



Dipartimento di Scienze della Vita

Corso di Laurea Magistrale in Bioscienze

**Anticorpi IgG specifici per alimenti nella
popolazione adulta italiana: definizione e analisi
degli intervalli di riferimento**

Relatore

Prof. Marcello Pinti

Tesi di Laurea di

Sara Verucchi

Co- Relatore

Dott.ssa Alda Tiziana Scacchetti

Indice

Riassunto.....	4
1. Introduzione	5
1.1 Fondamenti sul sistema immunitario	5
1.1.2 Immunità innata e adattativa.....	6
1.1.3 Tipi di risposte immunitarie adattative	7
1.2 Immunoglobuline e funzione anticorpale	9
1.2.1 Sintesi degli anticorpi.....	11
1.2.2 Struttura degli anticorpi	11
1.2.3 Classi di immunoglobuline.....	13
1.3 Reazioni di ipersensibilità.....	16
1.3.1 Reazioni di ipersensibilità di tipo I	17
1.3.2 Reazioni di ipersensibilità di tipo II	18
1.3.3 Reazioni di ipersensibilità di tipo III	18
1.3.4 Reazioni di ipersensibilità di tipo IV	18
1.4 Ipersensibilità alimentari.....	19
1.4.1 Allergia alimentare	20
1.4.2 Allergie alimentari IgE-mediate	20
1.4.3 Allergie alimentari miste e non IgE-mediate.....	21
1.4.4 Intolleranze alimentari.....	22
1.5 Immunoglobuline G e sottoclassi: ruolo funzionale nel sistema immunitario	24
1.5.1 Risposte anticorpali IgG	25
1.5.2 IgG1.....	26
1.5.3 IgG2.....	26
1.5.4 IgG3.....	27
1.5.5 IgG4.....	27

1.5.6 Ruolo protettivo delle IgG4 nell'immunoterapia allergene-specifica (AIT)	28
1.5.7 IgG specifiche per alimenti nel siero: significato biologico e interpretazione clinica	29
1.6 Barriera intestinale	31
1.6.1 Fattori che influenzano l'integrità della barriera intestinale.....	32
1.6.2 Ruolo della zonulina nella regolazione delle tight junctions	33
1.6.3 Associazione tra IgG specifiche per alimenti e permeabilità intestinale.....	33
2. Scopo della tesi	35
3. Materiali e metodi	36
3.1 Impostazione dello studio e popolazione in esame	36
3.2 Criteri di esclusione	37
3.3 Metodica FEIA (Fluorescent-Enzyme Immunoassay).....	37
3.4 Determinazione delle IgG specifiche per antigeni alimentari.....	38
3.5 Pannello degli allergeni alimentari analizzati	39
3.6 Analisi statistica	41
4. Risultati.....	43
4.1 Intervalli di riferimento	43
4.2 Limite inferiore analitico	46
4.3 Confronto tra sessi	47
4.4 Analisi per origine proteica	47
4.5 Esclusione di profili atipici	48
5. Discussione.....	49
5.1 Permeabilità intestinale ed esposizione antigenica	50
5.2 IgG alimentari e concetto di "intolleranza"	51
5.3 Confronto con la letteratura internazionale.....	51
5.4 IgG4 e tolleranza immunologica	52
5.5 Punti di forza e limiti dello studio.....	53
6. Bibliografia	54

Riassunto

Le immunoglobuline G (IgG) specifiche per antigeni alimentari sono frequentemente rilevabili nella popolazione generale e rappresentano principalmente un indice di esposizione agli alimenti, piuttosto che un indicatore di condizioni patologiche. Nonostante ciò, i test per IgG alimentari continuano a essere ampiamente utilizzati, sia in ambito clinico sia commerciale, come strumenti diagnostici per le cosiddette “intolleranze alimentari”, con possibili ripercussioni negative sul piano clinico e di sanità pubblica. In questo scenario, la disponibilità di intervalli di riferimento definiti in una popolazione di riferimento risulta essenziale per una corretta interpretazione dei risultati di laboratorio.

Il presente studio ha avuto l'obiettivo di definire intervalli di riferimento per IgG specifiche per alimenti in una popolazione adulta italiana, mediante un approccio statistico indiretto basato sull'intervallo compreso tra il 2,5° e il 97,5° percentile, in accordo con le raccomandazioni CLSI C28-A3. A tal fine, sono stati analizzati 240 campioni sierici provenienti da soggetti adulti apparentemente sani (120 uomini e 120 donne), di età compresa tra i 18 e gli 87 anni, sottoposti a determinazione delle IgG alimentari nell'ambito della pratica clinica routinaria. Sono stati esclusi soggetti con patologie gastrointestinali o immunologiche note, allergie alimentari IgE-mediate, terapia immunosoppressiva, profili IgG atipici o dati analitici incompleti, al fine di garantire l'omogeneità statistica della popolazione di riferimento. Le IgG specifiche per 33 allergeni alimentari sono state quantificate mediante metodica FEIA (ImmunoCAP).

Le concentrazioni di IgG hanno mostrato distribuzioni prevalentemente non gaussiane, con un'elevata variabilità tra i diversi alimenti analizzati. Gli intervalli di riferimento ottenuti hanno evidenziato valori più elevati per alimenti di largo consumo nella dieta italiana, quali latte vaccino, uovo e frumento, mentre livelli inferiori e distribuzioni più ristrette sono stati osservati per pesce e alcune tipologie di carne. Non sono emerse differenze clinicamente rilevanti tra i sessi. Un'analisi esplorativa ha inoltre evidenziato livelli di IgG tendenzialmente più elevati per alimenti di origine vegetale rispetto a quelli di origine animale.

Nel complesso, i risultati supportano l'interpretazione delle IgG alimentari come marker di esposizione antigenica, potenzialmente influenzati dall'interazione con la barriera intestinale, piuttosto che come indicatori diagnostici di allergia o intolleranza. La definizione di intervalli di riferimento specifici per la popolazione italiana potrebbe contribuire a migliorare l'appropriatezza interpretativa dei dati laboratoristici, riducendo il rischio di percorsi diagnostici fuorvianti e di restrizioni dietetiche non necessarie.

1. Introduzione

1.1 Fondamenti sul sistema immunitario

Il termine “immunità” deriva dal latino *immunitas*, il quale indicava in origine la protezione dalla perseguibilità legale concessa ai senatori romani durante il loro mandato. Nel corso del tempo il significato del termine si è evoluto fino ad arrivare ad indicare la protezione dell’organismo dalle malattie, in particolare da quelle infettive. L’insieme delle cellule e delle molecole che mediano questa protezione costituisce il sistema immunitario, mentre la loro azione coordinata contro sostanze estranee prende il nome di risposta immunitaria.

La funzione principale del sistema immunitario è quella di difendere l’organismo dagli agenti patogeni; tuttavia, anche sostanze estranee non infettive possono attivare una risposta immunitaria. Inoltre, in alcune circostanze, i meccanismi deputati alla difesa possono risultare dannosi, causando lesioni tissutali e contribuendo allo sviluppo di malattie. Per questo motivo una definizione più completa di immunità la descrive come la risposta dell’organismo a componenti microbiche e a macromolecole, come proteine e polisaccaridi, indipendentemente dagli effetti, benefici o patologici, che ne derivano. In determinate condizioni, anche molecole proprie dell’organismo (self) possono innescare una risposta immunitaria, dando luogo a fenomeni di autoimmunità.

Dal punto di vista storico, uno dei primi riferimenti al concetto di immunità viene attribuito a Tucidide, che nel V secolo a.C., durante l’epidemia di Atene, osservò come gli individui sopravvissuti alla malattia fossero protetti da successive infezioni. Tuttavia, pratiche empiriche riconducibili al concetto di immunizzazione erano probabilmente già presenti in epoche precedenti, come dimostra l’antica tradizione cinese di indurre resistenza al vaiolo facendo inalare ai bambini polveri ottenute da lesioni cutanee di soggetti guariti.

L’immunologia moderna si configura come una scienza sperimentale, fondata sull’osservazione e sull’interpretazione dei fenomeni attraverso metodi controllati. Un esempio fondamentale nello sviluppo dell’immunologia è rappresentato dal lavoro di Edward Jenner, che alla fine del XVIII secolo introdusse la vaccinazione contro il vaiolo, dimostrando che l’esposizione al vaiolo bovino conferiva protezione contro la forma umana. Questo approccio portò alla diffusione della vaccinazione come strategia preventiva e culminò con l’eradicazione globale del vaiolo nel 1980, primo caso di eliminazione di una malattia infettiva grazie a un programma vaccinale.

Dagli anni Sessanta l'immunologia ha conosciuto un'evoluzione significativa grazie all'introduzione di tecniche avanzate, tra cui colture cellulari, produzione di anticorpi monoclonali, immunochimica, tecnologia del DNA ricombinante, cristallografia a raggi X e modelli animali geneticamente modificati. Questi progressi hanno trasformato la disciplina da descrittiva a una scienza basata sulla comprensione strutturale e biochimica dei meccanismi immunitari [1].

1.1.2 Immunità innata e adattativa

La difesa dell'organismo nei confronti dei microrganismi si fonda su due principali sistemi: l'immunità innata, che interviene nelle fasi iniziali, e l'immunità adattativa, che si sviluppa successivamente. L'immunità innata, definita anche naturale o nativa, è costituita da meccanismi di difesa cellulari e biochimici già presenti prima dell'infezione e capaci di attivarsi rapidamente; tali meccanismi riconoscono componenti tipiche dei microrganismi e segnali derivanti da cellule danneggiate, rispondendo in maniera sostanzialmente invariata anche a esposizioni ripetute. Essi sono in grado di identificare strutture condivise da gruppi di microrganismi correlati, senza distinguere in modo fine tra specie diverse. Tra i principali elementi dell'immunità innata si includono: le barriere fisiche e chimiche, come gli epiteli e le sostanze antimicrobiche da essi prodotte; le cellule fagocitiche, in particolare neutrofili e macrofagi, insieme alle cellule dendritiche, alle cellule natural killer (NK) e ad altre cellule linfoidi innate; le proteine plasmatiche, tra cui i componenti del sistema del complemento e altri mediatori coinvolti nella risposta infiammatoria [1].

Accanto all'immunità innata esistono ulteriori forme di risposta immunitaria che aumentano progressivamente di intensità ed efficacia difensiva a seguito di esposizioni successive allo stesso agente infettivo. Questa modalità di difesa, definita immunità specifica o acquisita, è nota come immunità adattativa, poiché si sviluppa e si modula in funzione dello stimolo infettivo. Il sistema immunitario adattativo possiede la capacità di riconoscere un'ampia varietà di sostanze, sia di origine microbica sia non microbica, e di attivare risposte mirate nei loro confronti. Le sue caratteristiche distintive sono la specificità, ossia la capacità di discriminare tra differenti antigeni, e la memoria, che consente una risposta più rapida ed efficace in seguito a successive esposizioni allo stesso patogeno. I principali effettori di questo sistema sono i linfociti e i loro prodotti di secrezione, tra cui gli anticorpi. Le sostanze estranee in grado di indurre una risposta immunitaria specifica o di essere riconosciute da linfociti e anticorpi vengono definite antigeni.

L'immunità innata e quella adattativa non operano come sistemi separati, ma costituiscono un insieme integrato di meccanismi di difesa che coinvolge numerose cellule e molecole. Sebbene l'immunità innata sia in grado di fornire una protezione efficace contro molti agenti patogeni, alcuni microrganismi hanno evoluto strategie per eluderla, rendendo necessario l'intervento dell'immunità adattativa, più specifica e potente. Esistono, inoltre, strette interazioni tra i due sistemi: l'immunità innata non solo rappresenta la prima linea di difesa, ma contribuisce anche ad attivare e orientare la risposta adattativa; a sua volta, l'immunità adattativa potenzia i meccanismi effettrici dell'immunità innata, aumentandone l'efficacia nell'eliminazione dei patogeni (**Figura 1**) [2].

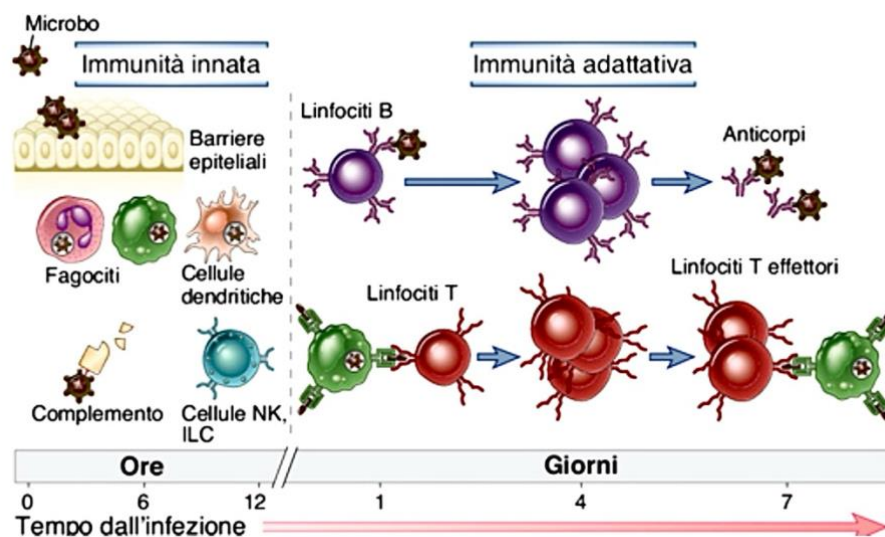


Figura 1. Immunità innata e adattativa. I meccanismi dell'immunità innata forniscono le difese iniziali contro le infezioni. Le risposte adattative si sviluppano successivamente e richiedono l'attivazione dei linfociti. Adattata da Abbas et al., 2015.

