

Domande frequenti sul PAX

Dal momento che la nostra offerta di PAX continua ad arricchirsi, siamo lieti di condividere alcune FAQ (Frequently Asked Questions) su PAX. Questo vi consentirà di trarre il massimo vantaggio dalla nostra nuova metodica per i test allergologici.

Che cos'è l'allergologia molecolare?

L'allergologia molecolare è un approccio all'avanguardia per l'individuazione delle sensibilizzazioni, che prevede l'utilizzo di singoli componenti molecolari per la determinazione delle IgE specifiche, al posto degli estratti di allergeni tradizionalmente utilizzati. I componenti molecolari sono proteine ricombinanti che forniscono un livello di standardizzazione più elevato rispetto agli estratti di allergeni e consentono un'identificazione più precisa delle sensibilizzazioni mediate da IgE.

Nell'ultimo decennio, i test allergologici molecolari per l'uomo si sono rivelati strumenti potenti che aiutano a individuare i fattori scatenanti delle allergie, facilitando così la valutazione del caso e le decisioni terapeutiche.

Che cos'è il PAX?

PAX (Pet Allergy Xplorer) è il primo test sierologico veterinario multiplex macroarray quantitativo delle IgE. Utilizza cartucce con un numero di spot compreso tra 250 e 300, contenenti sia estratti (un terzo) che componenti molecolari (due terzi).



Come sono stati selezionati gli allergeni per PAX?

PAX è un prodotto derivato da ALEX2 utilizzato in medicina umana. Abbiamo innanzitutto eliminato tutti gli estratti e i componenti molecolari ritenuti irrilevanti per gli animali domestici (ad esempio, quelli di kiwi, gamberi, pesca, etc...). Poiché ALEX2 contiene pochi estratti, abbiamo aggiunto quelli ritenuti importanti per i cani, ad esempio quelli dell'acaro della polvere domestica *Dermatophagoides farinae* e dell'acaro delle derrate alimentari *Tyrophagus putrescentiae*.

Poiché esistono caratteristiche specifiche che rendono una proteina un allergene, abbiamo mantenuto tutti i componenti di ALEX2 che sarebbero stati probabili target delle IgE degli animali.

Infine, abbiamo aggiunto tutti i componenti noti come allergeni per gli animali, che erano assenti nell'ALEX2 per gli esseri umani.

Dopo aver analizzato più di 1.000 sieri canini provenienti dall'Europa, abbiamo potuto constatare che quasi tutti gli estratti e i componenti avevano prodotto in una percentuale variabile di cani un risultato positivo di IgE specifiche, confermando così che il metodo di selezione degli allergeni era valido. Nextmune modificherà nel tempo la natura degli estratti e dei componenti presenti nella cartuccia, in modo da eliminare gli allergeni non reattivi/poco reattivi. Per contro, gli specialisti di Nextmune lavoreranno per caratterizzare l'"allergoma" di cani, gatti e cavalli, in modo da aggiungere regolarmente nelle cartucce nuovi componenti ritenuti rilevanti.



Esiste un'interferenza da parte di ittero, lipemia ed emolisi?

Un campione di siero contenente IgE allergene-specifiche a diverse concentrazioni è stato addizionato con bilirubina, trigliceridi o emoglobina alle concentrazioni di 2,5, 150 e 15 mg/dL, rispettivamente. Tutti i valori di IgE specifiche erano entro il 25% di quelli del siero non addizionato e il rapporto medio tra il siero addizionato e quello non addizionato variava tra il 96 e il 100%.

In conclusione, non vi è alcuna influenza rilevante di ittero, lipemia o emolisi sui risultati di PAX.

Cosa sono i CCD e dove si trovano?

La maggior parte degli allergeni sono glicoproteine, il che significa che alcuni aminoacidi possiedono una catena di carboidrati (zuccheri). Gli allergeni vegetali (compresi gli alimenti vegetali), i veleni di insetti (api) e i nematodi (vermi) possiedono catene di carboidrati diverse da quelle dei mammiferi. Di conseguenza, queste catene possono essere riconosciute dalle IgE di esseri umani e animali. Sfortunatamente, poiché gli zuccheri sono presenti negli allergeni, sono in grado di provocare reazioni crociate; per questo motivo sono chiamati CCD, o determinanti carboidrati cross-reattivi.

In che modo i CCD sono coinvolti nelle allergie?

Durante una reazione allergica, le IgE vengono prodotte contro le catene di carboidrati e le proteine dell'allergene. Gli studi hanno confermato che questo avviene nel 30% degli esseri umani, dei cani e dei gatti. Le IgE contro le catene CCD non sembrano essere clinicamente rilevanti.

Perché è importante bloccare i CCD?

