

In vitro evaluation of IgE mediated sensitization to tropomyosin

Lorena Mihaela Gheorghită, Ana-Maria-Antoaneta Cristea, Mariana Vieru, Florin-Dan Popescu

First published: 31 martie 2021

Editorial Group: MEDICHUB MEDIA

DOI: 10.26416/Aler.5.1.2021.4450

Abstract

Tropomyosins are part of a muscular protein family that includes a large number of cross-reactive allergens originating mainly from invertebrates. Tropomyosins have been identified as food allergens of animal origin from shellfish, such as crustaceans and mollusks, and rarely from parasitic nematodes from fish or some edible insects, and as aeroallergens from arthropods (house dust mites, storage mites, cockroaches). In current allergy practice, in vitro analysis of IgE-mediated sensitization to tropomyosins can be performed using singleplex immunoassays such as fluorescence enzyme immunoassay and chemiluminescence or multiplex ones such as microarray on immuno solid phase allergen chip and microarray nanotechnology based immunoassay used as a next-generation molecular allergy explorer.

Keywords

tropomyosin, allergens, immunoanalysis

Tropomiozinele aparțin unei familii de proteine musculare care include un număr mare de alergene cu reactivitate încrucișată, majoritatea din surse de nevertebrate (panalergen al nevertebratelor), cum ar fi crustacee și moluște, acarieni din praful de casă, insecte și helminți.

În funcție de calea de expunere, sensibilizarea mediată IgE este asociată rareori cu simptome ușoare la ingestie, cum ar fi sindromul de alergie orală, manifestări intestinale sau cutanate generalizate, însă provoacă frecvent anafilaxie severă, iar inhalarea acestor alergene poate provoca simptome respiratorii, cum ar fi cele de rinită și astm.

Tropomiozina este o proteină alfa-helicoidală care formează o structură spiralată cu două spirale paralele, care conțin două seturi de șapte locuri de legare alternante ale actinei. Tropomiozinele au fost identificate ca alergene alimentare de origine animală din fructe de mare, precum crustacee sau moluște, și, mai rar, din alte artropode ingerate. Tropomiozinele sunt, de asemenea, identificate ca aeroalergene din artropode (acarieni din praful de casă sau de stocaj, gândaci de bucătărie). Secvențele de tropomiozine sunt foarte bine conservate, ceea ce explică sensibilizarea încrucișată frecventă între sursele de alergene care le conțin⁽¹⁾.

Tropomiozinele sunt prezente în toate celulele eucariote, asociate cu filamente subțiri din mușchi și microfilamente în multe celule nemusculare, fiind implicate în activitatea contractilă a acestor celule și, de asemenea, în ajustarea reglării morfologiei și motilității celulare. Ca panalergene, acestea sunt rezistente la căldură, la pH-ul gastric scăzut și la peptidaza gastrointestinală, prin urmare alergenicitatea lor este menținută în alimentele preparate termic și digerate, provocând reacții alergice sistemice până la anafilaxie. Tropomiozina naturală are o greutate moleculară medie de 37 kDa. Alergenele grupului 10 din acarienii prafului de casă sunt compuse din 284 de aminoacizi. Identitatea secvenței în cadrul tropomiozinelor acarienilor din praf este mai mare decât la orice alt alergen al acarienilor. Tropomiozina Der p 10 are mai mult de 65% reziduuri identice cu alte tropomiozine nevertebrate⁽²⁻⁵⁾. Regiunile adiacente pozițiilor 133-135 și 201 ale tropomiozinelor nevertebrate prezintă o probabilitate mai mică de pliere a alfa-helixului decât cele ale vertebratelor și sunt candidate responsabile de alergenicitate⁽⁶⁾.

