



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

SCUOLA DI DOTTORATO
in Medicina del Lavoro e Igiene Industriale

DIPARTIMENTO
di
Scienze cliniche e di Comunità

XXVI ciclo di dottorato

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA:

*Asma del panificatore:
nuove strategie preventive, diagnostiche e terapeutiche*

Dottorando: Chiara B.L Marsili

Tutor: Chiar.mo Prof. P.A Bertazzi

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Giovanni Costa

A.A.2012/2013

INDICE

ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	5
EPIDEMIOLOGIA	6
AMBIENTE	7
ETIOPATOGENESI	9
ASPETTI CLINICI E DIAGNOSTICI	17
Manifestazioni cliniche	17
Diagnosi	18
Anamnesi.....	19
Monitoraggio del PEF	19
Test di funzionalità respiratoria.....	20
Test di bronco stimolazione aspecifica (TBPA)	23
Test di broncostimolazione specifico (TBPS).....	25
Misurazione dei marcatori non invasivi di infiammazione delle vie aeree	26
Test Immunologici.....	26
Rinomanometria.....	28
Terapia	30
Immunoterapia specifica:.....	32
STUDIO CLINICO	33
Materiali e metodi	33
Skin prick test.....	33
Determinazione IgE specifiche	34
FeNO.....	34
TPBA	34
TPBS	34
Rinomanometria.....	35
Estratti di farine	35
Vaccino	35
Descrizione dei casi clinici con l'approccio diagnostico delineato nei materiali e metodi.	36
Caso 1	36
Caso 2	38
Caso 3	39
Caso 4	40
Pazienti in immunoterapia specifica	42
STUDIO BIOCHIMICO.....	43
Materiali e metodi	43
Test ELISA per la determinazione delle citochine: IL6, IL8, TNF α	43
Determinazione dei polimorfismi genetici TLR-4/+896 e CD14/-159.....	43
Popolazione.....	49
Analisi statistica	51
Risultati	51
Discussione	57
CONCLUSIONI.....	60
BIBLIOGRAFIA	63
LISTA DELLE ABBREVIAZIONI.....	66

ABSTRACT

L'asma da farine è ancora oggi una delle cause più frequenti di asma professionale in molti paesi. Si tratta della manifestazione più grave negli esposti a farine che possono presentare anche rinite, congiuntivite e dermatite. La polvere di farina, alcuni contaminanti e additivi sono causa delle varie manifestazioni. Ad oggi molti aspetti delle patogenesi restano da chiarire, così come nuovi test diagnostici e nuove terapie devono essere validate. Il presente progetto di ricerca di dottorato si è sviluppato su un doppio binario:

- 1) adozione di tests di provocazione nasale specifici con estratti di farina purificati e standardizzati (Lofarma Allergeni), monitorando le resistenze nasali e la funzionalità respiratoria. I soggetti per i quali viene formulata una diagnosi di allergopatia respiratoria da farina di frumento sono sottoposti ad immunoterapia sublinguale.
- 2) Definizione dei polimorfismi genetici dei recettori TLR-4/+896 e CD14/-159 delle endotossine batteriche che sono presenti come contaminanti nelle farine e possono favorire la risposta immunitaria, nonché il dosaggio delle interleuchine IL6, IL8 e TNF α , e della frazione espirata di ossido nitrico (FeNO) identificati come markers di infiammazione che possono variare nelle popolazioni di lavoratori esposti a farina di frumento.

Lo studio clinico ha permesso di testare gli estratti di farine impiegati nel test di provocazione nasale specifico, metodica che si è rivelata fondamentale per la diagnosi di alcuni casi di malattia professionale e che in futuro potrà verosimilmente essere utilizzata per la stimolazione bronchiale; l'immunoterapia specifica ha fornito risultati più che soddisfacenti in termini di miglioramento dei sintomi e di proseguimento dell'attività lavorativa. Lo studio biochimico eseguito su una popolazione di 167 panificatori suddivisi tra malati professionali, atopici e sani ha permesso di chiarire meglio il ruolo delle interleuchine e dei recettori per le endotossine nella patogenesi dell'asma professionale, fornendo spunti interessanti in termini di monitoraggio e prevenzione della patologia.

Baker's asthma is still one of the most frequent causes of occupational asthma in many countries. This is the most severe manifestation in flour exposed that may also develop rhinitis, conjunctivitis and dermatitis. Flour dust, some contaminants and additives can cause clinical manifestations. To date, many aspects of the pathogenesis remain to be clarified, as well as new diagnostic tests and new treatments must be validated.

This doctoral research project has developed on a dual track :

- 1) adoption of specific nasal provocation test with extract of purified and standardized flour (Lofarma Allergens), monitoring the resistance and nasal respiratory function. Then subjects for which there is a diagnosis of allergic respiratory disease related to flour dust, are enrolled for the sublingual immunotherapy.
- 2) Definition of genetic polymorphisms of TLR-4/+896 and CD14/-159 of bacterial endotoxins that are present as contaminants in the flour and can boost the immune response, as well as the dosage of interleukins IL6, IL8 and TNF- α , and fraction of exhaled nitric oxide (FeNO) identified as markers of inflammation, which may vary in populations of workers exposed to wheat flour.

The clinical study has allowed us to test extracts of flour used in the specific nasal provocation test, a method that turned out to be essential for the diagnosis of some cases of occupational disease and that in the future will likely be used for the specific bronchial provocation test. Immunotherapy has provided more than satisfactory results in terms of improvement in symptoms and continuation of work. The biochemical study performed on a population of 167 workers divided among bakers with occupational disease, atopics and healthy workers, has allowed us to better clarify the role of interleukins and receptors for endotoxins in the pathogenesis of occupational asthma, providing interesting insights in terms of monitoring and prevention of pathology .

INTRODUZIONE

Nel 1700 Bernardo Ramazzini descrisse il primo caso di asma del panificatore riportando sintomi come tosse, dispnea e congiuntivite.

Egli ipotizzava un meccanismo di tipo meccanico dovuto al fatto che la farina mischiandosi alla saliva si depositava sulla parete delle vie aeree, causando difficoltà respiratoria. L'asma da farine è ancora oggi una delle cause più frequenti di asma professionale in molti paesi. Si tratta della manifestazione più grave negli esposti a farine che possono presentare anche rinite, congiuntivite e dermatite. La polvere di farina, alcuni contaminanti e additivi sono causa delle varie manifestazioni. Il meccanismo patogenetico presenta ancora degli aspetti poco chiari, ma diverse evidenze indicano che il meccanismo immunologico primario è di tipo I secondo la tradizionale classificazione di Gell e Coombs con la produzione di IgE; in seguito l'infiammazione delle vie aeree viene sostenuta anche da altri meccanismi, tuttora oggetto di studi scientifici. I panificatori addetti alla produzione rappresentano la categoria più a rischio ma tutte le professioni a contatto con le farine (addetti al confezionamento, vendita, pasticceri, pizzaioli, ecc.) possono esserne colpite. Invero molti aspetti delle patogenesi restano da chiarire, così come nuovi test diagnostici e nuove terapie devono essere validate. Il presente progetto di ricerca di dottorato si è sviluppato su un doppio binario:

- 3) Adozione di test di provocazione nasale specifici con estratti di farina purificati e standardizzati (Lofarma Allergeni), eseguiti ad integrazione dei challenge più tradizionali con le farine di frumento in cabina di esposizione, monitorando le resistenze nasali e la funzionalità respiratoria. I soggetti per i quali viene formulata una diagnosi di allergopatia respiratoria da farina di frumento sono sottoposti ad immunoterapia sublinguale.
- 4) Definizione dei polimorfismi genetici dei recettori TLR-4/+896 e CD14/-159 delle endotossine batteriche che sono presenti come contaminanti nelle farine e possono favorire la risposta immunitaria, nonché il dosaggio delle interleuchine IL6, IL8 e TNF α , e della frazione espirata di ossido nitrico (FeNO) identificati come markers di infiammazione che possono variare nelle popolazioni di lavoratori esposti a farina di frumento.

EPIDEMIOLOGIA

L'asma del panificatore è una delle più frequenti cause di asma occupazionale in molti paesi. In Norvegia e in Inghilterra è la seconda causa di asma professionale (1) mentre in Francia (2) e in Germania (3) la prima. Il tasso di incidenza annuo è stimato intorno a 1-10 casi per 1000 panificatori (2). Diversi studi hanno stimato la prevalenza della patologia tra il 5 e il 7% (3). La prevalenza della sensibilizzazione nei confronti della farina di grano è stimata intorno al 4-47% e verso l'alfa amilasi tra 4,68-24% (4) in soggetti professionalmente esposti. L'incidenza varia tra 4 e 10% l'anno (5). Nella popolazione generale i dati relativi alla sensibilizzazione si aggirano intorno allo 0,4-6% sia probabilmente per cross reattività con i pollini, sia per effettiva sensibilizzazione in soggetti atopici (4). L'atopia risulta essere un forte fattore di rischio per lo sviluppo dell'asma da farine (OR: 3,7-20,8), così come i livelli di esposizione a farina di frumento (4). Ad eccezione di alcuni studi (6), non sono riportate in letteratura associazioni con età, sesso ed abitudine al fumo (4).

L'anzianità media di comparsa dei sintomi varia nei diversi studi tra 4 e 13, anni ma sembra che il rischio maggiore si abbia entro i primi due anni di esposizione (7). Si deve comunque registrare che negli ultimi anni in Italia la produzione dei prodotti da forno è molto cambiata; da piccole realtà prevalentemente artigiane e a carattere familiare si è tendenzialmente passati a realtà industriali e soprattutto alla produzione nei supermercati. Ciò presumibilmente in tendenza con quanto avviene all'estero dove diversi studi sono stati condotti sui panificatori impiegati nella grande distribuzione; i dati che sono emersi mostrano percentuali di sensibilizzazione (lavoratori asintomatici che presentano test cutanei e/o IgE specifiche positive alle farine di frumento e/o additivi) e di asma (sintomi respiratori e positività cutanee e/o sierologiche agli allergeni professionali) rispettivamente del 35 e 9%. (8)

Baatjies e Lopata hanno rilevato il 13% di soggetti con asma occupazionale e il 16% di soggetti sensibilizzati nei confronti di vari tipi di farine tra gli addetti alla lavorazione del pane in una realtà della grande distribuzione del Sud Africa (9). Si tratta dunque di una patologia che ancora oggi costituisce un problema, e la cui prevalenza/incidenza non tende a diminuire, anche se variano le modalità di produzione da artigianale ad industriale.

AMBIENTE

L'esposizione a farina di frumento si può considerare inevitabile, diretta e ripetitiva per un addetto alla panificazione. Non è noto il limite di esposizione ambientale responsabile della sensibilizzazione e dello scatenamento dei sintomi in soggetti precedentemente sensibilizzati. Alcuni autori hanno indicato diversi limiti di esposizione, l'ACGIH nel 2000 ha proposto per le polveri inalabili di farine un TLV-TWA di $0,5 \text{ mg/m}^3$.

Questo valore risulterebbe tutelativo per la maggior parte degli esposti, ma spesso molte operazioni eccedono ampiamente tale limite di esposizione proposto. In vari paesi europei sono stati misurati i livelli ambientali in panifici tradizionali e della grande distribuzione. Durante i processi di panificazione si possono individuare alcune fasi in cui vi è esposizione ad alti livelli di farina nell'aria quali: caricamento dell'impastatrice, pulizia delle macchine e dei piani di lavoro, lancio di farina sulle superfici di lavoro per evitare l'aderenza dell'impasto. Impasto e formatura costituiscono le mansioni con maggiore esposizione per periodi prolungati, con picchi particolarmente elevati. Valori di picco molto alti, sottostimati dalle misurazioni sull'intero turno di lavoro, sono stati documentati sia nel corso di operazioni ricorrenti (sfarinamento, setacciatura, svuotamento sacchi, ecc.) che durante operazioni saltuarie per pulizia o manutenzione. Nella grande distribuzione i lavoratori che stanno all'inizio della catena produttiva (impastatori, quelli che fanno la forma del pane) hanno l'esposizione più alta alla farina (in media $3-6 \text{ mg/m}^3$ per 8 ore di lavoro) (10); gli addetti ai forni hanno un'esposizione intermedia alla polvere (in media $1-3 \text{ mg/m}^3$ per 8 ore di lavoro) mentre quelli addetti all'impacchettamento e al taglio del pane hanno l'esposizione più bassa (al di sotto di 1 mg/m^3) (11). In Inghilterra, l'unico studio pubblicato ha messo in evidenza un'esposizione media a $1,2 \text{ mg/m}^3$ di polveri inalabili nei panificatori, la media totale comprese le altre mansioni era di $0,5 \text{ mg/m}^3$ (12). In generale nella grande distribuzione i livelli sono inferiori considerando la maggior attenzione nei confronti di salute e sicurezza sul lavoro e la maggiore automatizzazione dei processi. Le dimensioni della realtà produttiva sono considerate quindi un indicatore di minor rischio (13,14,15).

Se in passato veniva misurata solo la polverosità ambientale con metodo gravimetrico, oggi con i moderni metodi di immunochimica si riescono a misurare i livelli di allergeni come le frazioni proteiche del grano e l'alfa amilasi sia utilizzando campionamenti fissi che personali. I livelli più alti di allergeni sono stati misurati per le polveri inalabili di farina mentre più bassi livelli sono stati misurati per l'alfa amilasi ($0,61 \text{ ng/m}^3$ per i panificatori belgi di Bulat et al 2004 (5)) spesso anche al di sotto del limite di misurabilità (10). La correlazione tra

sintomi respiratori e sensibilizzazione e livelli di polvere inalabile e concentrazione di allergeni è stata ampiamente dimostrata (7). Recenti studi giudicano in $1,7 \text{ mg/m}^3$ il livello minimo di polvere in grado di indurre la sensibilizzazione e la comparsa di sintomi respiratori (il contenuto allergenico varierebbe in questi casi da 2,4 a 6 ng per mg di polvere di farina) (16). La sensibilizzazione allergica per l' α -amilasi fungina, che è un additivo della farina, sarebbe indotta per concentrazioni ambientali pari o superiori a $0,25 \text{ ng/m}^3$ (17). L'associazione tra polvere e sintomi respiratori evidenzia un incremento del rischio di asma per concentrazioni di polvere inalabile pari o superiore a 3 mg/m^3 , valori pari o superiori ad 1 mg/m^3 indurrebbero un maggior rischio di rinite (17).

Alla luce di queste osservazioni è fondamentale ridurre le operazioni a maggior rischio, individuando e attuando procedure in grado di abbattere l'esposizione. E' dimostrato che accurate misurazioni degli allergeni sul luogo di lavoro, associate alla formazione e informazione dei lavoratori e alla supervisione possono ridurre significativamente i livelli di esposizione dei panificatori.

Negli anni i livelli di esposizione a farine si sono sicuramente ridotti grazie a regolamenti e direttive emanate sia a livello nazionale che europeo, resta centrale il ruolo delle figure della prevenzione in azienda perché le misure generali di tutela vengano messe in atto e monitorate.

ETIOPATOGENESI

L'asma dei panificatori è il classico esempio di asma occupazionale con un periodo di latenza variabile tra 1 e 5 anni, di tipo IgE mediato. Le reazioni asmatiche dovute alle farine sono generalmente di tipo immediato ma sono possibili anche reazioni di tipo ritardato o dual (18). Gli allergeni presenti nelle farine di cereali sono stati a lungo considerati la causa principale del Baker's Asthma. Sono invece di importanza rilevante anche altri ingredienti presenti nell'impasto, come gli enzimi utilizzati per migliorare l'impasto, o i contaminanti come le muffe (19).

La farina è costituita da una miscela complessa di peptidi e zuccheri, molti dei quali sono dei potenziali allergeni che possono indurre sensibilizzazione dopo inalazione (il grano, ad esempio, contiene quattro frazioni proteiche tutte capaci di determinare sensibilizzazione ed asma: albumina, globulina, gliadina, glutamina). La reattività più forte, in vitro, è stata osservata con le proteine idrosolubili, in particolare l'albumina (7, 20, 21) e per le proteine presenti nella banda 12-17 kDa che sono definiti allergeni maggiori (tra queste si trovano l' α -amilasi e la tripsina) (2). Si sono trovate anche IgE verso proteine non idrosolubili come la gliadina, la globulina e la gluteina (7, 22).

Gli agenti etiologici comprendono proteine ed altri costituenti le piante e i semi e sostanze esterne alle piante, che possono contaminare le farine, nei siti di conservazione o durante la lavorazione.

L'alfa amilasi fungina è un enzima capace di catalizzare l'idrolisi del legame alfa 1,4 glucosidico in vari polisaccaridi e viene utilizzata dagli anni '80 per migliorare le qualità dell'impasto. Molti casi di asma del panificatore possono essere imputabili a questo enzima.

In relazione alla modalità di esposizione, l'allergia alle farine può manifestarsi in altri modi, ad esempio l'ingestione può provocare dermatite atopica, sintomi gastrointestinali o anafilassi legata all'esercizio fisico. La cross reattività tra gli allergeni della farina e altri cereali o piante può essere spiegata con la presenza di epitopi comuni. In particolare l'allergene più condiviso risulta una non specific lipid transfer protein (LTPs) che agisce come induttore della risposta immunitaria sia per via inalatoria che per via alimentare (23).

Il gruppo delle proteine denominate inibitori dell'alfa amilasi è considerato il maggior responsabile dell'asma del panificatore e comprende proteine monomeriche, dimeriche e tetrameriche (24) sia solubili in acqua che in etanolo. Ad oggi non esiste un pannello completo di allergeni ricombinanti della farina che aiuti nel distinguere tra una prima

sensibilizzazione e una cross reattività ma sviluppi futuri aiuteranno ad orientare la diagnosi in modo più specifico (24).

Il meccanismo patogenetico vede alla base l'attivazione della risposta allergica da parte delle cellule T che con la secrezione di citochine instaurano e mantengono l'infiammazione delle vie aeree. Le cellule T CD4+ sono state tipicamente classificate in due popolazioni funzionalmente distinte, Th1 e Th2, sulla base dei relativi profili citochinici espressi in vitro da parte di cloni cellulari di origine murina. Le cellule Th1 producono IFN γ e TNF β , promuovendo lo sviluppo di cellule T ad attività citotossica e dei macrofagi, determinando l'immunità cellulare. È invece noto che le cellule Th2 producono IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, che sono coinvolte nella risposta di tipo umorale, tipica dell'atopia e delle infezioni parassitarie. Le citochine prodotte dalle cellule CD4 Th2 (helper), favoriscono la crescita e la differenziazione delle cellule, le attivano e le inducono a migrare nelle vie aeree, dove ne prolungano la sopravvivenza.

FARINE DI CEREALI	FRUTTA SECCA
• Frumento	SEMI DI SESAMO
• Segale	COLORANTI
• Orzo	SPEZIE
• Luppolo	UOVO
• Riso	LATTE
• Grano	BLATELLA
ALTRE FARINE	MUFFE
• Grano saraceno	• Alternaria
• Soia	• Aspergillo
ADDITIVI ENZIMATICI	
• α -amilasi	
• cellulasi	
• xylanasi	
• altre proteasi	

Tabella 1: Allergeni nel settore della panificazione. Oltre alle farine possono svolgere un ruolo anche vari additivi, alimenti, ed agenti biologici (11).

Le principali citochine coinvolte comprendono l'interleuchina IL-4, necessaria per la produzione di IgE; l' IL-5, che è un fattore chemiotattico per gli eosinofili, e il fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi, simile all' IL-5 per i suoi effetti sugli eosinofili, ma meno potente. Nella figura 1 vengono riportati sinteticamente i meccanismi patogenetici sopra descritti.

