

La diagnostica molecolare in allergologia

La disponibilità degli allergeni molecolari ha rivoluzionato la gestione diagnostica, prognostica e di follow-up delle reazioni allergiche IgE-mediate, portando all'attuale approccio di medicina di precisione. Ciò ha migliorato la gestione del paziente e ha permesso di ottenere test più sensibili, specifici e riproducibili.

Maria De Filippo^{1,2}, Jacopo Pagani³, Gian Luigi Marseglia^{1,4}

¹ Department of Clinical, Surgical, Diagnostic and Pediatric Sciences, University of Pavia, Pavia, Italy

² Department of Maternal Infantile and Urological Sciences, AOU Policlinico Umberto I, Roma, Italy

³ Department, Pediatric Unit Sant'Andrea Hospital, Faculty of Medicine and Psychology, "Sapienza" University, Rome, Italy

⁴ Pediatric Clinic, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italy

ABSTRACT

The identification of molecular allergens responsible for allergic reactions has significantly transformed the diagnostic and therapeutic approach in allergology. Molecular allergology represents a precision medicine approach for the diagnosis, stratification, therapeutic management, follow-up, and prognostic evaluation of patients affected by a broad spectrum of allergic diseases. Exclusively available for in vitro diagnosis, molecular allergology is not redundant with existing clinical tools for allergological investigation. As a key application example, the differentiation between genuine sensitization and cross-reactivity to allergens at the molecular level allows accurate targeting of the culprit allergen and dramatically improves patient management.

Keywords: Allergy, molecular diagnostics, cross-reactivity, IgE

ABSTRACT

L'identificazione degli allergeni molecolari responsabili delle reazioni allergiche ha notevolmente cambiato l'approccio diagnostico-terapeutico in allergologia. L'allergologia molecolare è un approccio di medicina di precisione per la diagnosi, stratificazione, gestione terapeutica, follow-up e valutazione prognostica dei pazienti affetti da un ampio spettro di malattie allergiche. Esclusivamente disponibile per la diagnosi *in vitro*, l'allergologia molecolare non è ridondante rispetto agli attuali strumenti clinici per l'indagine allergologica. Come esempio di un'applicazione principale, la discriminazione tra sensibilizzazione genuina e cross-reattività agli allergeni a livello molecolare consente un targeting corretto dell'allergene colpevole e migliora drasticamente la gestione del paziente.

Parole chiave: Allergia, diagnostica molecolare, cross-reattività, IgE

INTRODUZIONE

Le malattie allergiche rappresentano un rilevante problema di salute pubblica, con una prevalenza che raggiunge il 30% della popolazione mondiale, sebbene con notevoli variazioni geografiche ed età-correlate. L'imponente incremento dell'incidenza di queste patologie a partire dalla metà del XX secolo ha stimolato un'intensa attività di ricerca, che ha portato a significativi progressi nella comprensione dei meccanismi patogenetici, nella diagnostica e nella terapia, grazie anche allo sviluppo di nuovi biomarcatori. L'allergia è definita come una risposta immunitaria di tipo I (IgE-mediata), scatenata dall'interazione tra un antigene esogeno, l'allergene, e specifici recettori (FcεRI) presenti sulla superficie dei mastociti e dei basofili. Questa reazione è caratterizzata dalla produzione di IgE specifiche per l'allergene e dalla conseguente degranulazione dei mastociti, con rilascio di mediatori infiammatori responsabili dei sintomi clinici. A livello molecolare, l'allergenicità di una proteina dipende dalla sua capacità di indurre una risposta immunitaria di tipo Th2, caratterizzata dalla produzione di IgE e dalla proliferazione di linfociti Th2. La struttura molecolare dell'allergene gioca un ruolo cruciale in questo processo, in quanto deve presentare specifici epitopi in grado di legare le IgE e di indurre l'aggregazione dei complessi IgE-FcεRI.

L'esposizione umana a un vasto numero di allergeni, presenti in diverse matrici ambientali, è alla base dello sviluppo di reazioni allergiche. Tali matrici, definite fonti allergeniche, sono composte da miscele complesse di molecole, tra cui proteine, lipidi e carboidrati, che possono indurre una risposta immunitaria di tipo I. Esempi tipici di fonti allergeniche includono pollini, acari della polvere, alimenti e veleni di insetti.

