

## RUBRICA SPECIALISTULUI

## Abordarea diagnostică moleculară în aspergiloza bronhopulmonară alergică

### Molecular diagnosis approach in allergic bronchopulmonary aspergillosis

[Vieru Mariana \(/reviste/search?author=Mariana+Vieru\)](#),  
[Bucur Irina-Gabriela \(/reviste/search?author=Irina-Gabriela+Bucur\)](#),  
[Ganea Carmen-Saviana \(/reviste/search?author=Carmen-Saviana+Ganea\)](#),  
[Neagu Diana-Luiza \(/reviste/search?author=Diana-Luiza+Neagu\)](#),  
[Gheorghiță Lorena-Mihaela \(/reviste/search?author=Lorena-Mihaela+Gheorghiță\)](#),  
[Popescu Florin-Dan \(/reviste/search?author=Florin-Dan+Popescu\)](#)

First published: 22 octombrie 2021

Editorial Group: MEDICHUB MEDIA

DOI: 10.26416/Aler.6.3.2021.5679

## Abstract

Allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) is a disease that occurs in patients with asthma or cystic fibrosis who have positive skin tests for immediate hypersensitivity against *Aspergillus fumigatus*, and elevated levels of serum IgE and IgG antibodies against fungal-specific antigen, determined by fluoroimmunoassay. In this review, we present the diagnostic criteria for ABPA revised in the last decade by several expert groups. The officially recognized molecular allergens of *Aspergillus fumigatus* used in commercially available singleplex and multiplex immunoassays for the determination of serum specific IgE are mitogillin Asp f 1 from ribonuclease family, fibrinogen binding-protein Asp f 2, peroxisomal membrane protein Asp f 3, group 4 fungal allergen Asp f 4, and Mn superoxide dismutase Asp f 6. The detailed evaluation of IgE sensitization molecular profiles, using the panel of recombinant allergenic components of *Aspergillus fumigatus*, is useful in clinical practice to identify genuine versus cross-reactive sensitization in patients sensitized to *Aspergillus fumigatus*, including patients with comorbid atopic dermatitis and sensitization to other fungi with cross-reactive allergenic components, for an accurate molecular allergy diagnosis of ABPA, and to distinguish ABPA from asthma with *Aspergillus fumigatus* sensitization without ABPA.

Keywords

## Rezumat

Aspergiloza bronhopulmonară alergică (ABPA) este o afecțiune care apare la pacienți cu astm sau fibroză chistică și care prezintă teste cutanate de hipersensibilitate imediată pozitive la *Aspergillus fumigatus* și valori serice crescute ale anticorpilor IgE și IgG față de antigen fungic specific, determinate prin metodă de analiză fluoroimunoenzimatică. În această recenzie, prezentăm criteriile de diagnostic pentru ABPA revizuite în ultimul deceniu de mai multe grupuri de experți. Alergenele moleculare ale *Aspergillus fumigatus* recunoscute oficial și utilizate în metodele de imunoanaliză singleplex și multiplex disponibile comercial pentru determinarea IgE specifice serice sunt: mitogilina Asp f 1 din familia ribonucleazelor, proteina de legare a fibrinogenului Asp f 2, proteina membranală peroxizomală Asp f 3, alergenul fungic de grup 4 Asp f 4 și Mn superoxid dismutaza Asp f 6. Evaluarea detaliată a profilurilor moleculare de sensibilizare IgE, utilizând panelul de componente alergenice recombinante pentru *Aspergillus fumigatus*, este utilă în practica clinică pentru identificarea sensibilizării autentice față de cea cross-reactivă la pacienții sensibilizați la *Aspergillus fumigatus*, inclusiv la pacienții cu dermatită atopică asociată și sensibilizare la alți fungi cu componente alergenice cu reactivitate încrucișată, pentru diagnosticul alergologic molecular de precizie al ABPA și pentru a distinge ABPA de astmul cu sensibilizare la *Aspergillus fumigatus* fără ABPA.

### Cuvinte cheie

aspergiloză bronhopulmonară alergică (/reviste-de-specialitate/alergologia?tag=aspergiloză bronhopulmonară alergică)

diagnostic molecular (/reviste-de-specialitate/alergologia?tag=diagnostic molecular)

metode de imunoanaliză (/reviste-de-specialitate/alergologia?tag=metode de imunoanaliză)

***Aspergillus fumigatus*** este un fung filamentos trimorfic din încrengătura *Ascomycota*, clasa *Eurotiomycetes*, ordinul *Eurotiales*, familia *Aspergillaceae*, care prezintă în ciclul de viață<sup>(1,2)</sup> conidii (spori asexuați de 2,5 μm, cu propagare aeriană, produși în lanțuri pe fialide dezvoltate pe conidiofori), ascospori (spori sexuați de 4-5 μm, dormanți și implicați în supraviețuirea în compost) și micelii (forme vegetative cu hife filamentoase, care apar în sol pe materia organică în descompunere și la nivel pulmonar)<sup>(3-5)</sup>. *Aspergillus fumigatus* este răspândit la nivel global și este comun în multe medii. Este prezent în aer, în sol și în vegetația în descompunere, se găsește în cantități mari în solul de grădină și de seră și în depozitele de compost. Deși este capabil să provoace afecțiuni variate la om, *Aspergillus fumigatus* nu colonizează în mod obișnuit tractul respirator<sup>(5,6)</sup>.