Tropomiozine relevante clinic ca aeroalergene dintre artropodele din clasa Arachnida sunt reprezentate de Der p 10 și Der f 10, alergene din grupul 10 din acarienii din praful de casă din zona temperată *Dermatophagoides pteronyssinus*, respectiv *Dermatophagoides farinae* (ambii din familia Pyroglyphidae), Blo t 10 din acarianul de stocaj și din praful de casă din zone tropicale/subtropicale *Blomia tropicalis* (familia Echimyopodidae), Tyr p 10 și Lep d 10 din acarienii de stocaj *Tyrophagus putrescentiae* (familia Acaridae), respectiv *Lepidoglyphus destructor* (familia Glycyphagidae). Alergenele moleculare Blo t 10 și Der p 10 au identitate de aminoacizi de 95% și sunt semnificativ cross-reactive, iar Tyr p 10 are identitate de secvențe de aminoacizi de 64-94% cu alte tropomiozine^(7,8). Datele referitoare la prevalența sensibilizării mediate IgE la tropomiozinele acarienilor din praful de casă sunt insuficiente și uneori contradictorii. Prevalența sensibilizării la Der f 10 a fost evaluată inițial la 80,6%, în timp ce pentru Der p 10, la 5-18%, chiar 55% la populația africană. Date mai recente arată că sensibilizarea la rDer p 10 se întâlnește la 15% dintre pacienții cu alergii respiratorii la acarienii din praful de casă, iar pacienții rDer p 10-reactivi sunt frecvent sensibilizați la alergene de acarieni, altele decât Der p 1 și Der p 2. Puțini pacienți cu simptome respiratorii la acarienii din praful de casă, fără alergii la fructele de mare, sunt monosensibilizați la Der p 10. Mai mult, sensibilizarea IgE la Der p 10 permite identificarea unui subgrup de pacienți cu alergii respiratorii la acarieni care pot să nu aibă un răspuns terapeutic optim la imunoterapia alergică cu extracte de acarieni disponibile în prezent⁽⁹⁾. În anafilaxia la acarieni pe cale orală, cum ar fi cea la clătite contaminate cu acarieni, componentele alergice responsabile sunt probabil alergenele din grupul 2 (termostabile, rezistente la digestie) reactive încrucișat între specii, în timp ce alergenele din grupul 1 sunt mascate prin legarea de prolamine din făină, iar tropomiozinele din grupul 10 nu sunt implicate⁽¹⁰⁻¹²⁾.

Unele artropode din clasa Insecta conțin tropomiozine importante ca aeroalergene, precum gândacul de bucătărie *Blattella germanica* din familia Ectobiidae (Bla g 7) și gândacul de canalizare *Periplaneta americana* din familia Blattidae (Per a 7). Dintre pacienții alergici la gândacul *Blattella germanica*, 16,2% sunt sensibilizați la rBla g 7,

alergene cu identitate de secvență de aminoacizi de până la 91% cu alte tropomiozine ale altor gândaci de casă⁽¹³⁾. Dintre speciile de insecte utilizate ca hrană umană merită menționate cele aprobate recent în Elveția pentru acest scop: greierele de casă (*Acheta domestica*), lăcusta europeană (*Locusta migratoria*) și viermii de făină (*Tenebrio molitor*) ca larve, pentru aceștia din urmă fiind descrisă și tropomiozina ca trofialergen (Ten m 7)^(12,14,15). Anafilaxia la ingestia de insecte comestibile (larve de *Tenebrio molitor*, omida moliei africane *Gonimbrasia belina*) poate apărea la pacienți sensibilizați inhalator la aceste insecte sau la acarienii din praful de casă și gândaci de bucătărie, sugerându-se reactivitatea încrucișată a alergenelor de tip glutatión transferaze sau tropomiozine cum ar fi Der p 10, Der f 10 și Bla g 7^(16,17).

Paraziții din încrengătura Nematoda, ordinul Ascaridida, care conțin tropomiozine cu rol alergic sunt viermele de hering *Anisakis simplex* din familia Anisakidae (Ani s 3) și limbricul *Ascaris lumbricoides* din familia Ascarididae (Asc l 3)⁽¹⁾. Prevalența crescută a sensibilizării la *Anisakis simplex*, de aproximativ 15%, a fost raportată la pacienții din zone în care consumul de pește crud sau marinat este foarte frecvent, cum ar fi sudul Italiei, confirmând faptul că obiceiurile alimentare influențează sensibilizarea mediată IgE la acest nematod. Doar 5,5% dintre pacienții sensibilizați au avut antecedente de alergii la *Anisakis simplex*. Pacienții sensibilizați la nematod au fost mai predispuși la simptome alergice când au avut cosensibilizare la acarienii din praful de casă, ceea ce sugerează implicarea alergenelor cu reactivitate încrucișată clinic relevantă⁽¹⁸⁾. Tropomiozina Asc l 3 a *Ascaris lumbricoides* este cross-reactivă cu tropomiozinele acarienilor. Sensibilizarea mediată IgE la acest alergen este foarte frecventă atât la astmatici, cât și la cei fără astm, dar sensibilizați la nematod, și s-a sugerat un rol potențial al Asc l 3 în mecanismele patogenice ale astmului în regiunile tropicale⁽¹⁹⁾.