Gli estratti allergenici, ottenuti mediante processi di estrazione e purificazione delle fonti allergeniche, sono stati a lungo utilizzati sia in ambito diagnostico che terapeutico. Tuttavia, la complessità di questi estratti, spesso costituiti da miscele eterogenee di allergeni, ha limitato la loro caratterizzazione molecolare e la comprensione dei meccanismi alla base delle reazioni allergiche. A partire dalla fine del XX secolo, lo sviluppo di tecnologie di biologia molecolare ha consentito l'isolamento e la caratterizzazione di singoli allergeni molecolari, ovvero proteine pure responsabili dell'induzione della risposta allergica. L'introduzione degli allergeni molecolari nella diagnostica *in vitro* delle allergie IgE-mediate ha rappresentato una vera

e propria rivoluzione, offrendo numerosi vantaggi rispetto agli estratti allergenici tradizionali, tra cui una maggiore specificità, sensibilità e riproducibilità dei test..

RILEVANZA CLINICA DELLA DIAGNOSTICA MOLECOLARE

L'introduzione degli allergeni molecolari nella diagnostica *in vitro* ha rivoluzionato l'approccio alla diagnosi e alla gestione delle allergie. La maggiore specificità e sensibilità dei test basati sull'utilizzo della diagnostica molecolare consentono una più accurata stratificazione del rischio e una personalizzazione delle terapie, inclusa l'immunoterapia allergene specifica (AIT). Inoltre, l'utilizzo degli allergeni molecolari supporta lo sviluppo di algoritmi di apprendimento automatico e intelligenza artificiale, aprendo nuove prospettive per la diagnosi precoce e la previsione della risposta ai trattamenti.

Gli allergeni molecolari appartengono a una vasta gamma di famiglie biochimiche, superando le 180 classificazioni. Tra le classi più rappresentate troviamo proteasi, proteine legate alla patogenesi (PR), proteine di trasporto, di riserva e strutturali. Inizialmente considerati molecole inerti, in grado di innescare una risposta immunitaria eccessiva in soggetti predisposti, gli allergeni molecolari sono oggi riconosciuti come proteine biologicamente attive, capaci di interagire direttamente o indirettamente con il sistema immunitario dell'ospite. Numerose evidenze sperimentali indicano che molti allergeni molecolari possiedono funzioni biologiche specifiche, coinvolte in processi quali l'attivazione di recettori immunitari, il danneggiamento tissutale e l'alterazione delle barriere epiteliali. Pertanto, il concetto di allergene come entità biologicamente inerte è stato superato dalla moderna ricerca allergologica.

La proteasi cisteinica Der p 1, un prototipo degli allergeni del gruppo 1 degli acari della polvere, esercita una molteplicità di effetti dannosi a livello dell'epitelio respiratorio. Questa proteasi è in grado di degradare le giunzioni strette, attivando specifici recettori cellulari (PAR-2) e inducendo il rilascio di molecole pro-infiammatorie come l'IL-33 e la TSLP. Tali eventi alterano la permeabilità epiteliale, facilitando la penetrazione degli allergeni e l'attivazione di risposte immunitarie di tipo 2.

I marcatori di allergenicità evidenziano l'espressione, l'omologia proteica e l'interazione con le immunoglobuline E (IgE) in modo limitato a specifiche specie, generi o gruppi tassonomici ristretti di fonti allergeniche. Ad esempio,

Fel d 1 rappresenta un marcatore per la sensibilizzazione all'epitelio felino, in quanto è esclusivamente legato alle IgE corrispondenti. Allo stesso modo, Cup a 1 funge da marcatore per la sensibilizzazione al polline delle Cupressaceae, poiché è associato alle IgE prodotte in risposta a un insieme circoscritto di pectato liasi omologhe, prevalentemente espresse nel polline di cipresso, ginepro e cedro giapponese. Inoltre, la fosfolipasi A1 Ves v 1 è identificata come un marcatore per la sensibilizzazione al veleno di vespa comune, mentre la beta-lattoglobulina Bos d 5 rappresenta un marcatore per la sensibilizzazione al latte vaccino.