1.1.3 Tipi di risposte immunitarie adattative

Le risposte immunitarie adattative si distinguono in due principali categorie: immunità umorale e immunità cellulo-mediata. Ciascuna di esse è mediata da specifiche componenti del sistema immunitario ed è specializzata nell'eliminazione di differenti classi di agenti patogeni (**Figura 2**).

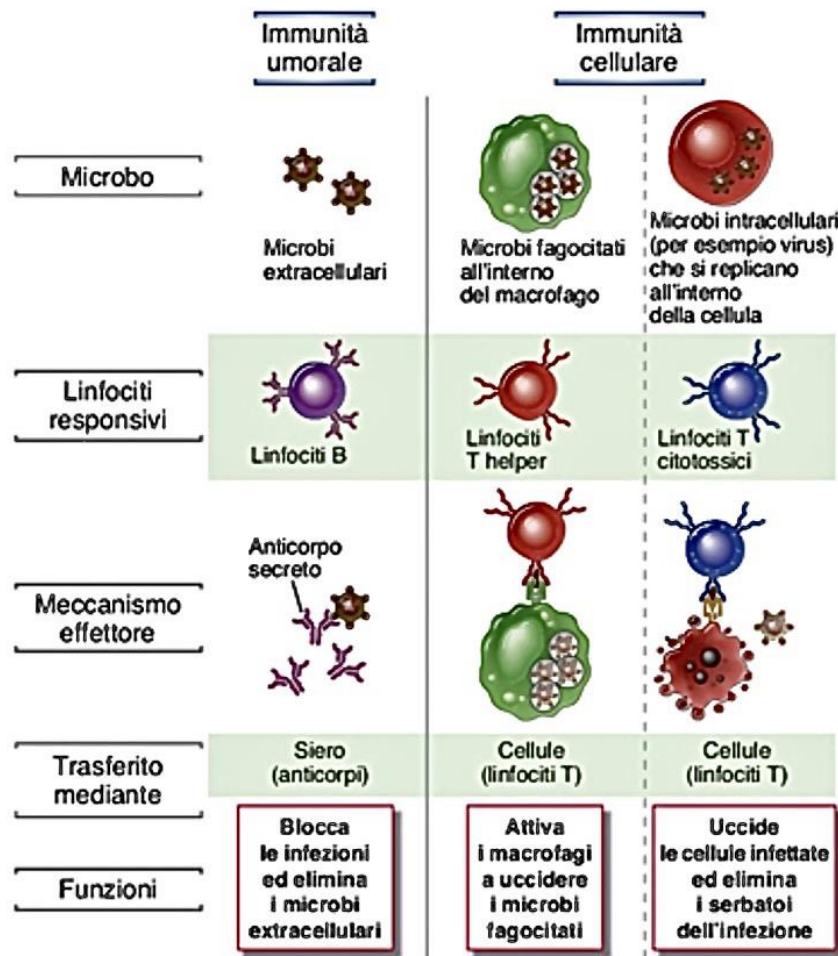


Figura 2. Tipi di immunità adattativa. Nell'immunità umorale, i linfociti B secernono anticorpi che prevengono le infezioni ed eliminano i microbi extracellulari. Nell'immunità cellulare, i linfociti T helper attivano i macrofagi a uccidere microbi fagocitati o, in alternativa, i CTL uccidono direttamente le cellule infette. Adattata da Abbas et al., 2015.

L'immunità umorale è mediata dagli anticorpi, molecole solubili presenti nel circolo ematico e nelle secrezioni mucosali, prodotti dai linfociti B. Tali anticorpi sono in grado di riconoscere specifici antigeni microbici, neutralizzandone l'attività infettiva e marcandoli per la successiva eliminazione attraverso diversi meccanismi effettori. Questa forma di immunità rappresenta il principale sistema di difesa nei confronti dei microrganismi extracellulari e delle loro tossine, poiché gli anticorpi possono legarsi direttamente a tali agenti patogeni facilitandone la rimozione. Inoltre, le diverse classi anticorpali presentano un elevato grado di specializzazione funzionale: alcune favoriscono la fagocitosi da parte delle cellule dell'ospite, altre inducono il rilascio di mediatori dell'infiammazione da parte dei leucociti, mentre altre ancora vengono trasportate attivamente attraverso le superfici mucosali o la placenta, contribuendo rispettivamente alla protezione contro patogeni inalati o ingeriti e alla difesa immunitaria del neonato.

L'immunità cellulo-mediata, invece, è sostenuta dai linfociti T ed è fondamentale per il controllo delle infezioni da parte di microrganismi intracellulari. Questi patogeni, tra cui virus e alcuni batteri, sono in grado di sopravvivere e replicarsi all'interno dei fagociti o di altre cellule dell'ospite, risultando così inaccessibili agli anticorpi circolanti. La risposta cellulare interviene eliminando tali serbatoi di infezione mediante l'attivazione dei fagociti e la distruzione diretta delle cellule infettate. Inoltre, alcune sottopopolazioni di linfociti T contribuiscono all'eliminazione dei microrganismi extracellulari attraverso il reclutamento e l'attivazione di ulteriori leucociti, nonché fornendo supporto ai linfociti B nella produzione di anticorpi ad alta efficacia.

La protezione immunologica nei confronti di un determinato microrganismo è generalmente il risultato diretto della risposta immunitaria dell'ospite. L'immunità acquisita in seguito all'esposizione a uno specifico antigene viene definita immunità attiva, in quanto l'individuo immunizzato partecipa attivamente allo sviluppo della risposta immunitaria contro tale antigene. Gli individui, così come i linfociti, che non sono ancora venuti a contatto con uno specifico antigene, vengono definiti naïve. Al contrario, i soggetti che hanno già sviluppato una risposta immunitaria nei confronti di un antigene microbico e risultano protetti da successive esposizioni allo stesso agente patogeno vengono definiti immuni.

L'immunità può essere conferita ad un individuo anche in ambito sperimentale mediante il trasferimento di siero o di linfociti provenienti da un soggetto precedentemente immunizzato. Tale procedura, definita trasferimento adottivo, consente al ricevente di acquisire protezione nei confronti di uno specifico antigene senza essere stato direttamente esposto ad esso né aver sviluppato una risposta immunitaria autonoma. Per questo motivo, tale forma di protezione viene definita immunità passiva [1][2].

1.2 Immunoglobuline e funzione anticorpale

Gli anticorpi sono proteine presenti nel circolo sanguigno, prodotte dai vertebrati in risposta all'esposizione a sostanze estranee, definite antigeni. Essi si distinguono per l'elevata variabilità e specificità nel riconoscere strutture molecolari non proprie dell'organismo, svolgendo un ruolo centrale come mediatori dell'immunità umorale contro un'ampia gamma di microrganismi. In origine, queste molecole furono identificate con il termine "antitossine", poiché osservate nel siero come fattori protettivi nei confronti della tossina difterica. Solo successivamente venne introdotta la denominazione "anticorpi", quando si comprese che tali molecole non erano limitate alla

neutralizzazione delle tossine microbiche, ma erano in grado di riconoscere e contrastare numerose altre sostanze esogene. Le molecole capaci di indurre la loro produzione o di essere da esse riconosciute furono quindi definite antigeni. Gli anticorpi, insieme alle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) e ai recettori per l'antigene dei linfociti T, costituiscono le tre principali categorie di strutture utilizzate dal sistema immunitario adattativo per il riconoscimento degli antigeni. Tra queste, gli anticorpi, storicamente i primi a essere scoperti, rappresentano la classe caratterizzata dalla più ampia capacità di legame verso differenti antigeni, dalla maggiore specificità discriminativa e da un'elevata affinità di interazione con l'antigene.

Gli anticorpi sono prodotti esclusivamente dai linfociti B e si presentano in due forme principali: una associata alla membrana dei linfociti B, dove svolgono la funzione di recettori per l'antigene, e una forma secreta. Quest'ultima è responsabile di diverse attività difensive, tra cui la neutralizzazione delle tossine, l'inibizione dell'ingresso e della proliferazione dei patogeni nell'organismo e la loro successiva eliminazione. Il legame tra l'antigene e gli anticorpi di membrana presenti sui linfociti B naïve rappresenta il segnale iniziale che induce l'attivazione di queste cellule e l'avvio della risposta immunitaria umorale. A seguito dell'attivazione, i linfociti B si differenziano in plasmacellule, le quali producono e secernono anticorpi con la medesima specificità del recettore originario per l'antigene. Gli anticorpi secreti possono distribuirsi in diversi compartimenti corporei, tra cui il plasma, le secrezioni mucose e il liquido interstiziale dei tessuti.

Durante la fase effettrice dell'immunità umorale, gli anticorpi si legano agli antigeni e attivano vari meccanismi volti alla loro eliminazione. Spesso questo processo richiede la collaborazione con componenti dell'immunità innata, come le proteine del complemento e cellule quali fagociti ed eosinofili. Tra le principali funzioni effettrici degli anticorpi si includono: la neutralizzazione di microrganismi e tossine, l'attivazione del complemento, l'opsonizzazione degli antigeni per facilitarne la fagocitosi, la citotossicità anticorpo-dipendente (attraverso cui cellule dell'immunità innata eliminano cellule infette opsonizzate) e l'attivazione degli eosinofili nella difesa contro elminti e parassiti.

Gli anticorpi sono presenti nel siero, la frazione liquida del sangue priva dei fattori della coagulazione. Un siero contenente anticorpi specifici per un antigene è definito antisiero. La quantità di anticorpi specifici viene espressa come titolo anticorpale, determinato mediante diluizioni seriali: un titolo più elevato indica una maggiore concentrazione di anticorpi.

Dal punto di vista generale, le proteine presenti nel plasma o nel siero possono essere suddivise in albumine e globuline in base alla loro solubilità, e ulteriormente classificate tramite elettroforesi, che

ne separa le componenti in funzione della loro mobilità in un campo elettrico. In questo contesto, la maggior parte degli anticorpi appartiene alla frazione delle gammaglobuline. Per questo motivo, gli anticorpi sono comunemente definiti anche immunoglobuline (Ig), termine che sottolinea il loro ruolo nella risposta immunitaria [2][3].

1.2.1 Sintesi degli anticorpi

Le catene pesanti e leggere delle immunoglobuline, analogamente alla maggior parte delle proteine destinate alla secrezione o all'espressione di membrana, vengono sintetizzate da ribosomi associati al reticolo endoplasmatico rugoso. Durante la sintesi, le catene polipeptidiche vengono traslocate all'interno del lume del reticolo endoplasmatico, dove le catene pesanti subiscono processi di N-glicosilazione. L'assemblaggio corretto delle immunoglobuline e l'associazione tra catene pesanti e leggere sono regolati da specifiche proteine residenti nel reticolo endoplasmatico, note come chaperonine. Tra queste, la calnexina e la proteina BiP (Binding Protein) svolgono un ruolo cruciale nel controllo della qualità: esse si legano alle catene nascenti, favorendone il corretto ripiegamento e trattenendo o indirizzando alla degradazione le molecole non correttamente strutturate. Durante questa fase avviene anche la formazione dei ponti disolfuro, che stabilizzano le interazioni covalenti tra le diverse catene. Una volta completato l'assemblaggio, le immunoglobuline si dissociano dalle chaperonine e vengono trasferite all'apparato di Golgi, dove subiscono ulteriori modificazioni, in particolare a carico delle componenti glucidiche. Successivamente, le molecole anticorpali vengono trasportate mediante vescicole verso la membrana cellulare. A questo punto, gli anticorpi destinati alla forma di membrana rimangono ancorati alla superficie cellulare, mentre quelli destinati alla secrezione vengono rilasciati all'esterno della cellula [2].

1.2.2 Struttura degli anticorpi

Le prime analisi strutturali degli anticorpi furono condotte su sieri di individui immunizzati, ma risultarono limitate dalla natura eterogenea degli anticorpi presenti, prodotti da molteplici cloni di linfociti B e diretti contro diversi epitopi dello stesso antigene (anticorpi policlonali); questa variabilità rendeva difficile una caratterizzazione strutturale precisa. Un avanzamento decisivo derivò dallo studio del mieloma multiplo, una neoplasia delle plasmacellule caratterizzata dalla produzione di immunoglobuline monoclonali identiche.

Tutte le immunoglobuline condividono una struttura di base comune, pur mostrando una notevole variabilità nelle regioni deputate al legame con l'antigene, questa variabilità è alla base della capacità del sistema immunitario di riconoscere un'enorme varietà di antigeni differenti. Ogni individuo possiede milioni di cloni distinti di linfociti B, ciascuno dei quali produce anticorpi caratterizzati da un sito di legame unico, determinandone la specificità antigenica. Al contrario, le regioni non coinvolte nel legame con l'antigene risultano relativamente conservate e sono responsabili delle funzioni effettrici e delle proprietà chimico-fisiche degli anticorpi.

Le immunoglobuline sono glicoproteine con struttura simmetrica costituite da due catene pesanti e due catene leggere identiche, organizzate in domini immunoglobulinici (Ig) di circa 110 amminoacidi. Ogni dominio Ig è formato da due foglietti β -planari, ciascuno composto da 3-5 "nastri" polipeptidici ad andamento antiparallelo; i due foglietti sono tenuti insieme da un ponte disolfuro e i nastri adiacenti a ogni foglietto β sono connessi da brevi anse superficiali fondamentali per il riconoscimento dell'antigene.

Le catene anticorpali sono suddivise in una regione variabile (V), localizzata all'estremità amminoterminale e coinvolta nel legame antigenico, e una regione costante (C), situata all'estremità carbossiterminale e responsabile delle funzioni effettrici. Nelle catene pesanti, la regione variabile comprende un dominio Ig, mentre la regione costante è formata da tre o quattro domini; nelle catene leggere, entrambe le regioni (variabile e costante) contengono un solo dominio Ig.