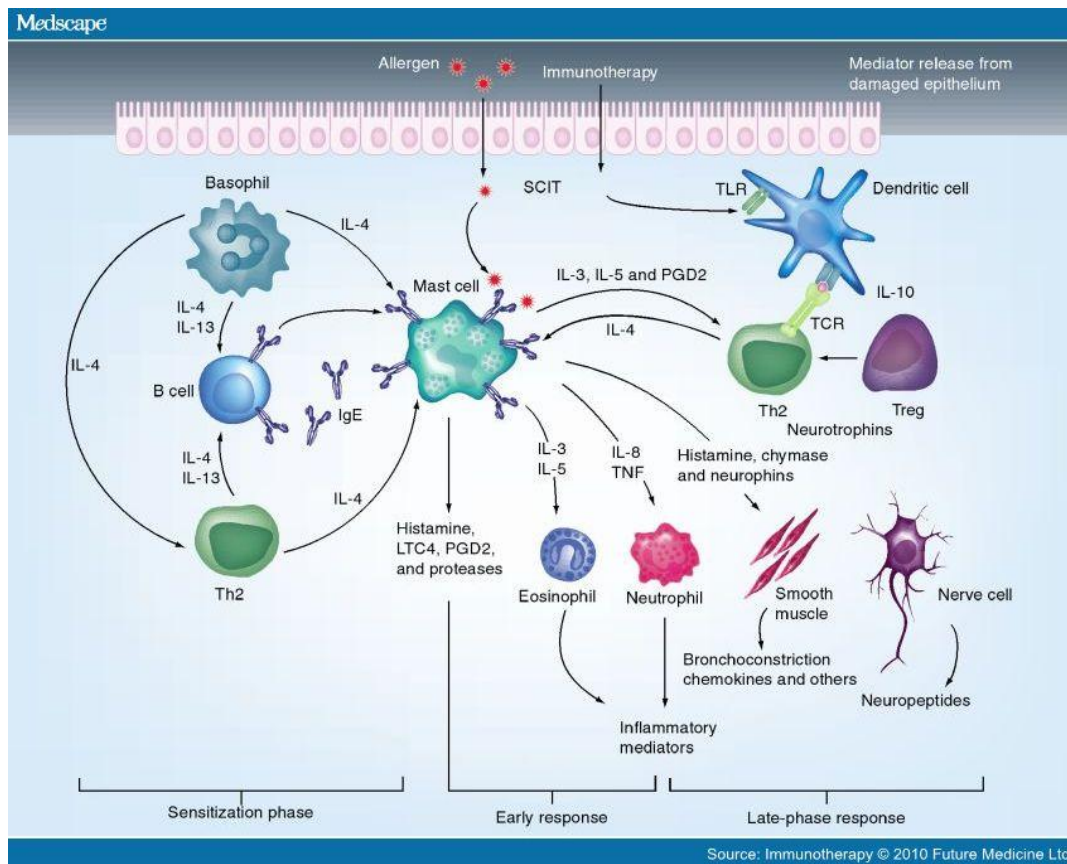


Figura 1: attivazione cellulare e secrezione di citochine nell'asma.

Sebbene biopsie bronchiali di asmatici atopici abbiano evidenziato un repertorio citochinico Th2, studi sull'asma e rinite allergiche hanno evidenziato anche un'aumentata espressione della citochina Th1 $IFN\gamma$, che può presentarsi nel caso di riacutizzazione dell'asma. L' $IFN\gamma$ può, inoltre, contribuire all'attivazione degli eosinofili e svolgere un ruolo pro infiammatorio nell'asma. E' stato anche osservato come l'IL-10 possa inibire la produzione di citochine pro infiammatorie da parte delle cellule effettrici sia Th1 sia Th2.

Anche le endotossine (25), che sono componenti tossici della membrana esterna dei batteri gram negativi, sembrano implicate nella patogenesi dell'asma. Sono costituite da proteine, lipidi e lipopolisaccaridi (LPS). Il LPS dei batteri gram negativi è una macromolecola anfotera, stabile al calore e idrosolubile, responsabile di buona parte delle proprietà biologiche delle endotossine batteriche. La tossicità è associata alla componente lipidica, mentre l'immunogenicità alla componente polisaccaridica; spesso i termini LPS e endotossina vengono utilizzati (erroneamente) come sinonimi. Le endotossine sono induttori non specifici dell'infiammazione, stimolano varie cellule a produrre citochine, incluse IL-1 e $TNF\alpha$ e attivano il complemento per la via alternativa.

L'esposizione alle endotossine nei luoghi di lavoro è associata a febbre, tosse, fiato corto, sibili, irritazione nasale e toracica, restrizione acuta del flusso nelle vie aeree e infiammazione. Le endotossine agiscono peggiorando le patologie: agiscono come coadiuvanti naturali nel peggiorare l'asma e l'infiammazione negli atopici, oppure agiscono da sole, provocando effetti avversi sulla funzione polmonare e sulle risposte infiammatorie (25).

Alcuni studi dimostrano, tuttavia, che le endotossine possono svolgere una funzione protettiva nei confronti dell'asma atopico nei primi anni di vita, mentre negli adulti avrebbero una funzione favorente lo sviluppo delle patologie respiratorie (25). Questo aspetto fa parte della cosiddetta "igiene hypotesis" secondo la quale l'esposizione a microrganismi o infezioni nella prima infanzia sarebbero associati a ridotto rischio di atopia. La mancata stimolazione del Toll like receptor infatti sbilancerebbe la risposta immunitaria verso la produzione di citochine di tipo Th2. Secondo alcuni studi l'esposizione a endotossine risulterebbe protettiva anche nei confronti del cancro. L'esposizione a endotossine sarebbe, inoltre, direttamente proporzionale al rischio di sviluppare asma nell'adulto e inversamente proporzionale a rischio di atopia e l'esposizione nel neonato aumenterebbe il rischio di asma. Una scoperta importante per capire la tossicità delle endotossine è stata quella della famiglia dei recettori TLR ("toll-like receptor") ed in particolare del TLR-4 (26). Questi recettori scatenano la secrezione di citochine infiammatorie nelle cellule, portando allo sviluppo di infiammazione nel sito di azione e nel resto dell'organismo.

Le endotossine presenti nelle polveri organiche, a livello delle vie aeree, si legherebbero tramite il LPS alla Lipidic Binding Protein (LPB) che fa parte della risposta immunitaria aspecifica e si trova nelle secrezioni che ricoprono la superficie delle vie aeree. Questo legame sarebbe riconosciuto dal CD14 presente su monociti e macrofagi e stimolerebbe l'invio di un segnale al Toll like receptor (TLR4). Inoltre il CD14 solubile stimolerebbe l'internalizzazione delle endotossine da parte delle cellule dendritiche ed epiteliali portando a una cascata citochinica fino alla produzione di IL 1 β , INF α , IL 6 (Fig 2).

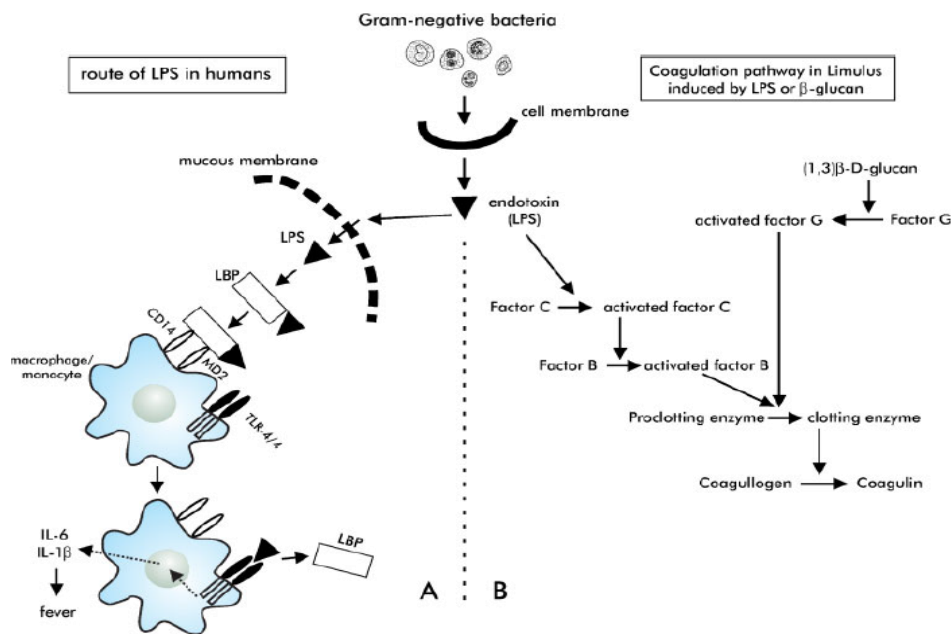


Figura. 2: Ruolo del TLR4 e CD14 nel legame con le endotossine (25)

Di rilievo è che nelle farine sono state riscontrate alte concentrazioni di endotossine (in alcuni studi sono state evidenziate quantità prossime a 4000 EU/mg) (25, 27).

In modelli animali è stato osservato che il LPS a basse dosi determina l'attivazione di una reazione Th 2 mediata mentre ad alte dosi promuove una reazione Th1-Th17 mediata (28) (Fig.3).

Topi geneticamente privi dei TLR4 si sono dimostrati incapaci di sviluppare una reazione infiammatoria polmonare se esposti a LPS per via inalatoria (30). Molti studi sono stati rivolti a vedere i polimorfismi nel gene che controlla il TLR-4/+896 e diversi studi su animali hanno messo in evidenza che altri geni, a parte quelli che regolano il TLR-4 (TLR4/+896, TLR4/+1196), come il CD14 e MyD88, sono importanti nella risposta infiammatoria delle endotossine (26,31). Infatti, è noto che il CD14 (CD14/-159) gioca un ruolo importante nel legame delle endotossine alle superfici cellulari, quindi polimorfismi nei geni che regolano questi recettori possono influenzare la risposta infiammatoria che si sviluppa in seguito all'inalazione delle stesse endotossine o di polveri che le contengono (9). Michael nel 2003 ha dimostrato che i topi eterozigoti per il gene TLR4+869 e TLR4+1196 sviluppavano una minor risposta infiammatoria nei confronti del LPS (31).

Il ruolo di alcune citochine come l' IL 6 è tuttora controverso. Diverse esperienze dimostrano che l'IL6 abbia un ruolo nella regolazione della risposta infiammatoria durante infezioni da Gram+. Tuttavia è riportato che l'IL6 abbia sia effetti pro anche anti infiammatori.

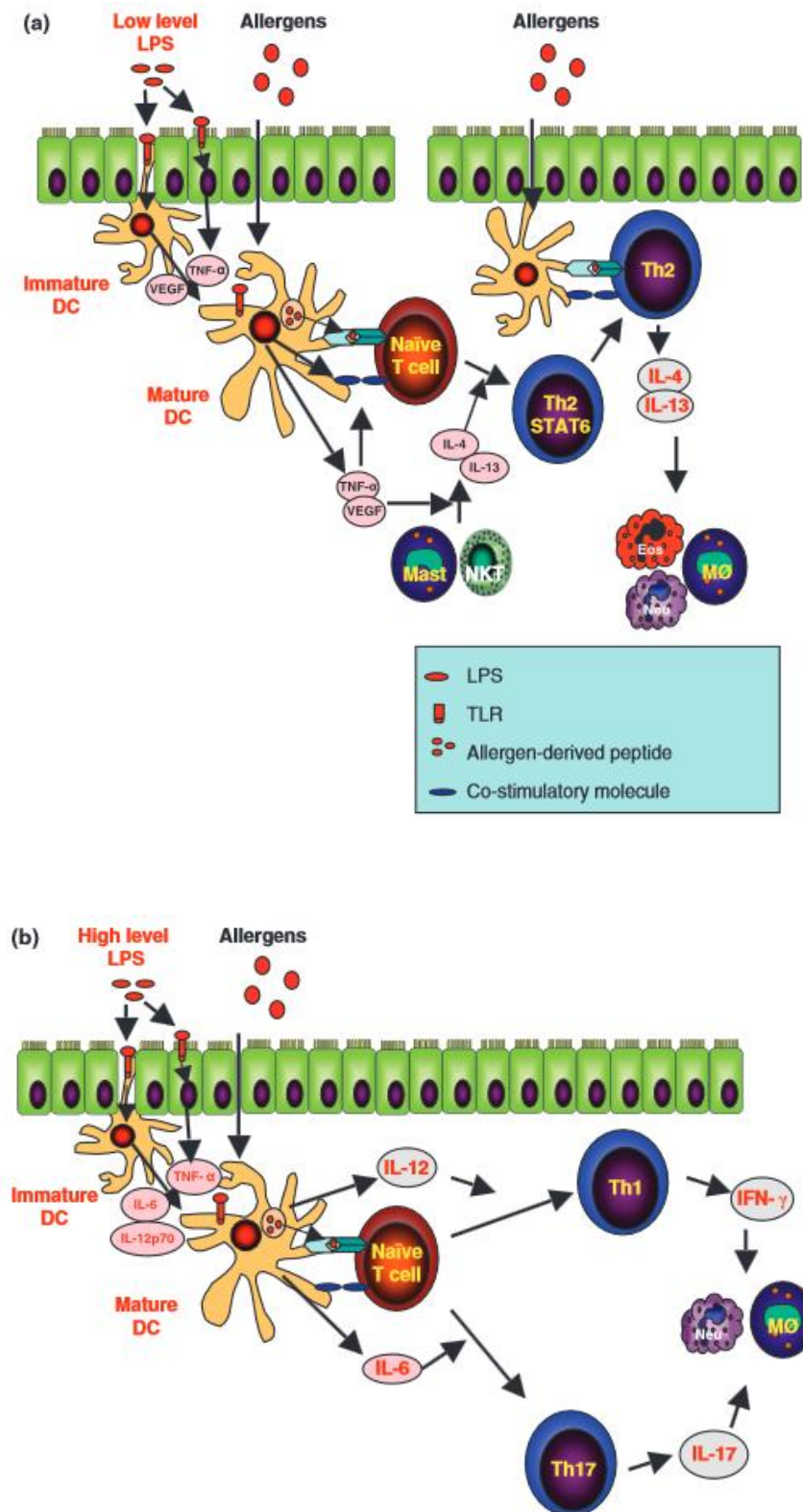


Figura 3: Meccanismo proposto secondo cui il LPS modula la risposta immunitaria indotta dall'esposizione ad aeroallergeni e la risposta adattativa, Th1, Th 2 e Th 17 mediata nei polmoni (28)

Per altro, alcuni autori svedesi hanno evidenziato come la capacità di produrre IL-6 e IL-8 nelle esposizioni a polveri organiche possa essere una risposta a stimoli infiammatori in termini di reazione di difesa, da intendere come una risposta benefica (33). In particolare l'IL-8 giocherebbe un ruolo di reclutamento dei neutrofili mentre l'IL-6 sarebbe coinvolta nelle fasi acute con produzione di anticorpi (33).

In un altro studio, è stato dimostrato che le persone iporesponsive al LPS per via inalatoria avevano una minore secrezione di IL-6 e IL-8 da parte dei monociti del sangue periferico (34).

Secondo Rylander gli atopici presentano valori inferiori di IL-6 e IL-8 (35), è concepibile che tali individui sviluppino un'inflammatione meno grave dopo esposizione alle endotossine contenenti polveri. Questa conclusione concorda con un precedente studio in cui la risposta al LPS per via inalatoria è stata meno pronunciata tra atopici (31).

Il ruolo di queste interleuchine è tutt'ora da approfondire e sarà anche scopo del nostro studio.

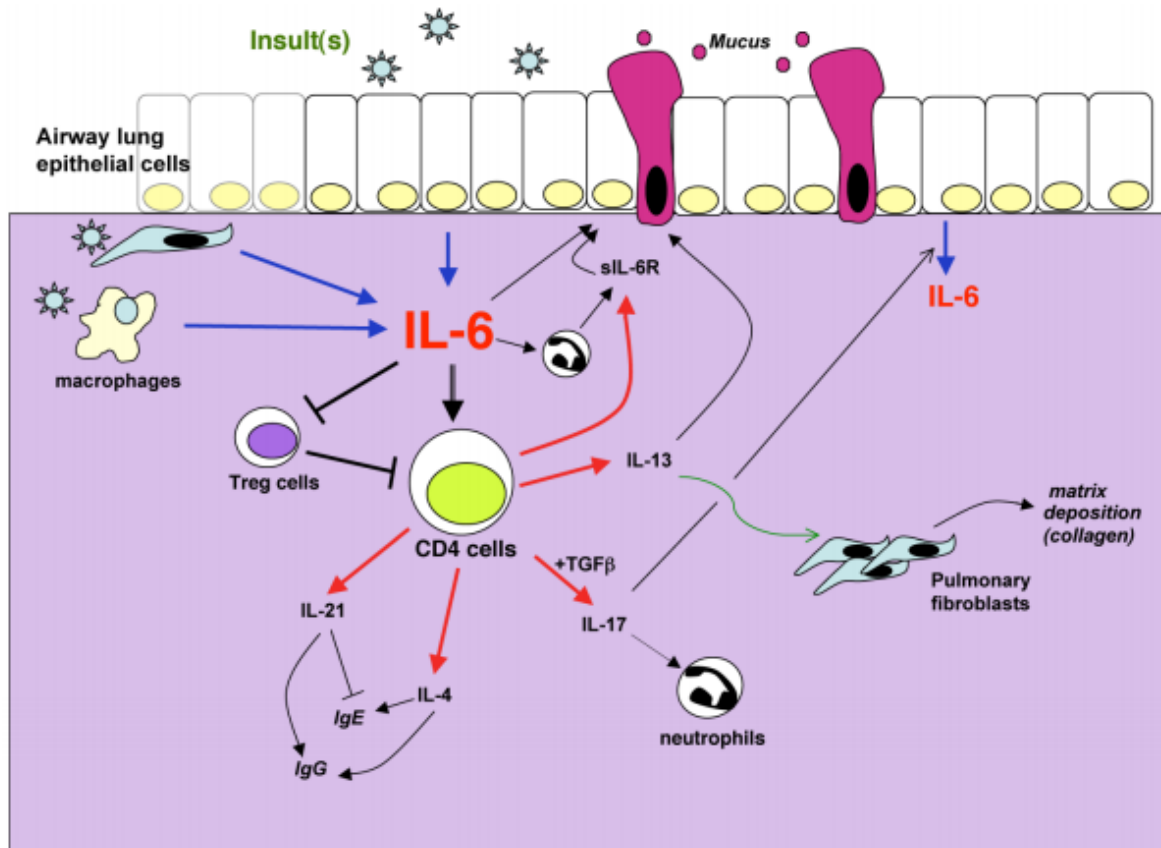


Figura 4 . Potenziali meccanismo con cui l'IL6 contribuisce al danno polmonare. L'IL6 nel polmone può essere prodotta da differenti tipi cellulari come cellule epiteliali, fibroblasti interstiziali, macrofagi e altre cellule infiammatorie. La produzione è indotta da vari stimoli definiti come “insulti” perché molto spesso creano stress o danno cellulare. Questi includono allergeni, virus respiratori, esercizio fisico, particolato atmosferico, particelle tossiche inalate. L'IL6 può regolare differenti risposte delle cellule T-CD4 come la produzione di citochine, di recettori solubili per IL6, o sopprimerne l'attività. Questi mediatori contribuiscono a loro volta al danno polmonare attraverso la produzione di muco, deposizione di matrice, rilascio di proteine dai granulociti. In presenza di recettori solubili per IL6, l'IL6 può inoltre regolare diversi aspetti funzionali di cellule non immunitarie come le cellule epiteliali.

ASPETTI CLINICI E DIAGNOSTICI

La diagnosi dell'asma professionale non può prescindere dall'analisi degli aspetti clinici e professionali, di fondamentale importanza anche i test di laboratorio e diagnostici. Nuovi test sono stati utilizzati in studi sperimentali, alcuni di questi sono argomento di questa tesi e verranno illustrati di seguito.

Manifestazioni cliniche

I sintomi caratteristici dell'asma sono sibili espiratori, dispnea e tosse; tali sintomi possono essere più marcati durante la notte e tipicamente possono provocare il risveglio del paziente. I pazienti riferiscono la cosiddetta "fame d'aria", cioè la percezione di fatica nel riempire d'aria i polmoni. In alcuni pazienti vi è anche la produzione di muco che si presenta vischioso e difficile da espettorare. Può verificarsi iperventilazione, con uso dei muscoli accessori per facilitare la respirazione (36).

Durante un attacco acuto, il paziente mostra una sofferenza respiratoria di vario grado a seconda della gravità e della durata dell'episodio. Sono presenti tachipnea e tachicardia. Il paziente preferisce sedere ben dritto o sporto in avanti, usa i muscoli respiratori accessori, è ansioso e sembra combattere per respirare. L'esame del torace mostra una fase espiratoria prolungata con sibili di tonalità relativamente alta durante tutta l'inspirazione e la maggior parte dell'espirazione. Il torace può apparire nettamente iperespanso per effetto dell'intrappolamento di aria. Ronchi grossolani possono accompagnare i sibili, ma non si auscultano fini rantoli, a meno che non ci sia una concomitante presenza di polmonite, atelettasia o scompenso cardiaco.

Durante gli episodi di maggior gravità, il paziente può non essere in grado di pronunciare più di qualche parola per volta senza doversi fermare per prendere fiato. Affaticamento e grave sofferenza sono evidenziati da movimenti respiratori rapidi, superficiali e inefficaci. Col peggioramento dell'attacco diventa manifesta la cianosi. Stato confusionale e letargia possono indicare l'insorgere di uno scompenso respiratorio ingravescente con narcosi da CO₂. In tali pazienti, l'auscultazione può evidenziare solo pochi sibili, dal momento che l'ostruzione diffusa da tappi di muco e l'affaticamento del paziente comportano una marcata riduzione del flusso aereo e degli scambi gassosi. I segni più affidabili di un grave attacco sono la dispnea a riposo, la difficoltà nel parlare, la cianosi, il polso paradossale (> 20-30 mm Hg) e l'uso dei

muscoli accessori della respirazione. La valutazione più precisa della gravità è fornita dalla misurazione dei gas nel sangue arterioso.

Nell'intervallo tra gli attacchi acuti, i suoni respiratori possono risultare normali durante la respirazione tranquilla. Tuttavia, fini sibili possono essere auscultati durante l'espiazione forzata o dopo sforzo. In alcuni pazienti si può rilevare costantemente un respiro appena o moderatamente sibilante, anche quando sono asintomatici. In caso di grave asma persistente da lungo tempo, specie se fin dall'infanzia, un' iperespansione cronica può deformare la gabbia toracica, producendo p. es., il torace "a botte", l'inarcamento anteriore dello sterno o l'abbassamento del diaframma (37).

