



## COME L'ALLERGOLOGIA MOLECOLARE PUO' DARE FORMA ALLA GESTIONE DELLE PATOLOGIE ALLERGICHE DELLE VIE AEREE



### How molecular allergology can shape the management of allergic airways diseases

*Davide Caimmi<sup>a,b</sup>, Enrica Manca<sup>a,c</sup>, Elena Carboni<sup>a,d</sup>, and Pascal Demoly<sup>a,b</sup>*

#### ELENA CARBONI, ENRICA MANCA

Unità di Pediatria, Ospedale Maggiore, ASST Cremona  
UOC Pediatria Universitaria- Azienda Ospedaliero Universitaria – Ospedali riuniti di Foggia

#### CONTATTO

enricamanca  
@hotmail.com

Rinite allergica, congiuntivite ed asma rappresentano le patologie allergiche più comuni. Classicamente la diagnosi si basa sulla storia clinica del paziente e sul risultato di prick test cutanei (SPT) e/o delle IgE specifiche sieriche, usando gli estratti allergenici. La composizione degli estratti influenza fortemente l'identificazione delle IgE specifiche, per cui usando pannelli di aziende diverse si possono avere risultati differenti o addirittura opposti. Gli SPT e le IgE specifiche in estratto contengono un mix di allergeni, alcuni specifici mentre altri cross-reattivi. Pertanto, non sono utili nell'identificare in modo preciso la componente molecolare responsabile della reazione allergica, fondamentale soprattutto per i pazienti polisensibilizzati. Il trattamento è sintomatico, per il controllo di sintomi ed eventuali esacerbazioni, o curativo. Il primo, che include antistaminici orali o topici, corticosteroidi nasali, cromoglicato topico e gocce oculari, non sempre è efficace soprattutto nei pazienti con sintomi severi, nei poli-allergici o nei pazienti sensibilizzati ad allergeni cross-reattivi o a pan-allergeni. Ad oggi, l'unica terapia con effetto potenzialmente curativo è l'immunoterapia specifica (ITS). Questa, somministrata principalmente per via sottocutanea (SCIT) e sublinguale (SLIT), è associata ad una riduzione dei sintomi e ad una desensibilizzazione nei confronti dell'allergene che persiste anche anni dopo la sua sospensione.

La prescrizione dell'ITS sulla base del risultato degli SPT potrebbe condurre alla prescrizione di estratti verso i quali il paziente non è allergico ostacolandone la sua efficacia. L'utilizzo invece della component-resolved diagnosis (CRD) o diagnosi molecolare, guida invece verso la "medicina personalizzata" ed alla prescrizione di ITS sulla base del profilo di sensibilizzazione molecolare del paziente. La CRD è una tecnica precisa e standardizzata che può aiutare nel differenziare una sensibilizzazione nei confronti di un allergene inalatorio da una poli-sensibilizzazione o una cross-reazione legata a pan-allergeni. Tale metodica permette di individuare allergeni molecolari specifici verso cui il paziente è sensibilizzato e sta diventando sempre più utile nella prescrizione della corretta AIT.

Il problema delle allergopatie respiratorie è legato al loro impatto sulla qualità di vita del paziente e ai loro costi diretti ed indiretti. L'obiettivo di questo lavoro è di discutere come l'allergologia molecolare può aiutare i clinici nell'ottimizzare la diagnosi ed il trattamento delle patologie allergiche respiratorie.

Nel 1988-1989, la duplicazione delle sequenze di cDNA di alcuni allergeni quali betulla, veleno di calabrone e acari della polvere, ha rappresentato la nascita dell'allergologia molecolare. Da allora sono stati isolati, standardizzati e prodotti numerosi allergeni ricombinanti e naturali purificati. Per esempio, nei pazienti allergici alla betulla, una sensibilizzazione all'estratto di arachide può essere solo una cross-reazione clinicamente non significativa a causa dell'omologia di sequenza tra le proteine PR-10 di betulla Bet v 1 (allergene maggiore) e Ara h 8; invece, un soggetto con sindrome orale allergica alla pesca può essere sensibilizzato alla betulla senza presentare sintomi poiché esiste una cross-reazione tra le profiline Pru p 4 e Bet v 2.