Il sito di legame per l'antigene è formato dall'associazione delle regioni variabili della catena pesante (VH) e della catena leggera (VL), conferendo all'anticorpo una bivalenza funzionale. Le regioni costanti delle catene pesanti mediano invece le interazioni con cellule e molecole effettrici del sistema immunitario e determinano le funzioni biologiche dell'anticorpo, oltre a consentire, in alcune forme, l'ancoraggio alla membrana dei linfociti B o la secrezione. Le catene pesanti sono inoltre collegate tra loro nella regione cerniera, che rappresenta anche il principale sito di digestione proteolitica. La digestione con papaina genera due frammenti Fab (legame antigenico) e un frammento Fc (funzioni effettrici), mentre la pepsina produce un frammento $F(ab')_2$ bivalente.

La specificità antigenica è determinata da regioni ipervariabili (CDR, Complementarity-Determining Regions) presenti nelle regioni variabili di VH e VL. Ciascuna catena contiene tre CDR (CDR1, CDR2, CDR3), che formano il sito di legame tridimensionale. Tra queste, la CDR3 è la più variabile e contribuisce in modo predominante al riconoscimento dell'antigene. Sebbene le CDR rappresentino

i principali determinanti del legame, anche alcune regioni conservate possono contribuire all'interazione antigene-anticorpo [3].

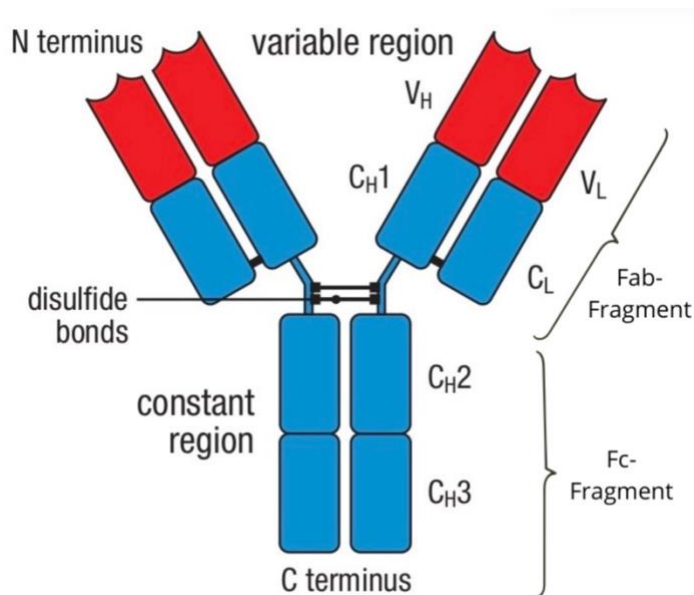


Figura 3. Struttura schematica di un anticorpo (immunoglobulina G, IgG). Sono evidenziate le regioni variabili delle catene pesanti (V_H) e leggere (V_L), responsabili del riconoscimento dell'antigene, e le regioni costanti delle catene pesanti (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) e leggere (C_L). Le due catene pesanti e le due catene leggere sono unite da ponti disolfuro. L'anticorpo è suddiviso in due frammenti Fab (antigen-binding fragment), coinvolti nel legame con l'antigene, e un frammento Fc (fragment crystallizable), responsabile delle funzioni effettrici. Sono inoltre indicati l'estremità N-terminale e C-terminale della molecola. Adattata da *Janeway's Immunobiology*.

1.2.3 Classi di immunoglobuline

Per quanto riguarda le regioni costanti, gli anticorpi vengono classificati in diverse classi o isotipi sulla base delle differenze strutturali delle catene pesanti. Nell'uomo si distinguono cinque isotipi principali: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Alcuni di questi presentano ulteriori suddivisioni in sottoclassi, come IgA1 e IgA2, e IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Le regioni costanti delle catene pesanti sono altamente conservate all'interno dello stesso isotipo, ma differiscono tra isotipi diversi, determinando proprietà funzionali specifiche. Le catene pesanti sono identificate con lettere greche corrispondenti all'isotipo (α , δ , ϵ , γ , μ). Dal punto di vista strutturale, le regioni costanti possono includere tre o quattro domini immunoglobulinici: le IgM e le IgE possiedono quattro domini costanti, mentre IgG, IgA e IgD ne presentano tre. Tali domini, denominati CH (constant heavy), sono numerati progressivamente dall'estremità amminotermineale a quella carbossiterminale (CH_1 , CH_2 , CH_3 , CH_4) e possono essere ulteriormente specificati in base all'isotipo di appartenenza.

Le diverse classi e sottoclassi di anticorpi svolgono funzioni effettrici differenti, determinate principalmente dalle caratteristiche delle regioni costanti delle catene pesanti. Tali funzioni sono mediate dall'interazione delle regioni CH con recettori specifici per il frammento Fc (FcR), presenti su varie cellule del sistema immunitario, come fagociti, cellule NK e mastociti, oltre che con proteine plasmatiche quali i componenti del complemento. Le variazioni strutturali nelle regioni costanti tra i diversi isotipi spiegano quindi le differenze nella capacità di legame e nelle funzioni biologiche svolte.

Gli anticorpi della classe IgM rappresentano le prime immunoglobuline prodotte durante la risposta immunitaria umorale e sono caratterizzati, in fase iniziale, da una relativamente bassa affinità per l'antigene. Tuttavia, tali molecole sono organizzate in strutture pentameriche, configurazione che conferisce complessivamente dieci siti di legame per l'antigene, determinando un'elevata avidità funzionale, particolarmente efficace nel riconoscimento di antigeni multivalenti, quali i polisaccaridi capsulari batterici. In questo modo, l'elevata avidità del pentamero compensa la limitata affinità dei singoli siti anticorpali presenti nei monomeri costitutivi. A causa delle loro dimensioni molecolari elevate, le IgM sono prevalentemente confinate al compartimento intravascolare, risultando abbondanti nel sangue e, in misura minore, nella linfa, mentre la loro diffusione negli spazi interstiziali dei tessuti risulta limitata. La loro struttura pentamerica le rende inoltre particolarmente efficienti nell'attivazione della via classica del complemento. Le IgM sono prodotte sia da linfociti B convenzionali non ancora sottoposti a commutazione isotipica, sia in misura prevalente, da popolazioni specializzate come le cellule B-1 e le cellule B della zona marginale della milza. Queste cellule generano anticorpi diretti soprattutto contro antigeni polisaccaridici comuni, spesso di origine batterica e sono in grado di rispondere ad antigeni T-indipendenti senza il supporto dei linfociti T helper. In questo modo contribuiscono a un repertorio preformato di IgM, presenti nel circolo e nelle cavità corporee, fondamentali per una risposta immunitaria rapida contro i patogeni.

Le immunoglobuline delle classi IgG, IgA e IgE presentano dimensioni più contenute rispetto alle IgM e sono pertanto in grado di diffondere con maggiore facilità dal compartimento vascolare ai tessuti. Le IgA possono essere presenti sotto forma di dimeri, mentre le IgG e le IgE sono esclusivamente monomeriche. In questo contesto, l'affinità dei singoli siti di legame per l'antigene rappresenta un determinante fondamentale dell'efficacia funzionale di tali anticorpi. La maggior parte dei linfociti B che esprimono queste classi anticorpali deriva infatti da processi di selezione nei centri germinativi, dove l'ipermutazione somatica consente l'arricchimento di cloni ad elevata affinità per l'antigene.

Le IgG rappresentano la principale classe di immunoglobuline più abbondanti nel siero umano, costituendo circa il 10–20% delle proteine plasmatiche totali, mentre le IgA costituiscono la classe predominante nelle secrezioni mucosali, in particolare a livello degli epiteli che rivestono il tratto gastrointestinale e quello respiratorio. Dal punto di vista funzionale, le IgG svolgono un ruolo efficace nell'opsonizzazione dei patogeni, facilitandone la fagocitosi, e sono inoltre in grado di attivare il sistema del complemento. Le IgG esercitano la loro azione soprattutto nei tessuti, dove sono presenti cellule effettrici e molecole accessorie del sistema immunitario. All'interno della classe IgG è possibile identificare quattro sottoclassi principali: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, elencate in ordine decrescente di abbondanza (**Figura 4**). Tali sottoclassi furono inizialmente descritte negli anni Sessanta grazie all'impiego di antisieri specifici ottenuti da conigli immunizzati con proteine mielomatose IgG umane. Nonostante un'elevata omologia di sequenza amminoacidica, superiore al 90%, ciascuna sottoclasse presenta caratteristiche strutturali e funzionali peculiari, che influenzano parametri quali il legame con l'antigene, la formazione di immunocomplessi, l'attivazione del complemento, l'interazione con le cellule effettrici, l'emivita sierica e il trasporto transplacentare.

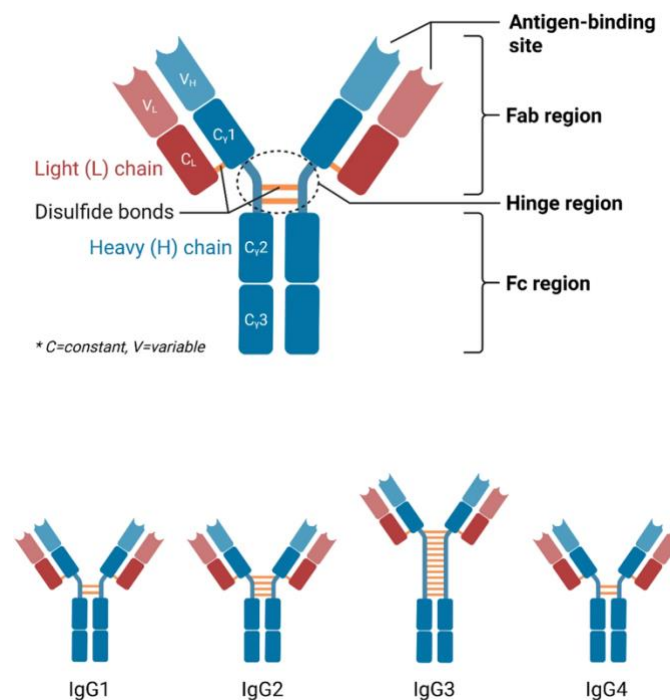


Figura 4. Struttura delle immunoglobuline G (IgG) e relative sottoclassi: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Adattato da *Structure–function relationships of human IgG subclasses: implications for therapeutic antibody engineering and clinical application*.

Le IgA presentano una minore attività opsonizzante e una capacità più limitata di attivazione del complemento, risultando quindi principalmente anticorpi neutralizzanti. Le IgA dimeriche agiscono prevalentemente sulle superfici epiteliali, ambienti in cui la presenza di complemento e fagociti è fisiologicamente ridotta. In tali sedi, la funzione principale delle IgA è quindi la neutralizzazione dei patogeni e delle tossine. Le IgA monomeriche, invece, possono essere prodotte da plasmacellule derivate da linfociti B, che hanno subito commutazione isotipica nei linfonodi e nella milza e svolgono anch'esse un ruolo neutralizzante negli spazi extracellulari e nel sangue. Questa forma monomerica appartiene prevalentemente alla sottoclasse IgA1; nel siero, il rapporto tra IgA1 e IgA2 è circa 10:1. Le IgA prodotte a livello intestinale sono invece prevalentemente dimeriche e appartenenti alla sottoclasse IgA2, con un rapporto IgA2 : IgA1 di circa 3:2.

Le IgE sono presenti in concentrazioni molto basse nel sangue e nei fluidi extracellulari, ma mostrano un'elevata affinità per i recettori (FcεRI) espressi sui mastociti e basofili, la cui attivazione, in seguito al legame con l'antigene, determina il rilascio di mediatori responsabili della risposta allergica.

I mastociti sono localizzati nel tessuto connettivo sottostante la cute, le mucose e le pareti dei vasi sanguigni mentre i basofili sono le cellule circolanti nel sangue [2].

Infine le IgD rappresentano una classe anticorpale caratterizzata da concentrazioni sieriche significativamente inferiori rispetto alle immunoglobuline IgG, IgA e IgM, ma superiori a quelle delle IgE. Nonostante oltre quarant'anni di ricerche, non è stato ancora identificato un ruolo funzionale specifico per l'IgD circolante nel siero, mentre per la forma di membrana espressa sulla superficie di numerosi linfociti B sono state avanzate diverse ipotesi funzionali. Le ricerche più recenti si concentrano su aspetti genetici, sulla forma di membrana, sui meccanismi di segnalazione nei linfociti B e sul suo ruolo nelle interazioni immunitarie, mentre le conoscenze sulle IgD sieriche derivano principalmente da studi più datati [4].

1.3 Reazioni di ipersensibilità

La risposta immunitaria adattativa rappresenta un elemento essenziale della difesa dell'organismo contro le infezioni ed è indispensabile per il mantenimento della salute fisiologica. Tuttavia, anche antigeni non associati ad agenti infettivi possono indurre risposte immunitarie adattative che, in determinate condizioni, risultano inappropriate o eccessive e possono contribuire all'insorgenza di patologie. Ciò si osserva, ad esempio, nelle reazioni di ipersensibilità.

Le reazioni di ipersensibilità costituiscono un insieme eterogeneo di risposte immunitarie dirette contro antigeni innocui o componenti dell'organismo stesso. Tali risposte diventano clinicamente rilevanti quando risultano sproporzionate o mal regolate, determinando processi infiammatori e possibili danni tissutali.

In questo contesto, è possibile distinguere tra risposte dirette contro antigeni self, alla base delle patologie autoimmuni, e risposte rivolte contro antigeni esogeni, come allergeni ambientali, farmaci o alimenti, responsabili delle reazioni allergiche. In soggetti predisposti (atopici), una precedente esposizione all'antigene può indurre uno stato di sensibilizzazione, che comporta risposte immunitarie più rapide ed intense alle successive esposizioni, con manifestazioni cliniche di gravità variabile.

In base alla classificazione proposta da ipersensibilità di Gell e Coombs, queste reazioni si distinguono in quattro principali categorie (Tipo I, II, III e IV), definite da specifici meccanismi immunologici e modalità di danno tissutale [1][5].