Molto spesso i sintomi sono però più sfumati, caratterizzati da tosse non costante che può essere o meno accompagnata da rinite e congiuntivite, che si può manifestare a fine giornata o di notte e può regredire o persistere all'allontanamento dell'allergene.

Diagnosi

Da un punto di vista strettamente clinico non è possibile differenziare l'asma occupazionale da quella causata da altri agenti ambientali. Infatti per stabilire l'origine di tale patologia è necessario verificare la presenza di un nesso di causa tra malattia ed esposizione professionale.

L'asma del panificatore è la più grave delle manifestazioni cliniche presenti nei soggetti esposti professionalmente a farine di frumento. Generalmente l'evoluzione naturale della patologia rispetta quella che è conosciuta come la marcia allergica, cioè il percorso che ha come step iniziale la sensibilizzazione e la successiva comparsa di orticaria, rinite e infine di asma. La rinite è in genere la manifestazione che si presenta più frequentemente.

Un corretto approccio diagnostico prevede:

- Raccolta anamnestica con particolare riferimento all'anamnesi allergologica e professionale ed un esame clinico del torace
- Una diagnosi funzionale basata sui test di funzionalità respiratoria e sul test di bronco stimolazione aspecifica
- Una diagnosi eziologica, basata sui test allergologici e sul test di bronco stimolazione specifica (38).

Anamnesi

La caratterizzazione della storia clinica ed occupazionale del paziente è indispensabile ai fini della diagnosi. I sintomi possono presentarsi durante il lavoro, ma anche in molti casi dopo la fine del turno lavorativo, spesso di sera e anche durante la notte (38).

Di particolare rilevanza, da un punto di vista anamnestico, riveste il fenomeno comunemente descritto come “test arresto ripresa” (TAR) rappresentato dalla remissione dei sintomi respiratori durante il periodo di allontanamento del lavoro e la loro ricomparsa alla ripresa dell’attività lavorativa. Tale caratteristica può essere oggettivata monitorando il paziente sia prima che dopo il reintegro sul posto di lavoro attraverso esame obiettivo del torace ed esami spirometrici (39).

A volte la sintomatologia, in rapporto anche alla gravità della malattia, può sganciarsi dall’esposizione, ed i brevi periodi di ferie possono non essere sufficienti a produrre un evidente miglioramento. Il ciclo produttivo va indagato per individuare asmogeni noti o per la presenza di forti irritanti. Inoltre il rapporto stabilito dal paziente tra particolari compiti e lo sviluppo della sintomatologia deve focalizzare l’attenzione sulle sostanze e sulle quantità presenti in quella particolare fase del processo produttivo (38).

Monitoraggio del PEF

Il monitoraggio del picco di flusso espiratorio o PEF permette di valutare in maniera approssimativa la funzionalità polmonare del lavoratore attraverso misurazioni successive effettuato mentre svolge le sue mansioni specifiche. Questa indagine viene effettuata attraverso misuratori portatili con i quali è possibile valutare le variazioni del PEF in relazione alla potenziale esposizione ad agenti asmogeni.

Operativamente vengono eseguite 4-5 misurazioni al giorno per almeno 2-3 settimane lavorative consecutive in cui il soggetto sia stato esposto alle sostanze sospette seguite dal monitoraggio per una settimana lontano dal luogo di lavoro.

Lo scopo di questo esame è principalmente effettuare una valutazione dinamica in soggetti con sospetta asma professionale;

I limiti di tale test sono:

- La difficoltà di standardizzarne l’esecuzione da parte del paziente
- L’impossibilità di verificare l’esatta esecuzione del test da parte dell’esaminatore (38, 40).

Test di funzionalità respiratoria

Le prove di funzionalità respiratoria permettono di evidenziare da un lato l'entità dell'ostruzione bronchiale, dall'altro permettono di effettuare una valutazione dinamica della meccanica polmonare del paziente asmatico.

Nelle tabelle sottostanti sono rappresentate le caratteristiche spirometriche dell'asma bronchiale secondo i criteri dell'American Thoracic Society (ATS):

Caratteristiche fisiopatologiche dell'asma bronchiale	
Reversibilità	Dopo inalazione di beta2-agonista aumento del FEV1 del 12% e di volumi >200 ml
Variabilità	Variabilità giornaliera del PEF > al 20%
Ipereattività bronchiale	Aumentata responsività bronchiale alla metacolina, all'istamina ed ad altri stimoli

Tabella 2: Caratteristiche fisiopatologiche dell'asma secondo le linee guida dell'ATS(2008)

Parametri di definizione del grado di ostruzione	
Lieve	FEV1:70-80%
Moderato	FEV1:60-69%
Moderato/severo	FEV1:50-59%
Severo	FEV1:35-49%
Molto severo	FEV1<35%

Tabella 3: classificazione dell'asma bronchiale in base al grado di ostruzione secondo le linee guida dell'ATS (2008)

Osservazione	Lieve	Moderata	Grave	Arresto respiratorio imminente
Dispnea	Mentre cammina	Mentre parla Neonati: pianto più dolce e breve	A riposo Neonati: smettono di mangiare	
	Può sdraiarsi	Preferisce posizione seduta	Posizione con busto piegato in avanti	
Capacità di parlare	A periodi	A frasi	A parole	
Stato di vigilanza	Può essere agitato	Generalmente agitato	Generalmente agitato	Confuso o letargico
Frequenza respiratoria	Aumentata	Aumentata	Spesso > 30/min	
	Frequenze respiratorie in bambini svegli: Età: < 2 mesi < 60 /min 2-12 mesi < 50/min 1-5 anni < 40/min 6-8 anni < 30 /min			
Muscoli accessori e retrazione retrosternale	Generalmente no	Generalmente si	Generalmente si	Movimenti paradossi toraco-addominali
Sibili	Moderati, spesso solo tele espiratori	Forti	Generalmente forti	Assenza di sibili
Frequenza cardiaca	< 100	100-120	> 120	Bradicardia
Pulsazioni/min	Limiti normali del polso nei bambini: Neonati 2-12 mesi - Polso normale < 160/min Età prescolare 1-2 anni < 120/min Età scolare 2-8 anni < 110 /min			
Polso paradosso	Assente < 10 mmHg	Può essere presente 10-25 mm Hg	Spesso presente > 25 mm Hg (adulti) 20-40 mm Hg (bambini)	L'assenza suggerisce affaticamento dei muscoli respiratori
PEF dopo broncodilatatore % predetto % migliore personale	oltre 80%	Circa 60-80%	< 60% predetto o migliore personale (<100L/min adulti) o risposta al broncodilatatore durata < 2 ore	
PaO ₂ (in aria) § e/o PaCO ₂ (in aria) §	Normale test spesso non necessario; < 45 mm Hg	> 60 mm Hg < 45 mm Hg	< 60 mmHg Cianosi possibile > 45 mm Hg. Possibile collasso respiratorio (vedi testo)	
SaO ₂ (in aria) §	> 95%	91-95%	< 90%	
Ipercapnia (ipoventilazione) si sviluppa più facilmente e più rapidamente nei bambini che negli adolescenti e adulti				
* Nota: la presenza di più parametri, ma non necessariamente di tutti § Internazionalmente vengono anche usati i Kilopascals; nel qual caso sarebbe opportuno praticare una conversione.				

Tabella 4: Stima della gravità delle riacutizzazioni di asma (45)

Inoltre vengono valutati altri indici utili a meglio definire il quadro:

- Riduzione della Capacità vitale (CV)
- Riduzione indice di Tiffeneau (FEV1 /CV x 100)
- Riduzione della massima velocità di flusso espiratorio (PEF)
- Riduzione della conduttanza delle vie aeree (sGaw)
- Aumento delle resistenze delle vie aeree
- Riduzione del volume di riserva inspiratoria (VRI)
- Riduzione del volume di riserva espiratoria (VRE)
- Aumento del volume residuo (VR)
- Aumento della capacità funzionale residua (CFR)

La valutazione dei volumi sopra elencati permette di differenziare sindromi ostruttive da quelle restrittive; l'agente più importante in questo caso è l'indice di Tiffeneau che in caso di patologie ostruttive risulta $< 88-89\%$ del valore predetto.

In caso di patologia asmatica in fase quiescente il FEV1 è almeno l'80% del valore predetto.

Durante i periodi sintomatici il FEV 1 scende anche al 70% di tale valore.

Nel corso delle prove di funzionalità respiratoria viene anche effettuato il test di reversibilità dopo somministrazione di beta2-agonista; il test viene considerato positivo con un aumento del FEV 1 post broncodilatatore almeno del 12% e $> 200\text{ml}$. La somministrazione del broncodilatatore è di solito rappresentata da una dose, per via inalatoria, di 200-400 mg di salbutamolo o 100 – 400 mg di terbutalina. Nel caso in cui non ci sia un pieno recupero dopo broncodilatatore è necessaria la somministrazione di steroidi quali beclometasone 200 mg o steroidi equivalenti per via inalatoria.

I meccanismi che consentono ai corticosteroidi di risolvere il quadro sono legati ad un'azione sulla flogosi bronchiale.

In conclusione si può affermare che, in caso di sospetta o certa asma bronchiale, le prove di funzionalità respiratoria servono a:

- Confermare la diagnosi di asma
- Valutarne la gravità
- Valutare la risposta alla terapia (39)

L'esame spirometrico necessita però, per essere valido, della piena collaborazione del paziente, che quindi va istruito attentamente (40)

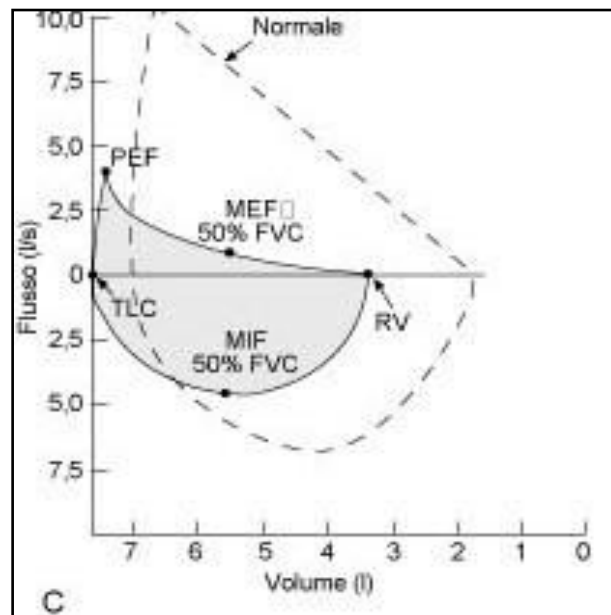


Figura 5: Curva flusso-volume. Normale. La parte inspiratoria della curva è simmetrica e convessa. La parte espiratoria è lineare. A volte il picco di flusso espiratorio è utilizzato per valutare il grado di ostruzione delle vie aeree ma è molto influenzato dallo sforzo del paziente. **BPCO, asma (area evidenziata).** Sebbene tutti i flussi polmonari siano diminuiti, il prolungamento dell'espirazione predomina (42).

Test di bronco stimolazione aspecifica (TBPA)

Il test di broncostimolazione aspecifica è un metodo diagnostico che consente di evidenziare l'iperreattività bronchiale, una delle caratteristiche principali della patologia asmatica, misurandone contemporaneamente la severità.

Lo stimolo a cui viene sottoposto il paziente, come dice il nome dell'esame, non è specifico stando ciò ad indicare che il paziente non è sensibilizzato (o potrebbe esserlo) nei confronti di tale agente. Le sostanze utilizzate a tal fine causano bronco costrizione a base dosi nei soggetti asmatici, proprio per l'aumentata reattività bronchiale, ma ad alte dosi sono in grado di stimolare lo stesso tipo di reazione anche nei soggetti sani.

Gli stimoli utilizzati possono essere di natura fisica o chimica.

Nel primo gruppo rientrano lo sforzo fisico (test da sforzo), il freddo e la nebbia (test con nebbia ultrasonica). Lo svantaggio di tali test è l'impossibilità di calcolare con precisione la dose di stimolo somministrata e quindi la valutazione del grado di iperreattività bronchiale risulta essere piuttosto approssimativa.

Gli stimoli chimici sono rappresentati da sostanze ad azione colinergica (bronco-costrittrice) quali istamina e metacolina. Queste sostanze possono essere dosate in maniera precisa permettendo di descrivere una accurata curva dose-risposta cumulativa partendo da dosi basse a dosaggi più elevati. Tali sostanze possiedono inoltre una breve emivita e quindi riducono al minimo le sequele sul paziente al termine del test.

Per questa serie di motivi le sostanze chimiche sono più utilizzate.

E' necessario sottolineare che presupposto all'esecuzione dell'esame è che il paziente presenti un FEV1 > 80% rispetto al valore teorico.

La sostanza bronco costrittrice può essere erogata in due modi:

- In aerosol che viene inalato durante una lunga inspirazione attraverso un apposito erogatore; attraverso tale metodica il grado di iperreattività viene associato alla dose minima in grado di provocare tale effetto; questa dose viene chiamata "provocative dose", PD.
- Attraverso inalazione continua di aerosol somministrato in flusso continuo per 2 minuti; in questo caso viene espressa una "provocative concentration", PC.

Dopo ogni singola dose inalata viene eseguito un esame spirometrico per valutare il grado di ostruzione bronchiale.

I risultati dei 2 metodi sono praticamente sovrapponibili.

Il parametro spirometrico più utilizzato per tale valutazione è il FEV1: l'esame viene considerato positivo con riduzione del FEV1 pari al 20% del valore basale dello stesso parametro.

In alcuni casi è tuttavia possibile adottare come significativa anche una caduta del FEV1 pari al 15%.

Inizialmente vengono somministrate dosi piccolissime di colinergico (generalmente 50 – 100 mcg/ml) per salvaguardare la sicurezza del paziente nel caso in cui sia portatore di grave iperreattività bronchiale. In assenza di una risposta significativa la dose viene gradualmente incrementata tenendo in considerazione il fatto che la lunga durata d'azione di tali sostanze permette di raggiungere progressivamente dosi cumulative efficaci della sostanza. In particolare viene chiamata PD20 quella dose cumulativa in grado di provocare una caduta del FEV1 del 20% rispetto al basale.

Il test di broncostimolazione aspecifico con metacolina o istamina può essere utilizzato per confermare la diagnosi di asma, di asma professionale o di sindrome da distress respiratorio acuto (RADS).

Per il medico del lavoro è uno strumento necessario a confermare la presenza di patologia asmatica in un lavoratore con sintomi respiratori e per stimare il rischio di sviluppo di asma in un soggetto con rinite. Nei casi professionali è il test di broncostimolazione specifico ad evidenziare in maniera ottimale l'associazione tra esposizione lavorativa e sintomi respiratori. Il test di broncostimolazione aspecifico con metacolina, comunque, è sempre utilizzato in prima istanza per confermare la presenza di una iperreattività delle vie aeree; con l'eccezione di alcuni casi di asma professionale in cui il TBPA può essere negativo, il test di solito mostra una elevata sensibilità per la diagnosi di asma. Per altro, dal momento che l'iperreattività bronchiale può essere determinata da molti fattori, la specificità di questo esame è bassa. Per tale motivo la positività del test non significa necessariamente che il paziente è affetto da asma: una non corretta interpretazione di tale test può portare a varie conseguenze sia sulla salute, sia in termini lavorativi (46).

Didascalico è il caso dei soggetti con asma professionale in periodo intercritico in cui il livello di reattività bronchiale può essere tanto più basso quanto più tempo è passato dall'ultima esposizione all'agente asmogeno. L'iperreattività bronchiale può aumentare, invece, dopo l'esposizione all'allergene durante un test di bronco stimolazione specifica (39).

Test di broncostimolazione specifico (TBPS)

La diagnosi di asma del panificatore può richiedere, oltre che degli accertamenti sopra elencati, l'esecuzione di un esame che evidenzi in maniera inequivocabile un nesso causale tra l'agente e la comparsa di asma; questo esame è il test di broncostimolazione specifico, che per tale motivo è ritenuto il gold standard per la diagnosi dell'asma del panificatore al pari di altre forme asmatiche occupazionali.

In dettaglio i test di provocazione bronchiale specifici (TPBS) hanno come principale indicazione la diagnosi etiologica dell'asma occupazionale, non altrimenti possibile, in particolare nei casi in cui l'agente occupazionale sospetto non sia tra gli asmogeni più comuni. L'esame consiste nel far inalare al paziente piccole dosi, eventualmente progressivamente crescenti, dell'agente occupazionale ritenuto responsabile dell'asma. Il livello di esposizione deve essere comunque mantenuto al di sotto del TLV-TWA. Gli agenti occupazionali possono essere somministrati in forma di aerosol, gas o particelle. Per eseguire il test il lavoratore deve essere posto in una cabina di esposizione a tenuta perfetta, dotata di sistema di ventilazione, che renda omogenea e costante nel tempo la concentrazione della sostanza testata in tutto il volume disponibile. Il test di provocazione bronchiale è modulato sulle concentrazioni della sostanza e sui tempi di esposizione. Prove di funzionalità

respiratoria si eseguono prima dell'esposizione controllata e poi in serie, fino a 8 ore dalla somministrazione della sostanza. Sono utili anche monitoraggi tardivi a 24 ore dal test con eventuale test di broncostimolazione aspecifico. Il test è considerato positivo quando si osserva una caduta di almeno il 20% del FEV₁.

Misurazione dei marcatori non invasivi di infiammazione delle vie aeree

La valutazione dell'infiammazione delle vie aeree nell'asma potrebbe essere effettuata esaminando gli eosinofili e le cellule metacromatiche riscontrati nell'espettorato spontaneo o indotto tramite soluzione salina ipertonica. Inoltre, i livelli di ossido nitrico (NO) e monossido di carbonio (CO) espirati sono stati considerati marcatori non invasivi suggestivi di infiammazione delle vie aeree nell'asma. L'ossido nitrico, prodotto dalla conversione dell'arginina attraverso la via dell'ossido nitrico sintetasi, è elevato nel polmone in diverse patologie infiammatorie polmonari che come sintomi mimano l'asma, come la bronchite eosinofila e altre patologie infiammatorie polmonari eosinofile, ma in queste patologie non c'è broncocostrizione e la spirometria risulta normale. Nel paziente asmatico, l'ossido nitrico può essere utilizzato per valutare l'andamento della terapia: è molto sensibile al trattamento steroideo per via inalatoria e i valori diminuiscono significativamente in 3-4 settimane, tornando nella norma se il paziente è ben compensato (43,44).

I livelli esalati di NO e CO sono elevati in pazienti asmatici (che non assumono glucocorticoidi inalatori), rispetto a pazienti non asmatici, ma questo non è specifico dell'asma. Né la presenza di eosinofili nell'espettorato né tanto meno il gas esalato sono ancora stati valutati dal punto di vista prospettico, quali ausili alla diagnosi di asma. Si ha quindi la necessità di disporre di ulteriori misurazioni non invasive di infiammazione delle vie aeree, che siano ulteriormente discriminanti (40, 42).

Test Immunologici

La presenza di una componente allergica può essere identificata tramite test cutanei, Skin Prick Test (SPT) o misurazioni di IgE specifiche nel siero. L'accertamento della sensibilizzazione agli allergeni presenti nelle lavorazioni per la panificazione è essenziale per la diagnosi di tale patologia e può essere d'aiuto per identificare le farine oppure l'alfa-amilasi come cause scatenanti, al fine di suggerire misure di controllo ambientale appropriate (2).

Sarà il test di provocazione bronchiale indotta con gli stessi allergeni a stabilire la causalità.

Gli SPT sono utili per la determinazione dell'atopia (attraverso uno screening dei comuni inalanti) e della sensibilizzazione allergica di 1° tipo ad allergeni inalatori professionali (farine, alfa amilasi, blatella germanica).

Gli SPT consistono nell'applicazione di una goccia di estratto allergenico sulla cute, in genere sulla superficie volare dell'avambraccio, e nel pungere poi attraverso la goccia con una lancetta sterile in modo da far penetrare la sostanza negli strati più superficiali della cute. In caso di allergia a una delle sostanze applicate compare un pomfo entro pochi minuti (10-20 minuti). Il test è considerato positivo quando il pomfo ha il diametro di almeno 3 mm. Una volta stabilito il criterio minimo di positività, la sua quantificazione è poi effettuata confrontando il risultato con il pomfo istaminico: + pomfo da $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$, ++ pomfo da $\frac{1}{2}$ a 1, +++ pomfo da 1 a 2, ++++ pomfo superiore a 2. Il risultato di un solo + è un risultato dubbio che deve essere valutato nel contesto generale della situazione clinica ed eventualmente confermato con altri test allergologici.

Prima dell'esecuzione del test è importante accertarsi che il paziente non abbia fatto uso di farmaci (soprattutto antistaminici) durante le precedenti 48 ore, che non abbia avuto episodi di shock anafilattico, che non soffra di dermopatie.