Attualmente sono disponibili numerosi test di laboratorio ed i clinici possono adattare la loro scelta su quale prescrivere ai loro pazienti in base alla storia clinica, costo e disponibilità geografica di ciascuno. Le tre principali opzioni disponibili sono rappresentate dai singleplex, i multiplex personalizzati, i microarray e macroarray [Tabella 1]. I test Singleplex (ImmunoCap) per essere efficaci richiedono una conoscenza estensiva della storia clinica del paziente e del/degli allergene/i da indagare. Un'opzione intermedia è costituita dai multiplex personalizzati (Euroline, Euroimmun, Lübeck, Germany) che associano gli estratti ed i loro principali allergeni molecolari scelti sulla base dello specifico pattern clinico del paziente in modo da differenziare tra cross-reazione e vera sensibilizzazione. I multiplex possono essere eseguiti attraverso microarrays (come ISAC e MeDALL) e nanoparticelle (FABER) oppure macroarrays (ALX). Sebbene questi siano più pratici nei pazienti che reagiscono a varie fonti allergeniche, il loro uso rispetto ai Singleplex richiede la stessa conoscenza estensiva della storia clinica del paziente ed una conoscenza ancora maggiore degli allergeni visto il rischio di falsi positivi (vale a dire sensibilizzazione senza rilevanza clinica). Ciò è vero soprattutto per i bambini, a causa della lunga lista di pneumo e trofoallergeni normalmente inclusi nei pannelli multiplex.

Inoltre, i pannelli che valutano le fonti allergeniche e quelli che invece considerano le componenti molecolari talvolta danno risultati differenti. Una spiegazione possibile di questa discrepanza può essere

ritrovata nel considerare che alcune IgE molecolari sono assenti o presenti in quantità limitate nel pannello molecolare, pertanto possono essere negative nonostante la positività del test fatto con estratto.

Talvolta, le IgE possono non riconoscere la componente maggiore di un estratto mentre risultano positive verso le sue componenti minori e cross-reattive. In questo caso, i test basati sugli estratti possono essere positivi e tutti i molecolari negativi. Infine, le IgE possono reagire fortemente verso allergeni molecolari di un estratto ma più debolmente verso l'estratto stesso portando a test molecolare positivo con estratti negativi o debolmente positivi.

Nel 2016, l'Accademia Europea di Allergologia ed Immunologia Clinica (EAACI) ha suggerito due possibili strategie per la diagnosi di patologie allergiche: decidendo in base all'anamnesi quali SPT e successivamente quali allergeni molecolari eseguire ("dalla clinica alle molecole"), oppure eseguendo un multiplex e successivamente gli SPT ("dalle molecole alla clinica"). Nel 2018, Motches-Luksch et al. hanno analizzato l'accuratezza di entrambe le strategie concludendo che l'approccio "dalle molecole alla clinica" offre un percorso diagnostico affidabile e più rapido ed è applicabile soprattutto in bambini ed anziani, negli atopici e ogni volta che gli SPT siano difficili da eseguire o non affidabili. Ciononostante, non è stato valutato il costo-beneficio di tale approccio.

	Vantaggi	Svantaggi
<b>Singleplex</b>	<b>Costo</b>	<b>Raccolta di anamnesi estensiva</b>
	<b>Assenza di informazione potenzialmente irrilevanti</b>	<b>Conoscenza dell'esatto allergene da ricercare</b>
		<b>Indagini limitate</b>
<b>Multiplex personalizzato</b>	<b>Combinazione di estratti e molecole rilevanti</b>	<b>Costo</b>
	<b>Opzione intermedia tra singleplex e multiplex</b>	<b>Raccolta di anamnesi estensiva</b>
		<b>Conoscenza del profilo clinico del paziente</b>
<b>Multiplex: microarray/macroarray</b>	<b>Dosaggio di un ampio numero di estratti e molecole</b>	<b>Costo</b>
	<b>Dose molto piccola di sangue richiesto (20 µl)</b>	<b>Raccolta di anamnesi estensiva</b>
		<b>Valutazione della rilevanza clinica di ciascun risultato positivo</b>

## **La diagnostica molecolare per predire l'evoluzione clinica delle malattie allergiche**

La CRD può essere utile per valutare la gravità delle malattie allergiche e identificare potenziali fattori predittivi per l'evoluzione clinica dei sintomi. Inoltre, permette di identificare i pazienti multi-sensibilizzati a rischio di sviluppare rinite allergica e/o asma.