Tropomiozina a fost considerată mult timp cel mai important alergen al crevetelor. Mai multe studii au relevat sensibilizare mediată IgE la tropomiozină la 72-98% dintre pacienții sensibilizați la crevette, deși un studiu italian multicentric a constatat acest aspect la mai puțin de 50% dintre pacienții sensibilizați. Tropomiozinele crustaceelor, cum ar fi crevetele, homarii și crabii, au identitate de secvență de 91-100%. Identitatea de secvență dintre tropomiozina crustaceelor și moluștelor este mai mică, de aproximativ 65%⁽²⁰⁾.

Fructele de mare sunt definite ca orice nevertebrate marine comestibile. Crustaceele aparțin încrengăturii Arthropoda și sunt clasificate taxonomic alături de insecte și arahnide. Crustaceele includ specii de creveți, homari și crabi, toate acestea conținând tropomiozine ca panalergene ale nevertebratelor, cu înaltă omologie de secvență, care favorizează reactivitatea încrucișată între crustacee și între acestea și alte artropode, cum ar fi acarienii sau gândacii. Moluștele aparțin încrengăturii Mollusca și includ scoici, caracatițe și melci, iar probabilitatea de reactivitate încrucișată între aceste moluște nu este foarte bine stabilită. Alergenele comune au omologie a secvenței de aminoacizi mai redusă și, prin urmare, sunt mai puțin susceptibile de a reacționa încrucișat, deși unele

tropomiozine sunt cross-reactive între crustacee și moluște. Tropomiozina nevertebratelor comestibile este termostabilă și rezistentă la digestie⁽²⁰⁾.

Artropodele din subîncręgătura Crustacea, ordinul Decapoda, conțin tropomiozine cross-reactive ca alergene de origine musculară. Creveta comună cenușie *Crangon crangon*, din familia Crangonidae, conține tropomiozina Cra c 1, iar cea nordică *Pandalus borealis*, din familia Pandalidae, Pan b 1. Crevetele cu tropomiozine specificate din familia Penaeidae sunt cele de tip tigrat uriaș *Penaeus monodon* (Pen m 1), brun Farfantepenaeus/*Penaeus aztecus* (Pen a 1), indian Fenneropenaeus/*Penaeus indicus* (Pen i 1), cu picioare albe de *Pacific Litopenaeus vannamei* (Lit v 1) și regal occidental *Melicertus latisulcatus* (Mel l 1), iar din familia Palaemonidae, cei de apă dulce de tip gigant *Macrobrachium rosenbergii* (Mac r 1) și siberian *Exopalaemon modestus* (Exo m 1). Tropomiozinele altor crustacee comestibile sunt Hom g 1 din homarul european *Homarus gammarus* și Hom a 1 din cel american *Homarus americanus* (familia Nephropidae), Pan s 1 din langusta *Panulirus stimpsoni* (familia Palinuridae), Cha f 1 din crabul roșu înotător *Charybdis feriata* (familia Portunidae), Por p 1 din crabul albastru *Portunus armatus/pelagicus* și Pro cl 1 din racul roșu *Procambarus clarkii* (familia Cambaridae)^(2,21-25). Reactivitatea încrucișată a tropomiozinelor aparatului locomotor al acarienilor din praful de casă cu cele ale crustaceelor comestibile este semnificativă. Tropomiozina nu este însă singurul alergen cross-reactiv între crevete și acarieni, fiind citate și arginin kinaza (Der p 20), lanțul ușor al miozinei (Der p 26) și alergene cu greutate moleculară mare, precum paramiozina (Der p 11) și hemocianina^(26,27).