La oameni umani, speciile de *Aspergillus* determină un spectru variat de boli. În funcție de statusul imunitar al fiecărui individ, afecțiunile produse de *Aspergillus* spp. pot fi clasificate în trei mari grupuri cu mecanisme patogene și manifestări clinice distincte, cu sau fără diferite grade de suprapunere:

la pacienți imunocompetenți – aspergilom, aspergiloză pulmonară cronică;

la pacienți cu imunodepresie severă – aspergiloză pulmonară invazivă, aspergiloză bronșică invazivă, aspergiloză extrapulmonară la nivelul sistemului nervos central;

la pacienți cu hipersensibilitate imunologică – astm sever cu sensibilizare fungică, aspergiloză bronhopulmonară alergică<sup>(4)</sup>.

**Aspergiloza bronhopulmonară alergică (ABPA)** este o afecțiune de hipersensibilitate la *Aspergillus fumigatus*, care afectează aproximativ 2-15% dintre pacienții cu fibroză chistică și 1-3,5% dintre cei cu astm. În plus, ABPA este detectată la circa 25-35% dintre pacienții cu astm și test cutanat prick pozitiv la *Aspergillus fumigatus*<sup>(7,8)</sup>. În afară de fungul filamentos termotolerant *Aspergillus fumigatus*, alți fungi care posedă termotoleranță, cum ar fi fungii filamentoși *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp., *Schizophyllum commune*, dar și *Candida albicans*, pot provoca patologii similare, denumite micoze bronhopulmonare alergice (MBPA)<sup>(9,10)</sup>. Fungii termotoleranți, în mod tipic *Aspergillus fumigatus* și *Candida albicans*, pot coloniza căile respiratorii, în timp ce fungii care sunt rareori capabili să se dezvolte la 37 °C, cum ar fi cei nontermotoleranți *Alternaria alternata* și *Cladosporium herbarum*, exacerbează astmul, acționând ca aeroalergene<sup>(9-11)</sup>.

De-a lungul timpului, criteriile de diagnostic pentru ABPA au fost reevaluate, fiind subliniată importanța reacțiilor de hipersensibilitate mediate IgE (de tip I) și mediate IgG (de tip III), a determinării nivelurilor serice ale IgE, respectiv IgG specifice fungice, împreună cu aspectele imagistice pulmonare sugestive<sup>(12)</sup>.

**Criteriile de diagnostic pentru ABPA** au fost revizuite în ultimul deceniu de către mai multe grupuri de experți<sup>(7,9,13)</sup>, fiind prezentate în continuare (tabelele 1 și 2).



(/image/18525/0/3\_tabel\_1\_18525.png)

*Criteriile de diagnostic ABPA ale Societății Internaționale de Micologie Umană și Animală (ISHAM; International Society of Human and Animal Mycology)*<sup>(7,13)</sup>



*Criteriile de diagnostic ABPA ale ISHAM revizuite*<sup>(13)</sup>  
(/image/18524/0/3\_tabel\_2\_18524.png)

Deoarece *Aspergillus fumigatus* este cel mai frecvent fung care provoacă ABPA, criteriile de diagnostic ale ABPA se bazează pe reactivitatea imunologică a pacientului la extractul fungic natural specific. Cu toate acestea, din cauza reactivității încrucișate dintre extractele alergenice native din diferiți fungi, sensibilizarea aparentă la astfel de extracte nu este întotdeauna autentică la *Aspergillus fumigatus*<sup>(14,15)</sup>.

*Aspergillus fumigatus* este un fung ubicuitar peren în mediul interior și exterior, fiind atât un agent patogen sau oportunist asociat cu multe afecțiuni patologice, cât și o sursă majoră de aeroalergene<sup>(16,17)</sup>.

Spectrul alergenelor produse de acest fung este extins pe o mare varietate de structuri moleculare, incluzând enzime și proteine secretate, intracelulare sau structurale. Clasificarea în alergene majore și minore este dificilă, deoarece sensibilizarea pe un profil foarte variabil de componente alergenice depinde semnificativ de statusul imunologic și patologic al fiecărui individ. Alergia la *Aspergillus fumigatus* afectează rareori persoane atopice fără astm sau fibroză chistică, cunoscute ca afecțiuni cu multe fenotipuri<sup>(14)</sup>.

**Alergenele moleculare** ale *Aspergillus fumigatus* recunoscute oficial și utilizate în metodele de imunoanaliză singleplex sau multiplex pentru IgE specifice serice sunt: mitogilina Asp f 1 din familia ribonucleazelor, proteina de legare a fibrinogenului Asp f 2, proteina membranală peroxizomală Asp f 3, Mn superoxid dismutaza Asp f 6 și alergenul fungic de Grup 4 Asp f 4 (tabelul 3).

Componente alergice moleculare ale *Aspergillus fumigatus* recunoscute oficial și utilizate în metodele de imunoanaliză singleplex sau multiplex pentru IgE specifice serice disponibile comercial(18-20)

| Proteină | Funcție biologică                   | Măsură | Grupa |
|----------|-------------------------------------|--------|-------|
| Asp f 1  | Mitogilina                          | 18 kDa | 1     |
| Asp f 2  | Proteina de legare a fibrinogenului | 72 kDa | 2     |
| Asp f 3  | Proteina membranală peroxizomală    | 72 kDa | 3     |
| Asp f 4  | Alergen fungic                      | 72 kDa | 4     |
| Asp f 6  | Mn superoxid dismutaza              | 22 kDa | 6     |

(/image/18523/0/3\_tabel\_3\_18523.png)

*Componente alergice moleculare ale Aspergillus fumigatus recunoscute oficial și utilizate în metodele de imunoanaliză pentru IgE specifice serice disponibile comercial(18-20)*