La determinazione delle IgE specifiche nel siero attraverso diversi sistemi di dosaggio disponibili in commercio, viene considerato, nella pratica diagnostica allergologica generale, come un'indagine di secondo livello, da richiedere in casi di dubbi interpretativi dei test cutanei o come loro conferma. La sua maggiore utilità consiste infatti nell'evidenziare, in caso di polisensibilizzazione, i comuni allergeni contro i quali il soggetto atopico sviluppa una maggiore risposta IgE mediata. In particolare per gli allergeni macromolecolari ad alto contenuto proteico come sono le polveri vegetali quali segale, orzo, farine ed alcuni acari minori, sono state riscontrate buone correlazioni tra IgE specifiche, test cutanei e sintomatologia, mentre per gli apteni chimici (isocianati, anidride ftalica ecc.) i risultati hanno destato dubbi interpretativi. Le IgE che hanno la funzione di anticorpi contro gli allergeni, vengono determinate su un campione di sangue con metodo immunologico (il più diffuso ed utilizzato è l'Immuno CAP Phadia-Sweden). La tecnica consiste essenzialmente nel porre il siero del paziente a contatto con un allergene coniugato con un legame di covalenza ad una fase solida (disco di carta). Se il siero contiene IgE specifiche verso un determinato allergene, queste si legano all'allergene stesso. Dopo un lavaggio per asportare altre IgE sieriche non specifiche, vengono aggiunti anticorpi anti IgE marcati con enzimi. La lettura viene effettuata con metodica foto colorimetrica.

Rispetto alla ricerca delle IgE specifiche per allergene (RAST) gli SPT hanno maggiore sensibilità e valore predittivo, le IgE hanno una maggiore specificità e valore predittivo minore.

Questi test in vivo e in vitro presentano comunque un limite in quanto non danno indicazioni precise sulla molecola responsabile della manifestazione allergica. In questi ultimi anni si sta sviluppando la tecnologia del microarray che permette l'analisi di molteplici allergeni con un solo test mediante l'analisi di specifiche IgE rivolte contro componenti ricombinanti o purificati di allergeni naturali, sia in campo occupazionale che ambientale. L'ISAAC immunoassay presenta ad oggi problemi di sensibilità intrinseci alla sua natura di microchip basato sull'impiego di minime quantità di allergene. Pertanto non sono rari casi di false negatività. In tal senso l'analisi singleplex (Immuno- CAP) offre una sensibilità decisamente migliore se è disponibile l'allergene in questione. Un'applicazione di queste metodiche si è osservata per il lattice: particolari molecole allergeniche della stessa sostanza sono state identificate come maggiori allergeni in specifici fenotipi clinici negli operatori sanitari.

Nell'allergia da farine la $\omega 5$ gliadina (Tri a 19) è stata il primo allergene associato a un fenotipo clinico denominato: anafilassi indotta dall'esercizio fisico farina dipendente ed è stato incluso nel test ISAAC 103 microarray. In questo pannello sono stati inclusi altri allergeni delle farine come l'agglutinina isolecitina 1 (Tri a 18), una frazione della gliadina (Tri a Gliadina), un inibitore dell'alfa amilasi/tripsina (Tri a 30), ma nessuno di questi è stato ancora correlato ad uno specifico fenotipo. Da un recente studio di Oliveri et al, Tri a 30, Tri a 32 e Tri a GST sono stati messi in relazione alla dermatite da contatto da farine e il Tri a 32 anche con l'asma da farine di frumento (46). Nuovi studi saranno necessari per convalidare questi risultati così come l'ampiamiento del pannello ISAAC di allergeni e dell'analisi singleplex.

Rinomanometria

E' un esame diagnostico che fornisce una valutazione dinamica della pervietà nasale misurando la pressione ed il flusso aereo attraverso le fosse nasali durante gli atti respiratori. Visualizzando le resistenze al flusso aereo attraverso le fosse nasali la rinomanometria consente di ottenere una migliore comprensione della sensazione soggettiva della ventilazione nasale.

E' una metodica rapida ed efficace e produce un immagine chiara delle resistenze nasali al flusso aereo sia in inspirazione, che espirazione. Il sistema rappresenta una delle apparecchiature a trasduttore elettronico più compatte attualmente disponibili.

Sono cinque le principali modalità di esecuzione dell'esame: **Basale**, **dopo inalazione di acqua fredda** (test di provocazione aspecifico per la diagnosi di rinite idiopatica ,precedentemente definita vasomotoria), **dopo somministrazione di sostanze specifiche** (test di provocazione specifico per la diagnosi delle riniti allergiche), **dopo inalazione di decongestionante** (test di decongestione nasale), **posizionale** (facendo assumere al paziente varie posizioni ripetendo di volta in volta le misurazioni, per la conferma diagnostica di rinite posizionale).

La rinomanometria nella diagnosi della rinite professionale da farina si può eseguire o in cabina come il TPBS o facendo inalare estratti purificati di farina a diverse concentrazioni. Viene misurata la resistenza delle vie nasali dopo ogni inalazione così come il FEV 1. In genere si parte dalla concentrazione definita endpoint, ovvero capace di determinare una reazione cutanea allo SPT, e si valuta la risposta in termini di aumento delle resistenze nasali dopo una serie di spruzzi per narice (da 1 fino ad arrivare progressivamente a 6-8 spruzzi per narice).

Terapia

La terapia dell'asma professionale non si differenzia da quella dell'asma allergico ambientale; pertanto un buon controllo dell'asma non può però prescindere da un buon controllo delle condizioni ambientali e dell'esposizione lavorativa.

In ambito lavorativo ciò non sempre risulta possibile; i panificatori rappresentano una categoria lavorativa molto fedele al proprio lavoro, soprattutto perché molte realtà artigianali sono di tipo familiare, ma anche perché nell'attuale contesto socio – economico risulta difficile una differente ricollocazione lavorativa.

In genere gli obiettivi del trattamento dell'asma in generale sono riassunti in questi punti:

- Raggiungere e mantenere il controllo dei sintomi;
- Prevenire le riacutizzazioni asmatiche;
- Mantenere la funzionalità polmonare più vicina possibile ai livelli normali;
- Mantenere livelli normali di attività, incluso l'esercizio fisico;
- Evitare gli effetti collaterali dei farmaci;
- Prevenire lo sviluppo di una limitazione irreversibile del flusso aereo;
- Prevenire la mortalità per asma. (pneumologi amo)

Il trattamento dell'asma è stato suddiviso in sei parti collegate:

1. Sensibilizzare i pazienti a sviluppare una stretta collaborazione con il medico nel trattamento dell'asma;
2. Stabilire e monitorare la gravità dell'asma attraverso la valutazione dei sintomi e, per quanto possibile, la misura della funzionalità respiratoria;
3. Evitare o controllare gli stimoli che scatenano l'asma;
4. Stabilire trattamenti farmacologici individuali a lungo termine nei bambini e negli adulti;
5. Stabilire trattamenti individuali per trattare le riacutizzazioni;
6. Eseguire periodicamente controlli ambulatoriali.

Partendo dalla considerazione che nell'asma è meglio trattare l'infiammazione piuttosto che la bronco ostruzione questa tabella descrive l'approccio generico di trattamento dell'asma intermittente-persistente nell'adulto.

Classificazione di gravità: Caratteristiche cliniche prima del trattamento o controllo adeguato		Farmaci necessari ad ottenere un controllo a lungo termine
	Sintomi diurni Sintomi notturni	PEF o FEV ₁ Variabilità del PEF
Livello 4 Grave persistente	Continui Frequenti	≤ 60% ≥ 30%
Livello 3 Moderato Persistente	Quotidiani ≥ 1 notte/settimana	≥ 60% - < 80% ≥ 30%
Livello 2 Lieve persistente	> 2/settimana ma < 1/giorno > 2 notti/mese	≥ 80% 20-30%
Livello 1 Lieve intermittente	≤ 2 giorni/settimana ≤ 2 notti/mese	≥ 80% < 20%
Al bisogno per un sollievo rapido: Tutti i pazienti	<ul style="list-style-type: none"> ■ Broncodilatatori a breve durata d'azione: 2-4 puffi di beta²-agonisti inalatori a breve durata d'azione, a seconda dei sintomi ■ L'intensità della terapia dipende dalla gravità della riacutizzazione; fino a tre trattamenti in un'ora o una sola dose di aerosol al bisogno. Si può rendere necessario un ciclo di steroidi orali ■ L'uso di beta²-agonisti inalatori a breve durata d'azione > 2 volte a settimana nell'asma intermittente (l'uso giornaliero o l'incremento dell'uso nell'asma persistente) può indicare la necessità di iniziare (aumentare) la terapia di fondo per il controllo dei sintomi. 	
Passaggio ad un livello inferiore: Rivalutare la terapia ogni 1-6 mesi, è possibile diminuire la terapia passando gradualmente ad un livello inferiore.	NOTE:	
Passaggio ad un livello superiore: Se non si riesce ad ottenere un controllo a lungo termine, considerare il passaggio ad un livello superiore. Prima di passare al livello superiore rivalutare sia la tecnica di assunzione e l'aderenza alla terapia che il controllo ambientale.	<ul style="list-style-type: none"> ■ L'approccio a livelli è volto ad assistere ma non a sostituire il processo decisionale clinico necessario a soddisfare le necessità del singolo paziente ■ La presenza di una sola caratteristica clinica è sufficiente ad assegnare il paziente ad un livello di gravità superiore (PEF è % del miglior valore personale; FEV₁ è % del valore predetto) ■ Raggiungere il controllo più rapidamente possibile (può essere necessario un ciclo breve di corticosteroidi per via sistemica), successivamente scegliere il minimo dosaggio di terapia necessario a mantenere il controllo ■ Educare il paziente a gestire da solo la patologia e a tenere sotto controllo i fattori ambientali potenzialmente responsabili di peggioramento dell'asma (ad es. allergeni ed irritanti) ■ Raccomandare uno specialista ai pazienti che hanno difficoltà a mantenere il controllo della malattia o se ricadono nel livello 4 (asma grave persistente). Un consulto con uno specialista può essere necessario anche per i pazienti che ricadono nel livello 3 (asma moderato persistente). 	
Scopo della terapia: Controllo dell'asma		
<ul style="list-style-type: none"> ■ Sintomi cronici notturni o diurni minimi o assenti ■ Riacutizzazioni minime o assenti ■ Assenza di limitazione delle attività; nessuna perdita di giorni scolastici o lavorativi ■ Mantenimento della normale funzionalità polmonare ■ Utilizzo minimo di beta²-agonisti a breve durata d'azione (< 1 volta/giorno, < 1 confezione/mese) ■ Effetti collaterali dei farmaci minimi o assenti 		

Tabella 5: trattamento dell'asma intermittente persistente dell'adulto e bambino >5 aa

(riprodotta da <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/asthma/asthsumm.htm>).

Immunoterapia specifica:

Se da una parte la terapia dell'asma con i farmaci antinfiammatori e broncodilatatori serve a controllarne i sintomi, dall'altra esiste la possibilità di una prevenzione a lungo termine mediante l'immunoterapia specifica.

Un'interessante effetto dell'immunoterapia è il suo potente ruolo nel ridurre l'incidenza dell'asma nei soggetti con rinite allergica, modificando il normale corso dell'allergia.

Gli studi sul meccanismo d'azione del vaccino supportano l'idea che questo espanda la reazione Th1 mediata e sopprima la risposta Th2 presente nell'allergia. L'immunoterapia infatti aumenta le IgG specifiche (soprattutto le IgG4) che bloccano la produzione di istamina IgE dipendente dai basofili e la presentazione dell'antigene IgE mediata ai linfociti T. Recenti studi hanno evidenziato l'aumento di IL10 nel sangue periferico e sulla superficie delle mucose dopo ITS (48). L'IL10 ha numerose attività antiallergiche come la soppressione delle mast cells, degli eosinofili, e della risposta dei linfociti T, e interviene sulle cellule B in modo da differenziare la produzione verso le IgG4. Le cellule produttrici di IL10 vengono infatti chiamate regolatrici. L'utilizzo di vaccini allergenici basati su estratti di farina di frumento è stato negli anni sperimentato in vari paesi (49,50,51,52) ed ha consentito di ottenere buoni risultati clinici.

Da anni presso la UOML di Cremona è stata utilizzata l'immunoterapia specifica (ITS) volontaria nell'allergopatia da frumento, ed è stato svolto uno studio trasversale e retrospettivo su 43 panificatori allergici.

43 casi di panificatori esposti a farine trattati con ITS con un vaccino allergenico con estratto standardizzato di farina di frumento alimentare (Lofarma Allergeni, Milano) in preparazione ritardo adsorbita su idrossido di alluminio, con inoculo sottocutaneo settimanale e poi mensile o bimestrale.

I dati hanno mostrato che 34 lavoratori, cioè l'83% dei trattati con ITS, continuava il proprio lavoro; i 9 abbandoni erano avvenuti per pensionamento, per subiti traumi infortunistici, in un caso per migliore scelta economica di mercato, mai per patologia allergica aggravata o per intolleranza al vaccino. L'efficacia, intesa come controllo dei sintomi durante il lavoro o dopo il lavoro secondo una scala a 5 gradazioni, è stata valutata buona o molto buona in oltre i due terzi dei casi (53).

Il nostro studio vorrebbe partire da questo tipo di esperienza per valutare la risposta ad un vaccino di tipo sublinguale, quindi di più facile gestione al pari di altre ITS orali che hanno oggi soppiantato la terapia iniettiva più tradizionale.

STUDIO CLINICO

Come anticipato nell'introduzione il progetto di ricerca si compone di una parte clinica e di una parte di laboratorio.

Dal punto di vista clinico sono stati indagati 4 panificatori con sospetta rinite-asma professionale da farine afferiti presso l'ambulatorio di allergologia professionale e ambientale della Clinica Devoto della Fondazione Policlinico Mangiagalli Regina Elena.

I lavoratori sono stati inviati dal medico competente, dall'INAIL o dal medico curante per accertamenti mirati alla diagnosi di malattia professionale; nel periodo compreso tra febbraio 2011 e novembre 2013 (intervallo temporale oggetto dello studio). In tale periodo sono stati inviati e studiati con la metodologia descritta e con l'esecuzione dei test di provocazione nasale i 4 casi descritti nella tesi. Gli altri lavoratori che sono stati inseriti nel programma di ITS avevano effettuato gli accertamenti alcuni mesi prima ed eseguito lo stesso iter diagnostico ma senza l'esecuzione del Test di Provocazione Nasale specifico con estratti Lofarma, che si sono resi disponibili dal febbraio 2013.

Previa sottoscrizione del consenso informato a tutti i lavoratori sono stati eseguiti:

- Anamnesi ed esame obiettivo
- Skin prick test per comuni inalanti ed allergeni professionali
- Test di provocazione bronchiale aspecifico con metacolina
- Test di provocazione bronchiale specifico con farina
- Test di stimolazione nasale aspecifico con acqua a 0°
- Test di stimolazione specifico con estratti purificati e standardizzati di farina

I quattro casi clinici vengono descritti nel dettaglio di seguito

Materiali e metodi

Skin prick test

Gli SPT sono stati eseguiti con gli estratti allergenici della ditta Lofarma- Milano. Il pannello dei comuni inalanti e degli allergeni professionali è riportato nella tabella 6.

Estratto	
Erba canina	Cane
Bambagiona	Gatto
Erba mazzolina	Dermatophagoides pteronissinus
Betulla	Dermatophagoides farinae
Ontano	Farina di frumento
Artemisia	Soia
Cipresso	Segale
Olivo	Orzo
Nocciolo	Malto
Parietaria	Mais
Ambrosia	Alfa amilasi
Alternaria	Blatella germanica
Cladosporum	

Tabella 6: pannello di SPT

Determinazione IgE specifiche

La determinazione si effettua su un campione di sangue con metodo immunologico (Immuno CAP Phadia-Sweden). La tecnica consiste nel porre il siero del paziente in esame a contatto con un allergene coniugato con un legame di covalenza ad una fase solida (disco di carta). Se il siero contiene IgE specifiche verso un determinato allergene, esse si legano all'allergene stesso. Dopo un lavaggio per asportare altre IgE sieriche non specifiche per quell'allergene, vengono aggiunti anticorpi anti IgE marcati con enzimi. La lettura viene effettuata con metodica foto colorimetrica.

FeNO

La misurazione della frazione espirata di ossido nitrico è stata effettuata mediante l'apparecchio NIOX mino della ditta Aerocrine ab.

TPBA

Per il test di provocazione bronchiale aspecifico è stato utilizzato l'apparecchio Mefar Dosimeter mb 3 per l'erogazione della metacolina e lo strumento Sensor medics v max 201 per il controllo della funzionalità respiratoria.

TPBS

Per il test di provocazione bronchiale specifico è stata utilizzata la cabina di esposizione e lo strumento Sensor medics v max 201 per il controllo della funzionalità respiratoria.

Rinomanometria

Per la rinomanometria attiva anteriore è stato utilizzato l'apparecchio RhinoStream della ditta RhinoMetrics (versione 2.0 ed 1.3).

Estratti di farine

Gli estratti di farine sono stati forniti dalla ditta Lofarma Milano a diluizioni progressive. Ogni puff eroga 60 µl di soluzione per narice e ogni flacone contiene 1,2 mg/ml di proteine. L'estratto viene progressivamente diluito fino al 5% che rappresenta la concentrazione 1/1, successivamente si fanno diluizioni 1:10, 1:100 e 1:1000 e si valutano le risposte alle somministrazioni.

Vaccino

Il vaccino è fornito dalla ditta Anallergo (Firenze) in forma di flaconi con erogazione orale di tipo sublinguale. In ogni confezione è presente un flacone denominato "iniziale" e da tre a cinque flaconi denominati "di mantenimento". Lo schema vaccinale è riportato in figura 6. La prima somministrazione viene erogata sotto osservazione medica dopodiché il paziente prosegue a domicilio. Periodicamente il paziente viene ricontrollato in ambulatorio mentre la rivalutazione con i test di funzionalità respiratoria avviene al termine del ciclo di terapia (3 anni circa).

ITS Sublinguale a induzione breve

DENOMINAZIONE DEL MEDICINALE

Soluzione acquosa di frazioni allergeniche per somministrazione sublinguale.

Composizione
Le soluzioni acquose di frazioni allergeniche utilizzate per la preparazione della terapia sono quelle indicate nella prescrizione medica individuale e sono riportate in etichetta.
Le frazioni allergeniche dializzate sono in soluzione fisiologica contenente glicerina al 50% e titolate in Unità RAST/ml.
Eccipienti: cloruro di sodio, glicerina.

Confezione
La terapia è costituita da:
un flacone iniziale, etichetta verde, 400 U.RAST/ml e da 3 a 5 flaconi di mantenimento, etichetta rossa, 10.000 U.RAST/ml.
Il contenuto di ciascun flacone multidose è di 4 ml. di soluzione allergenica.

Proprietà farmacologiche
La somministrazione ripetuta di allergeni specifici a livello della mucosa sublinguale ha come obiettivo la modulazione della risposta immunitaria con prevalente polarizzazione cellulare verso l'ambiente IT1 e conseguente azione preventiva nei confronti della flogosi allergica. L'ITS sublinguale è associata con l'inibizione degli eosinofili e con la riduzione delle molecole di adesione nell'organo bersaglio.

INFORMAZIONI CLINICHE

Indicazioni Terapeutiche
Affezioni allergiche (IgE indotte), particolarmente con genesi inalatoria quali asma bronchiale allergica, bronchite allergica, congiuntivite, rinite, provocate da allergeni stagionali.

Effetti indesiderati e precauzioni
Molto raramente si verificano reazioni locali come prurito orale e/o labiale e nausea, ancor più raramente si può verificare una modesta riacacerbazione della sintomatologia con rinite o leggeri sintomi respiratori: in questi casi non aumentare la dose e consultare il medico curante.
E' consigliabile la sospensione temporanea (5/7 giorni) in corso di malattie acute febbrili, per vaccinazioni (tetanica/difterica ecc.) e per interventi odontoiatrici.

Opportune precauzioni di impiego
La gravidanza non costituisce controindicazione assoluta.

Interazioni con altri medicinali
La terapia con farmaci beta bloccanti vale come controindicazione assoluta.

Posologia e modalità di somministrazione
Togliere dal flacone iniziale il tappo a vite e inserire sul flacone il tappo erogatore perforando la capsula di protezione di alluminio, avvitare a fondo il tappo erogatore sul flacone.
Assicurarsi del completo caricamento del dispensatore, effettuando alcune pressioni.
Erogare sotto la lingua il numero previsto di gocce (1 compressione = 1 goccia). Le gocce dovrebbero rimanere sotto la lingua per circa 2 minuti e quindi preferibilmente inghiottite senza acqua. Il flacone iniziale prevede due somministrazioni giornaliere, mattina e sera, lontano dai pasti, mentre il flacone di mantenimento una sola somministrazione.