1.3.1 Reazioni di ipersensibilità di tipo I

Le reazioni di ipersensibilità di tipo I, o immediate, sono mediate da IgE e si osservano prevalentemente in risposta ad antigeni ambientali in individui atopici. In condizioni fisiologiche, le IgE svolgono un ruolo protettivo, in particolare nelle infezioni parassitarie, attraverso l'attivazione degli eosinofili; tuttavia, negli individui predisposti, esse possono essere prodotte in modo inappropriato contro antigeni innocui.

Le IgE si legano a recettori ad alta affinità espressi su mastociti e basofili; una successiva esposizione all'antigene determina il cross-linking delle IgE e l'attivazione di queste cellule, con conseguente degranulazione e rilascio di mediatori infiammatori.

La risposta si articola in una fase precoce, che insorge entro pochi minuti ed è mediata da istamina, prostaglandine e leucotrieni, e in una fase tardiva, che compare dopo 4–8 ore ed è caratterizzata dalla produzione di citochine, tra cui interleuchine, fattore di necrosi tumorale (TNF) e dal reclutamento di cellule infiammatorie, in particolare eosinofili. Le manifestazioni cliniche comprendono anafilassi, asma bronchiale e orticaria [5].

1.3.2 Reazioni di ipersensibilità di tipo II

Le reazioni di ipersensibilità di tipo II, definite anche citotossiche, sono mediate principalmente da anticorpi delle classi IgG e IgM diretti contro antigeni presenti sulla superficie cellulare o nei tessuti. Il danno tissutale può avvenire attraverso diversi meccanismi, tra cui l'opsonizzazione e la fagocitosi delle cellule bersaglio, l'attivazione del sistema del complemento e la conseguente risposta infiammatoria, nonché la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente. In alcuni casi, gli anticorpi possono anche alterare la funzione dei recettori cellulari, come avviene nella malattia di Graves. Esempi clinici includono l'anemia emolitica autoimmune e la porpora trombocitopenica autoimmune [5].

1.3.3 Reazioni di ipersensibilità di tipo III

Le reazioni di ipersensibilità di tipo III sono caratterizzate dalla formazione e dal deposito nei tessuti di immunocomplessi costituiti da antigeni e anticorpi (prevalentemente IgG e IgM). L'attivazione del sistema del complemento e il reclutamento di cellule infiammatorie, in particolare neutrofili, determinano danno tissutale. Le manifestazioni cliniche dipendono principalmente dalla sede di deposito degli immunocomplessi ed includono vasculiti, glomerulonefriti e artriti. Tra le patologie associate rientra la malattia da siero [5].

1.3.4 Reazioni di ipersensibilità di tipo IV

Le reazioni di ipersensibilità di tipo IV, o ritardate, sono mediate da linfociti T sensibilizzati piuttosto che da anticorpi. Questa risposta immunitaria, prevalentemente di tipo Th1, è caratterizzata da un'insorgenza tardiva ed è sostenuta dal rilascio di citochine proinfiammatorie, che attivano macrofagi e altre cellule effettrici. Il danno tissutale è determinato dalla produzione di enzimi lisosomiali, specie reattive dell'ossigeno e ossido nitrico.

In base ai sottotipi linfocitari coinvolti, ai profili citochinici e ai meccanismi effettrici, le reazioni di tipo IV possono essere ulteriormente suddivise in quattro categorie: IVa, IVb, IVc e IVd.

Le reazioni di tipo IVa sono mediate da linfociti Th1, che attivano i macrofagi attraverso IFN- γ e TNF, determinando danno tissutale; un esempio tipico è la dermatite da contatto. Le IVb sono associate a una risposta Th2, con produzione di IL-4, IL-5 e IL-13, che favoriscono il coinvolgimento

di eosinofili e mastociti e contribuiscono, in particolare, alla fase tardiva delle reazioni allergiche. Le IVc coinvolgono linfociti T citotossici CD8+, responsabili della morte cellulare per apoptosi o necrosi, come nelle gravi reazioni cutanee quali sindrome di Stevens-Johnson e necrolisi epidermica tossica. Infine, le IVd sono caratterizzate dal reclutamento di neutrofili mediato da chemochine (ad esempio CXCL-8) e citochine come IL-17 e IL-22, con manifestazioni cliniche quali la pustolosi esantematica acuta generalizzata [5].

1.4 Ipersensibilità alimentari

L'ipersensibilità alimentare rappresenta una condizione clinica di crescente rilevanza a livello globale, caratterizzata da reazioni avverse a specifici componenti degli alimenti. Essa comprende sia le allergie alimentari, mediate da meccanismi immunologici, sia le intolleranze alimentari, riconducibili a meccanismi non immuno-mediati. Tali condizioni possono manifestarsi attraverso un ampio spettro di sintomi, che variano da forme lievi a manifestazioni severe, potenzialmente letali. Tra le principali manifestazioni cliniche si annoverano sintomi cutanei (quali rash, dermatite, rosacea e angioedema), disturbi gastrointestinali (tra cui gonfiore addominale, diarrea, stipsi, meteorismo, reflusso e alterazioni dell'assorbimento di macro- e micronutrienti) e sintomi respiratori (inclusi shock anafilattico, dispnea, congestione nasale, rinorrea, starnuti, prurito a carico delle vie aeree superiori, tosse e wheezing).

Negli ultimi decenni si è assistito ad un progressivo incremento dell'ipersensibilità alimentare; in ambito pediatrico si riscontrano prevalentemente forme mediate da immunoglobuline E (IgE), mentre nella popolazione adulta si osserva una maggiore rappresentazione delle forme non IgE-mediate e delle intolleranze alimentari. Un esempio emblematico è rappresentato dall'intolleranza al lattosio, una condizione ampiamente diffusa a livello mondiale, che interessa oltre il 65% della popolazione ed è determinata da una assente o ridotta attività dell'enzima lattasi in età adulta. Analogamente, la sensibilità al glutine non celiaca è stata riconosciuta come entità clinica distinta, sebbene i meccanismi fisiopatologici sottostanti non siano ancora completamente chiariti. La distinzione tra allergia alimentare e intolleranza risulta fondamentale ai fini di una corretta diagnosi e dell'impostazione di adeguate strategie terapeutiche e nutrizionali [6].

1.4.1 Allergia alimentare

L'allergia alimentare, inclusa nel più ampio ambito delle ipersensibilità alimentari, è definita come una reazione immunologica nei confronti delle proteine presenti negli alimenti. Tale risposta può essere mediata da immunoglobuline E (IgE), può presentarsi in forma mista (IgE- e non IgE-mediata) oppure essere esclusivamente non IgE-mediata. Le allergie alimentari IgE-mediate rappresentano la forma più studiata e diffusa, interessando milioni di individui a livello globale e incidendo in maniera significativa sulla qualità della vita dei soggetti affetti. La prevalenza delle allergie alimentari è stimata tra il 2 e 10% della popolazione mondiale, con un incremento progressivo osservato negli ultimi due decenni; riguardano per il 6-8% bambini e 3-4% adulti [7].

Le manifestazioni cliniche delle allergie alimentari possono coinvolgere diversi sistemi e apparati, tra cui quello respiratorio, gastrointestinale, cutaneo e cardiovascolare. I sintomi a carico dell'apparato respiratorio comprendono starnuti, congestione nasale, rinorrea, respiro sibilante ed edema laringeo. Le manifestazioni gastrointestinali comprendono nausea, vomito, dolore addominale e diarrea. A livello cutaneo, si possono osservare orticaria, angioedema, flushing e prurito. Il coinvolgimento del sistema cardiovascolare può determinare tachicardia e ipotensione e, nei casi più gravi, evolvere in sincope o shock anafilattico, una condizione potenzialmente fatale. In genere, la sintomatologia insorge rapidamente, entro pochi minuti dall'ingestione dell'alimento responsabile; tuttavia, in alcuni casi più rari, può manifestarsi con un ritardo fino a 8–10 ore, come osservato nelle reazioni all'alpha-gal [8].

1.4.2 Allergie alimentari IgE-mediate

Le allergie alimentari IgE-mediate rappresentano una forma di ipersensibilità di tipo I, caratterizzata da una risposta immunitaria immediata nei confronti di specifiche proteine alimentari. Tali reazioni, generalmente dose-indipendenti, sono sostenute dalla produzione di IgE, responsabili del rilascio di mediatori infiammatori e dell'insorgenza dei sintomi, che compaiono in tempi rapidi, generalmente da pochi minuti a poche ore dall'ingestione, con un quadro clinico variabile fino all'anafilassi.

Negli ultimi decenni si è osservato un incremento della prevalenza delle allergie alimentari IgE-mediate, in particolare in età pediatrica. Tra gli allergeni più frequentemente coinvolti si annoverano arachidi, frutta a guscio e prodotti ittici.

La diagnosi si basa su un approccio integrato che combina anamnesi clinica e test diagnostici in vivo e in vitro, includendo, nei casi selezionati, il test di provocazione orale.

Tra i test di primo livello, il prick test cutaneo (Skin Prick Test, SPT) consente una valutazione rapida e simultanea della sensibilizzazione a diversi allergeni ed è caratterizzato da elevata sensibilità. Tuttavia, i risultati possono essere influenzati da fattori tecnici, dalla qualità degli estratti e da condizioni del paziente, con possibile comparsa di falsi positivi o falsi negativi (ad esempio in corso di terapia antistaminica o terapia corticosteroidea) pertanto, l'interpretazione di tipo qualitativa, deve sempre essere integrata con il quadro clinico ed eventualmente con approfondimenti attraverso la ricerca delle IgE Specifiche (sIgE) in vitro.

Il dosaggio sIgE in vitro rappresenta un utile esame per l'identificazione di anticorpi diretti contro allergeni specifici. I test di ultima generazione presentano buona sensibilità e specificità, con curva di taratura che restituisce un risultato quantitativo espresso in kUA/L (chilo unità arbitrarie/allergeniche per litro), riproducibile e standardizzato. Tale esame è indicato anche in pazienti in terapia con antistaminici e presenza di dermografismo.

Tecniche più avanzate, come la diagnostica molecolare (Component-Resolved Diagnostics, CRD), permettono una caratterizzazione più precisa del profilo di sensibilizzazione, distinguendo tra sensibilizzazione primaria e fenomeni di cross-reattività. Nel complesso, la diagnosi di allergia alimentare IgE-mediata richiede un approccio multimodale che si avvale di dati clinici e laboratoristici al fine di ottenere un'elevata accuratezza diagnostica [6].

1.4.3 Allergie alimentari miste e non IgE-mediate

Le allergie alimentari miste IgE/non IgE-mediate e quelle esclusivamente non IgE-mediate costituiscono un gruppo eterogeneo di patologie caratterizzate da meccanismi immunologici complessi e da una maggiore difficoltà diagnostica rispetto alle forme IgE-mediate.

Tra le principali allergie alimentari miste rientra l'esofagite eosinofila, una malattia cronica immuno-mediata dell'esofago, caratterizzata da infiltrazione eosinofila e sintomi quali disfagia e impatto alimentare. La sua gestione prevede un approccio integrato basato su diete di eliminazione e terapia farmacologica.

Le allergie non IgE-mediate comprendono diverse entità cliniche, tra cui la proctocolite allergica, la malattia celiaca con la sua manifestazione cutanea (dermatite erpetiforme), l'enteropatia indotta da proteine alimentari (FPE), la sindrome di Heiner e la sindrome da enterocolite indotta da proteine alimentari (FPIES). Tali condizioni si manifestano prevalentemente nei primi anni di vita e sono frequentemente associate a proteine del latte vaccino, della soia e del grano [9].

La proctocolite allergica è generalmente una condizione benigna del lattante, caratterizzata da sanguinamento rettale e risolvibile con l'eliminazione dell'alimento responsabile. La malattia celiaca è invece una patologia cronica immuno-mediata indotta dal glutine, che comporta malassorbimento intestinale e richiede una dieta priva di glutine per tutta la vita. L'enteropatia indotta da proteine alimentari si presenta con diarrea cronica e ritardo della crescita, mentre la sindrome di Heiner, più rara, è associata a manifestazioni respiratorie legate al latte vaccino. La FPIES è caratterizzata da sintomi gastrointestinali severi e ritardati, con prognosi generalmente favorevole.

Nel complesso, queste patologie richiedono un approccio multidisciplinare e una gestione personalizzata, basata principalmente sull'eliminazione degli alimenti responsabili e su un attento monitoraggio clinico, al fine di garantire un adeguato sviluppo e prevenire complicanze a lungo termine [6].

1.4.4 Intolleranze alimentari

Le intolleranze alimentari rappresentano un'ulteriore espressione dell'ipersensibilità alimentare e sono definite come reazioni avverse non immunologiche conseguenti all'ingestione di alimenti o componenti alimentari generalmente tollerati a determinate soglie di assunzione. Si stima che fino al 20% della popolazione mondiale possa presentare forme di intolleranza alimentare.

La diagnosi di tali condizioni risulta spesso complessa, in quanto richiede un'accurata valutazione della presentazione clinica, con particolare attenzione all'intensità dei sintomi e al tempo di insorgenza rispetto all'ingestione dell'alimento. La variabilità dei meccanismi patogenetici contribuisce ulteriormente alla complessità del quadro clinico. Le intolleranze alimentari possono infatti derivare da effetti farmacologici (ad esempio la caffeina), da deficit enzimatici (come nel caso dell'intolleranza al lattosio, causata da una carenza di lattasi), oppure da alterazioni funzionali aspecifiche del tratto gastrointestinale.

Tra i principali alimenti e componenti implicati si annoverano il lattosio, il glutine/frumento, gli alimenti ricchi di istamina e FODMAPs (Fermentable Oligo-saccharides, Disaccharides, Monosaccharides and Polyols). Le manifestazioni cliniche sono prevalentemente gastrointestinali e comprendono gonfiore addominale, meteorismo, diarrea, dolore addominale e nausea. A differenza delle allergie alimentari, le intolleranze raramente determinano reazioni gravi o potenzialmente letali e risultano essere generalmente manifestazioni dose-dipendenti.