Figura 1. Dermatophagoides pteronyssinus

Moluștele (încręgătura Mollusca) din clasa Bivalvia cu tropomiozine precizate ca alergene includ midia albastră/comună *Mytilus edulis* (Myt e 1), midia mediteraneeană *Mytilus galloprovincialis* (Myt g 1) și midia verde asiatică *Perna viridis* (Per v 1) din familia Mytilidae, stridia de Pacific *Crassostrea gigas* (Cra g 1) și cea de stâncă din Sydney *Saccostrea glomerata* (Sac g 1) din familia Ostreidae, scoica venus de nisip *Chamelea/Venus gallina* (Ven g 1) din familia Veneridae și scoica-pieptene *Mimachlamys nobilis* (Mim n 1) din familia Pectinidae. Moluștele din clasa Cephalopoda includ caracatița comună *Octopus vulgaris* (Oct v 1) din familia Octopodidae, sepia aurie *Sepia esculenta* (Sep e 1) din familia Sepiidae, calmarul japonez *Todarodes pacificus* (Tod p 1) din familia Ommastrephidae și cel

indian *Uroteuthis duvaucelii* (Uro du 1) din familia Loliginidae. În plus, moluștele din clasa Gastropoda includ melcii marini abalone din familia Haliotidae, de tip disc *Haliotis discus hannai* (Hal di 1), tigrat *Haliotis rubra x laevigata* (Hal l 1) și japonez *Haliotis diversicolor* (Hal d 1), melcul turban cu coarne *Turbo cornutus* (Tur c 1) din familia Turbinidae și melcul brun de grădină *Helix aspersa* (Hel as 1) din familia Helicidae. Reactivitatea încrucișată a tropomiozinelor de la acarienii din praful de casă cu cele ale moluștelor marine sau terestre a fost de asemenea raportată^(2,21-24).

Sindromul acarieni din praful de casă-crustacee-moluște este o variantă relativ rară a alergiilor alimentare prin cross-reactivitate, în care acarienii din praful de casă sunt agenții de sensibilizare IgE primari, în timp ce crustaceele pot induce alergii alimentare, până la anafilaxie, chiar și la prima ingestie⁽²⁸⁾. În sindromul mai obișnuit, acarieni-creveți, componenta tipică alergenica menționată este tropomiozina Der p 10⁽²⁹⁾.

Moleculele alergene implicate în alergia la crustacee sunt reactive încrucișat cu componentele alergene de la acarienii prafului de casă, în special anumite proteine cu rol în contracția musculară. Reactivitatea încrucișată cu specii care nu sunt strâns înrudite este frecventă la pacienții alergici la crustacee, unele alergene din fructele de mare fiind panalergene ale nevertebratelor distribuite pe scară largă⁽³⁰⁾. Tropomiozina a fost primul alergen identificat implicat în reactivitatea încrucișată între acarianul *Dermatophagoides pteronyssinus*, crevete și insecte⁽³¹⁾ și este considerat alergen major al crustaceelor, responsabil frecvent de reactivitatea încrucișată clinică cu aeroalergenele de grup 10 din acarienii din praful de casă^(24,32).

Tabelul 1 Tropomiozine față de care se determină IgE specifice serice în practica clinică prin metode de imunoanaliză singleplex și multiplex⁽⁴¹⁻⁴⁴⁾

Sursa alergenica	Tropomiozina
acarian <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	rDer p 10
acarian <i>Blomia tropicalis</i>	rBlo t 10
gândac <i>Blattella germanica</i>	nBla g 7
gândac <i>Periplaneta americana</i>	rPer a 7
nematod <i>Anisakis simplex</i>	rAni s 3
crevetă <i>Penaeus aztecus</i>	rPen a 1
crevetă <i>Penaeus monodon</i>	nPen m 1
crevetă <i>Litopenaeus vannamei</i>	Lit v 1
scolcă <i>Venus gallina</i>	Ven ga 1
calmar <i>Uroteuthis duvaucelii</i>	Uro du 1
melc <i>Helix aspersa</i>	Hel as 1

Așa cum am menționat anterior, tropomiozinele alergene sunt proteine musculare foarte conservate, prezente la nevertebrate, cum ar fi arahnide (acarieni din praful de casă), insecte (gândaci de casă), crustacee (crevete, homari, languste, raci, crabi) și moluște (midii, stridii, sepii, caracatițe, melci marini sau de grădină), fiind deci considerate panalergene ale nevertebratelor. Spre deosebire de acestea, tropomiozinele mamiferelor și păsărilor, cum ar fi cele din carne de vită, porc, iepure sau pui, nu sunt alergene^(21,33). Tropomiozinele animalelor vertebrate nu sunt în general alergene, o