Bloccare i CCD significa aumentare la specificità del test sierologico. È stato dimostrato che aumenta anche la correlazione con i risultati dei test intradermici.

I determinanti carboidratici cross-reattivi (CCD) sono bloccati con PAX?

Ogni siero animale testato viene diluito in un tampone che contiene una specifica miscela di proteine con diversi tipi di CCD. PAX è anche il primo test sierologico veterinario che ha incorporato in ogni cartuccia rivelatori dei CCD per verificare l'efficienza del blocco CCD. Nel caso in cui uno di questi rivelatori produca livelli elevati di IgE anti-CCD dopo il blocco iniziale, il siero viene analizzato una seconda volta previa incubazione con una quantità maggiore di un diverso bloccante CCD. Questa seconda incubazione determina una marcata diminuzione delle IgE specifiche per i CCD e una marcata riduzione del numero di positività delle IgE per pollini e alimenti vegetali.

Quale reagente anti-IgE viene utilizzato nel PAX?

Per il test canino, PAX utilizza l'anticorpo monoclonale anti-IgE canina 5.91, prodotto negli anni '90 dal Prof. Bruce Hammerberg presso il College of Veterinary Medicine della NC State University. Questo anticorpo riconosce un epitopo nel segmento Ce2 del frammento Fc delle IgE canine. L'epitopo è differente dalle regioni delle IgE che si legano ai recettori IgE ad alta e bassa affinità, garantendo così l'assenza di interferenze da parte dei recettori IgE solubili naturalmente presenti nei cani allergici. È importante notare che la sequenza dell'epitopo riconosciuto dalle IgE del cane è completamente diversa da quella presente nelle IgM, nelle IgA e nelle quattro diverse sottoclassi di IgG (da IgG1 a IgG4). Infatti abbiamo verificato, utilizzando sia l'ELISA standard che il PAX, che l'anticorpo 5.91 non si lega alle IgG canine. È in corso una ricerca per identificare il miglior anticorpo contro le IgE feline ed equine da includere nel PAX.

In conclusione, l'anticorpo monoclonale 5.91 è specifico per le IgE del cane. Per i gatti e i cavalli verrà utilizzato un anticorpo diverso.

Qual è la precisione del test?

La precisione è stata determinata in due condizioni diverse:

Per la variabilità da lotto a lotto della cartuccia, sono stati confrontati due lotti diversi utilizzando 54 combinazioni allergene/campione che coprono 44 allergeni. Per i valori di IgE specifiche inferiori a 400 ng/mL, il coefficiente di variabilità intra-test è stato del 3,0% e il coefficiente inter-test del 7,1%. Per i valori superiori a 400 ng/mL, questi CV% erano rispettivamente del 2,0 e del 5,2%.

Per la determinazione della ripetibilità, tre campioni di siero canino sono stati analizzati in doppio in cinque diverse prove. Analogamente, per i valori di IgE più bassi il CV% intra- e inter-test è stato rispettivamente del 6,2 e dell'8,2%, mentre per i valori più alti è stato rispettivamente del 2,7 e del 7,0%.

In conclusione: La precisione del PAX è eccellente e i risultati sono altamente riproducibili.

Perché ci sono più risultati negativi quando invio sieri canini testati con il PAX rispetto ad altre tecnologie più datate?

Per rispondere meglio a questa domanda, diamo uno sguardo ai risultati ottenuti con PAX, raccolti finora nel 2023 da oltre 25.000 cani.

In Europa (11.196 sieri) le percentuali di cani con almeno una reazione positiva variavano a seconda del laboratorio di analisi (Spagna, Paesi Bassi e Regno Unito) e del mese di esecuzione tra l'83% (Spagna, aprile) e il 96% (Regno Unito, giugno). Se si considerasse solo la percentuale di cani che potrebbero essere candidati all'immunoterapia (ovvero, escludendo allergeni alimentari, veleni d'insetti e l'allergene della saliva delle pulci Cte f 1), le percentuali varierebbero tra il 51% (Regno Unito, aprile) e l'88% (Regno Unito, giugno; Paesi Bassi, aprile).

Negli Stati Uniti (14.243 cani) la percentuale con almeno una IgE specifica rilevabile con PAX è rimasta abbastanza stabile durante la maggior parte dell'inverno e della primavera (84-87%), per poi aumentare nei mesi di luglio (88%) e agosto (95%). La percentuale di cani potenzialmente trattabili con l'immunoterapia è variata da un minimo del 70% a gennaio, per poi aumentare ogni mese fino al 91% ad agosto.

