

## I sistemi multiplex nella diagnostica allergologica

Roberto Bernardini

*Direttore della Struttura Organizzativa Complessa Pediatria e Neonatologia, Ospedale San Giuseppe, Empoli, Azienda USL Toscana Centro; Docente Scuola di Specializzazione in Allergologia e Immunologia Clinica, Università di Pisa; Presidente della Società Italiana di Pediatria - Sezione Toscana -*



I sistemi multiplex consentono di saggiare *in vitro* numerose e diverse molecole biologiche in simultanea.

Nella diagnostica allergologica ne esistono fondamentalmente due tipologie: la prima è basata su una tecnologia microarray ISAC<sub>E112i</sub> (ISAC), mentre la seconda è basata su una tecnologia macroarray ALEX<sup>2</sup> (ALEX). Ambedue i sistemi sono in grado di generare un referto con un ampio profilo di sensibilizzazione IgE del paziente per oltre cento allergeni molecolari, permettendo innanzitutto di distinguere le sensibilizzazioni genuine dalle cross-reattività.

## Il sistema ISAC

Il sistema ISAC è stato il primo sistema su piattaforma multiplex disponibile per la diagnostica allergologica e dal 2001 è stato continuamente aggiornato. Oggi permette il dosaggio di 112 selezionate IgE monomolecolari da 48 diverse fonti allergeniche del mondo animale e vegetale. Grazie alla tecnologia microarray, esso richiede microscopiche quantità di campione biologico e di reagenti, ed effettua su microchip tutti i dosaggi in triplicato per garantire sempre un risultato affidabile. Il sistema di lettura in fluorescenza prevede un laser scanner confocale.

## Il sistema ALEX

Il sistema ALEX, più recente, unitamente al dosaggio di 178 IgE monomolecolari, associa anche il dosaggio di 117 IgE policlonali verso estratti allergenici completi. Sono dosabili dal sistema anche altre 5 IgE monomolecolari solamente per ricerca e non utilizzabili per la diagnostica clinica. Il sistema di lettura prevede un lettore colorimetrico in densità ottica.

## Elementi di confronto tra i due sistemi

Come ogni dosaggio immunodiagnostico, i due sistemi ISAC e ALEX sono basati su “design” specifici per quanto concerne la qualità dell’antigene, del substrato, dell’anticorpo coniugato e del sistema di riferimento isotipico utilizzato per la calibrazione dei risultati. Nella diagnostica allergologica tali aspetti sono particolarmente critici e infatti è stato frequentemente osservato che differenti sistemi di dosaggio sierologico generano dei risultati non sovrapponibili e non intercambiabili.

Nel confronto tra i due sistemi ISAC e ALEX bisogna innanzitutto considerare che le loro caratteristiche tecniche e metodologiche sono differenti

- le due fasi solide di supporto per l’antigene hanno delle peculiarità chimico-fisiche sostanzialmente differenti;
- la produzione degli estratti allergenici e delle componenti molecolari ha un’origine diversa;
- la metodologia ALEX necessita di una pre-diluizione significativa del siero;
- diverse sono le unità di misura e diverso è il sistema di marcatura delle anti-IgE umane per l’esplicitazione del segnale di lettura e, conseguentemente, diverso è il sistema di lettura dei risultati (Tabella).

I multiplex rappresentano un progresso nella diagnostica allergologica, in quanto permettono di individuare con un prelievo di sangue la presenza o meno di un grande numero di molecole allergeniche; un limite delle metodologie multiplex è quello di essere semi-quantitative e meno sensibili delle metodologie “singleplex”, che permettono la ricerca delle sole molecole che desideriamo testare in base alla storia clinica del paziente.

Tabella	ISAC <sub>E112i</sub>	ALEX <sup>2</sup>
Versione attuale	2019	2019
Tipologia Array	Microscopica	Macroscopica
Volume campione (microlitri)	30	100
Intervallo di misura	0,3-100	0,3-50
Segnale di lettura	Fluorimetrico	Colorimetrico
Supporto fase solida	Microchip in vetrino	Chip nitrocellulosa
N° dosaggi multipli per ogni test	3	1
Eliminazione interferenza CCD	100% (su 108 di 112 componenti)	85%-95%
Necessità pre-diluizione	No	Sì, 1:5
N° molecole	112	178
N° estratti completi	0	117
IgE totali	No	Sì

**Tabella.** Confronto tra i sistemi ISAC e ALEX (modificato da Bernardini R, Arasi S, Barni S, et al. Multiparametric or multiplex systems in allergy diagnostics. Italian Journal of Pediatric Allergy and Immunology 2024;2:17-21).