excepție fiind tropomiozina provenind de la tilapia *Oreochromis mossambicus* (Ore m 4) din familia Cichlidae. Tropomiozinele altor pești osoși din clasa Actinopterygii au dovedit identități structurale, Pan h 4 de la somn *Pangasianodon hypophthalmus* (familia Pangasiidae), având 80% din secvență comună cu Sal s 4 de la somonul de Atlantic *Salmo salar* (familia Salmonidae), ambele tropomiozine având identitate de structură de peste 80% cu Ore m 4 de la tilapia. Tropomiozina este o proteină abundentă, după parvalbumină, în extractele de pește, dar legarea IgE la tropomiozina peștilor este rară, cu puține cazuri de alergie raportate⁽³⁴⁻³⁶⁾.

Prevalența sensibilizării la tropomiozină în rândul pacienților alergici la acarienii din praful de casă, evaluată utilizând componentele alergene din grupul 10, variază în funcție de zona geografică^(2,37). În multe țări europene, această prevalență de sensibilizare la rDer p 10 variază între 9% și 18%⁽³⁸⁾. Alte studii au arătat că ratele de sensibilizare la tropomiozină sunt depistate la valori mai mari de 30-55% în regiunile subtropicale sau tropicale, cum ar fi Australia sau Africa Centrală. Această variabilitate poate fi explicată prin expunerea diferită la alergene sensibilizante de nevertebrate în diferite părți ale lumii⁽³⁷⁾. Anticorpul IgE rezultați sunt capabili să reacționeze încrucișat cu diferite tropomiozine, chiar și cu cele care nu au indus producția lor. De exemplu, reactivitatea anticorpilor IgE la un alergen alimentar major, tropomiozina din crevete, poate apărea la subiecți neexpuși (care respectă legi dietetice care interzic consumul de crustacee), dar cu alergii respiratorii la acarienii din praf și/sau gândaci de casă⁽³⁹⁾. Un alt studiu a dezvăluit că jumătate dintre pacienții europeni alergici la acarienii din praful de casă cu sensibilizare IgE la tropomiozina Der p 10 au un istoric de reacții clinice relevante la consumul de fructe de mare, cealaltă jumătate neavând reacții alergice când consumă astfel de nevertebrate comestibile⁽³²⁾.

IgE serice specifice față de tropomiozina de crevete Pen a 1 constituie un predictor mai bun al alergiei la crevete decât IgE serice specifice la extract natural de crevete. Cu toate acestea, ar trebui luate în considerare anumite diferențe regionale, deoarece rata de sensibilizare la tropomiozina *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 10) poate influența sensibilizarea la Pen a 1, ca urmare a reactivității încrucișate ridicate⁽⁴⁰⁾.

În practica alergologică actuală, explorarea *in vitro* a sensibilizării mediate IgE la tropomiozine cu reactivitate încrucișată se poate realiza utilizând metode de imunoanaliză singleplex și multiplex (tabelul 1).

IgE serice specifice față de tropomiozine pot fi determinate *in vitro* prin analiză fluoroimunoenzimatică (FEIA) singleplex, cu alergene cuplate în fază solidă cu polimer de celuloză capsulată, utilizând alergenele recombinante rDer p 10 din acarianul din praful de casă *Dermatophagoides pteronyssinus* (d205) și rPen a 1 din creveta *Penaeus aztecus* (f351). Prin metoda de chemiluminescență singleplex cu alergene biotinite în fază lichidă pot fi determinate IgE serice specifice față de componenta alergică purificată nativă nPen m 1 din creveta *Penaeus monodon*.

IgE serice specifice față de tropomiozine native înalt purificate (n) sau recombinante (r) pot fi determinate *in vitro* și prin metode de imunoanaliză multiplex.

Prin imunoanaliză de tip microarray pe cip cu alergene în fază solidă (lamă de sticlă acoperită cu polimer) pot fi determinate IgE specifice față de tropomiozina de acarian *Dermatophagoides pteronyssinus* (rDer p 10), gândac *Blattella germanica* (nBla g 7), nematod *Anisakis simplex* (rAni s 3) și creveta *Penaeus monodon* (nPen m 1).

Printr-o altă metodă de imunoanaliză multiplex bazată pe nanotehnologie de tip nano-bead array, pot fi determinate IgE specifice față de acarianul *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 10), gândacul *Periplaneta americana* (Per a 7), nematodul *Anisakis simplex* (Ani s 3), creveta *Litopenaeus vannamei* (Lit v 1), scoica *Venus gallina* (Ven ga 1), calmar *Uroteuthis duvauceli* (Uro du 1) și melc de grădină *Helix aspersa* (Hel as 1).