Schema terapeutico iniziale

Flacone	Giorno	Gocce / Die
Flacone Etichetta Verde 400 U.RAST / ml	1*	1 gt x 2 volte di *
	2*	2 gt x 2 volte di
	3*	3 gt x 2 volte di
	4*	4 gt x 2 volte di
	5*	5 gt x 2 volte di
	6*	6 gt x 2 volte di
	7*	7 gt x 2 volte di
	8*	8 gt x 2 volte di

* Preferibilmente di mattina a digiuno e la sera prima di cena.

Flacone	Giorno	Gocce / Die
Flacone Etichetta Rossa 10000 U.RAST / ml	9*	1 gt
	10*	2 gt
	11*	3 gt
	12*	4 gt
	13*	5 gt

Il trattamento prosegue dal 15° giorno con 5 gt per tre volte alla settimana (Schema di mantenimento).

Terapia di mantenimento
Si somministrano 5 gocce tre volte la settimana.

INFORMAZIONI FARMACEUTICHE

Allergeni disponibili
L'ITS sublinguale è disponibile per gli allergeni previsti in tavola sinottica sotto tale forma farmaceutica.

Periodo di validità
Fino a 24 mesi.
La data di scadenza indicata anche sull'etichetta dei flaconi si riferisce al prodotto in confezionamento integro e correttamente conservato.

Particolari precauzioni di conservazione
Evitare il congelamento.
Tenere lontano da fonti di calore.
Non necessita di conservazione a temperatura controllata.

anallergo
immunotherapy research
Viale Nilda Iotti, 7 - 50037 San Piero a Sieve (FI)
http://www.anallergo.it e-mail: info@anallergo.it
Tel. 055 218517 - Fax 055 284474

Ed. 1 rev.0 del 01/09/2010

Figura 6: schema terapia vaccinale

Descrizione dei casi clinici con l'approccio diagnostico delineato nei materiali e metodi.**Caso 1**

D. L. D maschio di 26 anni, con allergia nota ad acari, graminacee, blatella e grano. Dai 6 anni ripetuti episodi di asma allergico stagionale trattato con aerosol e broncodilatatore al bisogno, poi stabilizzazione del quadro clinico fino ai 12 anni con massimo 1-2 episodi/anno. Da giugno 2010 ripresa della sintomatologia asmatiforme con crisi che insorgono indifferentemente sul luogo di lavoro e fuori soprattutto al risveglio e durante attività fisica. Le crisi durano max 15 min o se più prolungate o severe si risolvono con l'assunzione di

broncodilatatore. Il lavoratore è impiegato come addetto alla produzione di dolci e pizze dal 2003 (7 anni). Ad ottobre 2010 viene effettuata una visita allergologica che si conclude con la diagnosi di “Asma allergico in sensibilizzato agli acari della polvere domestica”. Prove di funzionalità respiratoria (PFR) ed elettrocardiogramma (ECG) nella norma, test di provocazione bronchiale aspecifico (TPBA) : “severa iperreattività bronchiale”, frazione espirata di ossido nitrico (FeNO): 61 ppb. Skin prick test (SPT) negativi per allergeni professionali ma non attendibili (istamina +/-). Viene prescritta terapia steroidea con beneficio per 1 mese, alla cessazione della terapia ricomparsa della sintomatologia asmatica per cui a gennaio 2011 inizia nuovo ciclo di terapia steroidea terminato nel marzo 2011. In data 30 marzo 2011 viene eseguita una nuova visita allergologica: FeNO 48 ppb, PFR e ECG nella norma. Viene confermata la diagnosi e consigliati approfondimenti allergologici in merito a sospetta sensibilizzazione alle farine. A Maggio 2011 ricovero presso Clinica del Lavoro dove vengono eseguiti i seguenti accertamenti:

- SPT per inalanti professionali con il seguente risultato: Grano estratto commerciale: ++ ; Grano estratto Lofarma 1:100 = ++ , Grano estratto Lofarma 1:10 = + ; soia, orzo, segale: neg; blatella germanica: +, Istamina: +++.
- Proteina cationica eosinofila: (ECP) 59,50 µg/L (<15,00)
- Ig E anti grano: 3,27 kUA/l, IgE anti orzo: 1,05 kUA/l, IgE anti segale: 1,57 kUA/, IgE anti malto: 1,43 kUA/l (kUA/l<0,35classe 0 0,35-0,7classe 1 0,7-3,5classe 2 3,5-17,5classe 3 17,5-50 classe 4 50-100classe 5 >100classe 6).
- TPBS: Il test è risultato negativo con un max decremento del FEV1 del 10% a 6 ore dall’inizio del test.
- Rinomanometria attiva anteriore: Valori basali entro i limiti della norma (0,23 *s/cm³). Non condizioni di ostruzione basale anche se vi è un maggiore incremento delle resistenze nasali a destra. A 1/1000 e a 1/100 incremento delle resistenze del 65% con scarsi sintomi ostruttivi. Dopo 1/10 valori equivalenti a quelli basali. Incremento modesto, del 43% dopo la concentrazione 1/1. Asintomatico test sostanzialmente negativo.
- TPBA: positivo PD 20: 1,49
- FeNO: 52 ppb (v.n 10-35)
- Elettrocardiogramma (ECG): nella norma
- Visita Otorinolaringoiatrica (ORL): deviazione settale, presenza di formazioni di aspetto polipoide bilateralmente. Si consiglia TC massiccio facciale

- TC massiccio facciale s.m.c: i seni mascellari sono completamente occupati da materiale a densità tissutale che occupa completamente anche i seni frontali e parzialmente le celle etmoidali sia anteriori che posteriori. Parzialmente opacato anche il seno sfenoidale. Non sembrano evidenti erosioni ossee. L'ipotesi più probabile è quella di processo infiammatorio.

Conclusioni: vista la risposta cutanea all'estratto di grano Lofarma con endpoint riscontrato alla diluizione di 1:100 ma senza corrispondenza alla rinomanometria né al TPBS con farine si può parlare di sensibilizzazione e non di allergia a farine di frumento. Viene dunque confermata la diagnosi di asma allergico ambientale, sarà comunque necessario un follow up.

Caso 2

R.B maschio di 29 anni, panificatore da 3 anni in un supermercato dove si occupa di impasto, cottura al forno e trasferimento dell'alimento nelle padelle. In passato ha sofferto di oculorinite nei confronti di graminacee dai 7 ai 10 anni, da 2 anni circa comparsa di oculorinite al termine dell'attività lavorativa e dopo un mese circa inizia la comparsa anche di tosse. Da circa 6-7 mesi riferisce difficoltà respiratoria alla sera al momento di coricarsi, indipendentemente dall'orario di fine turno. Il Test arresto ripresa (TAR) viene riferito come positivo. Ad aprile 2011 ha effettuato una visita allergologica c/o Ospedale S. Carlo Borromeo dove ha eseguito i prick test con le farine portate dal paziente stesso: mais, nocciola, farina, farina di cereali +++++, farina bianca ++, segale +, malto +++, grano 00 ++, lievito +, grano duro ++. Ad agosto 2011 visita c/o Clinica del Lavoro e ricovero durante il quale vengono eseguiti i seguenti accertamenti:

- SPT: positività per graminacee, ambrosia, acari, gatto, betulla, alternaria. Farina bianca commerciale: ++; orzo, segale: +; Farina grano Lofarma: +; Grano estratto Lofarma 1:1000= neg, 1:100= 3mm (+/-); 1:10= 5 mm (+), 1:1= 6 mm (++) ; Istamina: +++.
- ECP: 31,30 basale µg/L (<15,00), 79,10 dopo TPBS e 41,40 il giorno seguente prima dell'esposizione
- IgE totali: 143 KUA/l
- Ig E anti grano: 5,70 kUA/l; IgE anti orzo: 2,28 kUA/l; IgE anti segale: 2,29 kUA/l; IgE anti granoturco: 0,56 kUA/l; rPhl p1 Timothy: 13 kUA/l; rPhl p 5 b Timothy: 9,28 kUA/l
- TPBA: negativo

- FeNO: 44 ppb (v.n 10-35)
- ECG: nella norma
- Test di broncostimolazione specifico con farine: negativo
- Test di provocazione bronchiale con placebo (lattosio): negativo
- Test di provocazione nasale aspecifico (H₂O 0°): negativo
- Rinomanometria attiva anteriore: valori basali entro i limiti della norma, non condizioni di ostruzione basale. Incremento delle resistenze nasali con valori di significatività dopo 4 puff per narice a concentrazione 1/1 accompagnato a starnutazione e sensazione di ostruzione nasale e prurito. Durante il test è stata monitorata la funzionalità respiratoria che è risultata sempre nella norma. Il test è stato ripetuto il giorno seguente ed ha mostrato risultati sovrapponibili
- Visita ORL: deviazione del setto nasale di sinistra substenosante ed ipertrofia dei turbinati inferiori. Mucose pallide che suggeriscono soggetto atopico vasomotorio. Faringite cronica in fumatore. Non difonia né dispnea

Conclusioni: la diagnosi è di oculorinite allergica da farine di origine professionale. E' stata inoltrata la denuncia e ordinato il vaccino. Il lavoratore potrà riprendere il lavoro utilizzando i dispositivi di protezione individuale (DPI) e proseguire la terapia steroidea e l'immunoterapia specifica. Necessario follow up.

Caso 3

P.R maschio di 38 anni dal 1995 addetto alla produzione di pane e pasticceria. Dai 21 anni affetto da oculorinite da graminacee e dai 30 anni comparsa di sintomi anche al lavoro. A Novembre 2011 giunge all'attenzione dell'ambulatorio di allergologia e nel gennaio 2012 viene eseguito il ricovero ed effettuati i seguenti esami:

- SPT: mix graminacee:++++; grano estratto commerciale: +++; soia, orzo, segale: +; blatella germanica: ++; alfa amilasi:++; Grano estratto Lofarma 1:100 = neg ; Grano estratto Lofarma 1:10 = +++ (8mm); Grano estratto Lofarma 1/1= +++ (8mm); Istamina: +++ ECP: 15,0 µg/L (<15,00) 17/1/2012 (preesposizione)
- ECP: 37,0 µg/L (<15,00) 18/1/2012 (postesposizione)
- IgE totali: 148 kUA/l
- RAST: Ig E anti grano: 5,53 kUA/l; IgE anti orzo: 2,98 kUA/l; IgE anti segale: 3,64 kUA/l; rPhl p1 Timothy (g205): 4,39 kUA/l; rPhl p5b Timothy (g215): 3,40 kUA/l; rPhl p7 Timothy (g210): <0,10 kUA/l

- TPBA: test positivo PD20: 457 mcg
- FeNO: 99 ppb
- TPBS: Il test è risultato positivo e le spirometrie seriali hanno evidenziato una risposta bifasica tipica. Dopo 10' di esposizione comparsa di starnutazione, bruciore oculare e dopo 15' tosse. Il max decremento del FEV1 del 35% si è osservato a 1' dalla fine del test, successivamente si è evidenziato un lento e progressivo incremento del FEV1, normalizzatosi dopo 2h. Nel pomeriggio c'è stata una nuova caduta (max -16%) alla decima ora risolta dopo somministrazione di 400mcg di salbutamolo con ritorno del FEV1 ai valori basali. Per escludere che si fosse trattato di una reazione irritativa si è ripetuto il test il giorno successivo con un flusso di erogazione ridotto e con un'esposizione di 20' che ha mostrato un calo progressivo del FEV1 (max 19%) confermandone la natura allergica.
- Rinomanometria attiva anteriore dopo stimolo aspecifico: valori basali aumentati senza variazioni dopo stimolo aspecifico con H2O a 0°. Dopo vasocostrittore (Localin 2 puff) decremento significativo delle resistenze con ritorno dei valori alla norma (valori normali 0,22-0,28 Pa*s/cm³).
- Rinomanometria attiva anteriore con estratti di farine: valori basali normali (0,18). Incremento delle resistenze nasali dopo challenge con 4 puff di soluzione al 5% (277%) e dopo 15' (311%) accompagnato da starnutazione, rinite, prurito, tosse e congiuntivite con ostruzione nasale.
- Visita ORL: deviazione settale e ipertrofia residua dei turbinati in soggetto poliallergico. Non secrezioni patologiche e/o formazioni poliploidi visibili. Se si accentua la difficoltà respiratoria può beneficiare di chirurgia funzionale turbino settale.

Conclusioni: è stata evidenziata una risposta rinitica e asmatica e la malattia professionale è stata denunciata. Il lavoratore è stato arruolato per l'immunoterapia specifica ed ha iniziato una terapia con cortisonico e broncodilatatore, potrà proseguire l'attività lavorativa con utilizzo di mascherina.

Caso 4

L.O maschio di 24 anni, da 5 addetto alla panificazione in negozio.

Da circa 3 anni lamenta rinocongiuntivite e dispnea riconducibile all'attività lavorativa. Riferisce accesso in PS 3 anni fa per dispnea da allora riferisce frequenti aerosol con sostanza

non specificata con riferito beneficio (in assenza di documentazione). A febbraio 2012 ha eseguito visita specialistica allergologica che ha evidenziato cutipositività per graminacee, ambrosia, betullacee, olivo, acari, blatella e grano. PFR ai limiti della norma con parziale risposta al broncodilatatore e FeNO 63 ppb. Da quel momento è stata impostata terapia con associazione corticosteroide-broncodilatatore 2 puff /die, dopo 1 mese al controllo riferito beneficio (contemporaneamente ha interrotto l'attività lavorativa). In data 23/04/2012 si ricovera per esecuzione di test di stimolazione in regime di ricovero, sospesa la terapia da 15 gg dove esegue i seguenti esami:

- SPT: Positività per: graminacee, ambrosia, betullacee, olivo, acari, blatella e grano (inserire); Grano estratto Lofarma 1:1000 = neg ; Grano estratto Lofarma 1:100 = neg; Grano estratto Lofarma 1:10 = ++ (5mm); Grano estratto Lofarma 1/1= +++ (8mm)
- ECP: 84,7 µg/L (<15,00)
- IgE totali: 716 kUA/l
- Ig E per allergeni professionali: IgE anti grano: 30,4 kUA/l; IgE anti orzo: 18,90 kUA/l; IgE anti segale: 16,50 kUA/l; IgE anti granoturco: 12,80 kUA/l
- Spirometria basale: nella norma
- TPBA: test negativo.
- FeNO: 54 ppb
- Rinomanometria basale: nella norma 0,25 Pa*s/cm³ (valori normali 0,22-0,28 Pa*s/cm³)
- Rinomanometria dopo stimolo aspecifico: valori basali ai limiti e nel range di normalità dopo stimolo aspecifico con H₂O a 0°. Test sostanzialmente negativo (valori normali 0,22-0,28 Pa*s/cm³)
- TPBS: il test è risultato negativo: max decremento del FEV 1 del 6% a 5 h dal test.
- Rinomanometria attiva anteriore dopo test con estratti: valori basali normali (0,21). Incremento delle resistenze nasali dopo challenge con 4 puff concentrazione 1/1. Incremento del 238 % dopo 4 puff e del 485% dopo 5 min dall'ultimo test (8 puff). Normalizzazione dopo 1 h dal challenge

Conclusione: è stata evidenziata una risposta rinitica e la malattia professionale è stata denunciata. E' stata impostata la terapia con cortisonico e broncodilatatore e consigliata l'immunoterapia specifica qualora il paziente avesse voluto proseguire con l'attività di panificatore (attualmente disoccupato).

Pazienti in immunoterapia specifica

Nei tre anni in cui si è sviluppato il seguente progetto di ricerca complessivamente 8 lavoratori hanno iniziato, proseguito e/o interrotto l'immunoterapia specifica per le farine di frumento. 6 avevano iniziato la terapia al momento dell'avvio del progetto di ricerca. 2 sono stati arruolati avendo anche eseguito lo specifico challenge nasale. Del gruppo 2 panificatori hanno dovuto interrompere la terapia, uno per la comparsa di effetti collaterali, l'altro per inefficacia e persistenza dei sintomi (quest'ultimo ha cessato l'attività lavorativa, mentre il lavoratore con reazione all'ITS ha proseguito l'attività riducendo l'esposizione ed adottando terapia farmacologica). Gli altri 6 stanno attualmente proseguendo con benefici clinici e hanno mantenuto l'attività lavorativa. Al termine del ciclo vaccinale (3 anni) verranno rivalutati dal punto di vista respiratorio.

Le caratteristiche dei soggetti arruolati per l'ITS sono riportati in tabella:

Soggetto	Età	Anni lavoro	SPT+	Rinite	Asma	Inizio ITS	Effetti collaterali	Proseguimento ITS	Miglioramento sintomi
1	34	17	αamilasi, grano, blatella	si	si	11/01/2011	pomfi, rinite, asma	no	si
2	31	13	grano, orzo e malto	si	no	03/09/2010	no	si	si
3	32	3	grano, orzo, segale e malto	si	si	28/03/2011	no	si	si
4	28	4	grano, mais blatella	si	no	16/05/2011	no	si	si
5	29	10	grano, segale	si	si	16/05/2011	no	si	si
6	29	13	grano, orzo, segale	si	si	07/11/2011	pomfi 2 gg anziché 5	si	si
7	38	17	grano, orzo, segale, blatella	si	no	10/01/2012	no	si	si
8	57	6	orzo, segale	si	si	01/12/2012	no	no	no

Tabella 7: soggetti arruolati in ITS

STUDIO BIOCHIMICO

Materiali e metodi

Test ELISA per la determinazione delle citochine: IL6, IL8, TNF α

Questo saggio impiega la tecnica quantitativa di immunodosaggio enzimatico a sandwich (R&D Systems – USA). In breve un anticorpo monoclonale specifico per le IL-6, IL-8 e TNF- α è stato pre-rivestito su una micropiastre. Sono stati pipettati nei pozzetti gli standard e i campioni, ed ogni citochina presente è stata legata con anticorpi immobilizzanti. Dopo aver lavato via ogni sostanza slegata, è stato aggiunto nel pozzetto un anticorpo policlonale legato con un enzima specifico per le citochine di interesse. In seguito è stato fatto un lavaggio per rimuovere il complesso di reagenti anticorpo-enzima non legati, è stata aggiunta nel pozzetto una soluzione substrato e si è sviluppato colore in proporzione alla quantità di citochine legata nel passaggio iniziale. Una volta fermato lo sviluppo del colore se ne è misurata l'intensità. La dose minima calcolabile con questa tecnica è < 0.70 pg/mL per le IL (sensibilità del test). Il test è un saggio colorimetrico e misura l'assorbanza secondo la legge di Lambert e Beer secondo cui $A = \epsilon \times C$.

Determinazione dei polimorfismi genetici TLR-4/+896 e CD14/-159

La metodica applicata è stata inizialmente quella descritta da Rylander e Michel di tipo qualitativo (35). In sintesi per il rilievo del polimorfismo TLR-4/+896 è stata eseguita PCR in 15 volumi 20 ng di DNA genomico, 200 μ M dNTP, 0.75 mM MgCl₂, 1_x buffer (Life Technologies, Rockville, MD), 0.4 U Platinum Taq polimerasi, 0.1 μ M del primer 5' GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCAT e del reverse primer 5'CTAAGCCCAAGAAGTTTGAACCC.

Condizioni di ciclo: 96°C per 2 min, 35 cicli a 96 °C per 30 secondi, 62°C per 30 s, 72° C per 40 s, ed una finale estensione di 72° C per 10 min. Il DNA amplificato con la PCR è stato digerito con 0.2 U NcoI (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) a 37°C per 16 ore. I prodotti sono stati separati poi su un gel di agarosio al 3%. NcoI è specifica per la sequenza CCATGG, che si trova nel prodotto della PCR solamente come carrier del TLR-4/+896G allele. Questo saggio individua la banda 373-bp per il genotipo AA e 2 bande 373- e 347-bp per gli eterozigoti AG.

Analogamente si è provveduto per il polimorfismo CD14/-159. Il forward primer è 5'GTGCCAACAGATGAGGTTAC ed il reverse primer è 5'CCTCTGACAGTTTATGTAATC. Cicli sono stati eseguiti a 95° C per 2 minuti, 35 cicli di 95° C per 30 secondi, a 56° C temperature di appaiamento per 30 secondi, poi 72° C per 40 s, ed una estensione finale di 72° C per 10 min. Il DNA amplificato mediante PCR è stato digerito con 5 U dell'enzima di restrizione Ava II a 37° C per 16 ore.

I campioni sono stati inoltre processati apportando delle modifiche a questo standard della letteratura secondo le istruzioni del fabbricante.