L'intolleranza al lattosio è causata da un deficit di lattasi con conseguente malassorbimento del lattosio e sintomi gastrointestinali dopo ingestione di latticini. Può essere primaria, secondaria, congenita o legata allo sviluppo. La diagnosi si basa principalmente sul breath test all'idrogeno o sul test genetico molecolare, mentre il trattamento prevede riduzione del lattosio, enzimi sostitutivi e, in alcuni casi, probiotici. La variabilità individuale suggerisce la possibilità di adattamento dietetico [10].

La NCGWS è una condizione caratterizzata da sintomi intestinali ed extraintestinali legati all'ingestione di glutine o grano, in assenza di celiachia o allergia. La diagnosi si basa su criteri di esclusione di Salerno, che prevedono anche la valutazione della risposta clinica alla dieta priva di glutine. Il quadro clinico è eterogeneo e potrebbe coinvolgere anche componenti diversi dal glutine, come i FODMAPs. Non esistono biomarcatori specifici.

L'intolleranza ereditaria al fruttosio è una rara malattia genetica causata da mutazioni del gene ALDOB, responsabile di gravi alterazioni metaboliche dopo l'ingestione di fruttosio, saccarosio o sorbitolo. Il trattamento consiste nell'esclusione rigorosa di tali zuccheri dalla dieta [11]. Il malassorbimento del fruttosio, invece, è una condizione funzionale più comune, dovuta a un ridotto assorbimento intestinale del fruttosio. Si manifesta principalmente con sintomi gastrointestinali ed è diagnosticato mediante breath test; il trattamento prevede una dieta a ridotto contenuto di fruttosio o FODMAP [12]. Un'altra forma di intolleranza ai carboidrati è il deficit di sucrali-isomaltasi, congenito o acquisito, che comporta una ridotta digestione di saccarosio e amidi e si manifesta con sintomi gastrointestinali dopo l'ingestione di tali zuccheri [13].

L'intolleranza all'istamina è causata da ridotta degradazione dell'istamina, principalmente per deficit di diamino ossidasi (DAO). Si manifesta con sintomi gastrointestinali, cutanei e cardiovascolari. La diagnosi è complessa e il trattamento si basa su dieta a basso contenuto di istamina, antistaminici e supplementazione enzimatica.

I FODMAPs sono carboidrati fermentabili che possono causare sintomi gastrointestinali nei soggetti sensibili, soprattutto nei pazienti con IBS. La dieta low-FODMAP, articolata in eliminazione, reintroduzione e personalizzazione, è efficace nel controllo dei sintomi, ma richiede supervisione per evitare squilibri nutrizionali.

La sindrome dell'intestino irritabile è un disturbo funzionale gastrointestinale che interessa circa il 20% della popolazione. Si manifesta con dolore addominale, gonfiore e alterazioni dell'alvo ed è classificata in sottotipi in base al pattern delle feci. La sua eziopatogenesi è multifattoriale e coinvolge alterazioni del microbiota, disfunzione della barriera intestinale, asse intestino-cervello e fattori psicologici. È frequentemente associata a intolleranze alimentari, in particolare FODMAPs, lattosio e sensibilità al grano, mentre le allergie IgE-mediate sono rare [6].

1.5 Immunoglobuline G e sottoclassi: ruolo funzionale nel sistema immunitario

Le IgG mostrano una risposta anticorpale con marcata variabilità in funzione della natura dell'antigene e delle modalità di attivazione del sistema immunitario. Tale variabilità si traduce in una polarizzazione verso specifiche sottoclassi, determinata da molteplici fattori immunologici, tra cui la via di ingresso dell'antigene, la sua composizione chimica e il contesto citochinico locale. In condizioni fisiologiche, eventuali carenze selettive di sottoclassi IgG non comportano necessariamente manifestazioni cliniche rilevanti; tuttavia, in alcuni casi possono associarsi a una maggiore suscettibilità a determinate infezioni, in particolare quelle sostenute da batteri capsulati. Le carenze possono derivare, sebbene raramente, da delezioni genetiche a livello dei loci delle immunoglobuline sul cromosoma 14, con conseguente deficit completo di isotipo o sottoclasse. Più frequentemente, si osservano riduzioni isolate dei livelli sierici di una o più sottoclassi, in particolare IgG2 e IgG4, anche in individui apparentemente sani. Tali alterazioni possono compromettere la risposta immunitaria verso specifici patogeni, evidenziando il ruolo funzionale differenziato delle sottoclassi IgG. Nel complesso, la variabilità del locus delle immunoglobuline sembra essere stata mantenuta nel corso dell'evoluzione in quanto vantaggiosa per l'ottimizzazione e la regolazione fine della risposta immunitaria umorale.

Dal punto di vista strutturale, le quattro sottoclassi IgG condividono un'elevata omologia, ma differiscono principalmente nelle regioni costanti, in particolare nella regione cerniera e nei domini superiori CH2. Tali regioni sono cruciali per l'interazione con i recettori Fc delle immunoglobuline G (FcγR) e con il componente C1q del complemento. Di conseguenza, le differenze strutturali tra le

sottoclassi si riflettono in una diversità funzionale significativa, che include la capacità di attivare il complemento e di mediare risposte effettrici quali la fagocitosi e la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC).

Inoltre, la regione Fc delle IgG contiene il sito di legame per il recettore Fc neonatale (FcRn), il quale svolge un ruolo fondamentale nel prolungamento dell'emivita sierica delle IgG, nel trasporto transplacentare e nella distribuzione bidirezionale verso le superfici mucosali. Il recettore FcRn è espresso anche in cellule del compartimento mieloide, dove contribuisce ai processi di fagocitosi e presentazione dell'antigene in cooperazione con i recettori FcγR e il sistema del complemento [2][14].

1.5.1 Risposte anticorpali IgG

La natura dell'antigene e la modalità attraverso cui esso entra nell'organismo rappresentano determinanti fondamentali nel modulare la risposta immunitaria adattativa, influenzando in modo significativo i processi di "class switching" delle cellule B. Oltre alla stimolazione antigenica diretta, la differenziazione delle cellule B è regolata da segnali accessori, tra cui l'attivazione di recettori del riconoscimento del pattern, come i Toll-like receptors e la produzione di citochine da parte di linfociti e cellule presentanti l'antigene.

Gli antigeni di natura proteica inducono tipicamente una risposta T-dipendente, mediata dall'interazione tra cellule B e cellule T attraverso le molecole MHC di classe II. In questo contesto, il class switching è prevalentemente orientato verso le sottoclassi IgG1 e IgG3, sebbene possano essere indotte anche risposte verso IgG4 o IgE. Al contrario, antigeni polisaccaridici, che generalmente attivano risposte T-indipendenti, favoriscono in modo particolare la produzione di IgG2.

Le cellule B attivate possono inoltre andare incontro ad ulteriori eventi di ricombinazione isotipica nel corso della risposta immunitaria primaria o secondaria; tuttavia, tali processi sono vincolati dalla disposizione genomica dei geni delle catene pesanti immunoglobuliniche, che non vengono completamente eliminati durante i precedenti eventi di switch. La posizione relativamente distale del segmento genico Cγ4 all'interno del locus delle immunoglobuline potrebbe spiegare la tendenza delle risposte IgG4 a manifestarsi in seguito a esposizioni antigeniche ripetute o prolungate [1][14].

1.5.2 IgG1

Le risposte anticorpali dirette contro antigeni proteici solubili e proteine di membrana determinano principalmente la produzione di immunoglobuline di classe IgG1, sebbene siano generalmente accompagnate da livelli più bassi delle altre sottoclassi, in particolare IgG3 e IgG4. Poiché l'IgG1 rappresenta la sottoclasse più abbondante nel siero, una sua carenza osservata in diverse forme di immunodeficienza anticorpale primaria e secondaria può comportare una riduzione complessiva delle IgG circolanti, configurando un quadro di ipogammaglobulinemia. Le deficienze di IgG1, talvolta associate a carenze concomitanti di altre sottoclassi delle IgG, risultano clinicamente correlate a una maggiore suscettibilità a infezioni ricorrenti [14]

1.5.3 IgG2

Le risposte anticorpali delle immunoglobuline G dirette contro antigeni polisaccaridici capsulari batterici sono frequentemente e quasi esclusivamente mediate dalla sottoclasse IgG2. La carenza di IgG2 può determinare una marcata riduzione, fino alla quasi totale assenza, degli anticorpi IgG diretti contro antigeni di natura oligo o polisaccaridica. Tuttavia, in alcuni casi tali risposte possono essere compensate da un incremento delle altre sottoclassi IgG, in particolare IgG1 e IgG3.

Dal punto di vista clinico, una ridotta concentrazione di IgG2 è stata associata a una maggiore suscettibilità a determinate infezioni batteriche, suggerendo un ruolo fondamentale di questa sottoclasse nella difesa immunitaria contro patogeni capsulati. Non di rado, la carenza di IgG2 si associa anche a ridotti livelli di IgG4 e/o di immunoglobuline A (IgA1 e IgA2).

Studi sulle reattività anti-carboidrati in preparati di immunoglobuline endovenose hanno evidenziato che, sebbene IgG2 rappresenti generalmente la principale componente della risposta verso numerosi glicani, tale predominanza non è universale. In condizioni fisiologiche, inoltre, anche le sottoclassi IgG1 e IgG3 possono contribuire in modo significativo alla risposta anticorpale, come osservato, ad esempio, nelle infezioni naturali da *Haemophilus influenzae* tipo b. Analogamente, nelle risposte immunitarie di individui sani, le IgG1 e IgG3 risultano frequentemente coinvolte, in particolare nei confronti di antigeni glucidici coniugati a proteine, come avviene nelle vaccinazioni pneumococciche coniugate di seconda generazione [14].

1.5.4 IgG3

La sottoclasse IgG3 si distingue per la sua elevata capacità di attivare funzioni effettrici del sistema immunitario, risultando particolarmente efficiente nell'induzione di risposte infiammatorie e nell'attivazione del complemento. La sua emivita relativamente breve è generalmente considerata un meccanismo fisiologico di limitazione della potenziale tossicità associata a risposte infiammatorie eccessive. Tuttavia, alcune evidenze suggeriscono che determinati allotipi possano presentare un'emivita prolungata delle IgG3, mettendo in discussione l'interpretazione tradizionale del loro ruolo regolatorio. Nonostante ciò, in tali soggetti i livelli sierici di IgG3 non risultano necessariamente aumentati, fenomeno che potrebbe essere spiegato da polimorfismi a carico del promotore del gene $\gamma 3$, i quali influenzano la frequenza del class switch verso IgG3 e contribuiscono alla variabilità interindividuale delle concentrazioni di questa sottoclasse.

Le infezioni virali inducono tipicamente risposte anticorpali dominate dalle sottoclassi IgG1 e IgG3, con quest'ultima che tende a comparire precocemente nel corso dell'infezione. Risposte immunitarie caratterizzate da una predominanza esclusiva di IgG3 sono relativamente rare, sebbene siano stati descritti alcuni esempi peculiari, come gli anticorpi anti-regione cerniera, diretti contro la regione di giunzione dei frammenti Fab2. Inoltre, anticorpi diretti contro antigeni dei gruppi sanguigni P e Pk risultano prevalentemente appartenenti alla sottoclasse IgG3. Al contrario, le risposte immunitarie verso altri antigeni eritrocitari e piastrinici, quali RhD e HPA-1a, osservate in contesti trasfusionali o gravidici, mostrano frequentemente una predominanza di IgG1, IgG3 o di entrambe le sottoclassi. Ridotti livelli di IgG3 sono inoltre spesso associati ad altre deficienze delle sottoclassi IgG [14].

1.5.5 IgG4

Le risposte immunitarie verso allergeni sono frequentemente caratterizzate dalla produzione di IgG1 e IgG4, oltre che di immunoglobuline E (IgE). La sottoclasse IgG4 è tipicamente indotta in seguito a esposizioni ripetute o prolungate all'antigene in contesti non infettivi e può diventare la sottoclasse predominante. Esempi rilevanti includono soggetti esposti cronicamente ad allergeni, come i pazienti sottoposti a immunoterapia allergene-specifica (AIT).

In tali contesti clinici, la riduzione della sintomatologia allergica risulta spesso associata a un incremento dei livelli di IgG4, suggerendo un ruolo di questa sottoclasse nei meccanismi di tolleranza immunologica. Il processo di class switching verso IgG4 è modulato da citochine immunoregatorie,

in particolare dall'interleuchina-10 (IL-10), che contribuisce alla down regolazione della risposta immune.

Le IgG4 possono inoltre rappresentare la sottoclasse predominante nelle risposte immunitarie a proteine terapeutiche, come i fattori della coagulazione VIII e IX, nonché ad alcuni anticorpi monoclonali ricombinanti. Analogamente, infezioni parassitarie da elminti o filarie sono frequentemente associate a una risposta anticorpale di tipo IgG4, talvolta correlata a forme di infezione asintomatica.

Le deficienze isolate di IgG4 sono rare e il loro significato clinico non è ancora completamente chiarito. Al contrario, un gruppo eterogeneo di patologie, denominate malattie correlate alle IgG4 (IgG4-related diseases, IgG4-RD), è caratterizzato da elevati livelli sierici di IgG4 e da infiltrazione tissutale di plasmacellule IgG4-positive, con possibile interessamento multiorgano.

Tale spettro patologico include condizioni quali pancreatite autoimmune, malattia di Mikulicz, ipofisite, tiroidite di Riedel, pneumopatie e nefriti interstiziali, prostatite, linfadenopatie, fibrosi retroperitoneale, aneurismi aortici infiammatori e pseudotumori infiammatori. Nella pancreatite autoimmune, elevati livelli sierici di IgG4 sono riscontrabili nella maggioranza dei pazienti, sebbene possano essere presenti anche in una piccola percentuale di soggetti sani e in pazienti con carcinoma pancreatico. Pertanto, il dosaggio delle IgG4 assume valore diagnostico solo se interpretato in associazione con altri parametri clinici, laboratoristici e radiologici [14][15].