Alte componente alergice ale *Aspergillus fumigatus* recunoscute oficial<sup>(18,20)</sup>, care nu sunt utilizate în imunoanalizele IgE disponibile actual sunt:

proteaze – metaloproteaza Asp f 5 (40 kDa), aspartat proteaza Asp f 10 (34 kDa), serin proteaza alcalină Asp f 13 (34 kDa), serin proteaza vacuolară cerevisina Asp f 18 (34 kDa);

izomeraze – peptidil-prolil izomeraza Asp f 11 (24 kDa), ciclofilina/rotamaza Asp f 27 (18 kDa);

proteine ribozomale și de șoc termic – proteine ribozomale P2 Asp f 8 (11 kDa) și L3 Asp f 23 (44 kDa), proteina de șoc caloric P90 Asp f 12 (90 kDa);

enolaze – enzima glicolitică Asp f 22 (46 kDa);

tioredoxine – oxidoreductazele Asp f 28 (13 kDa) și Asp f 29 (13 kDa);

glicozil hidrolaze – Asp f 16 (43 kDa), Asp f 9 (34 kDa);

proteine ale peretelui celular – cerato-platanina Asp f 15 (16 kDa); galactomananproteina Asp f 17 (27 kDa), proteina PhiA din peretele celular Asp f 34 (20 kDa);

alte alergene moleculare fără funcție biologică definită – Asp f 7 (12 kDa).

Cu atât de multe alergene moleculare aprobate oficial de Subcomitetul pentru nomenclatura alergenelor al Organizației Mondiale a Sănătății și al Uniunii Internaționale a Societăților de Imunologie (OMS/IUIS), *Aspergillus fumigatus* reprezintă una dintre cele mai complexe surse de alergene cunoscute până în prezent.

Aplicarea unui **diagnostic alergologic molecular de precizie (PAMD)** în ABPA este o abordare recent discutată, cunoscută anterior și sub numele de diagnostic bazat pe componente alergice<sup>(21)</sup>. De-a lungul timpului au existat mai multe încercări menite să facă diferența dintre ABPA și astmul cu sensibilizare mediată IgE la *Aspergillus fumigatus* fără ABPA, prin aplicarea diagnosticului alergologic molecular<sup>(15)</sup>.

**Componentele alergice moleculare** ale *Aspergillus fumigatus* utilizate uzual în PAMD pentru ABPA sunt Asp f 1, Asp f 2, Asp f 3, Asp f 4 și Asp f 6.

**Asp f 1** este o ribonuclează fungică de 18 kDa din familia mitogilinei. Această ribotoxină, inhibitorie potentă a sintezei proteinelor eucariote, este un alergen major produs de miceliile de *Aspergillus fumigatus*. Nu este prezent în spori și este produs după germinarea și creșterea fungică, de aceea sensibilizarea IgE la Asp f 1 poate fi considerată biomarker specific pentru expunerea la *Aspergillus fumigatus* care a

germinat în căile respiratorii ale pacienților. Niveluri semnificative de anticorpi IgE specifici față de Asp f 1 sunt prezente la majoritatea pacienților cu ABPA din stadiile incipiente ale bolii<sup>(14,22-24)</sup>. Asp f 1 este un alergen specific speciei *Aspergillus fumigatus* și nu are omologie cu niciun alergen fungic cunoscut, cu excepția restrictocinei Asp r 1, care este aproape identică cu Asp f 1<sup>(15)</sup>. Asp f 1 a fost raportat ca inductor potent de răspunsuri IgE și IgG specifice la pacienții cu ABPA, dar nu și la indivizii sănătoși, sugerându-se astfel utilitatea sa ca biomarker pentru ABPA<sup>(25)</sup>.

**Asp f 2** este o proteină de legare a fibrinogenului, alergen major de 37 kDa al *Aspergillus fumigatus*, majoritatea persoanelor sensibilizate la acest fung având anticorpi IgE specifici serici față de Asp f 2. Cea mai mare parte a pacienților cu ABPA au anticorpi IgE direcționați împotriva rAsp f 2<sup>(26,27)</sup>. Asp f 2 poate fi, de asemenea, considerat ca alergen relativ specific pentru *Aspergillus fumigatus* și/sau alți fungi din genul *Aspergillus*. Similar Asp f 1, Asp f 2 poate fi considerat biomarker pentru sensibilizarea IgE autentică la *Aspergillus fumigatus*. Sensibilizarea și nivelurile serice crescute de IgE specifice la Asp f 2 somatic și Asp f 1 secretat au fost raportate la 60-100% dintre pacienții cu ABPA. Nivelurile de IgE specifice pentru Asp f 2 și Asp f 1 sunt raportate discriminant, dar nivelul-prag optim diferă de la un studiu la altul<sup>(27-30)</sup>.

**Asp f 3** este o proteină membranară peroxizomală de 19 kDa care poate fi considerată panalergen în alergია fungică. Asp f 3 prezintă omologie structurală semnificativă cu proteinele membranale peroxizomale din *Candida* spp. și *Malassezia* spp. Sensibilizarea la Asp f 3 indică niveluri stabile ale IgE de-a lungul timpului, în ciuda episoadelor de exacerbare și remisiune ale ABPA, sporind astfel diferențierea pacienților cu ABPA de cei non-ABPA<sup>(31-35)</sup>. Frecvențele crescute ale sensibilizării IgE la Asp f 1, Asp f 2 și Asp f 3 indică faptul că aceste trei componente alergice pot fi considerate alergene majore ale *Aspergillus fumigatus* pentru ABPA<sup>(15,36)</sup>.

**Asp f 4** este un alergen fungic de grup 4 cu greutate moleculară de 30 kDa și specificitate crescută pentru *Aspergillus fumigatus*. Sensibilizarea mediată IgE la Asp f 4 este un biomarker foarte specific pentru ABPA<sup>(15,37)</sup>. Asp f 4, cu funcție biologică necunoscută, împreună cu Asp f 6 sunt proteine somatice considerate alergene minore (mai puțin 50% dintre pacienții non-ABPA sensibilizați la *Aspergillus fumigatus* prezintă IgE specifice la aceste componente moleculare). Sensibilizările IgE la aceste alergene moleculare sunt raportate ca biomarkeri specifici pentru diagnosticul ABPA, atât la pacienții cu fibroză chistică, dar și la cei astmatici<sup>(30)</sup>.