La metodica, sopra descritta in dettaglio, prevede l'utilizzo di una reazione di amplificazione in PCR con primers specifici, seguita da una reazione enzimatica, anch'essa specifica per i due polimorfismi, con successivo gel per una valutazione qualitativa delle bande. Nell'esecuzione della metodica abbiamo riscontrato problematiche nella messa a punto del metodo con discordanze tra le condizioni consigliate nell'articolo e quanto invece indicato dal produttore. Non pienamente soddisfatti dai risultati nell'applicazione di entrambe abbiamo valutato la disponibilità in commercio di assays già standardizzati e pronti all'uso, che sono stati forniti dalla ditta Applied Biosystems per la valutazione degli SNPs di nostro interesse. A fronte di una metodica qualitativa che non risultava pienamente soddisfacente, abbiamo deciso di cambiare l'approccio metodologico ed utilizzato uno strumento di recentissima acquisizione, un real time PCR accoppiato alla preparazione della piastra, con i campioni da analizzare, con 384 pozzetti da parte di un robot automatico, che evita i potenziali errori dello sperimentatore. Di seguito si riporta sinteticamente la metodica applicata per lo studio. Il DNA genomico è stato estratto da 500 µl di leucociti del sangue venoso periferico usando Maxwell® 16 DNA Purification Kits (Promega Italia s.r.l.) secondo le istruzioni del produttore. In breve il DNA è stato purificato usando particelle paramagnetiche (PMPs) in una cartuccia nella quale sono distribuiti i reagenti per la purificazione del DNA; PMPs prevedono una fase solida mobile che ottimizza la cattura, il lavaggio e l'estrazione del materiale da identificare. Il DNA ottenuto è amplificato mediante PCR usando una coppia di primers per i due loci contenenti il polimorfismo genetico (TLR4 +896) rs4986790 ed il polimorfismo CD14 gene (-159) rs2569190. Le sequenze del TLR4 primer sono state 5'TGTATTCAAGGTCTGGCTGG -3' (forward) and 5'-TCCCACCTTTGTTGGAAGTG-3' (reverse).

Le sequenze per il primer CD14 primer sono state 5'-TAAGGCACTGAGGATCATCC -3' (forward) and 5'-TGTCATTCAGTTCCTCCTC-3' (reverse). Un gel di agarosio 1% è stato utilizzato per valutare la bontà della coppia di primers e scegliere le condizioni ottimali per la

PCR (Fig 7 e 8). La sequenziatura diretta dei frammenti amplificati è stata effettuata usando il BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit e il 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) . Le fasi di sequenziamento (Fig 9 a-e) sono state importanti per validare i risultati dell'analisi dei polimorfismi mediante PCR Real time usando il programma SDS 2.3 (7900 Fast-Applied Biosystem, Foster City, CA) (Fig.10 a,b)

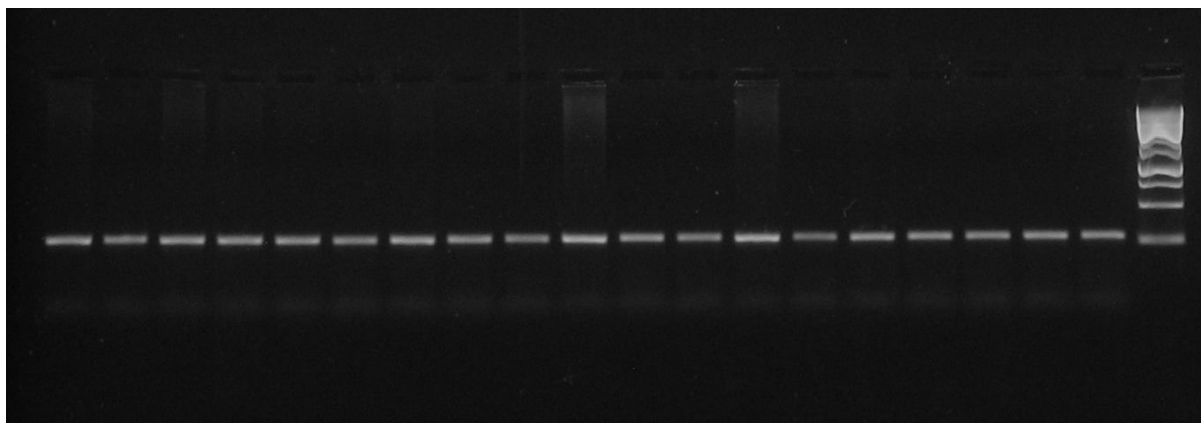


Figura 7. CD14: Gel di agarosio 1% per scegliere le condizioni ottimali per la PCR.

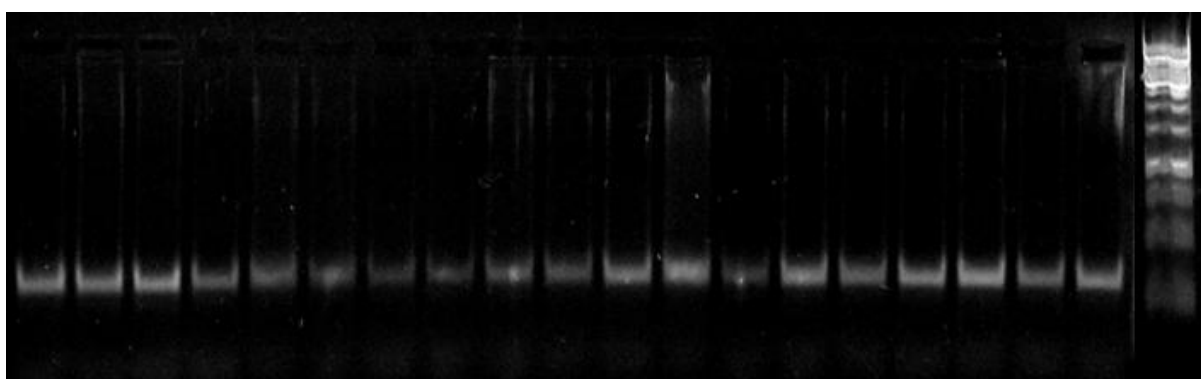


Figura 8. TLR4: Gel di agarosio 1% per scegliere le condizioni ottimali per la PCR

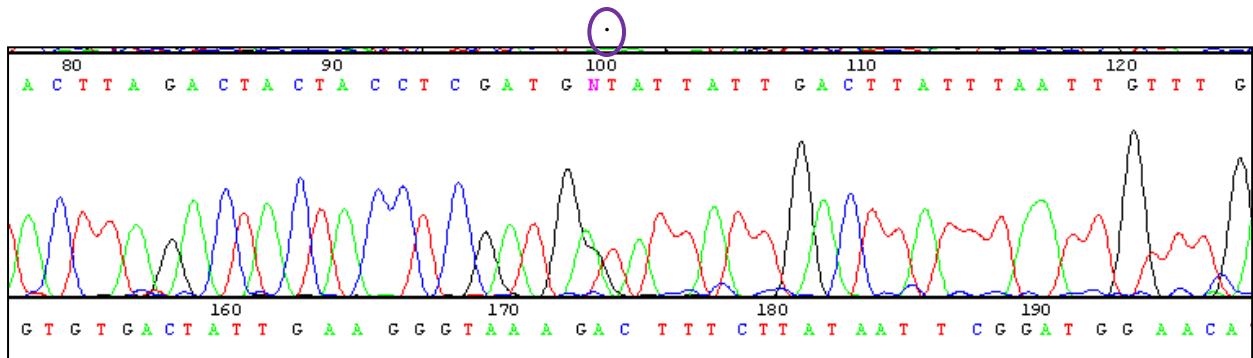


Figura 9 a. Sequenza TLR4 per il campione 4: questo campione è eterozigote (A/G) identificato con N nel cerchio viola

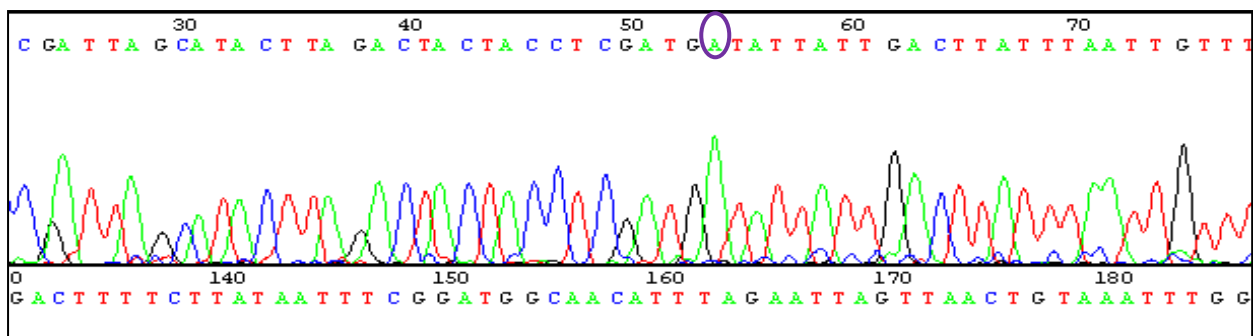


Figura 9 b. Sequenza TLR4 per il campione 43: questo campione è omozigote per A (A/A) identificato dal cerchio viola

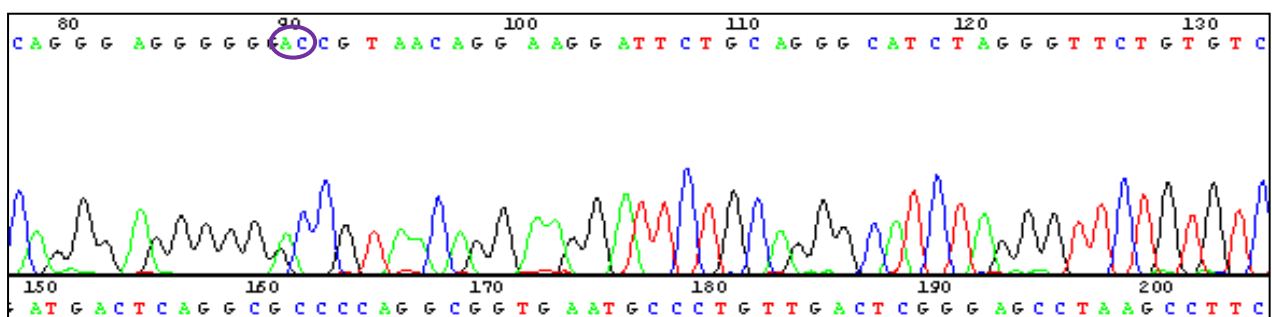


Figura 9 c. Sequenza CD14 per il campione 8: questo campione è eterozigote (C/T) identificato con il cerchio viola.

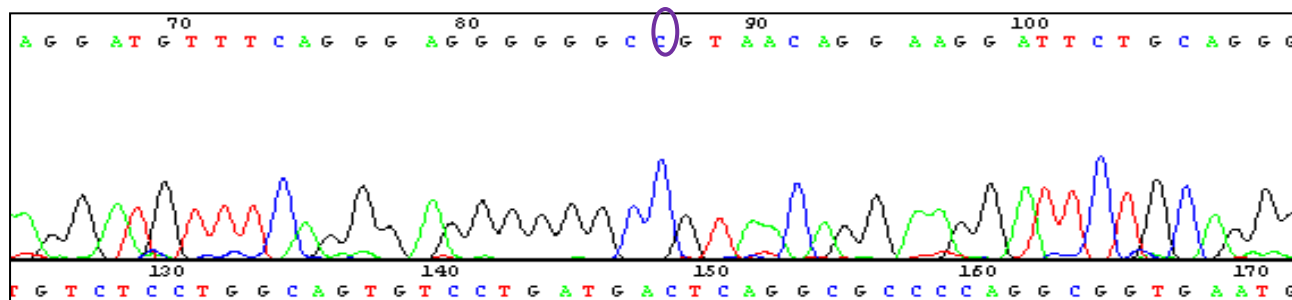


Figura 9 d. Sequenza CD14 per il campione 10: è omozigote per C (C/C) identificato con il cerchio viola.

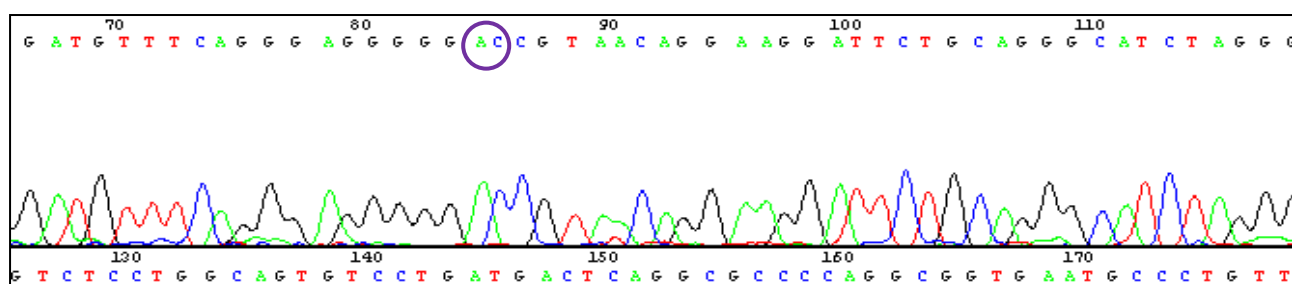


Figura 9 e. Sequenza CD14 per il campione 16: è omozigote per T (T/T) identificato con il cerchio viola.

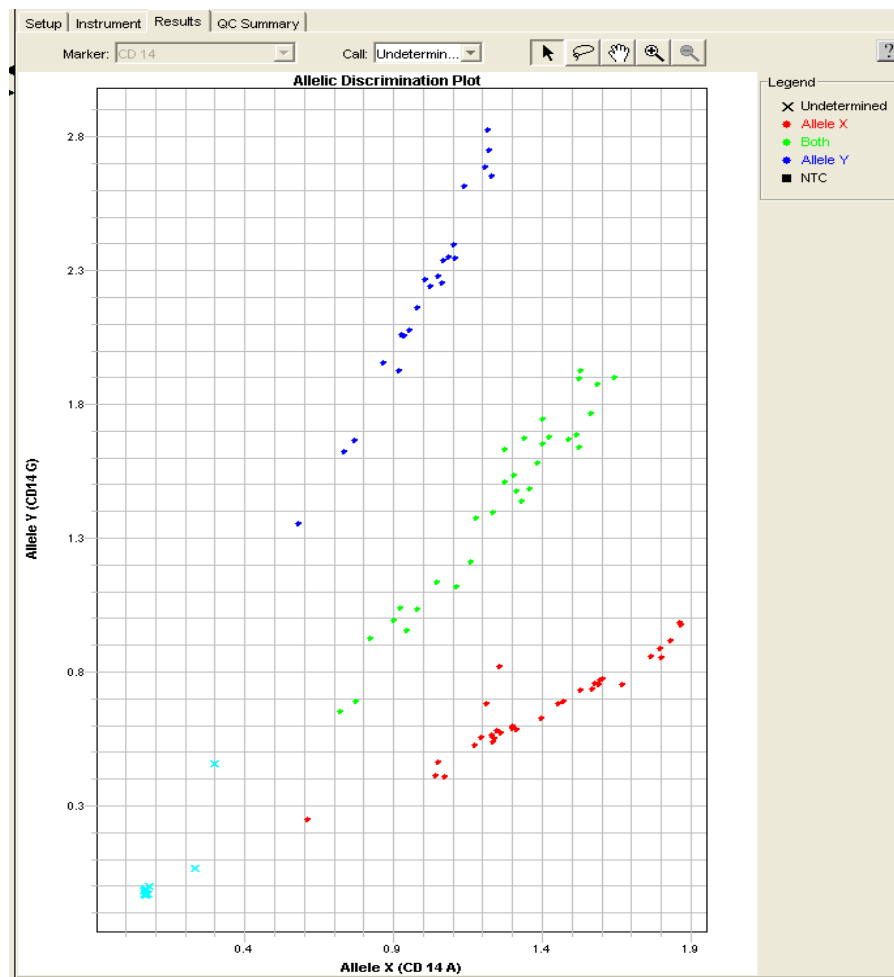


Figura 10 a. Analisi SNP per CD14/-159. Il gruppo in rosso identifica i campioni omozigoti TT; il gruppo in blu identifica gli omozigoti CC; il gruppo in verde identifica il gruppo eterozigote C/T.

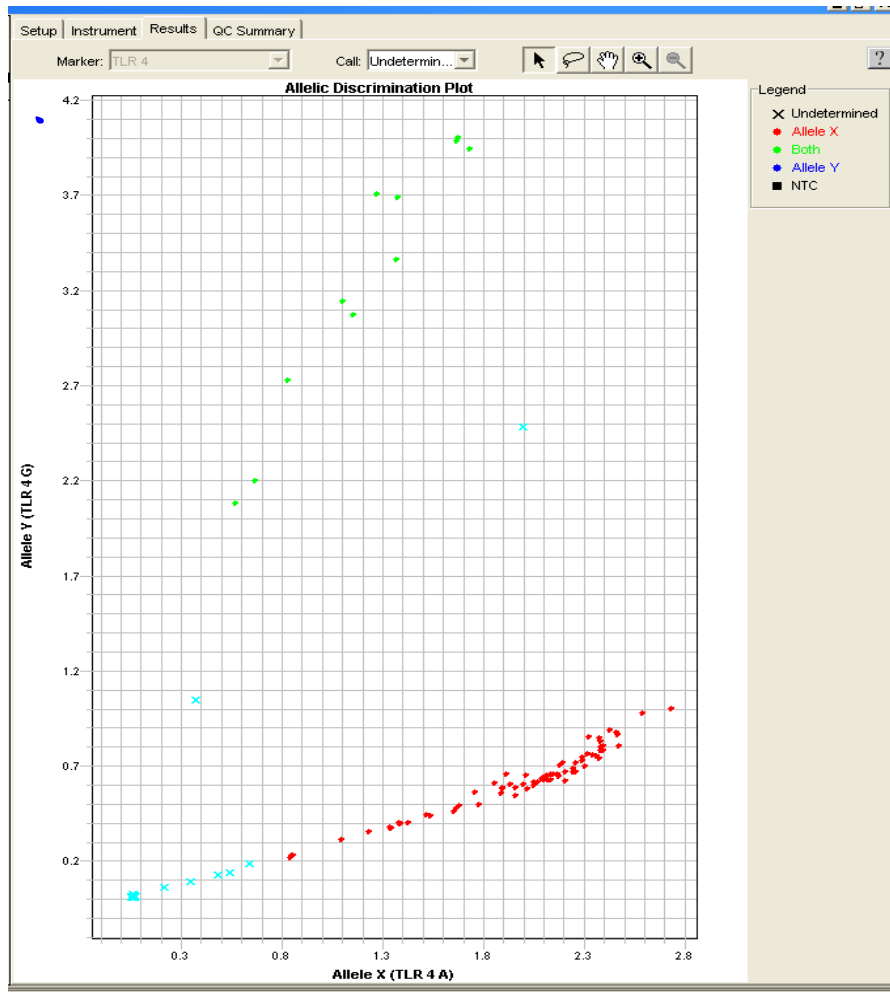


Figura 10 b. Analisi SNP per il TLR4/+896. Il gruppo in rosso identifica i campioni omozigoti AA; il gruppo in verde identifica i campioni con eterozigosi A/G, mentre l'unico campione in blu è omozigote GG.

Popolazione

Sono stati selezionati 167 panificatori afferiti all'ambulatorio di Allergologia ambientale e professionale della Clinica del Lavoro dell'Ospedale Maggiore Policlinico di Milano e alla U.O di Medicina del Lavoro degli Ospedali Riuniti di Bergamo. Tutti i soggetti erano esposti a farine di frumento, 162 panificatori e 5 pasticciere, 161 maschi e 6 femmine di età media 41 anni. Erano presenti 53 fumatori (media 12 sig/die), 18 ex fumatori, 95 non fumatori; l'anzianità lavorativa media era di 19,4 anni (Tabella 7).

Totale esposti a farine	167
M	161
F	6
Panificatori	162
Pasticcieri	5
Fumatori (media 12 sig/die)	53
Ex fumatori	18
Non fumatori	95
Anzianità lavorativa media (aa)	19
Allergici professionali	59
Atopici	45
Sani	63

Tabella 8: caratteristiche della popolazione esaminata

I 167 soggetti sono stati suddivisi in tre gruppi: malati professionali (con diagnosi di asma e/o rinite e/o dermatite da farine di frumento): 59 soggetti, atopici (presenza di sensibilizzazione nei confronti di allergeni ambientali e/o professionali ma senza sintomi legati all'attività lavorativa): 45 soggetti e sani (né atopia né sintomi di tipo allergico): 63 soggetti.

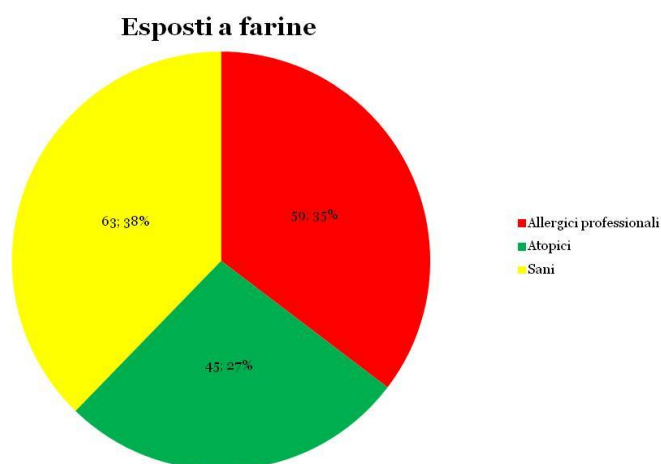


Figura 11: distribuzione degli esposti nei tre gruppi (allergici professionali, atopici e sani)

I malati professionali erano a loro volta così distribuiti: 44 affetti da asma in 25 casi associata a rinite, 4 da oculo – rinite ed 1 da dermatite.