1.5.6 Ruolo protettivo delle IgG4 nell'immunoterapia allergene-specifica (AIT)

Dal punto di vista funzionale, le IgG4 svolgono un ruolo prevalentemente protettivo nelle risposte allergiche, in particolare durante l'immunoterapia allergene-specifica (AIT), dove agiscono come anticorpi "bloccanti". Esse competono con le IgE per il legame con l'allergene e, soprattutto, inibiscono l'attivazione delle cellule effettrici attraverso l'interazione con il recettore inibitorio FcγRIIb, riducendo la degranulazione di mastociti e basofili.

Le IgG4 presentano inoltre peculiari caratteristiche strutturali, tra cui il fenomeno del Fab-arm exchange, che consente la formazione di anticorpi funzionalmente monovalenti e bispecifici, incapaci di formare grandi immunocomplessi e di attivare la cascata del complemento. Tali proprietà conferiscono a questa sottoclasse un profilo prevalentemente antinfiammatorio e tollerogenico.

Dal punto di vista clinico, il rapporto tra IgG4 e IgE specifiche per un determinato allergene può rappresentare un indicatore dello stato di tolleranza immunologica. Le IgG4 sono rilevabili anche nei soggetti sani e mostrano una variabilità legata all'età e all'esposizione antigenica, risultando spesso aumentate nei soggetti atopici e durante l'immunoterapia [15].

1.5.7 IgG specifiche per alimenti nel siero: significato biologico e interpretazione clinica

I test per la determinazione delle IgG specifiche per alimenti sono stati ampiamente diffusi, soprattutto in ambito commerciale, come strumenti per l'identificazione delle cosiddette "intolleranze alimentari", contribuendo a generare incertezza interpretativa sia nei pazienti sia tra i professionisti sanitari.

Le evidenze scientifiche attualmente disponibili indicano che la presenza di IgG specifiche per alimenti deve essere interpretata principalmente come un indicatore di esposizione antigenica e di memoria immunologica, piuttosto che come un segno di ipersensibilità o di patologia.

Una corretta interpretazione dei livelli di IgG richiede la disponibilità di intervalli di riferimento definiti su popolazioni ben caratterizzate e ottenuti mediante metodologie analitiche validate. Tuttavia, gli studi disponibili in letteratura risultano limitati e mostrano una significativa variabilità legata a fattori quali abitudini alimentari, caratteristiche demografiche e grado di esposizione agli antigeni.

Ad oggi, gli studi che hanno proposto intervalli di riferimento per le IgG specifiche per alimenti sono limitati. Martins et al. hanno descritto intervalli basati su percentili in una popolazione nordamericana [16], mentre ulteriori dati provenienti da coorti cinesi ed europee/statunitensi (Wang et al., Santos et al.) evidenziano come la distribuzione dei livelli di IgG sia influenzata da fattori quali abitudini alimentari [17][18], caratteristiche demografiche e grado di esposizione agli antigeni. Attualmente, non risultano disponibili intervalli di riferimento specifici per la popolazione italiana, nonostante l'ampia diffusione, spesso inappropriata, dei test IgG nella pratica clinica ambulatoriale e la peculiarità dei modelli dietetici nazionali.

In condizioni fisiologiche, le proteine introdotte con la dieta, inclusi gli antigeni alimentari, vengono sottoposte a un processo di digestione completo nel tratto gastrointestinale, che porta alla formazione di frammenti oligopeptidici. Questi ultimi sono ulteriormente degradati dagli enzimi proteolitici intestinali in di- e tripeptidi e amminoacidi, successivamente assorbiti dagli enterociti. All'interno di

queste cellule avvengono ulteriori processi di proteolisi, al termine dei quali i prodotti finali, principalmente amminoacidi e dipeptidi, vengono immessi nella circolazione portale e trasportati al fegato. Nonostante l'elevata efficienza di tali meccanismi, è stato stimato che circa il 15% delle proteine ingerite sfugga a una digestione completa, comprendendo anche una frazione di antigeni alimentari che possono attraversare la barriera epiteliale intestinale, accedendo all'ambiente interno dell'organismo se non vengono completamente degradati dall'azione combinata degli enzimi digestivi, dei sali biliari e del pH gastrico.

Un altro fattore da tenere in considerazione è la digeribilità delle proteine alimentari, il quale non è un valore costante, ma varia in funzione dei processi di trasformazione e cottura degli alimenti e dell'origine proteica. Il trattamento termico e le diverse tecnologie di lavorazione possono modificare la struttura proteica, influenzandone l'accessibilità agli enzimi digestivi. Tali processi possono sia aumentare la digeribilità, attraverso l'inattivazione di fattori antinutrizionali e una maggiore disponibilità delle proteine, sia ridurla, a causa di modificazioni conformazionali che le rendono più resistenti alla digestione. La digeribilità delle proteine varia anche in funzione della fonte animale o vegetale; le proteine di origine vegetale, in particolare quelle presenti in cereali, legumi e frutta secca, presentano spesso una maggiore resistenza ai processi digestivi enzimatici.

Il passaggio degli antigeni alimentari attraverso l'epitelio intestinale può avvenire mediante diversi meccanismi. Una prima via è rappresentata dalla captazione da parte delle cellule M localizzate nelle placche di Peyer. Un secondo meccanismo coinvolge le cellule dendritiche, che estendono i propri prolungamenti tra gli enterociti per campionare direttamente gli antigeni presenti nel lume intestinale. Una terza modalità consiste nell'assorbimento diretto da parte degli enterociti. Inoltre, in condizioni patologiche caratterizzate da alterazione dell'integrità della barriera epiteliale, come nei processi infiammatori, gli antigeni possono attraversare l'epitelio anche per via paracellulare, a causa della compromissione delle giunzioni intercellulari.

Una volta oltrepassata la barriera epiteliale, gli antigeni alimentari entrano in contatto con il sistema immunitario associato all'intestino, noto come tessuto linfoide associato al tratto gastrointestinale (GALT). Questo compartimento svolge un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi immunitaria, regolando l'equilibrio tra risposte difensive nei confronti di agenti patogeni e l'induzione di tolleranza verso antigeni innocui. In tale contesto, gli antigeni alimentari possono essere riconosciuti come non pericolosi, favorendo lo sviluppo di tolleranza immunologica, oppure come potenzialmente dannosi, determinando l'attivazione di risposte immunitarie che, in alcuni casi, possono evolvere in fenomeni di ipersensibilità.

Poco approfondita risulta la caratterizzazione delle risposte IgG nei confronti degli antigeni alimentari. Studi pionieristici hanno dimostrato che anche individui non allergici possono sviluppare anticorpi IgG specifici per determinati alimenti, successivamente, è stato proposto l'utilizzo delle IgG4 come biomarcatori di ipersensibilità alimentare; tuttavia, tali approcci sono stati ridimensionati, poiché la presenza di IgG specifiche è oggi interpretata principalmente come indice di esposizione frequente agli antigeni alimentari, piuttosto che come segno di patologia [19].

1.6 Barriera intestinale

L'epitelio intestinale rappresenta la più estesa superficie di contatto tra ambiente esterno e interno dell'organismo. La barriera gastrointestinale svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi, consentendo l'assorbimento selettivo di nutrienti, acqua ed elettroliti e, al contempo, limitando l'ingresso di antigeni e microrganismi potenzialmente dannosi.

La barriera intestinale è un sistema complesso e dinamico costituito da diverse componenti funzionali interconnesse: la barriera microbica, biochimica, fisica e immunitaria (**Figura 5**).

La barriera microbica è rappresentata dal microbiota intestinale, che contribuisce al mantenimento dell'equilibrio ecologico attraverso la produzione di metaboliti bioattivi e la competizione con microrganismi patogeni. La barriera biochimica è costituita principalmente dal muco, che riveste l'epitelio intestinale e contiene mucine, immunoglobuline A secretorie (sIgA) e sostanze ad attività antimicrobica.

La barriera fisica è formata da un monostrato di cellule epiteliali altamente specializzate, tra cui enterociti, cellule caliciformi, cellule di Paneth e cellule enteroendocrine. L'integrità di questa barriera è garantita da complessi sistemi di giunzione intercellulare, in particolare le tight junctions, che regolano la permeabilità paracellulare.

La barriera immunitaria è rappresentata dal tessuto linfoide associato all'intestino (GALT), che comprende cellule del sistema immunitario innate e adattative e svolge un ruolo cruciale nel bilanciamento tra risposte difensive e tolleranza immunologica.

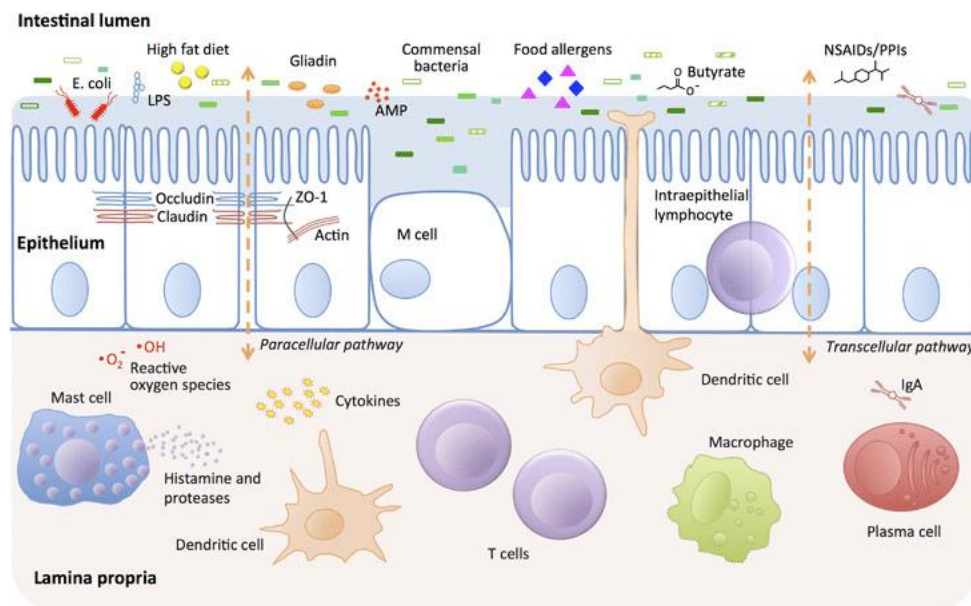


Figura 5. Rappresentazione schematica della barriera intestinale e dei fattori che ne influenzano l'integrità e la funzionalità. *Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease, Clinical and Translational Gastroenterology (2016)*

Dal punto di vista funzionale, la maggior parte delle proteine alimentari viene degradata durante la digestione, limitando l'attivazione del sistema immunitario. Tuttavia, una quota di antigeni può attraversare l'epitelio intestinale e interagire con il sistema immunitario mucosale [20].

1.6.1 Fattori che influenzano l'integrità della barriera intestinale

L'integrità della barriera intestinale può essere influenzata da diversi fattori, tra cui dieta, alterazioni del microbiota intestinale e condizioni infiammatorie. Questi fattori possono determinare modificazioni della permeabilità intestinale e della funzione di barriera, facilitando il passaggio di antigeni dal lume intestinale alla circolazione sistemica (**Figura 6**) [20].

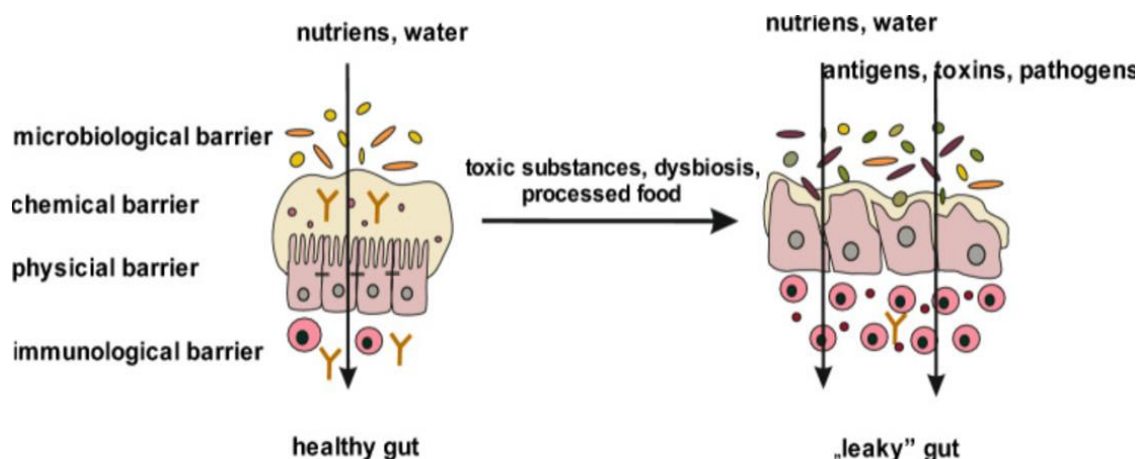


Figura 6. Barriera intestinale. La barriera intestinale è costituita da quattro livelli: microbiologico, chimico, fisico e immunologico. Sotto l’influenza di fattori esogeni o endogeni, la barriera intestinale può essere compromessa; questo fenomeno è definito “leaky gut”. *Intestinal permeability disturbances: causes, diseases and therapy, Clin Exp Med.* 2024 Sep.

1.6.2 Ruolo della zonulina nella regolazione delle tight junctions

La zonulina è una proteina coinvolta nella regolazione dinamica della permeabilità intestinale attraverso la modulazione delle tight junctions. Il suo rilascio può essere stimolato da fattori quali disbiosi intestinale e componenti alimentari, contribuendo alla disorganizzazione delle giunzioni intercellulari e all’aumento della permeabilità della barriera intestinale.