Prin metoda de imunoanaliză bazată pe nanotehnologie macroarray, folosită ca analiză de explorare alergologică moleculară de tip multiplex de ultimă generație, pot fi determinate IgE specifice față de acarianul din praful de casă european *Dermatophagoides pteronyssinus* (rDer p 10), acarianul din zone tropicale *Blomia tropicalis* (rBlo t 10), gândacul de casă american *Periplaneta americana* (rPer a 7), nematodul *Anisakis simplex* (rAni s 3) și crevetele tigrat brun *Penaeus monodon* (nPen m 1).

În concluzie, tropomiozinele sunt alergene cu reactivitate încrucișată care aparțin unei familii de proteine musculare din surse variate de nevertebrate, cum ar fi crustacee și moluște, acarieni din praful de casă, insecte și helminți. Aceste alergene moleculare sensibilizează pe căi diferite și sunt implicate în alergii respiratorii și alimentare variate. În practica alergologică actuală, explorarea *in vitro* a sensibilizării mediate IgE la tropomiozine prin dozarea IgE specifice serice se poate realiza utilizând metode de imunoanaliză singleplex și multiplex. n

Bibliografie

1. 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 Allergy Immunology User's Guide. *Pediatr Allergy Immunol*. 2016;27 Suppl 23:1-250. DOI: 10.1111/pai.12563.
2. Shafique RH, Inam M, Ismail M, Chaudhary FR. Group 10 allergens (tropomyosins) from house-dust mites may cause covariation of sensitization to allergens from other invertebrates. *Allergy Rhinol (Providence)*. 2012;3(2):e74-90. DOI: 10.2500/ar.2012.3.0036.
3. Asturias JA, Arilla MC, Gómez-Bayón N, Martínez A, Martínez J, Palacios R. Sequencing and high level expression in *Escherichia coli* of the tropomyosin allergen (Der p 10) from *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1397(1):27-30. DOI: 10.1016/S0167-4781(98)00006-2.
4. Ivanciuc O, Garcia T, Torres M, Schein CH, Braun W. Characteristic motifs for families of allergenic proteins. *Mol Immunol*. 2009;46(4):559-68. DOI: 10.1016/j.molimm.2008.07.034
5. Liu GM, Huang YY, Cai QF, Weng WY, Su WJ, Cao MJ. Comparative study of *in vitro* digestibility of major allergen, tropomyosin and other proteins between Grass prawn (*Penaeus monodon*) and Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J Sci Food Agric*. 2011;91(1):163-70. DOI: 10.1002/jsfa.4167.
6. González-Fernández J, Rodero M, Daschner A, Cuéllar C. New insights into the allergenicity of tropomyosin: a bioinformatics approach. *Mol Biol Rep*. 2014;41(10):6509-17. DOI: 10.1007/s11033-014-3534-6.