I marcatori di allergenicità cross-reattivi sono allergeni distinti che contengono epitopi legati da molecole di immunoglobuline E (IgE) con la medesima specificità. La reattività crociata si verifica comunemente quando gli anticorpi IgE indotti da allergeni molecolari di una fonte allergenica specificamente sensibilizzante riconoscono e si legano a epitopi condivisi con altre fonti allergeniche. Esempi clinicamente significativi di tale fenomeno includono le sindromi polline-cibo, che si manifestano come sintomi gastrointestinali in individui allergici al polline, a causa di epitopi condivisi tra il polline e le molecole alimentari vegetali. Altri esempi comprendono la reattività crociata tra arachidi e noci, nonché quella tra allergeni derivanti da mammiferi. La reattività crociata deve essere considerata più come un continuum piuttosto che come una categorizzazione discreta; ad esempio, l'allergene marcatore del gatto, Fel d 1, cross-reattivo con gli omologhi di altri felidi, si dimostra nella maggior parte dei pazienti un marcatore attendibile per una vera sensibilizzazione al gatto.

Gli allergeni cross-reattivi appartengono generalmente alla medesima famiglia biochimica. All'interno di una famiglia biochimica, una percentuale di identità di sequenza pari o superiore al 40% è frequentemente associata a una reattività crociata osservabile. Il grado di reattività crociata a livello molecolare, e di conseguenza la prevalenza di reattività crociata clinicamente significativa a livello di fonte allergenica, varia tra le diverse famiglie biochimiche. Le famiglie di allergeni che presentano una reattività incrociata quasi universale e sono ampiamente distribuite tra le fonti allergeniche sono designate come "panallergeni". Un esempio di panallergeni del polline sono le polcalcine: le IgE indotte da una polcalcina tendono a legare praticamente qualsiasi altra polcalcina, risultando in molteplici test cutanei

ed ematici positivi con estratti allergenici di polline. I marcatori di allergenicità di origine vegetale, fungina e animale appartengono generalmente a famiglie distinte, le quali non presentano reattività crociata. Tuttavia, esistono eccezioni clinicamente significative, in particolare tra gli allergeni derivati da funghi, acari e insetti. Ad esempio, le tropomiosine degli animali invertebrati costituiscono una famiglia di panallergeni animali caratterizzata da un'ampia reattività crociata. La reattività crociata delle tropomiosine, con rilevanza clinica, coinvolge insetti (ad esempio, Bla g 7 per la *Blattella germanica*), acari della polvere domestica (ad esempio, Der p 10 dall'acaro europeo *Dermatophagoides pteronyssinus*), crostacei (ad esempio, Pen a 1 dal gambero *Penaeus azteca*), funghi (ad esempio, tropomiosine di *Dermatophagoides pteronyssinus*), nematodi (ad esempio, Ani s 3 dal parassita dei pesci *Anisakis simplex*), molluschi (ad esempio, Hel as 1 dalla lumaca da giardino *Helix aspersa*) e tropomiosine di pesci, come Sal s 4 dal salmone atlantico *Salmo salar*.

Inoltre, le tropomiosine evidenziano una mancanza di allergenicità per le proteine con un'identità di sequenza pari o superiore al 70% rispetto agli ortologi umani. Infatti, la tropomiosina è una proteina ubiquitaria che interagisce con l'actina e si trova nelle cellule di invertebrati e vertebrati. Tuttavia, le tropomiosine di specie evolutivamente affini condividono un'elevata identità di sequenza, suggerendo che la sensibilizzazione alle tropomiosine dei mammiferi richiederebbe una perdita di tolleranza verso la proteina umana (*self*). Pertanto, l'allergia alla carne di mammifero non coinvolge le tropomiosine di origine mammifera come allergeni.

L'attribuzione di una reazione clinica alla reattività crociata, piuttosto che a una vera e propria sensibilizzazione, ha un impatto significativo sulla gestione della condizione. Infatti, la presenza di IgE dirette verso più allergeni molecolari cross-reattivi è associata a una minore efficacia e a una maggiore incidenza di reazioni avverse durante l'immunoterapia allergene-specifica (AIT). Al contrario, la rilevazione di IgE verso un allergene molecolare cross-reattivo può spiegare le reazioni cliniche a fonti allergeniche apparentemente non correlate.