**Asp f 6** este o superoxid dismutază de 26,5 kDa, foarte specifică ca alergen pentru ABPA și care aparține familiei de proteine superoxid dismutaze cu mangan (MnSOD). Diagnosticul serologic bazat pe rAsp f 4 și rAsp f 6 al ABPA are specificitate de 100% și atinge o sensibilitate de 90% la pacienții astmatici sensibilizați la *Aspergillus fumigatus*, în timp ce distincția serologică dintre sensibilizarea *Aspergillus fumigatus* și ABPA la pacienții care suferă de fibroză chistică ajunge la 100%<sup>(14,38,39)</sup>. Asp f 6 este de asemenea un panalergen în alergია fungică. În particular, Mala s 11, care este MnSOD cross-reactivă din *Malassezia sympodialis*, reprezintă un alergen major implicat în dermatita atopică<sup>(32-35)</sup>.

Combinările de mai multe molecule alergice fungice au fost sugerate pentru a ajuta diagnosticul ABPA în diferite studii. Pacienții cu ABPA au niveluri semnificativ mai ridicate de IgE specifice la Asp f 1 și Asp f 2 decât cei cu astm alergic<sup>(21)</sup>. IgE specifice la rAsp f 2, rAsp f 4 și rAsp f 6 au fost detectate semnificativ mai frecvent în serul pacienților cu

ABPA relevantă clinic în comparație cu subiecții sănătoși sau astmatici<sup>(20)</sup>. Într-o metaanaliză de studii, IgE specifice la Asp f 1 și Asp f 3 au fost biomarkerii cei mai specifici pentru ABPA<sup>(40)</sup>. Ratele de pozitivitate pentru Asp f 1, Asp f 2, Asp f 4 și Asp f 6, precum și nivelurile de IgE specifice la Asp f 1, Asp f 4 și Asp f 6 sunt mai mari la pacienții cu ABPA decât la pacienții cu astm și sensibilizare la *Aspergillus fumigatus*. Marea majoritate a pacienților cu ABPA și majoritatea pacienților cu astm sensibilizați la *Aspergillus fumigatus* au sensibilizare la cel puțin un alergen molecular fungic<sup>(41)</sup>. Detectarea IgE la alergenele specifice Asp f 1 și Asp f 2 confirmă sensibilizarea autentică la *Aspergillus fumigatus*, în timp ce IgE la Asp f 3, Asp f 4 și Asp f 6 indică gradul de complexitate al răspunsurilor IgE la *Aspergillus fumigatus*. Interesant, Asp f 3, Asp f 4 și Asp f 6 nu sunt secretate, ci proteine somatice, spre deosebire de Asp f 1 și Asp f 2, care sunt secretate extracelular. Distribuirea extinsă a răspunsurilor IgE față de alergene secretate ca sensibilizare benignă spre cele somatice în ABPA poate indica faptul că sistemul imunitar luptă împotriva unei încărcături mai mari de *Aspergillus fumigatus* sau împotriva unei devieri mai pronunțate către Th2 a răspunsului imunitar la *Aspergillus fumigatus*. În ambele cazuri, un răspuns IgE mai complex la acest fung poate fi predictiv pentru un risc mai mare de deteriorare clinică<sup>(30)</sup>.

Astmul poate fi frecvent asociat cu dermatita atopică, care este asociată la rândul ei cu sensibilizarea transdermică la *Malassezia* spp. Ca urmare a reactivității încrucișate între unele alergene moleculare ale *Malassezia* spp. și *Aspergillus fumigatus*, dermatita atopică trebuie luată în considerare drept comorbiditate în studiile de evaluare a diagnosticului alergologic molecular în alergia fungică<sup>(15)</sup>. *Malassezia*, denumită anterior *Pityrosporum*, constituie o familie de fungi lipofili care cuprinde mai multe specii diferite aparținând microflorei normale a pielii adulților sănătoși, dar care, în anumite condiții, pot acționa ca agenți patogeni oportuniști. Mai multe studii au raportat că *Malassezia* spp. au un rol important în eczema atopică<sup>(35)</sup>. Mal f 2 și Mal f 3, izolate din fungul lipofil *Malassezia furfur*, au omologie de secvență cu două proteine membranale peroxizomale ale *Candida boidinii* și alergenul cu Asp f 3 al *Aspergillus fumigatus*<sup>(33)</sup>. Mala s 10 (hsp-70) și Mala s 11 (MnSOD) sunt alergene majore ale *Malassezia sympodialis*. Mala s 11 are identitate structurală de 56% cu alergenul MnSOD Asp f 6 al *Aspergillus fumigatus*<sup>(35)</sup>. Mai mult, trebuie avertizat că Asp f 6 are reactivitate încrucișată cu alergene omoloage ale altor fungi, care ar trebui să fie luată în considerare în cazul dermatitei atopice asociate<sup>(30)</sup>. În plus, dovezile de reactivitate încrucișată între Asp f 6 și alergenul de *Alternaria alternata* Alt a 14 în cazul ABPA sugerează existența unui mecanism care poate fi legat de patogenia afecțiunii de hipersensibilitate<sup>(42)</sup>.

**Metodele de analiză imunoenzimatică pentru IgE specifice** față de componente alergene din *Aspergillus fumigatus* sunt de tip singleplex sau multiplex.

