effector memory lymphocytes in Churg-Strauss syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 2012 Jan-Feb;30(1 Suppl 70):S57-61.