I tre gruppi di lavoratori, previa sottoscrizione del consenso informato sono stati indagati attraverso:

- Anamnesi allergologica;
- Esami allergologici quali SPT per allergeni ambientali e occupazionali, integrati dal dosaggio di IgE specifiche per allergeni ambientali e professionali;
- Esami strumentali eseguiti presso l'ambulatorio di Allergologia ambientale e professionale della Clinica del lavoro o già in possesso del lavoratore ed effettuati presso una struttura specialistica ospedaliera di medicina del lavoro: spirometria, TPBA ed eventuale TPBS, laddove indicato per diagnosi di tecnopatia;
- Prelievo ematico per genotipi CD14/-159 e TLR4/+896 e per citochine IL 6, IL 8 e TNF α ;
- Misurazione del FeNO con strumento portatile.

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati mediante il software SAS 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC .

Per il confronto tra gruppi si è utilizzato il χ^2 test (Fisher's exact test), il test di Wilcoxon e il test di Kruskal-Wallis.

Le associazioni grezze tra le variabili sono state valutate mediante l'indice di correlazione di Pearson e il test dei ranghi di Spearman.

Risultati

I risultati relativi alle interleuchine e al FeNO hanno dato i seguenti esiti:

Status	N osservati	Variabile	IQR	Mediana	p
Allergico professionale	59	IL6	0,05-11,93	6,96	0.1592
		IL8	1,80-53,53	49,92	0.0046
		TNF α	0,80-9,68	7,38	0.1041
		FeNO	31,00-82,00	49,00	<.0001
Atopico	45	IL6	0,10-16,24	11,06	0.1592
		IL8	1,80-47,90	1,80	0.0046
		TNF α	0,80-12,50	8,26	0.1041
		FeNO	16,00-47,00	21,00	<.0001
Sano	63	IL6	0,00-11,06	1,46	0.1592
		IL8	1,80-1,80	1,80	0.0046
		TNF α	6,60-12,33	9,68	0.1041
		FeNO	15,00-26,00	19,00	<.0001

Tabella 9: valori delle citochine e del FeNO misurati nei tre gruppi di esposti
IQR: interquartile range (lower-upper quartile)

I valori di IL6 sono risultati più elevati negli atopici rispetto ai malati professionali e ai sani, con una differenza significativa solo nei confronti dei sani ($p < 0,05$) (Fig12).

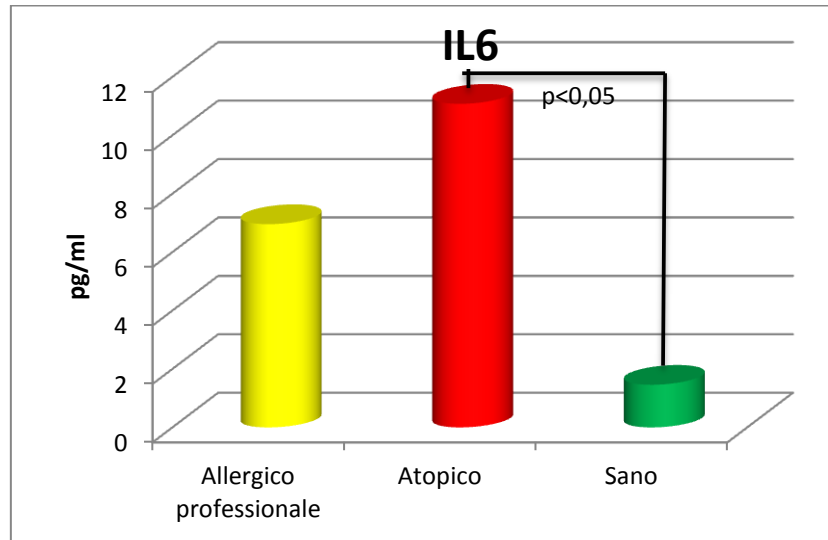


Fig 12: valori medi di IL 6 esaminati nei tre gruppi

L'IL8 è risultata significativamente più elevata negli allergici professionali ($p < 0,0046$), sia rispetto agli atopici ($p < 0,05$) sia ai sani ($p < 0,005$) (Fig 13). Il TNF α è più elevato nei sani, con una differenza significativa solo nei confronti dei malati professionali ($p < 0,0034$) (Fig 14).

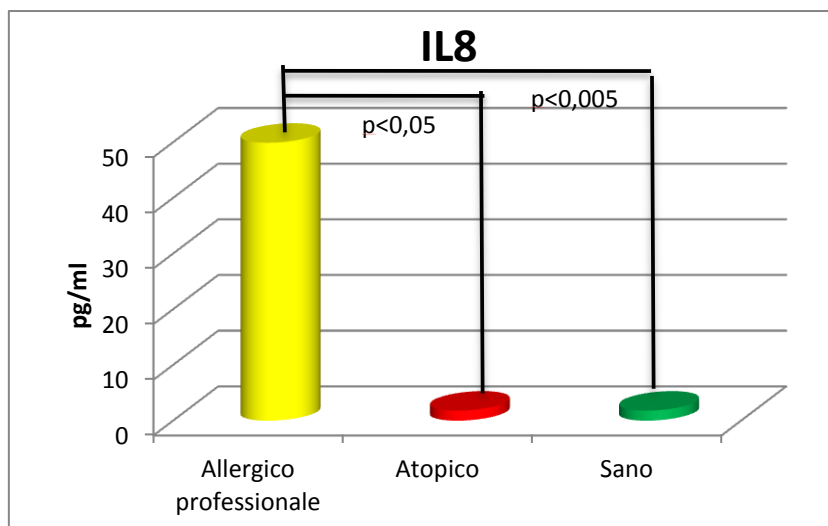


Fig 13: valori medi di IL 8 esaminati nei tre gruppi

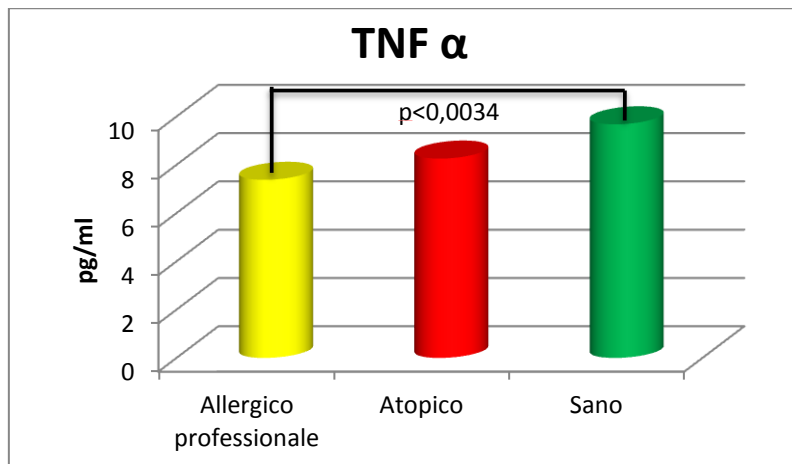


Fig 14: valori mediani di TNF α esaminati nei tre gruppi

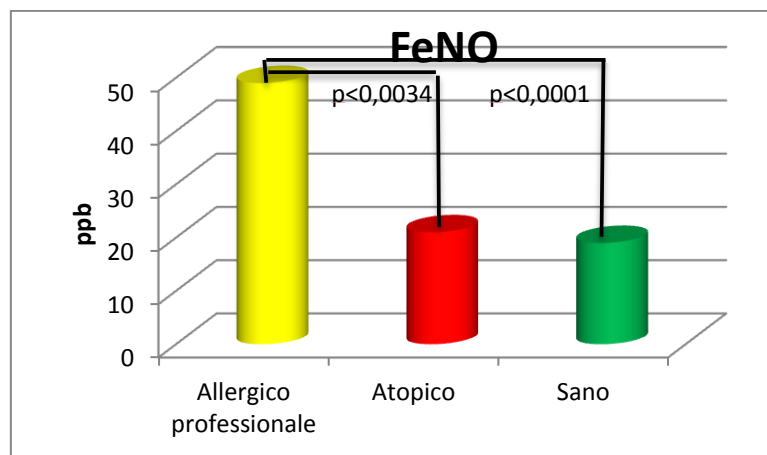


Figura 15: valori mediani di FeNO esaminati nei tre gruppi

Per quanto riguarda invece le misurazioni del FeNO, questo è significativamente più elevato nei lavoratori affetti da allergia professionale ($p < 0,001$) (Fig 15). Inoltre il FeNO, espresso in termini logaritmici, mostra una correlazione statisticamente significativa solo con l'IL8 (LogIL8) (r Pearson: 0,035770, $p < 0,0001$).

Anche l'analisi del FeNO (espresso in forma logaritmica) conferma una relazione lineare con l'IL8 (espresso in forma logaritmica), corretta per altri fattori (fumo, età etc) potenziali confondenti (Tab.10).

Effect	Status	FamAller	Estimate	Standard Error	Pr > t
Intercept			3	0,2982	<.0001
LogIL8			0,0979	0,0418	0,0211
Status	Allergico prof		0,7365	0,1682	<.0001
Status	Atopico		0,327	0,1704	0,0577
Status	Sano		0	0.1788	0.0899
Age			-0,00539	0,005739	0.1820
Fam Aller		No	0,2191	0.1630	0.0046
Fam Aller		Si	0	.	.
Ncigs			-0,04002	0.008792	<.0001

Tabella 10: analisi del modello del FeNO (Log FeNO) corretto per i parametri che potrebbero essere confondenti. Il FeNO risulta associato all'IL8 (LogIL8), allo stato di allergico professionale, all'assenza di familiarità allergica e negativamente al fumo di sigaretta.

Di seguito in tabella 11 i risultati relativi ai polimorfismi del recettore CD14/-159 e TLR4/+896:

CD14/-159 n (%)	TT	CC	CT	Tot
Allergico professionale	24 (15,19)	10(6,33)	24 (15,19)	58 (36,71)
Atopico	11 (6,96)	8 (5,06)	22 (13,92)	41 (25,95)
Sano	14(8,86)	21 (13,29)	24 (15,19)	59 (37,34)
Tot	49 (31,01)	39 (24,78)	70 (44,30)	158 (100)
				p(0,0627)
TLR4/+896 n (%)	AA	GG	AG	Tot
Allergico professionale	49(53,63)	0(0,00)	9 (5,63)	58 (36,25)
Atopico	35 (21,88)	0(0,00)	6(3,75)	41 (25,63)
Sano	53(33,13)	1 (0,63)	7 (4,38)	61 (38,13)
Tot	137 (85,63)	1 (0,63)	22 (13,75)	160 (100)
				p(0,8809)

Tabella 11: polimorfismi dei recettori per le endotossine e relativa distribuzione nei tre gruppi

In merito ai polimorfismi genetici analizzati per il recettore CD14/-159 la frequenza di distribuzione dei polimorfismi (TT, CT, CC) risulta significativamente diversa a seconda se si tratti di lavoratori affetti da malattia professionale, atopici o sani ($p < 0,0627$). Nei soggetti con allergia professionale prevalgono i genotipi TT e CT, negli atopici il genotipo CT mentre nei sani i genotipi CT e CC (Fig 16).

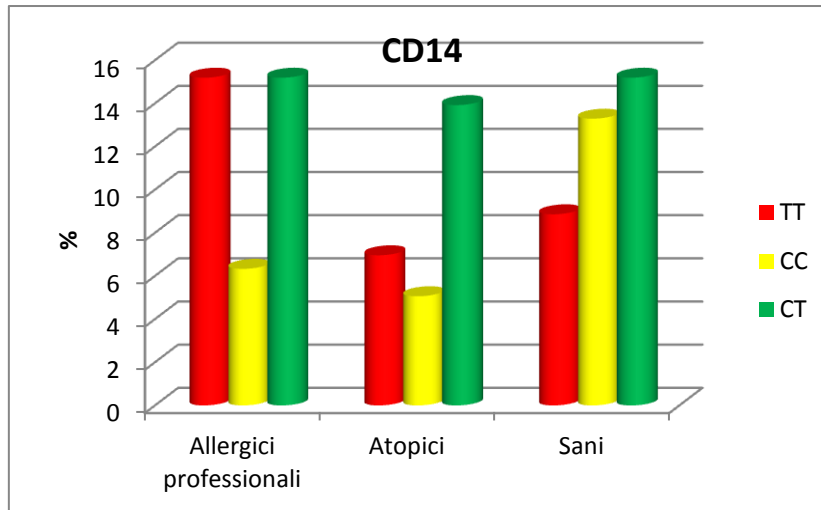


Fig 16: polimorfismi del recettore CD14/-159 e distribuzione nei tre gruppi

A differenza del recettore CD14 per il recettore delle endotossine TLR4 la distribuzione dei vari polimorfismi genetici non varia in modo significativo nei tre gruppi di esposti ($p < 0,8809$) (Fig 17).

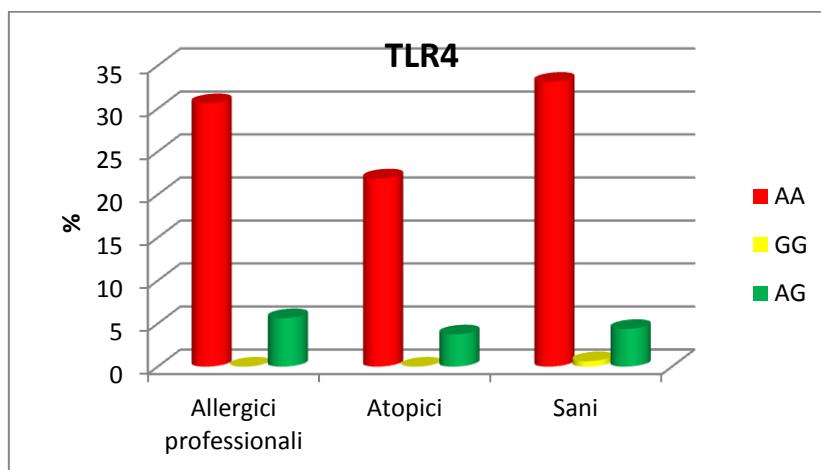


Fig 17: polimorfismi del recettore TLR4 e distribuzione nei tre gruppi.

Abbiamo analizzato anche i livelli delle interleuchine nel siero rispetto ai vari polimorfismi del CD14/-159 e del TLR4/+896: non si è osservata un'associazione statisticamente significativa tra i polimorfismi genetici del recettore CD14/-159 e i livelli di IL6 ($p < 0,4617$) e di IL 8 ($p < 0,7339$) nel siero; si è rilevato un incremento statisticamente significativo del TNF α nei soggetti con polimorfismo genetico CC rispetto al polimorfismo TT ($p < 0,0325$), così come tra il polimorfismo CT e quello TT ($p < 0,0121$); mentre non risulta significativa la differenza tra CC e CT ($p < 0,3899$) nei tre gruppi (Fig 18).

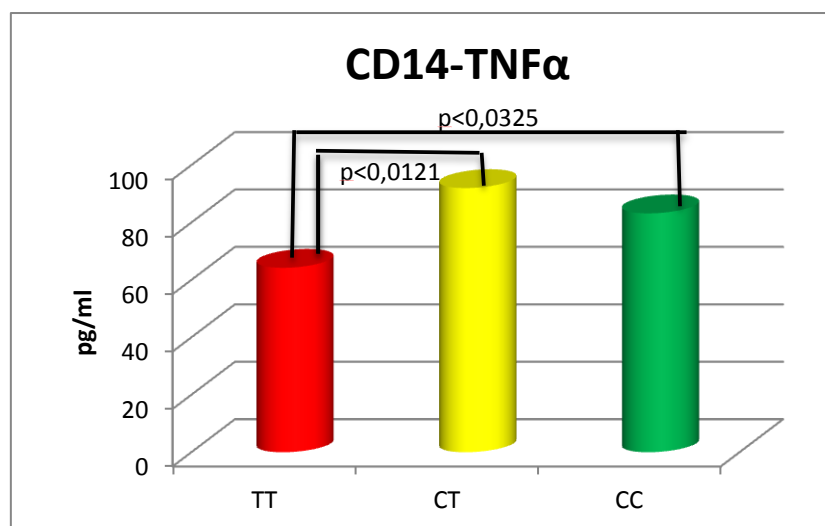


Fig 18: polimorfismi del recettore CD14/-159 e valori di TNF α misurati negli esposti

Anche rispetto ai vari confondenti, l'analisi del TNF α conferma l'associazione con i polimorfismi CC e CT.

Effect	smoke	CD14	Pharma	Estimate	Standard Error	Pr > t
Intercept				25.534	18.440	0.1682
Age				0.08811	0.03366	0.0098
smoke	Ex-fumatore			30.980	12.157	0.0118
smoke	Fumatore			14.796	0.8506	0.0840
smoke	Non fumatore			0	.	.
CD14		TT		-23.254	10.077	0.0224
CD14		CT		-0.7690	0.9347	0.4120
CD14		CC		0	.	.
Pharma			No	28.322	0.9357	0.0029
Pharma			Si	0	.	.

Tabella 12: analisi del modello del TNF α corretto per i parametri che potrebbero essere confondenti. Il TNF α risulta associato allo stato di ex fumatore, all'aumento dell'età, all'assenza di terapia farmacologica e negativamente al polimorfismo TT.

Nessuna relazione è emersa tra CD14/-159 e FeNO, così come tra i polimorfismi del recettore TLR 4/+896 e le varie interleuchine e il FeNO.

In merito alle abitudini voluttuarie si è osservato che gli ex fumatori presentano livelli più elevati di IL6 ($p < 0,0235$) e di TNF α ($p < 0,0086$) rispetto agli altri due gruppi (fumatori e non fumatori). Lo stato di ex fumatore è associato, inoltre, con incrementati livelli di FeNO ($p < 0,0088$). Non si osservano invece associazioni significative tra IL6, IL 8 e diverse concentrazioni di FeNO.

L'IL8 e il FeNO sono significativamente più elevati nei soggetti che assumono farmaci per l'allergia (broncodilatatori, antistaminici, corticosteroidi) (rispettivamente $p < 0,0331$ e $p < 0,0008$), mentre le concentrazioni sieriche di TNF α sono significativamente più alte nei soggetti che non assumono farmaci ($p < 0,00143$). Il FeNO è inoltre significativamente più elevato nei soggetti che indossano DPI al lavoro ($p < 0,0361$).

I vari polimorfismi del CD14/-159 e del TLR4/+896 hanno mostrato una distribuzione puramente casuale tra di loro senza associazioni particolari ($p < 0,7662$).

Discussione

I risultati ottenuti dall'analisi dei 167 panificatori mostrano livelli di IL6 elevati nei soggetti atopici, di IL8 nei malati professionali e di TNF α nei sani. Questo non conferma quanto rilevato da Rylander (35) che aveva osservato bassi valori di IL6 e IL8 negli atopici. I dati di letteratura relativi all'IL6 mostrerebbero invece valori elevati nei soggetti asmatici rispetto ai sani, anche se la presenza di IL6 nel siero di soggetti asmatici è considerato anche come il risultato di uno stato di attivazione delle cellule dell'epitelio polmonare (54) e non solo di malattia. L'IL 6 stimola inoltre i linfociti B a differenziarsi in plasmacellule e secernere anticorpi, attività che può essere presente anche nei soggetti atopici che non sono asmatici. Ciò sembra concordare con quanto da noi osservato. L'IL6, inoltre, è stata messa in relazione da precedenti studi (54) con una riduzione della funzionalità respiratoria; questo non è stato possibile verificarlo nel nostro studio perché i dati spirometrici, essenzialmente negativi, non erano simultanei all'esecuzione degli esami sierologici. Possiamo ragionevolmente ritenere che non vi sia, almeno nella nostra casistica, una relazione tra IL6 e le alterazioni della funzionalità respiratoria nei soggetti atopici, asintomatici nel luogo di lavoro, che nei pregressi controlli spirometrici hanno sempre presentato valori di normalità senza significative modifiche nei diversi controlli. E' comunque un parametro che potrebbe essere oggetto di indagine per valutare l'esposizione professionale avendo a disposizione di un marker per poter meglio valutare il declino della funzionalità respiratoria.

Il risultato legato all'IL8 concorda invece con il ruolo di questa citochina che è implicata nell'attivazione della risposta neutrofilica presente nell'asma moderato-severo (55). E' dunque più che ragionevole che si trovi in elevate quantità nel siero dei soggetti con malattia professionale. L'IL8 risulta elevata anche nei soggetti che assumono farmaci, confermando il fatto che sono i soggetti con malattia attiva. Il TNF α invece risulta più elevato nei soggetti

sani che potrebbero avere una risposta cellulo mediata più sviluppata che interviene bloccando la risposta allergica immuno-mediata (switch Th1- Th2); questa condizione potrebbe essere inoltre tramandata geneticamente in considerazione del fatto che i soggetti con elevati livelli di TNF α non presentano familiarità per allergopatie.