Metoda singleplex de analiză imunoenzimatică cu componente alergene cuplate la polimer celulozic activat ca fază solidă (capsulă) și detectare fluorimetrică poate fi utilizată pentru determinarea IgE specifice față de cele mai importante alergene moleculare recombinante ale *Aspergillus fumigatus*:

*Aspergillus fumigatus* rAsp f 1

*Aspergillus fumigatus* rAsp f 2

*Aspergillus fumigatus* rAsp f 3

*Aspergillus fumigatus* rAsp f 4

*Aspergillus fumigatus* rAsp f 6<sup>(43)</sup>.

Metoda singleplex de imunoanaliză prin chemiluminiscență amplificată enzimatic cu alergene moleculare în fază lichidă poate fi utilizată pentru determinarea IgE specifice față de componenta alergenica nativă recombinantă nAsp r 1 a *Aspergillus restrictus*<sup>(44)</sup>.

Metoda multiplex de analiză imunoenzimatică cu componente alergene imobilizate în microarray pe lamă de sticlă preactivată ca fază solidă (chip) și detectare fluorimetrică poate fi utilizată pentru determinarea IgE specifice față de următoarele alergene moleculare recombinante ale *Aspergillus fumigatus*:

*Aspergillus fumigatus* rAsp f 1

*Aspergillus fumigatus* rAsp f 3

*Aspergillus fumigatus* rAsp f 6<sup>(44)</sup>.

Metoda multiplex de explorare alergologică prin analiză imunoenzimatică cu componente alergene cuplate cu nanoparticule activate depozitate în macroarray pe membrană de nitroceluloză ca fază solidă (chip) și detectare colorimetrică poate fi utilizată pentru determinarea IgE specifice față de alergenele moleculare recombinante importante ale *Aspergillus fumigatus*:

*Aspergillus fumigatus* rAsp f 1

*Aspergillus fumigatus* rAsp f 3

*Aspergillus fumigatus* rAsp f 4

*Aspergillus fumigatus* rAsp f 6<sup>(45)</sup>.

**Abordarea alergologică moleculară în algoritmul de diagnostic** pentru ABPA este importantă, investigarea IgE serice specifice față de componentele alergene moleculare importante ale *Aspergillus fumigatus*, prin metodele de imunoanaliză singleplex sau multiplex prezentate anterior, fiind utilă în practica clinică pentru diagnosticul ABPA, conform schemei decizionale prezentate mai jos<sup>(46)</sup> și având potențialul de a revizui suplimentar criteriile de diagnostic în viitor.

► Dacă **factorii predispozanți** pentru ABPA sunt *prezenți* – astm, fibroză chistică, bronhopneumopatie obstructivă cronică sau prezența anomaliilor de structură bronhopulmonară – și dacă **două criterii majore** sunt *prezente*: nivel seric crescut ale IgE specifice față de *Aspergillus fumigatus* >0,35 kU<sub>A</sub>/L (sau test cutanat de hipersensibilitate imediată pozitiv în cazul în care determinarea IgE specifice nu este posibilă) și nivel seric al IgE totale >500 UI/mL (evaluare imunologică de primă linie):

*plus* prezența a cel puțin **două criterii minore** dintre următoarele *trei*: precipitine sau IgG serice specifice față de *Aspergillus fumigatus*, modificări imagistice CT concludente pentru ABPA, eozinofilie în sânge periferic >500/μL (actuală sau în istoric) este **diagnostic de ABPA**

*plus* absența a cel puțin **două criterii minore** dintre următoarele *trei*: precipitine sau IgG specifice serice față de *Aspergillus fumigatus*, modificări imagistice CT concludente pentru ABPA, eozinofilie în sânge periferic >500/μL (actuală sau în istoric) (evaluare diagnostică de a doua linie, dificilă din cauza caracterului fluctuant al unor criterii) este

Considerare: sensibilizare la *Aspergillus fumigatus* fără alergie, BPOC sau astm cu alergie la *Aspergillus fumigatus*, sau **aplicarea diagnosticului molecular pentru ABPA** (evaluare moleculară de a treia linie):

dacă sunt detectate IgE specifice serice crescute față de **rAsp f 1** sau **rAsp f 2** sau **rAsp f 3** **și** dacă sunt detectate IgE specifice serice crescute față de **rAsp f4** sau **rAsp f6** è **ABPA probabilă**

dacă sunt detectate IgE specifice serice crescute față de **rAsp f 1** sau **rAsp f 2** sau **rAsp f 3** **și** dacă *nu* sunt detectate IgE specifice serice crescute față de **rAsp f4** sau **rAsp f6** è se repetă evaluarea eozinofiliei și a imagisticii toracice și/sau se consideră *diagnosticul de MBPA* (micoză bronhopulmonară alergică)

dacă *nu* sunt detectate IgE specifice serice crescute față de **rAsp f 1** sau **rAsp f 2** sau **rAsp f 3** è diagnostic de **ABPA improbabil (!)** și se poate considera diagnosticul de MBPA.

► Dacă *factorii predispozanți* pentru ABPA sunt *prezenți*: astm, fibroză chistică, bronhopneumopatie obstructivă cronică sau prezența anomaliilor de structură bronhopulmonară, dar dacă nu sunt prezente ambele *criterii majore*: nivel seric crescut ale IgE specifice față de *Aspergillus fumigatus* >0,35 kU<sub>A</sub>/L (sau test cutanat de hipersensibilitate imediată pozitiv în cazul în care determinarea IgE specifice nu este posibilă), nivel seric al IgE serice totale >500 UI/mL è **diagnosticul de ABPA este exclus**.