In termini di affinità di legame delle IgE, si osserva generalmente un gradiente che va da allergeni molecolari sensibilizzanti, come la tropomiosina Der p 10 nei pazienti allergici agli acari della polvere (HDM), ad allergeni molecolari cross-reattivi, come le tropomiosine Pen

Esempi selezionati di allergeni rilevanti per la cross-reattività clinica

REGNO	FAMIGLIA	DISTRIBUZIONE	ESPOSIZIONE	CROSS-REATTIVITÀ	ESEMPLI DI MEMBRI CLINICAMENTE RILEVANTI
Piante	PR-10	Pollini, vegetali commestibili	R,A	++	Bet v 1 (polline di betulla), Pru p 1 (pesca), Cor a 1 (polline di nocciolo)
	nsLTP	Pollini, vegetali commestibili	R,A	+	Art v 3 (artemisia), Pla a 3 (polline di platano di Londra), Ole e 7 (olivo), Cor a 8 (nocciola, Pru p 8 (pesca)
	Profiline	Pollini, vegetali commestibili	R,A	+++	Bet v 2 (polline di betulla), Phi p 12 (polline di erba timothy), Cuc m 2 (melone), Hev b 8 (latice), Mus a 1 (banana), Pru p 4 (pesca)
	Polcalcine	Pollini	R	+++	Bet v 4 (polline di betulla), Phi p 7 (polline di erba timothy)
	GRP	Pollini, vegetali commestibili	R,A	++	Cup s 7 (polline di cipresso funerario), Cyl j 7 (polline di cedro giapponese), Pru p 7 (pesca), Cit s 7 (arancia dolce), Cap a 7 (peperone)
	Proteine di deposito	Arachidi, legumi, frutta a guscio e cereali	A	±	Ara h 2, Ara h 6 (2S-albumine di arachide), Ana o 3 (2S-albumina di anacardo), Ses i 1 (2S-albumina di sesamo), Cor a 9 (11S-globulina), Gly m 4 (7S-vicilina di soia)
	Oleosine	Arachidi, legumi, frutta a guscio e cereali	A	±	Ara h 10, Ara h 11, Ara h 14 (arachide), Cor a 12, Cor a 15 (nocciola), Ses i 4, Ses i 5 (sesamo)
Animale	Lipopaline	Mammiferi, insetti	R,A	++	Bos d 5 (beta1altoglobulina del latte vaccino), Can f 1, Can f 2, Can f 6 (cane), Fel d 4, Fel d 7 (gatto), Bla g 4 (biatta tedesca)
	Stereoalbumine	Mammiferi, uccelli	R,A	++	Bos d 6 (bovino), Can f 3 (cane), Fel d 2 (gatto), Sus s 1 (maiale), Gal d 5 (carne di pollo e uovo di gallina)
	Beta-parvoalbumine	Pesci	A	+++	Cyp c 1 (carpa comune), Gad c 1 (merluzzo ballico), Cro p 1 (coccodrillo)
Funghi	Tropomiosine	Artropodi, molluschi, nematodi, pesci	R,A,I	+++	Ani s 3 (<i>Anisakis simplex</i>), Bla g 7 (biatta tedesca), Der p 10, Der f 10 (ecari della polvere domestica), Pen a 1 (gambero), Sal s 4 (salmone), Hel as 1 (lumaca), Aed a 10 (zanzara)
	Proteine perossisomiali	Funghi	R,C	+++	Asp f 3 (<i>Aspergillus fumigatus</i>), Cand a 3 (<i>Candida albicans</i>), Mala f 2 (<i>Malassezia furfur</i>)

Abbreviazioni: R, esposizione respiratoria (inalazione); A, esposizione alimentare (ingestione); C, esposizione cutanea; I, iniezione (puntura di insetto, iatrogena ecc.)

A cura degli autori

Tabella 1

a 1 del gambero o Bla g 7 della blatta. Questo gradiente può influenzare la rilevanza funzionale del legame e del cross-linking delle IgE con il recettore FcεRI, nonché la degranolazione dei mastociti e l'espressione clinica.