### Precauzioni e accorgimenti di impiego

La reale efficacia dei sistemi multiplex dipende strettamente dal loro contesto di impiego. Sono infatti utili nelle polisensibilizzazioni complesse, nell'anafilassi idiopatiche e quando è necessario indagare per la presenza di allergeni "nascosti". Sono, al contrario, inutili prima della visita medica specialistica, quando l'anamnesi e la storia clinica hanno già delineato il caso clinico e quando la diagnostica molecolare mirata ("singleplex") ha definito esaurientemente il quadro clinico. In altre circostanze, inoltre, i sistemi multiplex possono rivelarsi anche dannosi: per esempio quando manca la cultura della "Molecular Allergology" per interpretare correttamente i risultati ed elaborare l'appropriato approccio terapeutico; quando il paziente dovesse ricevere un referto complesso senza un'interpretazione clinica (per esempio la "sensibilizzazione", caratterizzata dalla "sola" presenza di IgE dirette contro un allergene o una molecola, è diversa dall'"allergia", in cui alla positività sierologica si associa la sintomatologia clinica); e quando vengono effettuati come esame di primo livello senza prima una visita medica specialistica.

L'applicazione della tecnologia multiplex alla diagnostica allergologica *in vitro* ha rappresentato un progresso nella definizione del profilo di sensibilizzazione del paziente, con un'ottica molecolare nelle allergie sia respiratorie sia alimentari: questo ha portato a risolvere con maggiore precisione i casi clinici difficili come le polisensibilizzazioni complesse e le anafilassi idiopatiche. Tuttavia, la facilità con la quale può essere richiesta in generale questa tipologia di test dal pediatra rappresenta un potenziale rischio di abuso. La prescrizione del test multiplex dovrebbe essere pertanto appannaggio di chi possiede (pediatra di famiglia e/o ospedaliero e/o universitario, ecc.) una conoscenza sufficientemente elevata dell'allergologia molecolare ed è in grado di interpretare con appropriatezza i diversi e talvolta complessi profili di sensibilizzazione possibili.

### Opportunità e vantaggi dei test multiplex in Pediatria

L'uso appropriato, e non l'abuso, di queste nuove tecnologie necessita di un buon livello di conoscenza della metodologia utilizzata. A tale scopo, soprattutto per i pazienti pediatrici, sono da privilegiare il ridotto volume di siero, l'ampio intervallo di lettura dei risultati, il calcolo dei risultati da multiplette e la correlazione con la tecnologia ImmunoCAP, considerata il *gold standard* dei test allergo-diagnostici *in vitro*. Infine, e non certamente di minore importanza, è fondamentale per il

pediatra e per l'allergologo conoscere gli allergeni presenti nelle diverse piattaforme e quale impatto possano avere nella diagnosi e nelle decisioni cliniche le nuove molecole allergeniche che vengono proposte. Nell'allergologia pediatrica, soprattutto nella diagnosi di allergia alimentare, il test multiplex potrebbe fornire informazioni su livelli di sensibilizzazione di sconosciuta rilevanza clinica, inutili sia al fine di apportare modifiche appropriate della dieta sia per il suggerimento di test di provocazione orale.

Nell'ottica di un reale potenziamento dell'appropriatezza diagnostica e di un efficientamento del Servizio Sanitario, è auspicabile che lo sviluppo delle nuove tecnologie diagnostiche e la proposta di nuovi dosaggi di IgE monomolecolari sui sistemi multiplex siano sempre supportati da una documentazione scientificamente adeguata sulle performance e sulla significatività clinica delle componenti molecolari.