Criteriile clinice actualizate pentru diagnosticul de **micoză bronhopulmonară alergică** (MBPA) sunt prezentate în continuare<sup>(9)</sup>. Pacienții fără fibroză chistică care prezintă cel puțin 6 dintre cele 10 criterii sunt diagnosticați definitiv cu MBPA, iar cei care au doar 5 criterii sunt diagnosticați cu MBPA probabilă. Cele 10 criterii pentru diagnosticul MBPA sunt:

astm sau simptome astmatice, inclusiv wheezing, preexistente sau actuale;

eozinofilie în sânge periferic >500/μL;

niveluri serice crescute ale IgE totale ≥ 417 UI/mL;

test cutanat de hipersensibilitate imediată pozitiv la fungi filamentoși sau valori serice crescute ale anticorpilor IgE specifici față de antigen de fungi filamentoși;

anticorpi precipitanți (precipitine) sau anticorpi IgG serici specifici față de fungi filamentoși\* (corelați la nivel de gen cu criteriul anterior);

fungi filamentoși\* prezenți în spută sau lavaj bronhopulmonar (cultura fungică pozitivă poate fi considerată când există același gen fungic cu testele serice din criteriile anterioare);

prezența hifelor fungice în dopurile de mucus bronșic;

bronșectazii centrale prezente la tomografie computerizată toracic;

dopuri de mucus în bronhiile centrale (CT/bronhoscopie/anamnestice, dopuri de mucus în expectorație);

dopuri de mucus hiperdense la CT cu rezoluție crescută (HRCT).

\*Aplicabile fungilor filamentoși, dar nu și fungilor de tip *Candida* spp.

## Concluzii

Evaluarea detaliată a profilurilor moleculare de sensibilizare IgE, utilizând panelul de componente alergice recombinante pentru *Aspergillus fumigatus* din metodele de imunoanaliză disponibile comercial este utilă în practica clinică pentru identificarea sensibilizării autentice față de cea cross-reactivă la pacienții sensibilizați la *Aspergillus fumigatus*, inclusiv la pacienții cu dermatită atopică asociată și sensibilizare la alți fungi cu componente alergice cu reactivitate încrucișată, pentru diagnosticul alergologic molecular de precizie al ABPA și pentru a distinge ABPA de astmul cu sensibilizare la *Aspergillus fumigatus* fără ABPA. Sunt necesare mai multe cercetări la diferite populații pentru a confirma validitatea generală a acestor abordări alergologice moleculare.

## Bibliografie

1. Steenwyk JL, Shen XX, Lind AL, Goldman GH, Rokas A. A Robust Phylogenomic Time Tree for Biotechnologically and Medically Important Fungi in the Genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *mBio*. 2019 Jul 9;10(4):e00925-19. doi: 10.1128/mBio.00925-19.
2. Thines M, Aoki T, Crous PW, Hyde KD, Lücking R, Malosso E, May TW, Miller AN, Redhead SA, Yurkov AM, Hawksworth DL. Setting scientific names at all taxonomic ranks in italics facilitates their quick recognition in scientific papers. *IMA Fungus*. 2020 Nov 17;11(1):25. doi: 10.1186/s43008-020-00048-6.
3. Tekaia F, Latgé JP. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr Opin Microbiol*. 2005 Aug;8(4):385-92. doi: 10.1016/j.mib.2005.06.017.
4. Latgé JP, Chamilos G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Nov 13;33(1):e00140-18. doi: 10.1128/CMR.00140-18.
5. van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Romani L, Netea MG, Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2017 Nov;15(11):661-674. doi: 10.1038/nrmicro.2017.90.
6. Wéry N. Bioaerosols from composting facilities – a review. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:42. Published 2014 Apr 4. doi:10.3389/fcimb.2014.00042
7. Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, Gupta D, Meis JF, Guleria R, Moss R, Denning DW; ABPA complicating asthma ISHAM working group. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin Exp Allergy*. 2013 Aug;43(8):850-73. doi: 10.1111/cea.12141. PMID: 23889240.
8. Patel AR, Patel AR, Singh S, Singh S, Khawaja I. Diagnosing Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: A Review. *Cureus*. 2019 Apr 27;11(4):e4550. doi: 10.7759/cureus.4550.
9. Asano K, Hebisawa A, Ishiguro T, Takayanagi N, Nakamura Y, Suzuki J, Okada N, Tanaka J, Fukutomi Y, Ueki S, Fukunaga K, Konno S, Matsuse H, Kamei K, Taniguchi M, Shimoda T, Oguma T; Japan ABPM Research Program. New clinical diagnostic criteria for allergic bronchopulmonary aspergillosis / mycosis and its validation. *J Allergy Clin Immunol*. 2021 Apr;147(4):1261-1268.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2020.08.029.
10. Chowdhary A, Agarwal K, Kathuria S, Gaur SN, Randhawa HS, Meis JF. Allergic bronchopulmonary mycosis due to fungi other than *Aspergillus*: a global overview. *Crit Rev Microbiol*. 2014 Feb;40(1):30-48. doi: 10.3109/1040841X.2012.754401.
11. Woolnough KF, Richardson M, Newby C, Craner M, Bourne M, Monteiro W, Siddiqui S, Bradding P, Pashley CH, Wardlaw AJ. The relationship between biomarkers of fungal allergy and lung damage in asthma. *Clin Exp Allergy*. 2017 Jan;47(1):48-56. doi: 10.1111/cea.12848.
12. Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA, Denning DW, Cramer R, Brody AS, Light M, Skov M, Maish W, Mastella G; Participants in the Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis – state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis*. 2003 Oct 1;37 Suppl 3:S225-64. doi: 10.1086/376525.
13. Saxena P, Choudhary H, Muthu V, Sehgal IS, Dhooira S, Prasad KT, Garg M, Saikia B, Aggarwal AN, Chakrabarti A, Agarwal R. Which Are the Optimal Criteria for the Diagnosis of Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis? A Latent Class Analysis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2021 Jan;9(1):328-335.e1. doi: 10.1016/j.jaip.2020.08.043.
14. Cramer R, Zeller S, Glaser AG, Vilhelmsson M, Rhyner C. Cross-reactivity among fungal allergens: a clinically relevant phenomenon? *Mycoses*. 2009 Mar;52(2):99-106. doi: 10.1111/j.1439-0507.2008.01644.x.