La prevalenza della sensibilizzazione ad allergeni molecolari rappresenta un ulteriore criterio per l'interpretazione degli allergeni. Gli allergeni maggiori sono definiti come quelli in grado di indurre una sensibilizzazione rilevabile nel 50% o più dei pazienti allergici alla corrispondente fonte allergenica, mentre gli allergeni minori sono quelli con IgE rilevabili in meno del 50% della popolazione considerata. In accordo con questa classificazione, un allergene immunodominante è definito come quello riconosciuto dalla maggior parte delle IgE dirette contro la fonte allergenica corrispondente. Ad esempio, la proteina di stoccaggio dell'arachide Ara h 2 è considerata un allergene principale per l'arachide, mentre la proteina strutturale profilina Ara h 5 è classificata come allergene minore; Ara h 2 è anche un allergene immunodominante. La Tabella 1 mostra una selezione di famiglie di allergeni ben caratterizzati rilevanti per la cross-reattività clinica.

CONCLUSIONI

La disponibilità degli allergeni molecolari per i laboratori clinici ha rivoluzionato la gestione diagnostica, prognostica e di follow-up delle reazioni allergiche mediate da IgE, portando all'attuale approccio di medicina di precisione in allergologia. Gli allergeni molecolari selezionati da fonti allergeniche comuni forniscono informazioni sul rischio di gravità, persistenza, sviluppo successivo di malattie allergiche e idoneità alla immunoterapia allergene (AIT), sulla scelta della stessa e sulla risposta terapeutica. Ciascuno di questi passaggi richiede una costante collaborazione tra specialisti clinici e di laboratorio. L'ambiente ideale comprende allergologi, specialisti di laboratorio clinico e ricercatori di scienze di base, che affrontano il campo degli allergeni molecolari da diverse prospettive, fornendo in ultima analisi la migliore assistenza per i pazienti allergici. In Europa, stanno emergendo sempre più unità di allergologia trasversali basate su un'educazione e una pratica multidisciplinari all'interno delle strutture sanitarie e in coordinamento con le associazioni di pazienti, prevedendo un aumento dei metodi di laboratorio complementari, come la valutazione degli allergeni molecolari.

Bibliografia

1. Goodman RE, Chapman MD, Slater JE. The allergen: sources, extracts, and molecules for diagnosis of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2020;8:2506–14
2. Subcommittee IWAN. IUIS/WHO allergen nomenclature; 2023. Available from: <http://allergen.org/index.php>
3. Goodman RE, Breiteneder H. The WHO/IUIS allergen nomenclature. *Allergy* 2019;74:429–31.
4. Dramburg S, Hilger C, Santos AF, de Las Vecillas L, Aalberse RC, Acevedo N, et al. EAACI molecular allergology user's guide 2.0. *Pediatr Allergy Immunol* 2023(Suppl 28);34:e13854
5. Sharma E, Vitte J. A systematic review of allergen cross-reactivity: translating basic concepts into clinical relevance. *J Allergy Clin Immunol: Global* 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jacig.2024.100230>.
6. Matricardi PM, Potapova E, Panetta V, Lidholm J, Mattsson L, Scala E, et al. IgE to cyclophilins in pollen-allergic children: epidemiologic, clinical, and diagnostic relevance of a neglected panallergen. *J Allergy Clin Immunol* 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2024.01.030>.
7. Sircar G, Bhowmik M, Sarkar RK, Najafi N, Dasgupta A, Focke-Tejkl M, et al. Molecular characterization of a fungal cyclophilin allergen Rhi o 2 and elucidation of antigenic determinants responsible for IgE-crossreactivity. *J Biol Chem* 2020;295:2736–48.
8. Cramer R. Structural aspects of fungal allergens. *Semin Immunopathol* 2015;37:117–21.
9. van Hage M, Kack U, Asarnoj A, Konradsen JR. An update on the prevalence and diagnosis of cat and dog allergy – emphasizing the role of molecular allergy diagnostics. *Mol Immunol* 2023;157:1–7
10. Vilchez-Sanchez F, Rodriguez-Perez R, Gomez-Traseira C, DominguezOrtega J, Hernandez-Rivas L, Garcia IL, et al. Sensitisation to peach allergen Pru p 7 is associated with severe clinical symptoms in a Spanish population. *Pediatr Allergy Immunol* 2023;34:e14030.
11. Giusti D, Guemari A, Perotin JM, Fontaine JF, Tonye Libyh M, Gatouillat G, Tabary T, Pham BN, Vitte J. Molecular allergology: a clinical laboratory tool for precision diagnosis, stratification and follow-up of allergic patients. *Clin Chem Lab Med*. 2024 May 31;62(12):2339-2355. doi: 10.1515/cclm-2024-0305