Il FeNO, come ben prevedibile, risulta elevato nei soggetti con malattia professionale, che assumono farmaci e che indossano DPI al lavoro. Questo ultimo dato è da interpretare come il fatto che nei soggetti con malattia professionale viene espresso un giudizio di idoneità alla mansione condizionato con prescrizione di utilizzare DPI (mascherina) durante l'attività lavorativa, prescrizione che però viene poco rispettata per le caratteristiche intrinseche dell'attività (aziende familiari, artigiani, scomodità nell'utilizzo, sottostima della sintomatologia, terapia farmacologica in atto). Dunque l'incremento del FeNO si pone in relazione al fatto che persiste infiammazione per la continuità di esposizione nonostante la terapia, non sempre correttamente ed adeguatamente eseguita, ed altrettanto non sempre congruo utilizzo dei DPI.

Per quanto concerne i risultati relativi allo stato di fumatore, è emerso che gli ex fumatori hanno valori di IL6 e TNF α più elevati rispetto ai fumatori e ai sani. I dati presenti in letteratura suggeriscono che il fumo abbia un effetto sia stimolatorio che inibitorio nei confronti di alcune citochine come il TNF α e l'IL6 (56), gli ex fumatori da noi analizzati erano distribuiti in maniera equivalente nel gruppo degli atopici e dei malati professionali; non sappiamo dire al momento se la correlazione con lo stato di ex fumatore possa avere una qualche spiegazione in termini di anni di fumo e di cessazione dall'abitudine tabagica.

Per quanto riguarda i polimorfismi dei recettori TLR4/+896 e CD14/-159, in letteratura i dati risultano piuttosto vari. Rispetto all'articolo di Rylander (35), la distribuzione dei polimorfismi del TLR4/+896 nella popolazione esaminata è sovrapponibile a quella riscontrata nel presente studio (con una netta prevalenza del polimorfismo AA (90% circa) e una scarsissima presenza del polimorfismo GG (1% circa)), mentre varia la distribuzione dei polimorfismi del CD14/-159. Per questo recettore i due autori avevano riscontrato percentuali simili (45% circa) di CC e CT mentre TT era scarsamente rappresentato. Di contro noi abbiamo osservato valori più elevati del polimorfismo TT (31%) presente soprattutto nel gruppo dei malati professionali (15%). A differenza del loro studio in cui avevano esaminato solo atopici o sani tra gli esposti, noi abbiamo analizzato anche i soggetti con malattia professionale.

Secondo Rylander et al inoltre i soggetti esposti a endotossine, con polimorfismi AG e GG del TLR4/+896, mostravano bassi livelli di IL6 e IL8 nel siero, che fanno supporre una

iporesponsività nei confronti del LPS, dato osservato anche da Arbour (57) ma non confermato dal nostro studio in cui invece anche se in maniera non significativa l'IL6 era più elevata nei soggetti con genotipi AG e GG e l'IL8 nei soggetti con genotipi AA e GG. Rylander ha inoltre osservato che il polimorfismo CC del CD14/-159 era associato a valori più bassi sia di IL6 che di IL8 mentre dai nostri dati risulta confermata solo l'associazione con bassi livelli di IL6.

Come rilevato nello studio ALEX (58) e da Rylander (35) anche i nostri dati mostrano l'assenza di associazione tra i polimorfismi del TLR4/+896 e la presenza di atopica e/o patologia asmatica negli esposti ad endotossine. Il fatto che i vari polimorfismi del recettore TLR4/+896 non siano associati all'incremento delle citochine e del FeNO concorda con i dati sperimentali già osservati sull'animale (33) che sminuirebbero la tendenza osservata in letteratura attuale di attribuire un ruolo di rilievo nella patogenesi dell'asma professionale ai Toll like receptors.

Di contro la diversa distribuzione dei polimorfismi del CD14/-159 nei tre gruppi esaminati e il fatto che i polimorfismi CT e CC del CD14/-159 siano invece risultati più elevati nei soggetti con alti livelli di TNF α potrebbe far presupporre un ruolo protettivo di questi genotipi nei confronti dello sviluppo della patologia professionale, in particolar modo del CC. Leynaert (59) aveva invece definito un ruolo protettivo dei polimorfismi CT e TT nei confronti dello sviluppo di asma e atopica in una popolazione di bambini esposti nei primi anni di vita ed endotossine; il nostro dato che apparentemente sembra in contrasto con il dato di può essere posto in relazione all'età del soggetto e al ruolo stesso delle endotossine che sembrano invece svolgere un ruolo protettivo in età pediatrica (25).

CONCLUSIONI

Il progetto di ricerca descritto era partito con tre obiettivi:

- a) studiare la funzionalità respiratoria in risposta alla broncostimolazione specifica e alla stimolazione nasale specifica con farine ed estratti purificati e standardizzati di farine in lavoratori selezionati visitati in Clinica del Lavoro per accertamenti mirati alla diagnosi di patologia professionale da frumento;
- b) osservare la risposta all'immunoterapia specifica in soggetti affetti da rinite e/o asma occupazionale da farine con vaccino di tipo sublinguale nei soggetti selezionati affetti da rinite e/o asma professionale;
- c) studiare la risposta citochinica e i recettori per le endotossine in lavoratori esposti a farina di frumento e sottoposti a sorveglianza sanitaria

Al termine di questo progetto di ricerca possiamo affermare che sono presenti evidenze cliniche e risultati che aprono la strada verso nuove ricerche e approfondimenti specifici sul tema.

Nello studio clinico, sebbene non sia stato possibile reclutare un numero maggiore di soggetti (si deve segnalare una certa dispersione della casistica che afferisce a strutture e specialisti diversi quali dermatologi, ORL, pneumologi, allergologi, che spesso non trattano i casi secondo un'ottica di patologia professionale, considerato anche che tali pazienti spesso non sono lavoratori dipendenti), siamo riusciti ad avviare la sperimentazione che prevede l'impiego degli estratti di farine (ditta Lofarma (Milano) per l'esecuzione di challenge nasali mirati. Attraverso questi test sono state formulate diagnosi mirate di rinite professionale. Anche se la metodica non è ancora standardizzata e per il momento è applicabile solo per via nasale come da indicazioni della ditta fornitrice per i potenziali rischi di anafilassi con una stimolazione bronchiale diretta, ci aspettiamo che in futuro possa essere applicata anche per via bronchiale dopo un attento periodo di osservazione, in modo da poter semplificare il test di broncostimolazione specifica.

L'immunoterapia specifica ha mostrato risultati più che soddisfacenti. Su 8 lavoratori arruolati, 6 stanno proseguendo la loro attività con un netto miglioramento dei sintomi, e possibilità di arrestare l'evoluzione dell'allergia (marcia allergica). Resteranno da rivalutare la funzionalità respiratoria e gli indici di flogosi nei soggetti al termine dei tre anni di ciclo di immunoterapia specifica, dati che saranno però oggetto di studi futuri.

Relativamente alla parte di laboratorio, i dati analizzati hanno evidenziato il ruolo di alcune citochine come IL8 e TNF α , associate rispettivamente al gruppo dei malati professionali e dei sani, che costituisce un contributo ulteriore nella conoscenza della patogenesi dell'asma professionale e che aggiunge un tassello ai risultati degli studi precedentemente effettuati sul tema. Altresì il ruolo delle endotossine sembra ridimensionarsi; il fatto che i vari polimorfismi del recettore TLR4/+896 non siano distribuiti in maniera significativa nei tre gruppi di esposti analizzati (malati professionali, atopici e sani) né siano associati a nessuna delle citochine dosate né al FeNO, sembra ridurre l'importanza nella patogenesi dell'asma professionale che dai recenti dati di letteratura stava emergendo, confermando invece alcuni dati osservati sul modello animale (32).

I dati relativi al recettore CD14/-159 invece sembrerebbero in grado di aprire una nuova frontiera nella prevenzione della patologia professionale da farine; il fatto che i polimorfismi CT e CC siano i più rappresentati nei soggetti sani e che in particolare il genotipo CC sia associato significativamente anche al TNF α (a sua volta più elevato nei sani) porrebbe l'accento su un possibile ruolo protettivo di questo polimorfismo. Queste osservazioni devono comunque essere considerate propedeutiche ma di certo non si può ignorare l'importanza di misure preventive innovative e legate al soggetto che potrebbero migliorare la salute dei panificatori. Un'analisi del DNA in fase preassuntiva, unitamente a test come gli SPT, il dosaggio delle IgE specifiche e l'ISAAC test, permetterebbe di migliorare la conoscenza del potenziale rischio espositivo del lavoratore.

A differenza della parte clinica di questo progetto di ricerca, che comunque era finalizzata a mettere a punto una nuova metodica diagnostica, verificandone la fattibilità, la facilità di esecuzione, la sicurezza nell'esecuzione e la concordanza tra clinica e challenge, la parte laboratoristica, in particolare quella legata all'analisi dei recettori per le endotossine, fornisce un contributo ai dati di letteratura più che soddisfacente in termini numerici. La popolazione esaminata infatti, se confrontata con altri studi pubblicati sull'argomento, presenta un consistente numero di casi professionali che sono stati considerati nello studio (59 soggetti) comparati con altrettanti lavoratori sani ed atopici esposti allo stesso rischio professionale.

La misurazione del FeNO con strumento portatile è risultata uno strumento utile (valori elevati erano associati alla condizione di malato professionale, all'uso di terapia antiallergica e all'uso di DPI durante il lavoro, nonché all'aumento dell'IL8), valido e di facile impiego nella valutazione della gravità della malattia. Sarebbe stato utile relazionare i valori di FeNO con i dati delle spirometrie in tutti i soggetti che hanno partecipato allo studio, tuttavia i

valori delle PFR eseguiti durante la sorveglianza sanitaria risultavano nei range di normalità. Quello che però è emerso da questi pazienti e da quelli visitati per sospetta patologia professionale è che il FeNO risultava elevato nei soggetti affetti da asma e in misura minore anche nei soggetti affetti da rinite professionale, e che i valori si riducevano in presenza di terapia cortisonica. Per le caratteristiche di facile utilizzo, scarso ingombro e affidabilità clinica si può affermare che la misurazione del FeNO potrebbe rientrare negli strumenti da impiegare nella sorveglianza sanitaria dei soggetti esposti a farine di frumento come già sta iniziando a trovare impiego per il monitoraggio dell'asma occupazionale nelle strutture ospedaliere.

In conclusione riteniamo che il contributo attuale abbia chiarito il ruolo di alcuni indici di flogosi che potrebbero trovare impiego nella sorveglianza sanitaria delle popolazioni esposte e che gli studi di genetica possano meglio chiarire la predisposizione allo sviluppo delle patologie nei soggetti esposti a farine di frumento.

Certamente ciò può servire a superare anacronistici approcci quali ad esempio la condizione generica di atopia, mirando invece a quadri funzionali e di predisposizione individuale valutata con strumenti più correttamente predittivi.

BIBLIOGRAFIA

1. McDonald Jc, Chen Y, Zekveld C, et al. Incidence by occupational and industry of acute work related respiratory disease in the UK,1992-2001. *Occup Environ Med* 2005; 62:836-842.
2. Brant A. Baker's asthma. *Current opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2007, 7:152-155
3. Previdi M. Asma occupazionale: una patologia sottostimata. *G Ital Med Lav Erg* 2011; 33: 1,8-11
4. Patouchas D, Sampsonas F, et al. Determinants of specific sensitization in flour allergens in workers in bakeries with use of skin prick tests. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2009; 13:407-411.
5. Bulat P, Myny K. Exposure to inhalable dust, wheat flour and α -amylase allergens in industrial and traditional bakeries. *Ann.occup.Hyg* 2004; 48-1:57-63
6. De Zotti R, Larese F, Bovenzi M, Negro C, et al. Allergic airway in Italian bakers and pastry makers. *Occup Environ Med* 1994; 51:548-552.
7. Houba R, Doekes G. Occupational respiratory allergy in bakery workers: A Review of the Literature. *American journal of Industrial Medicine* 1998; 34:529-546.
8. Brant A, Nightingale S. Supermarket baker's asthma: how accurate is routine health surveillance? *Occup Environ Med* 2005; 62: 395-399.
9. Baatjies R, Lopata A. Determinants of asthma phenotypes in supermarket bakery workers. *Eur Respir J* 2009; 34:825-833.
10. Baatjies R, Meijster T, Lopata A. Exposure to flour dust in South African supermarket bakeries: modeling of baseline measurements of an intervention study. *Ann Occup Hyg* 2010; 54: 309-318.
11. Brisman J. Baker's asthma. *Occup Environ Med* 2002; 59: 498-502.
12. Brant A, Berriman J. The changing distribution of occupational asthma: a survey of supermarket bakery workers. *Eur Respir* 2005; 25:303-308.
13. Elms J, Fishwick D. Prevalence of sensitization to cellulose and xylanase in bakery workers. *Occup Environ Med* 2003; 60:802-4.
14. Elms J, Robinson E et al. Enzyme exposure in the British baking industry. *Ann Occup Hyg* 2006; 50: 379-384
15. Elms J, Robinson E et al. Exposure to flour dust in UK bakeries: current use of control measures. *Ann Occup Hyg* 2005; 49:85-91.
16. Houba R, Van Run P, Heederik D, et al.: Wheat Antigen Exposure Assessment for Epidemiological Studies in Bakeries Using Personal Dust Sampling and Inhibition ELISA. *Clin Exp Allergy* . 1996; 26:154.
17. Brisman J, et al: Exposure-response Relations for Self Reported Asthma and Rhinitis in Bakers. *Occ Env Med* 57:335-340, 2000
18. Foà V, Ambrosi L: *Medicina del Lavoro*, cap 18. seconda edizione, 2003
19. Bernstein I, Moira et al: *Asthma in the Workplace*. 2° edizione, cap 21, 1999
20. Baldo BA, Wrigley: IgE Antibodies to Wheat Flour Components. *Clin Allergy* 8:109-124, 1978

21. Prichard MG, Ryan G, Walsh BJ, Musk AW: Skin Test and RAST Responses to Wheat and Common Allergens and Respiratory Disease in Bakers. *Clin Allergy* 15:203-210, 1985.
22. Walsh BJ, Wrigley CW, Musk AW, Baldo BA: A Comparison of the Binding of IgE in the Sera of Patients with Baker's Asthma to Soluble and Insoluble Wheat-Grain Proteins. *J Allergy Clin Immunol* 76:23-28, 1985
23. Sotkovsky P, Sklenar J. A new approach to the isolation and characterization of wheat flour allergens. *Clinical Experimental Allergy*. 2011; 41:1031-1043
24. Sandre I, Rozynek P et al. Multiple wheat flour allergens and cross-reactive carbohydrate determinants bind IgE in baker's asthma. *Allergy*. 2011; 66: 1208-1215.
25. Liebers V, Bruning T et al. Occupational endotoxin-exposure and possible health effects on humans. *American Journal of Industrial Medicine* 2006; 49:474-491.
26. Rylander R. Endotoxin and occupational airway disease. *Curr Opin Allergy Immunol* 2006; 6:62-66.
27. George Ls, Hong J, et al: Endotoxin Responsiveness and Subchronic Grain Dust-Induced Airway Disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.2001; 280:L203-L213.
28. Zhu Z et al: Immunomodulating effects of endotoxin in mouse models of allergic asthma. *Clinical et experimental allergy*. 2010; 40: 536-546.
29. Immunotherapy in Asthma. Warrington R. *Immunotherapy*. 2010;2(5):711-72
30. Hollingsworth J.W, Cook D, et al. The role of toll-like receptor 4 in environmental airway injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 126-132.
31. Michel O, Le Van Td, Stern D, et al: Systemic Responsiveness to Lipopolysaccharide and Polymorphisms in the Toll Like Receptor 4 Gene in Human Beings. *J Allergy Clin Immunol*.2003; 112:923-929.
32. Leemans JC et al. Differential role of interleukin-6 in lung inflammation induced by lipoteichoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*. *Am J Respir Crit Care Med*.2002; 165: 1445-1450.
33. Marracini P, Brass D.M, et al. Bakery flour dust exposure causes non-allergic inflammation and enhances allergic airway inflammation in mice. *Clinical and Experimental Allergy*. 2008; 38: 1526-1535.
34. Kline JN, Cowden JD, Hunninghake GW et al: Variable air way responsiveness to inhaled lipopolysaccharide. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 1445 – 1450, 1999
35. Rylander R, Michel O: Organic Dust Induced Inflammation-Role of Atopy and TLR-4 and CD 14 Gene Polymorphisms. *Am J Ind Med* 48:302-307, 2005.
36. Braunwald et al. "Principles of internal medicine" . McGraw Hill 2009
37. Daddi G, Pasargiklian M et al, "Trattato di Pneumologia" Ed Piccin, 3 ed,1994
38. Sartorelli Emilio "Trattato di Medicina del Lavoro" Ed Piccin – 1998
39. Foà V, Ambrosi L. " Medicina del Lavoro" Ed. Utet – Seconda Edizione – 2005
40. Linee Guida GINA 2008
41. Romagnani S, Matucci A et al. "L'asma bronchiale" ed. SEE Firenze, 2004
42. AAVV Manuale Merck Online
43. Zeidler MR, Kleerup E, Tashkin DP: Exhaled Nitric Oxide in the Assessment of Asthma. *Curr Opin Pulm Med* 10:31-36, 2004

44. Turner S: Exhaled Nitric Oxide in the Diagnosis and Management of Asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008; 8:70-76
45. Guidelines for the diagnosis and management of asthma. National Asthma Education and Prevention Program. II, 1-150, 1997. Bethesda, Md: National Institutes of Health
46. Wheat IgE profiling and wheat IgE levels in bakers with allergic occupational phenotypes. *Occupational environmental medicine*. 2003; 70:617-622
47. Vandenplas O, Malo JL "Inhalation Challenges with agents causing occupational asthma" *Eur Respir J* 1997; 10:2612 – 2629
48. Sastre J, Quirce S. immunotherapy : an option in the management of occupational asthma ?. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006 ; 6 : 96-100.
49. Armentia A, Martin-Santos J et al. Baker's asthma :prevalence and evaluation of immunotherapy with a wheat flour extract. *Ann Allergy* 1990 ; 65 : 265-272.
50. Cirila AM. Specific immunotherapy in wheat flour induced occupational allergy ; immunological indicators of effectiveness. *Allergy* 1995 ; 50 :87-88.
51. Thiel H, Ulmer W. *Respiration allergien bei bakern*. GT Verlag ED, Stuttgart 1981.
52. Valero Santiago A, Amat Par P et al. Hypersensitivity to wheat flour in bakers. *Allergo Immunopathol* 1998 ; 16 :309-314.
53. AM Cirila. Asthma and baker's allergy: experience with health programs. *G Ital Med Lav Erg* 2011; 33:20-25
54. Rincon M, Irvin C.G. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary disease. *International journal of biological sciences* 2012 ; 8(9) :1281-1290
55. Nakagome K, Nagata M . Pathogenesis of airway inflammation in bronchial asthma.. *Auris Nasus Larynx*. 2011 ; 38 : 555-563.
56. Arnson Y, Shoenfeld Y et al. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity.. *Journal of autoimmunity* 2010 ; 34 : 258-265.
57. Arbour NC et al: TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000; 25: 187-191.
58. Eder W. et al: Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *Journal of Clinical Immunology* 2004; 113:482-488.
59. Leynaert B et al. Association between farm exposure and atopy, according to the CD14 C-159T polymorphism. *Lornal of Clinical Immunology*. 2006; 118 (3): 658-665.

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

FeNO: frazione espirata di ossido nitrico

TLR 4: toll like receptor

LTPs: non specific lipid transfer protein

LPS: Lipolisaccaride

LPB: Lipidic binding protein

TAR: test arresto ripresa

PEF: picco di flusso espiratorio

RADS: sindrome da distress respiratorio acuto .

SPT: skin prick test

TPBA: test di provocazione bronchiale aspecifica

TPBS: test di provocazione bronchiale specifica

UOML: Unità operativa di Medicina del Lavoro

ITS: immunoterapia specifica

ECP: proteina cationica eosinofila

ECG: elettrocardiogramma

ORL: otorinolaringoiatrica

TC: tomografia computerizzata

IQR: interquartile range

DPI: dispositivi di protezione individuale

RAST: radioallergosorbent test

PCR: polymerase chain reaction

PMPs: particelle paramagnetiche

RINGRAZIAMENTI

Giunta alla conclusione di questo lavoro desidero ringraziare tutti coloro che hanno collaborato allo studio: il Dott. Marraccini per avermi introdotto all'argomento e aver seguito passo dopo passo lo sviluppo del progetto di ricerca, il Prof. Bertazzi per la disponibilità dimostrata e i preziosi suggerimenti forniti, la Dott.ssa Cantone per aver reso possibile lo studio biochimico, il Dott. Barretta per l'analisi statistica e i medici della UOML di Bergamo guidati dal Prof. Mosconi (Dott. Paolo Leghissa, Marisa Santini e Claudia Bancone) che ci hanno permesso di reclutare i panificatori oggetto di questo studio.

Ringrazio inoltre il Prof. Costa, i miei compagni di dottorato e tutta la commissione per avermi accompagnato in questo percorso di crescita professionale.

Chiara Marsili