15. Tanimoto H, Fukutomi Y, Yasueda H, Takeuchi Y, Saito A, Watai K, Sekiya K, Tsuburai T, Asano K, Taniguchi M, Akiyama K. Molecular-based allergy diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in *Aspergillus fumigatus*-sensitized Japanese patients. *Clin Exp Allergy*. 2015 Dec;45(12):1790-800. doi: 10.1111/cea.12590.
16. Horner WE, Helbling A, Salvaggio JE, Lehrer SB. Fungal allergens. *Clin Microbiol Rev*. 1995 Apr;8(2):161-79. doi: 10.1128/CMR.8.2.161.
17. Kodzius R, Rhyner C, Konthur Z, Buczek D, Lehrach H, Walter G, Cramer R. Rapid identification of allergen-encoding cDNA clones by phage display and high-density arrays. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2003 Mar;6(2):147-54. doi: 10.2174/1386207033329751.
18. Allergen databases: <http://allergen.org>, [www.allergome.org](http://www.allergome.org)
19. Popescu FD, Vieru M. Precision medicine allergy immunoassay methods for assessing immunoglobulin E sensitization to aeroallergen molecules. *World J Methodol*. 2018 Nov 29;8(3):17-36. doi: 10.5662/wjm.v8.i3.17.
20. Kespohl S, Raulf M. Mould allergens: Where do we stand with molecular allergy diagnostics?: Part 13 of the series Molecular Allergology. *Allergo J Int*. 2014;23(4):120-125. doi:10.1007/s40629-014-0014-4
21. Steering Committee Authors; Review Panel Members. A WAO - ARIA - GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnosis (PAMD@): Update 2020. *World Allergy Organ J*. 2020 Mar 7;13(2):100091. doi: 10.1016/j.waojou.2019.100091.
22. Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, Valenta R, Hilger C, Hofmaier S, Aalberse RC, Agache I, Asero R, Ballmer-Weber B, Barber D, Beyer K, Biedermann T, Bilò MB, Blank S, Bohle B, Bosshard PP, Breiteneder H, Brough HA, Caraballo L, Caubet JC, Cramer R, Davies JM, Douladiris N, Ebisawa M, Eigenmann PA, Fernandez-Rivas M, Ferreira F, Gadermaier G, Glatz M, Hamilton RG, Hawranek T, Hellings P, Hoffmann-Sommergruber K, Jakob T, Jappe U, Jutel M, Kamath SD, Knol EF, Korosec P, Kuehn A, Lack G, Lopata AL, Mäkelä M, Morisset M, Niederberger V, Nowak-Węgrzyn AH, Papadopoulos NG, Pastorello EA, Pauli G, Platts-Mills T, Posa D, Poulsen LK, Raulf M, Sastre J, Scala E, Schmid JM, Schmid-Grendelmeier P, van Hage M, van Ree R, Vieths S, Weber R, Wickman M, Muraro A, Ollert M. EAACI Molecular Allergology User's Guide. *Pediatr Allergy Immunol*. 2016 May;27 Suppl 23:1-250. doi: 10.1111/pai.12563.
23. Sporik RB, Arruda LK, Woodfolk J, Chapman MD, Platts-Mills TA. Environmental exposure to *Aspergillus fumigatus* allergen (Asp f I). *Clin Exp Allergy*. 1993 Apr;23(4):326-31. doi: 10.1111/j.1365-2222.1993.tb00330.x.
24. Mayer C, Hemmann S, Faith A, Blaser K, Cramer R. Cloning, production, characterization and IgE cross-reactivity of different manganese superoxide dismutases in individuals sensitized to *Aspergillus fumigatus*. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997 May-Jul;113(1-3):213-5. doi: 10.1159/000237550.
25. Arruda LK, Platts-Mills TA, Longbottom JL, el-Dahr JM, Chapman MD. *Aspergillus fumigatus*: identification of 16, 18, and 45 kd antigens recognized by human IgG and IgE antibodies and murine monoclonal antibodies. *J Allergy Clin Immunol*. 1992 Jun;89(6):1166-76. doi: 10.1016/0091-6749(92)90301-h.
26. Banerjee B, Kurup VP, Greenberger PA, Kelly KJ, Fink JN. C-terminal cysteine residues determine the IgE binding of *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f 2. *J Immunol*. 2002 Nov 1;169(9):5137-44. doi: 10.4049/jimmunol.169.9.5137.
27. Banerjee B, Kurup VP, Greenberger PA, Hoffman DR, Nair DS, Fink JN. Purification of a major allergen, Asp f 2 binding to IgE in allergic bronchopulmonary aspergillosis, from culture filtrate of *Aspergillus fumigatus*. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Jun;99(6 Pt 1):821-7. doi: 10.1016/s0091-6749(97)80017-6.
28. Bowyer P, Fraczek M, Denning DW. Comparative genomics of fungal allergens and epitopes shows widespread distribution of closely related allergen and epitope orthologues. *BMC Genomics*. 2006 Oct 9;7:251. doi: 10.1186/1471-2164-7-251.
29. Denning DW, O'Driscoll BR, Hogaboam CM, Bowyer P, Niven RM. The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence. *Eur Respir J*. 2006 Mar;27(3):615-26. doi: 10.1183/09031936.06.00074705.
30. Carsin A, Romain T, Ranque S, Reynaud-Gaubert M, Dubus JC, Mège JL, Vitte J. *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis: An update on immune interactions and molecular diagnostics in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy*. 2017 Nov;72(11):1632-1642. doi: 10.1111/all.13204.
31. Lindborg M, Magnusson CG, Zargari A, Schmidt M, Scheynius A, Cramer R, Whitley P. Selective cloning of allergens from the skin colonizing yeast *Malassezia furfur* by phage surface display technology. *J Invest Dermatol*. 1999 Aug;113(2):156-61. doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00661.x.
32. Hemmann S, Blaser K, Cramer R. Allergens of *Aspergillus fumigatus* and *Candida boidinii* share IgE-binding epitopes. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Dec;156(6):1956-62. doi: 10.1164/ajrccm.156.6.9702087.
33. Yasueda H, Hashida-Okado T, Saito A, Uchida K, Kuroda M, Onishi Y, Takahashi K, Yamaguchi H, Takesako K, Akiyama K. Identification and cloning of two novel allergens from the lipophilic yeast, *Malassezia furfur*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Jul 20;248(2):240-4. doi: 10.1006/bbrc.1998.8944. PMID: 9675120.
34. Flückiger S, Scapozza L, Mayer C, Blaser K, Folkers G, Cramer R. Immunological and structural analysis of IgE-mediated cross-reactivity between manganese superoxide dismutases. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002 Aug;128(4):292-303. doi: 10.1159/000063862.