Ad esempio, nei pazienti sensibilizzati al pelo di animale, il work-up dell'allergia è classicamente basato sui risultati dell'estratto tramite SPT o dosaggio di IgE specifiche. Tuttavia, molecole cross-reattive, come le sieralbumine, sono presenti in tutti gli estratti animali utilizzati e possono quindi portare a una sovrastima dei tassi di sensibilizzazione. Attraverso la valutazione degli allergeni molecolari, come riportato in uno studio di Nwaru et al., la sensibilizzazione a specifici componenti allergenici del pelo animale si è dimostrata essere fortemente associata all'allergia, un buon predittore di rinite allergica e di asma ed un buon marcatore di gravità dell'asma.

Per quanto riguarda la sensibilizzazione alle graminacee diversi studi hanno valutato la correlazione tra il profilo di sensibilizzazione e la gravità della malattia allergica. Uno studio pediatrico italiano, che ha valutato i risultati di una coorte di 401 bambini, ha rivelato che la sensibilizzazione al *Phl p1*, allergene molecolare principale del *Phleum pratense*, era associata a rinite allergica persistente mentre forme di asma più grave e persistente erano associate alla sensibilizzazione al *Phl p 5*. La sensibilizzazione a *Pru p 3*, che fa parte delle *Non-specificLipid Transfer Proteins*, si è rivelata associata all'asma ad insorgenza tardiva, anche se gli autori non sono stati in grado di discriminare se tale profilo fosse direttamente associato all'asma o se si trattasse di un marker di grave propensione atopica. Un altro studio ha mostrato, invece, una correlazione direttamente proporzionale tra il valore di sensibilizzazione a *Phlp1*, *Phlp2*, *Phlp5* e *Phlp6e* la gravità della sintomatologia. Inoltre, è stato anche valutata l'evoluzione della sensibilizzazione al *Phleum pratense* nei bambini affetti da rinite allergica, mostrando che la sensibilizzazione può essere rilevata anni prima dell'inizio delle manifestazioni cliniche e che potrebbe progredire attraverso una "diffusione molecolare" in termini di concentrazione sierica e allergeni coinvolti, durante le fasi precliniche e le prime fasi cliniche di malattia.

Per quanto riguarda la sensibilizzazione agli allergeni degli acari della polvere, dall'analisi dei dati di 101 pazienti è emerso che la sensibilizzazione alle proteine degli acari della polvere del gruppo 1 (*Der p 1*, *Der f 1*) e alla *Lep d 2* era significativamente più frequente nei pazienti con rinite e asma rispetto ai soli pazienti con rinite. Invece, *Der p 2* e *Der f 2* erano associati a rinite da moderata a grave, mentre *Lep d 2* ad asma grave e rinite allergica grave. In una coorte di nascita tedesca è stata valutata, durante più di 20 anni, in più di 700 pazienti, l'evoluzione delle IgE specifiche dirette contro 12 allergeni degli acari della polvere. I bambini con sensibilizzazione precoce a *Der p 1*, *Der p 2* e *Der p 23*, familiarità per rinite allergica e una maggiore esposizione agli acari, presentavano in età adulta una sensibilizzazione polimolecolare. Inoltre,

la sensibilizzazione a *Derp1* o *Derp23* in età prescolare si è dimostrata essere in grado di predire l'insorgenza di asma in età scolare.

Le evidenze relative al rapporto tra sensibilizzazione ad allergeni specifici ed evoluzione o gravità delle malattie allergiche sono ancora limitate e sono necessari ulteriori studi per valutare se la CRD possa effettivamente aiutare il clinico a identificare il tipo di malattia allergica e la gravità in modo da mettere in atto il corretto follow-up diagnostico terapeutico.