Sebbene alcuni veterinari possano occasionalmente ricevere una serie di risultati negativi, questa non è una situazione comune, poiché i numeri sopra citati rientrano nell'intervallo di quanto ci si potrebbe aspettare dalla letteratura. Bisogna ricordare che alcuni cani hanno condizioni pruriginose simili alla dermatite atopica (AD) che non sono allergiche, mentre altri hanno AD con un meccanismo patologico che probabilmente non coinvolge le IgE. In effetti, in un recente studio si evidenzia che la cosiddetta atopica-like dermatitis rappresenta circa il 15% dei cani con una distribuzione di lesioni e prurito tipici dell'AD, ma con test intradermici e sierologici negativi (Botoni, Vet Dermatol 2019).

Perché c'è questa variabilità?

La risposta è semplice: queste differenze sono dovute alla variabilità dell'esposizione stagionale ai pollini. Diamo uno sguardo agli Stati Uniti, dove possediamo dati su PAX da gennaio 2023. Durante l'inverno, la percentuale di sieropositività per almeno un tipo di polline è stata intorno al 40%. Durante la primavera questa percentuale è variata tra il 48% e il 64% e durante l'estate, nel mese di agosto, è salita all'86%. Allo stesso modo, si è verificato un aumento costante del numero di allergeni che potevano essere inclusi nell'immunoterapia: circa 4 in inverno, 5 in primavera e 10 ad agosto.

In Europa, abbiamo avuto identici periodi di positività e negatività nei confronti degli allergeni dei pollini. Ad esempio, in un laboratorio olandese, la percentuale di positività per Fag s 1, l'allergene PR-10 del *Fagus sylvatica* (faggio), è stata del 57% a marzo, del 45% ad aprile, per poi scendere a circa il 10-15%. Al contrario, a causa di un periodo di impollinazione più tardivo, il picco di sensibilizzazione a Fag s 1 nel Regno Unito si è verificato a maggio, per poi scendere lentamente. Allo stesso modo e come previsto, la sensibilizzazione ai pollini di graminacee è stata più elevata a luglio nei laboratori olandesi e del Regno Unito. Inoltre non dobbiamo considerare solo il periodo di impollinazione, in quanto è probabile che anche i fattori meteorologici influenzino il rilascio dei pollini. Un ottimo esempio è quanto osservato nel laboratorio PAX spagnolo, che testa principalmente sieri provenienti da cani che vivono in paesi mediterranei e in Francia. Quest'estate il livello di sieropositività IgE per i pollini di graminacee ed erbe infestanti è stato notevolmente inferiore rispetto a quanto ci si aspettasse, probabilmente a causa dell'ondata di calore che ha colpito quella parte dell'Europa nei mesi di luglio e agosto.

Perché tali fluttuazioni non erano state osservate in precedenza?

Sembra che ci sia solo un articolo (Bjelland, Acta Vet Scand 2014) che ha documentato una tale variabilità. Nei cani norvegesi testati con il test Allercept Heska il tasso di sieropositività agli allergeni è stato più alto in estate e autunno (circa l'87%) rispetto all'inverno e alla primavera (79%). La differenza stagionale è stata maggiore per gli allergeni dei pollini, con un basso tasso di sensibilizzazione del 39% in inverno e del 50% in estate.

Ci sono alcuni test sierologici in cui questa differenza stagionale potrebbe non essere evidente. La principale spiegazione di ciò risiede nel probabile insufficiente blocco delle IgE che riconoscono i carboidrati cross-reattivi legati agli allergeni vegetali (IgE-CCD), portando così a risultati falsi positivi. Anche se la maggior parte dei laboratori ora include il blocco delle IgE-CCD, il test PAX di Nextmune è l'unico che verifica l'efficienza di tale blocco. Se il primo blocco viene ritenuto insufficiente, viene eseguito un secondo blocco, che potrebbe portare a una completa negativizzazione delle sensibilizzazioni agli estratti dei pollini. Inoltre, quasi tutti i componenti molecolari dei pollini testati con PAX sono proteine ricombinanti prive di CCD.

Per riassumere, la percentuale di positività di PAX è simile a quella di altri risultati di test segnalati in precedenza, ma esiste una forte influenza della stagione di esecuzione del test sulla percentuale di sensibilizzazione complessiva e su quella dei pollini. Inoltre, l'esclusiva strategia di blocco dei CCD elimina probabilmente le IgE-CCD che in altri test sierologici potrebbero portare a una falsa positività IgE verso allergeni dei pollini e degli alimenti vegetali.

Cosa fare per limitare i risultati negativi del PAX?

Ecco la nostra strategia consigliata:

1. Inviare il siero circa un mese dopo l'inizio della stagione in cui il cane manifesta i sintomi e
2. Eseguire il test quando il cane è in fase di esacerbazione acuta, in modo che le cellule T abbiano il tempo di attivare la secrezione di IgE da parte delle cellule B

Infine, bisogna ricordare che potrebbero esserci cani con atopica-like dermatitis, in cui i test di sensibilizzazione cutanea e sierologica risulteranno negativi.