35. Andersson A, Rasool O, Schmidt M, Kodzius R, Flückiger S, Zargari A, Crameri R, Scheynius A. Cloning, expression and characterization of two new IgE-binding proteins from the yeast *Malassezia sympodialis* with sequence similarities to heat shock proteins and manganese superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 2004 May;271(10):1885-94. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04098.x.
36. Knutsen AP, Hutcheson PS, Slavin RG, Kurup VP. IgE antibody to *Aspergillus fumigatus* recombinant allergens in cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy.* 2004 Feb;59(2):198-203. doi: 10.1046/j.1398-9995.2003.00310.x.
37. Li BCM, Huh SM, Prieto MD, Hong G, Schwarz C, Moss RB, Quon BS. Biomarkers for the Diagnosis of Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in Cystic Fibrosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021 May;9(5):1909-1930.e4. doi: 10.1016/j.jaip.2020.12.064.
38. Hemmann S, Menz G, Ismail C, Blaser K, Crameri R. Skin test reactivity to 2 recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens in *A. fumigatus*-sensitized asthmatic subjects allows diagnostic separation of allergic bronchopulmonary aspergillosis from fungal sensitization. *J Allergy Clin Immunol.* 1999 Sep;104(3 Pt 1):601-7. doi: 10.1016/s0091-6749(99)70330-1.
39. Hemmann S, Nikolaizik WH, Schöni MH, Blaser K, Crameri R. Differential IgE recognition of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens by cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis or *Aspergillus* allergy. *Eur J Immunol.* 1998 Apr;28(4):1155-60. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199804)28:04<1155::AID-IMMU1155>3.0.CO;2-6. PMID: 9565354.
40. Muthu V, Sehgal IS, Dhooria S, Aggarwal AN, Agarwal R. Utility of recombinant *Aspergillus fumigatus* antigens in the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis: A systematic review and diagnostic test accuracy meta-analysis. *Clin Exp Allergy.* 2018 Sep;48(9):1107-1136. doi: 10.1111/cea.13216. Epub 2018 Jul 24. PMID: 29927507.
41. Luo W, Hu H, Wu Z, Wei N, Huang H, Zheng P, Liu Y, Sun B. Molecular allergen sensitization of *Aspergillus fumigatus* between allergic bronchopulmonary aspergillosis and *A. fumigatus*-sensitized asthma in Guangzhou, Southern China. *J Clin Lab Anal.* 2020 Oct;34(10):e23448. doi: 10.1002/jcla.23448. Epub 2020 Jul 2. PMID: 32614101; PMCID: PMC7595924.
42. Gabriel MF, Postigo I, Gutiérrez-Rodríguez A, Suñén E, Guisantes J, Tomaz CT, Martínez J. Characterisation of *Alternaria alternata* manganese-dependent superoxide dismutase, a cross-reactive allergen homologue to Asp f 6. *Immunobiology.* 2015 Jul;220(7):851-8. doi: 10.1016/j.imbio.2015.01.006. Epub 2015 Jan 22. PMID: 25657116.
43. [www.abacusdx.com/autoimmunity/new-thermo-fisher-2021-product-catalogue-now-available/](http://www.abacusdx.com/autoimmunity/new-thermo-fisher-2021-product-catalogue-now-available/)
44. [www.siemens-healthineers.com/laboratory-diagnostics/assays-by-diseases-conditions/allergy/laboratorian-information](http://www.siemens-healthineers.com/laboratory-diagnostics/assays-by-diseases-conditions/allergy/laboratorian-information)
45. [www.macroarraydx.com/products/alex](http://www.macroarraydx.com/products/alex)
46. Lukaszewicz R, Mahay G, Boyer O, Martinet J. Medical algorithm: *Aspergillus fumigatus* components in the diagnosis of Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *Allergy.* 2021 Jul 12. doi: 10.1111/all.15001. Epub ahead of print. PMID: 34252208.

## Articole din edițiile anterioare

(/reviste-de-specialitate/alergologia/diagnosticul-molecular-al-alergiilor-in-practica-clinica-id-3989-cmsid-99)

LUCRĂRI ORIGINALE | Ediția 4 / 2020

**Diagnosticul molecular al alergiilor în practica clinică (/reviste-de-specialitate/alergologia/diagnosticul-molecular-al-alergiilor-in-practica-clinica-id-3989-cmsid-99)**