7. Yi FC, Cheong N, Shek LP, Wang DY, Chua KY, Lee BW. Identification of shared and unique immunoglobulin E epitopes of the highly conserved tropomyosins in *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(8):1203-10. DOI: 10.1046/j.1365-2745.2002.01449.x.
8. Jeong KY, Lee H, Lee JS, Lee J, Lee IY, Ree HI, Hong CS, Yong TS. Molecular cloning and the allergenic characterization of tropomyosin from *Tyrophagus putrescentiae*. *Protein Pept Lett*. 2007;14(5):431-6. DOI: 10.2174/092986607780782777.
9. Resch Y, Weghofer M, Seiberler S, Horak F, Scheiblhofer S, Linhart B, Swoboda I, Thomas WR, Thalhamer J, Valenta R, Vrtala S. Molecular characterization of Der p 10: a diagnostic marker for broad sensitization in house dust mite allergy. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(10):1468-77. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2011.03798.x.
10. Sánchez-Borges M, Fernández-Caldas E, Thomas WR, Chapman MD, Lee BW, Caraballo L, et al. International consensus (ICON) on: clinical consequences of mite hypersensitivity, a global problem. *World Allergy Organ J*. 2017;10(1):14. DOI: 10.1186/s40413-017-0145-4
11. Mangoldt EA, Van Gasse AL, Bridts CH, Sabato V, Ebo DG. Simultaneous oral mite anaphylaxis (pancake syndrome) in a father and daughter and a review of the literature. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2015;25(1):75-6.
12. Popescu FD, Vieru M. The presence of aeroallergens in food products: a potential risk for the patient with allergic rhinitis. *RJR*. 2018;8(29):11-15. DOI: 10.2478/rjr-2018-0001
13. Jeong KY, Lee J, Lee IY, Ree HI, Hong CS, Yong TS. Allergenicity of recombinant Bla g 7, German cockroach tropomyosin. *Allergy*. 2003;58(10):1059-63. DOI: 10.1034/j.1398-9995.2003.00167.x.
14. Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen (2017-04-28): Insects as food. www.blv.admin.ch/blv/de/home/lebensmittel-und-ernaehrung/lebensmittelsicherheit/einzelne-lebensmittel/insekten.html#-399311545
15. Palmer LK, Marsh JT, Lu M, Goodman RE, Zeece MG, Johnson PE. Shellfish Tropomyosin IgE Cross-Reactivity Differs Among Edible Insect Species. *Mol Nutr Food Res*. 2020;64(8):e1900923. DOI: 10.1002/mnfr.201900923..
16. Freye HB, Esch RE, Litwin CM, Sorkin L. Anaphylaxis to the ingestion and inhalation of *Tenebrio molitor* (mealworm) and *Zophobas morio* (superworm). *Allergy Asthma Proc*. 1996;17(4):215-9. DOI: 10.2500/108854196778996903.
17. Kung SJ, Fenemore B, Potter PC. Anaphylaxis to Mopane worms (*Imbrasia belina*). *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011;106(6):538-40. DOI: 10.1016/j.anai.2011.02.003.
18. Heffler E, Sberna ME, Sichili S, Intravaia R, Nicolosi G, Porto M, Liuzzo MT, Picardi G, Fichera S, Crimi N. High prevalence of *Anisakis simplex* hypersensitivity and allergy in Sicily, Italy. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2016;116(2):146-50. DOI: 10.1016/j.anai.2015.12.014.
19. Acevedo N, Erler A, Briza P, Puccio F, Ferreira F, Caraballo L. Allergenicity of *Ascaris lumbricoides* tropomyosin and IgE sensitization among asthmatic patients in a tropical environment. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;154(3):195-206. DOI: 10.1159/000321106.
20. Gelis S, Rueda M, Valero A, Fernández EA, Moran M, Fernández-Caldas E. Shellfish Allergy: Unmet Needs in Diagnosis and Treatment. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2020;30(6):409-420. DOI: 10.18176/jiaci.0565.
21. Woo CK, Bahna SL. Not all shellfish “allergy” is allergy! *Clin Transl Allergy*. 2011;1(1):3. DOI: 10.1186/2045-7022-1-3.
22. Shiomi K. Current knowledge on molecular features of seafood allergens. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 2010;51(4):139-52. DOI: 10.3358/shokueishi.51.139.
23. Taylor SL. Molluscan shellfish allergy. *Adv Food Nutr Res*. 2008;54:139-77. DOI: 10.1016/S1043-4526(07)00004-6.
24. Popescu FD. Cross-reactivity between aeroallergens and food allergens. *World J Methodol*. 2015;5(2):31-50. DOI:10.5662/wjm.v5.i2.31
25. Zhang Z, Li XM, Xiao H, Nowak-Wegrzyn A, Zhou P. IgE-binding epitope mapping of tropomyosin allergen (Exo m 1) from *Exopalaemon modestus*, the freshwater Siberian prawn. *Food Chem*. 2020;309:125603. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125603.
26. Bauermeister K, Wangorsch A, Garoffo LP, Reuter A, Conti A, Taylor SL, Lidholm J, Dewitt AM, Enrique E, Vieths S, Holzhauser T, Ballmer-Weber B, Reese G. Generation of a comprehensive panel of crustacean allergens from the North Sea Shrimp *Crangon crangon*. *Mol Immunol*. 2011;48(15-16):1983-92. DOI: 10.1016/j.molimm.2011.06.216.
27. Asero R, Pravettoni V, Scala E, Villalta D. House Dust Mite-Shrimp Allergen Interrelationships. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2020;20(4):9. DOI: 10.1007/s11882-020-0902-2.
28. Kütting B, Brehler R. House dust mite-crustaceans-molluscs syndrome. A rare variant of food allergy in primary sensitization to inhaled allergens. *Hautarzt*. 2001;52(8):708-11. German. DOI: 10.1007/s001050170086.
29. Melioli G, Spenser C, Reggiardo G, Passalacqua G, Compalati E, Rogkakou A, Riccio AM, Di Leo E, Nettis E, Canonica GW. Allergenius, an expert system for the interpretation of allergen microarray results. *World Allergy Organ J*. 2014;7(1):15. DOI: 10.1186/1939-4551-7-15.
30. Pedrosa M, Boyano-Martínez T, García-Ara C, et al. Shellfish Allergy: a Comprehensive Review. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2015;49:203-216. DOI:10.1007/s12016-014-8429-8.
31. Witteman AM, Akkerdaas JH, van Leeuwen J, van der Zee JS, Aalberse RC. Identification of a cross-reactive allergen (presumably tropomyosin) in shrimp, mite and insects. *Int Arch Allergy Immunol*. 1994;105(1):56-61. DOI: 10.1159/000236803.