Alterazioni nella regolazione della zonulina sono state associate a un aumento del passaggio di antigeni attraverso l’epitelio intestinale e alla possibile attivazione del sistema immunitario [20].

1.6.3 Associazione tra IgG specifiche per alimenti e permeabilità intestinale

Lo sviluppo della tolleranza immunologica nei confronti degli antigeni alimentari rappresenta un processo fondamentale per il mantenimento dell’omeostasi intestinale ed è mediato dall’interazione tra antigeni e sistema immunitario mucosale.

In condizioni fisiologiche, l’integrità della barriera intestinale limita il passaggio di antigeni verso la circolazione sistemica, favorendo lo sviluppo di risposte tollerogeniche. Tuttavia, in presenza di alterazioni della permeabilità intestinale, una maggiore quantità di antigeni può attraversare l’epitelio ed entrare in contatto con il sistema immunitario.

In questo contesto, è possibile osservare la produzione di immunoglobuline G (IgG) specifiche per alimenti. La presenza di tali anticorpi è generalmente interpretata come un indicatore di esposizione antigenica e di attivazione del sistema immunitario, piuttosto che come evidenza di una risposta patologica.

Sebbene siano state proposte ipotesi riguardanti un possibile ruolo delle IgG in alcune condizioni cliniche, ad oggi non esistono evidenze sufficienti a supportare un loro utilizzo come marker diagnostico di ipersensibilità alimentare [21].

2. Scopo della tesi

Negli ultimi anni, il crescente utilizzo dei test per la determinazione delle IgG specifiche per alimenti, soprattutto in ambito commerciale e ambulatoriale, ha sollevato rilevanti criticità interpretative e cliniche. Sebbene le evidenze scientifiche indichino che tali anticorpi rappresentano principalmente marker di esposizione antigenica e memoria immunologica, piuttosto che indicatori di allergia o intolleranza alimentare, questi test vengono frequentemente impiegati come strumenti diagnostici per condizioni non adeguatamente definite, contribuendo a generare confusione tra pazienti e operatori sanitari.

La presente tesi si propone di definire intervalli di riferimento per IgG specifiche per alimenti in una popolazione adulta italiana, mediante un approccio statistico indiretto basato sui percentili 2,5° e 97,5°, in conformità alle linee guida CLSI C28-A3, utilizzando dati derivati dalla pratica clinica routinaria.

Lo studio mira, inoltre, ad analizzare i pattern di distribuzione delle IgG in relazione alle diverse categorie alimentari, al fine di contribuire a una più appropriata interpretazione del loro significato biologico, con particolare riferimento all'esposizione antigenica e ai possibili meccanismi immunologici associati alla tolleranza orale.

Infine, la tesi intende discutere le principali implicazioni cliniche e di sanità pubblica associate all'impiego di tali test, evidenziando il potenziale ruolo degli intervalli di riferimento nel migliorare l'interpretazione dei risultati e nel ridurre il rischio di utilizzi impropri nella pratica clinica.

3. Materiali e metodi

3.1 Impostazione dello studio e popolazione in esame

Il presente studio osservazionale retrospettivo è stato condotto utilizzando dati di laboratorio anonimizzati, derivati da analisi cliniche eseguite nella pratica routinaria. I campioni non sono stati raccolti a fini di ricerca, ma ottenuti nell'ambito di indagini diagnostiche richieste spontaneamente dai soggetti, riflettendo pertanto condizioni di pratica clinica reale.

Sono stati analizzati complessivamente 240 campioni di siero provenienti da soggetti adulti apparentemente sani, di età compresa tra 18 e 87 anni, suddivisi equamente per sesso (120 maschi e 120 femmine; **Tabella 1**). Tutti i soggetti erano stati sottoposti alla determinazione delle IgG specifiche per alimenti nell'ambito della pratica clinica routinaria presso l'Ospedale Civile di Baggiovara e avevano auto-riferito uno stato di buona salute generale al momento del prelievo.

Popolazione totale (n)	240
Età (anni), range	18-87
Maschi, n (%)	120 (50%)
Femmine, n (%)	120 (50%)
Allergeni alimentari analizzati, n	33

Tabella 1. Caratteristiche della popolazione in studio.

Poiché non erano disponibili intervalli di riferimento consolidati per le IgG specifiche per alimenti nella popolazione italiana adulta, il presente studio è stato finalizzato alla loro definizione mediante approccio indiretto.

3.2 Criteri di esclusione

Per la definizione degli intervalli di riferimento, sono stati esclusi i campioni che soddisfacevano uno o più dei seguenti criteri:

- Soggetti in età pediatrica (<18 anni);
- Donne in gravidanza;
- Soggetti con patologie gastrointestinali croniche note (ad esempio sindrome dell'intestino irritabile, colite ulcerosa, morbo di Crohn, esofagite eosinofila e altri disordini gastrointestinali eosinofili);
- Soggetti con allergie alimentari IgE-mediate confermate;
- Soggetti sottoposti a terapia immunosoppressiva o immunomodulante;
- Campioni con profili IgG atipici, successivamente associati a condizioni cliniche non dichiarate;
- Dati analitici incompleti.

Le esclusioni sono state applicate al fine di definire una popolazione di riferimento il più possibile rappresentativa di soggetti adulti apparentemente sani, in conformità con le raccomandazioni CLSI C28-A3 per la determinazione degli intervalli di riferimento [22].

3.3 Metodica FEIA (Fluorescent-Enzyme Immunoassay)

La metodica FEIA (Fluorescent-Enzyme Immunoassay) è una tipologia di immunodosaggio enzimatico basata sull'utilizzo di substrati fluorogenici che, in seguito a reazione enzimatica, generano un segnale fluorescente proporzionale alla concentrazione dell'analita in esame. Questo approccio consente una rilevazione quantitativa ad elevata sensibilità e ampio intervallo dinamico rispetto ai tradizionali immunodosaggi cromogenici. Successivamente, la metodica è stata implementata in piattaforme automatizzate a fase solida.

I sistemi attualmente utilizzati in ambito diagnostico, come ImmunoCAP (Thermo Scientific, Phadia USA, Portage, MI, USA), si basano su immunodosaggi in fase solida con rilevazione fluorimetrica automatizzata, che non richiedono l'impiego della citometria a flusso. In questo contesto, la reazione antigene-anticorpo viene quantificata attraverso un segnale fluorescente direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita [23].

3.4 Determinazione delle IgG specifiche per antigeni alimentari

Le IgG specifiche per antigeni alimentari sono state determinate mediante il sistema analitico ImmunoCAP (Thermo Scientific, Phadia), basato su metodologia fluoroenzimatica (FEIA).

Il test prevede l'incubazione del siero del paziente, diluito 1:100, con allergeni immobilizzati su un supporto solido costituito da una matrice di nitrocellulosa idrofila attivata (ImmunoCAP). Durante questa fase, le IgG specifiche si legano agli antigeni presenti sulla fase solida, mentre le frazioni non legate vengono successivamente rimosse mediante lavaggi.

Successivamente viene aggiunto un anticorpo monoclonale murino anti-IgG umane coniugato con β -galattosidasi, che si lega al complesso antigene-anticorpo formando un sistema immunoenzimatico ternario. Dopo incubazione e ulteriore lavaggio, viene aggiunto il substrato fluorogenico 4-metilumbelliferil- β -D-galattoside, che viene idrolizzato dall'enzima generando un segnale fluorescente. La fluorescenza generata viene misurata automaticamente dal sistema ed è direttamente proporzionale alla concentrazione di IgG specifiche presenti nel campione. La reazione viene infine arrestata mediante aggiunta di carbonato di sodio al 4% (**Figura 7**).

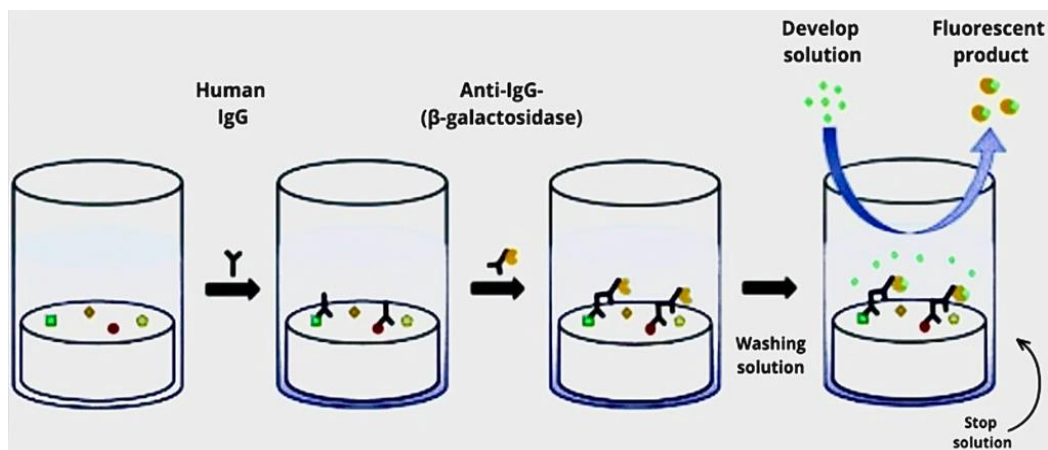


Figura 7. Principio sistema analitico Thermo Scientific ImmunoCAP™, basato su metodologia fluoroenzimatica (FEIA).

La fluorescenza prodotta viene misurata e confrontata con quella di calibratori analizzati in parallelo. L'intensità del segnale è direttamente proporzionale alla concentrazione di IgG specifiche presenti

nel campione. I calibratori sono tracciabili allo standard internazionale WHO 67/86 per immunoglobuline umane (IgA, IgG, IgM). Il limite inferiore di rilevabilità del metodo è pari a 2,0 mgA/L (milligrammi arbitrari per litro).

3.5 Pannello degli allergeni alimentari analizzati

Il pannello analitico considerato nello studio comprendeva un totale di 33 allergeni alimentari, selezionati sulla base della loro rilevanza nella dieta della popolazione italiana e della frequenza con cui vengono richiesti nella pratica laboratoristica di routine. Tale selezione è stata effettuata al fine di garantire una rappresentatività adeguata delle principali fonti alimentari potenzialmente coinvolte in risposte immunologiche.

Gli allergeni inclusi nel pannello sono stati identificati e classificati secondo la nomenclatura standardizzata ImmunoCAP™ (**Tabella 2**); l'adozione della nomenclatura standardizzata ha consentito una descrizione uniforme degli analiti inclusi nello studio. Tutti gli allergeni sono stati analizzati mediante la medesima piattaforma analitica e utilizzando un'unica metodologia, al fine di ridurre la variabilità inter-metodica e garantire l'omogeneità dei risultati ottenuti. Questo approccio ha permesso di migliorare l'affidabilità complessiva delle misurazioni e di rendere più robusta l'interpretazione dei dati.

Codice	Allergene	Fonte	Descrizione
F1	Bianco d'uovo	Origine animale	Proteina dell'albume d'uovo (ovoalbumina, ovomucoide)
F2	Latte vaccino	Origine animale	Proteine del latte vaccino (caseina, proteine del siero)
F3	Merluzzo	Origine animale	Proteina muscolare di pesce
F4	Grano	Origine vegetale	Proteine del grano, incluse componenti del glutine
F13	Arachide	Origine vegetale	Proteine di deposito dell'arachide
F14	Soia	Origine vegetale	Proteine della soia
F17	Nocciola	Origine vegetale	Proteine della frutta a guscio
F20	Mandorla	Origine vegetale	Proteine della frutta a guscio
F203	Pistacchio	Origine vegetale	Proteine della frutta a guscio
F210	Ananas	Origine vegetale	Proteine della frutta
F213	Carne di coniglio	Origine animale	Proteina muscolare di coniglio
F24	Gambero	Origine animale	Proteine dei crostacei
F25	Pomodoro	Origine vegetale	Proteine della frutta/ vegetali
F253	Pinolo	Origine vegetale	Proteine del seme
F256	Noce	Origine vegetale	Proteine della frutta a guscio
F27	Manzo	Origine animale	Proteina muscolare bovina
F35	Patata	Origine vegetale	Proteine vegetali
F40	Tonno	Origine animale	Proteine del pesce
F41	Salmone	Origine animale	Proteine del pesce
F44	Fragola	Origine vegetale	Proteine della frutta
F45	Lievito	Altro	Proteine derivate dal lievito
F75	Tuorlo d'uovo	Origine animale	Proteine del tuorlo d'uovo
F76	Bos d 4 (alpha-lattoalbumina)	Origine animale	Proteine del siero di latte
F77	Bos d 5 (beta-lattoglobulina)	Origine animale	Proteine del siero di latte
F78	Bos d 8 (caseina)	Origine animale	Proteine della caseina del latte
F79	Glutine	Origine vegetale	Proteine del glutine dal grano
F80	Aragosta	Origine animale	Proteine dei crostacei

F83	Pollo	Origine animale	Proteine del pollame
F84	Kiwi	Origine vegetale	Proteine della frutta
F87	Melone	Origine vegetale	Proteine della frutta
F92	Banana	Origine vegetale	Proteine della frutta
F95	Pesca	Origine vegetale	Proteine della frutta
F98	Gliadina	Origine vegetale	Componente della proteina del glutine

Tabella 2. Elenco degli allergeni analizzati, con indicazione del codice identificativo standardizzato, dell'origine biologica e della relativa descrizione.

3.6 Analisi statistica

La stima degli intervalli di riferimento è stata effettuata mediante un approccio indiretto non parametrico, basato sull'identificazione dei percentili 2,5° e 97,5°, in accordo con le raccomandazioni della linea guida Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) C28-A3 per la definizione degli intervalli di riferimento in medicina di laboratorio. Secondo le raccomandazioni IFCC, gli intervalli di riferimento comprendono il 95% centrale dei valori osservati in una popolazione di riferimento apparentemente sana.