### **La diagnostica molecolare e l'immunoterapia specifica personalizzata**

In un contesto di medicina personalizzata, che persegue l'obiettivo di fornire una terapia personalizzata, la CRD potrebbe acquisire un ruolo centrale nel migliorare l'accuratezza diagnostica e di conseguenza terapeutica per le malattie allergiche. Infatti, grazie all'analisi completa del profilo di sensibilizzazione del paziente, si può selezionare il miglior allergene con cui effettuare l'ITS con un conseguente miglioramento dell'efficacia della terapia.

Diversi studi sono andati ad analizzare le differenze nella prescrizione dell'ITS andando a rivalutare le prescrizioni effettuate sulla base dell'anamnesi e degli SPT alla luce dei risultati della CRD. Stringari et al. nel 2014 hanno condotto uno studio su 651 bambini italiani affetti da rinite allergica alle graminacee mostrando che dopo rivalutazione la prescrizione per l'ITS è stata modificata nel 40% dei casi con un tasso più alto di correzioni per l'ITS per l'olivo e la betulla. In uno studio spagnolo, effettuato su 70 bambini polisensibilizzati, la prescrizione, alla luce del profilo molecolare dei pazienti, è stata modificata nel 53,4% dei casi. Inoltre, utilizzando la CRD, la prescrizione dell'ITS per singolo allergene è aumentata dal 18% al 51% e nel 9,3% dei casi i risultati della CRD hanno mostrato che l'AIT non era utile o necessaria, perché presentavano una bassa sensibilizzazione agli allergeni maggiori e/o una sensibilizzazione a pan-allergeni non specifici. Burgos et al. hanno ottenuto risultati simili, nello studio in cui hanno valutato la prescrizione dell'ITS di 281 bambini. Dopo i risultati della CRD la prescrizione dell'ITS è stata modificata nel 52,8% dei pazienti e nel 15,3% dei casi non è stata ritenuta necessaria. Passalacqua et al. invece, hanno sottolineato che l'ITS monoallergenico ha dimostrato una maggiore efficacia rispetto alle formulazioni poli-allergeniche.

Gli studi citati non solo hanno evidenziato una diminuzione della necessità di utilizzare miscele di allergeni per l'ITS, ma anche che l'associazione di SPT e CRD può portare ad una prescrizione dell'ITS più accurata, personalizzata e più efficace.

### **Conclusioni**

Tradizionalmente, la diagnosi delle malattie allergiche si basa sull'anamnesi e sul risultato dei SPT. Dalla sua introduzione, la diagnostica molecolare si è notevolmente sviluppata e a differenza dei SPT, la capacità

di riconoscere specifiche molecole allergeniche permette l'identificazione di precisi profili di sensibilizzazione (genuina e cross-reattiva).

L'approccio "dalle molecole alla clinica" può risultare troppo costoso e non sempre necessario, ma la CRD sembra essenziale nei pazienti che presentano un profilo di sensibilizzazione complesso o allergie multiple o sintomi clinici diversi e non facilmente inquadrabili (da esposizioni ambientali note). Permette infatti, di accorciare il processo diagnostico, di selezionare una prescrizione ITS più accurata e, di conseguenza, di prescrivere misure di terapia e prevenzione più efficaci. Inoltre, la CRD può giocare un ruolo importante nella previsione dell'evoluzione clinica del paziente e della gravità dei sintomi.

In conclusione, la CRD ha dimostrato avere un valore aggiunto nella diagnosi e nella gestione delle malattie allergiche e pone il processo decisionale in ambito allergologico nel mondo della medicina personalizzata. Tuttavia, è ancora dibattuto il rapporto costo-beneficio della CRD nella pratica clinica quotidiana. Ad oggi, i multiplex sono ancora piuttosto costosi e non ci sono studi in letteratura che indagano sulla possibile riduzione della spesa conseguente a una terapia più appropriata e mirata.