32. Becker S, Gröger M, Canis M, Pfrogner E, Kramer MF. Tropomyosin sensitization in house dust mite allergic patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2012;269(4):1291-6. DOI: 10.1007/s00405-011-1826-1.
33. Reese G, Ayuso R, Lehrer SB. Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999;119(4):247-58. DOI: 10.1159/000024201.
34. González-Fernández J, Veleiro B, Daschner A, Cuéllar C. Are fish tropomyosins allergens? *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2016;116(1):74–76.e5. DOI:10.1016/j.anai.2015.09.017.
35. González-Fernández J, Daschner A, Cuéllar C. Allergenicity of vertebrate tropomyosins: Challenging an immunological dogma. *Allergologia et Immunopathologia*. 2017;45(3):297–304. DOI:10.1016/j.aller.2016.08.002.
36. Ruethers T, Taki AC, Karnaneedi S, Nie S, Kalic T, Dai D, Daduang S, Leeming M, Williamson NA, Breiteneder H, Mehr SS, Kamath SD, Campbell DE, Lopata AL. Expanding the allergen repertoire of salmon and catfish. *Allergy*. 2020. DOI:10.1111/all.14574
37. Pevec B, Pevec MR, Markovic AS, Batista I. House dust mite subcutaneous immunotherapy does not induce new sensitization to tropomyosin: does it do the opposite? *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2014;24(1):29-34. PMID: 24765878.
38. Weghofer M, Thomas WR, Kronqvist M, Mari A, Purohit A, Pauli G, Horak F, Grönlund H, van Hage M, Valenta R, Vrtala S. Variability of IgE reactivity profiles among European mite allergic patients. *Eur J Clin Invest*. 2008;38(12):959-65. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2008.02048.x.
39. Fernandes J, Reshef A, Patton L, Ayuso R, Reese G, Lehrer SB. Immunoglobulin E antibody reactivity to the major shrimp allergen, tropomyosin, in unexposed Orthodox Jews. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(7):956-61. DOI: 10.1046/j.1365-2222.2003.01722.x.
40. Tagami K, Nakayama S, Furuta T, Matsui T, Takasato Y, Sugiura S, Ito K. Pen a 1-specific IgE does not improve the accuracy of a shrimp allergy diagnosis among Japanese children due to cross-reactivity with Der p 10. *Allergol Int*. 2020;69(2):290-292. DOI: 10.1016/j.alit.2019.10.002.
41. Thermoscientific: Product Catalog 2020. https://www.abacusdx.com/media/PU_Product%20Catalog_2020.pdf
42. Siemens Healthineers: 3gAllergy™ Menu. https://cdn0.scrvt.com/39b415fb07de4d9656c7b516d8e2d907/1800000003516051/73f1640c25c4/160956-XC1_Allergy_Menu_OUS_Rev-01_1800000003516051.pdf
43. Centri Associati di Allergologia Molecolare: Faber®.
44. https://www.caam-allergy.com/pdf/Green_John_IgE_Multiplex_FABER244_ENG.pdf Macro Array Diagnostics: ALEX2® Allergen List. https://a.storyblok.com/f/69176/x/81f1990ace/alex2_allergen_list_en.pdf