### **Che cosa deve ricordare il pediatra di famiglia sull'utilizzo della diagnostica molecolare**

La diagnostica allergologica IgE mediata (oculorinite, asma bronchiale, sintomi e quadri clinici di allergia alimentare, di allergia al lattice e così via) si basa fundamentalmente sulla storia clinica (individuare un rapporto causa-effetto) e in seguito sull'esecuzione dei test cutanei (prick test per allergeni ritenuti responsabili in base alla storia clinica). Se gli estratti per eseguire i test cutanei non sono disponibili o se non è possibile eseguirli per reattività cutanea ridotta (ad esempio lesioni cutanee in atto, assunzione di antistaminici), può essere eseguita la ricerca quantitativa delle IgE sieriche specifiche per le fonti sospettate. A questo punto, in caso di non chiara diagnosi eziologica, per individuare la molecola specifica, "genuina", come sensibilizzante primario è utile eseguirne la ricerca tramite "singleplex", guidati sempre dall'anamnesi. Inoltre, sempre tramite "singleplex", è possibile individuare la presenza di molecole cross-reattive (ad esempio profiline e polcalcine, come pure PR-10 e ns-LTP). Ovviamente questi ultimi due passaggi possono essere intrapresi da chi ha una cultura molecolare specifica. In seguito, sempre in base all'esito delle risposte delle molecole ricercate, è possibile proseguire l'iter diagnostico con un terzo passaggio, e cioè con l'utilizzo dei sistemi multiplex, scegliendo il sistema che offre le maggiori garanzie da un punto di vista scientifico.

**Va infine sottolineato che il "fai da te" da parte dei genitori** (richiesta del multiplex da parte del genitore, al quale poi viene inviata la risposta a domicilio) **è per il bambino molto pericoloso, in quanto l'interpretazione delle risposte relative ai multiplex necessita di una valutazione specialistica allergologica da parte di un pediatra** con approfondite conoscenze in ambito molecolare, **altrimenti si corre il rischio di etichettare un bambino come allergico quando non lo è, con tutte le conseguenze negative che ne derivano.**

### **Osservazioni e considerazioni sulla posizione della Commissione Diagnostica della SIAIP**

**Nell'ottica di un reale potenziamento dell'appropriatezza diagnostica molecolare in ambito allergologico e di un efficientamento del Servizio Sanitario:**

- **è auspicabile che lo sviluppo delle nuove tecnologie diagnostiche e la proposta di nuovi dosaggi di IgE monomolecolari sui sistemi multiplex siano sempre supportati da una documentazione scientificamente adeguata sulle performance e sulla significatività clinica delle componenti molecolari;**
- **è necessario che la prescrizione e l'interpretazione dei test multiplex avvengano da parte dello specialista in questo settore della medicina.**

In conclusione, è necessario evitare che il referto dei multiplex venga interpretato da chi non è esperto in tale settore e in particolare con il "fai da te" da parte dei genitori del bambino, con una conseguente auto-diagnosi di allergia nel proprio figlio da parte loro senza prima una valutazione da parte dello specialista, con ovvie conseguenze negative per il bambino stesso e con ovi aumenti ingiustificati dei costi sia sociali che sanitari.

## Riferimenti bibliografici

- Bernardini R, Arasi S, Barni S, et al. Multiparametric or multiplex systems in allergy diagnostics. *Italian Journal of Pediatric Allergy and Immunology* 2024;2:17-21. <https://doi.org/10.53151/2531-3916/2024-463>
- Bojcukova J, Vlas T, Forstenlechner P, et al. Comparison of two multiplex arrays in the diagnostics of allergy. *Clin Transl Allergy* 2019;9:31. <https://doi.org/10.1186/s13601-019-0270-y>
- Casas ML, Esteban Á, González-Muñoz M, et al. Validation of allergy in vitro diagnostics assays (Tools and recommendations for the assessment of in vitro tests in the diagnosis of allergy). *Adv Lab Med* 2020;1:20200051. <https://doi.org/10.1515/almed-2020-0051>
- Wood RA, Segall N, Ahlstedt S, et al. Accuracy of IgE antibody laboratory results. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;99:34-41. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60618-7](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60618-7)
- Scala E, Caprini E, Abeni D, et al. A qualitative and quantitative comparison of IgE antibody profiles with two multiplex platforms for component resolved diagnostics in allergic patients. *Clin Exp Allergy* 2021;51:1603-1612. <https://doi.org/10.1111/cea.14016>
- Sonneveld LJH, Emons JAM, Arends NJT, et al. ALEX versus ISAC multiplex array in analyzing food allergy in atopic children. *Clin Mol Allergy* 2022;20:10. <https://doi.org/10.1186/s12948-022-00177-w>

© Copyright by Pacini Editore Srl

L'articolo è OPEN ACCESS e divulgato sulla base della licenza CC-BY-NC-ND (Creative Commons Attribuzione – Non commerciale – Non opere derivate 4.0 Internazionale). L'articolo può essere usato indicando la menzione di paternità adeguata e la licenza; solo a scopi non commerciali; solo in originale. Per ulteriori informazioni: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.it>