L'approccio indiretto è considerato particolarmente utile nei contesti real-world e nella medicina di laboratorio, nei quali il reclutamento prospettico di popolazioni rigorosamente selezionate può risultare complesso o non completamente applicabile. Tale metodologia consente infatti di derivare intervalli di riferimento a partire da dati ottenuti nella pratica clinica routinaria, mantenendo al contempo un'adeguata robustezza statistica.

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software MedCalc Statistical Software (MedCalc Software Ltd., Ostenda, Belgio), ampiamente utilizzato in ambito biomedico per l'elaborazione di dati clinici e di laboratorio.

L'identificazione dei valori anomali (outlier) è stata effettuata mediante il metodo di Tukey basato sull'intervallo interquartile (Interquartile Range, IQR). In particolare, sono stati considerati potenziali outlier i valori inferiori a $Q1 - 1,5 \times IQR$ o superiori a $Q3 + 1,5 \times IQR$. Tale procedura è stata utilizzata nell'ambito del processo di selezione della popolazione di riferimento, al fine di individuare

osservazioni potenzialmente non rappresentative e ridurre l'influenza di valori estremi sulla stima degli intervalli di riferimento.

I limiti inferiori degli intervalli di riferimento sono stati espressi come valori inferiori alla sensibilità analitica del metodo (<2 mgA/L), in accordo con la sensibilità funzionale del sistema FEIA ImmunoCAP™. Questa scelta riflette le limitazioni intrinseche del metodo analitico e consente una corretta interpretazione dei risultati prossimi al limite di rilevabilità.

Le differenze nei livelli di IgG specifiche per alimenti tra soggetti di sesso maschile e femminile sono state valutate mediante il test non parametrico di Mann–Whitney U. Tale test è stato selezionato in quanto non richiede l'assunzione di normalità nella distribuzione dei dati, condizione frequentemente non soddisfatta per variabili biologiche quali le concentrazioni anticorpali. L'analisi è stata effettuata al fine di identificare eventuali differenze statisticamente significative tra i due gruppi e valutare possibili variazioni biologiche associate al sesso.

4. Risultati

L'analisi delle concentrazioni di IgG alimento-specifiche ha evidenziato, per la maggior parte degli allergeni considerati, una distribuzione non gaussiana. Questo dato giustifica l'adozione di un approccio statistico non parametrico per la stima degli intervalli di riferimento. Le distribuzioni osservate si sono dimostrate eterogenee tra i diversi antigeni alimentari, con marcate differenze sia in termini di dispersione sia di variabilità interindividuale.

Alcuni allergeni hanno mostrato un'elevata variabilità tra i soggetti, mentre altri hanno presentato concentrazioni costantemente basse e distribuzioni ristrette. Tali differenze evidenziano una marcata eterogeneità delle concentrazioni di IgG tra i diversi allergeni alimentari analizzati.

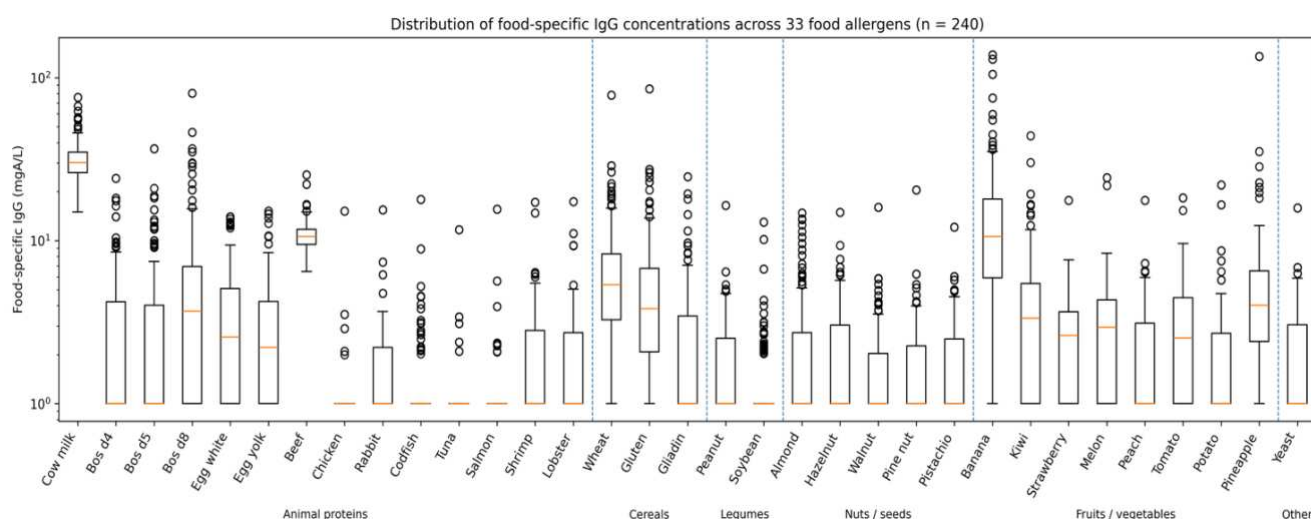


Figura 8. Distribuzione delle concentrazioni di IgG specifiche per alimento per i 33 allergeni alimentari analizzati nella popolazione adulta italiana (n = 240). Gli allergeni sono raggruppati secondo le principali categorie alimentari (proteine di origine animale, cereali, legumi, frutta a guscio e semi, frutta e verdura e altri). I boxplot rappresentano le concentrazioni di IgG (mgA/L) misurate mediante FEIA ImmunoCAP. A causa dell'ampia variabilità dei valori osservati tra i diversi allergeni, l'asse y è riportata in scala logaritmica.

4.1 Intervalli di riferimento

Gli intervalli di riferimento per ciascuno dei 33 allergeni alimentari sono stati determinati utilizzando i percentili 2,5° e 97,5°. I risultati hanno evidenziato una marcata eterogeneità tra gli allergeni analizzati. Tra gli allergeni associati a livelli più elevati di IgG nella popolazione studiata, il latte vaccino, l'albume d'uovo e il frumento hanno mostrato limiti superiori degli intervalli di riferimento particolarmente elevati. Al contrario, allergeni appartenenti alla categoria del pesce (ad esempio merluzzo e tonno) e alcune carni meno frequentemente consumate, come il coniglio, hanno mostrato

concentrazioni di IgG costantemente basse e intervalli di riferimento più ristretti. Gli allergeni appartenenti alla categoria della frutta a guscio, tra cui nocciola e mandorla, hanno evidenziato intervalli di riferimento intermedi, caratterizzati tuttavia da una maggiore variabilità interindividuale rispetto ad altri gruppi alimentari. L'insieme completo degli intervalli di riferimento è riportato nella **Tabella 2**, mentre le distribuzioni di alcuni allergeni rappresentativi sono illustrate nella **Figura 9**.

Codice allergene	Allergene	Limite inferiore di riferimento (2.5° percentile)	90% CI	Limite superiore di riferimento (97.5° percentile)	90% CI	Unità di misura
F1	Bianco d'uovo	<2	–	12.61	9.38–13.02	mgA/L
F13	Arachidi	<2	–	5.05	4.74–6.43	mgA/L
F14	Soia	<2	–	4.38	3.20–10.20	mgA/L
F17	Nocciola	<2	–	6.88	6.20–7.72	mgA/L
F2	Latte vaccino	20.37	17.50–21.40	57.04	55.30–67.00	mgA/L
F20	Mandorla	<2	–	12.53	9.59–13.60	mgA/L
F203	Pistacchio	<2	–	5.74	4.97–6.03	mgA/L
F210	Ananas	<2	–	21.24	12.40–28.67	mgA/L
F213	Carne di coniglio	<2	–	4.80	3.52–7.38	mgA/L
F24	Granchio	<2	–	6.25	5.99–14.80	mgA/L
F25	Pomodoro	<2	–	9.02	6.91–9.77	mgA/L
F253	Pinolo	<2	–	5.40	4.24–6.25	mgA/L
F256	Noce	<2	–	5.42	4.60–5.86	mgA/L

F27	Carne di manzo	7.71	6.81–7.90	16.51	15.00–22.20	mgA/L
F3	Merluzzo	<2	–	4.59	4.08–8.92	mgA/L
F35	Patata	<2	–	7.55	4.77–16.60	mgA/L
F4	Grano	<2	–	26.40	20.00–28.80	mgA/L
F40	Tonno	<2	–	2.41	1.00–3.40	mgA/L
F41	Salmone	<2	–	2.40	2.27–5.66	mgA/L
F44	Fragola	<2	–	7.06	5.77–7.62	mgA/L
F45	Lievito	<2	–	6.30	5.32–6.85	mgA/L
F75	Tuorlo d'uovo	<2	–	10.75	9.59–14.60	mgA/L
F76	Alpha-lattoalbumina	<2	–	16.33	10.40–18.20	mgA/L
F77	Beta-lattoglobulina	<2	–	18.30	13.01–18.85	mgA/L
F78	Caseina	<2	–	35.10	29.70–46.30	mgA/L
F79	Glutine	<2	–	27.30	26.10–27.40	mgA/L
F80	Aragosta	<2	–	9.32	4.80–11.10	mgA/L
F83	Carne di pollo	<2	–	2.12	1.00–3.53	mgA/L
F84	Kiwi	<2	–	16.41	12.45–19.30	mgA/L
F87	Melone	<2	–	8.25	6.48–8.71	mgA/L
F92	Banana	2.01	<2–2.45	75.95	55.10–130.00	mgA/L
F95	Pesca	<2	–	6.53	5.66–7.25	mgA/L
F98	Gliadina	<2	–	14.59	9.71–19.40	mgA/L

Tabella 2. Gli intervalli di riferimento sono stati calcolati mediante metodo non parametrico secondo le linee guida CLSI EP28-A3c. Gli intervalli di confidenza (IC) al 90% sono stati stimati tramite bootstrap resampling. I limiti inferiori di riferimento al di sotto della sensibilità analitica (<2 mgA/L) sono riportati come tali.

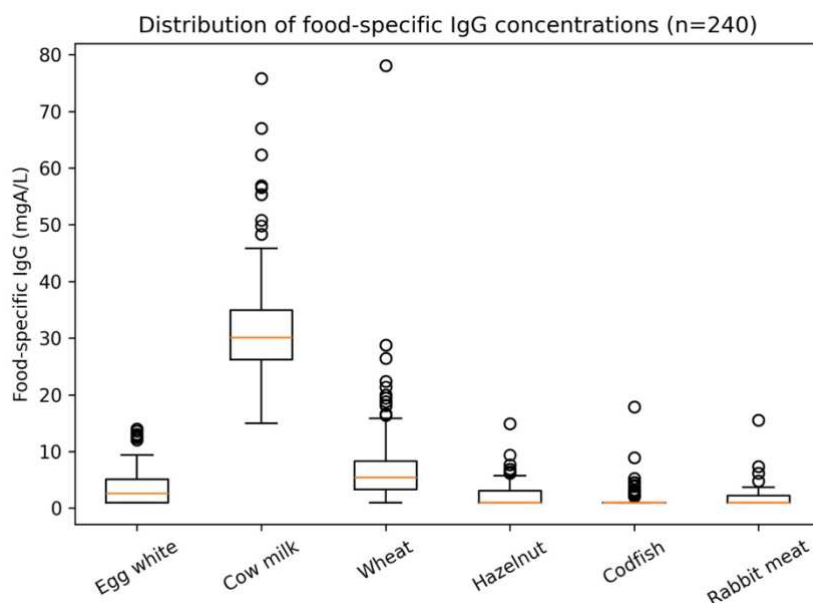


Figura 9. Distribuzione delle concentrazioni di IgG specifiche per alimento per alcuni allergeni rappresentativi selezionati nella popolazione adulta italiana (n = 240). I boxplot illustrano le concentrazioni di IgG (mgA/L) relative ad alimenti di largo consumo (albume d'uovo, latte vaccino, frumento), a un allergene appartenente alla categoria della frutta a guscio (nocciola) e a proteine animali altamente digeribili (merluzzo e carne di coniglio).

4.2 Limite inferiore analitico

Il limite inferiore degli intervalli di riferimento è stato espresso, per tutti gli allergeni analizzati, come inferiore alla sensibilità analitica del metodo (<2 mgA/L). Per alcuni alimenti di consumo frequente, quali latte vaccino, carne bovina e banana, le concentrazioni di IgG osservate nella popolazione studiata sono risultate costantemente superiori al limite analitico inferiore. In tali casi, non sono stati registrati valori al di sotto della soglia di rilevabilità del metodo. La definizione degli intervalli di riferimento è stata comunque mantenuta in accordo con le caratteristiche analitiche del sistema FEIA utilizzato. Tale osservazione conferma l'adeguatezza della sensibilità analitica del metodo FEIA per la determinazione delle IgG specifiche per alimenti nella popolazione studiata.

4.3 Confronto tra sessi

L'analisi comparativa tra soggetti di sesso maschile e femminile, condotta mediante test di Mann–Whitney U, non ha mostrato differenze statisticamente significative tra i due gruppi per la maggior parte degli allergeni analizzati ($p > 0,05$). Solo per un numero limitato di alimenti sono state osservate variazioni minori, non tali da giustificare la definizione di intervalli di riferimento distinti per sesso. Questi risultati suggeriscono che il sesso biologico non esercita un'influenza rilevante sulla distribuzione delle concentrazioni di IgG alimento-specifiche nella popolazione studiata.

4.4 Analisi per origine proteica

Per questa analisi esplorativa, gli allergeni sono stati raggruppati in due categorie sulla base della loro origine biologica (vegetale vs animale). I risultati hanno mostrato concentrazioni di IgG significativamente più elevate per gli alimenti di origine vegetale rispetto a quelli di origine animale (test di Mann–Whitney U, $p < 0,001$; **Figura 10**).

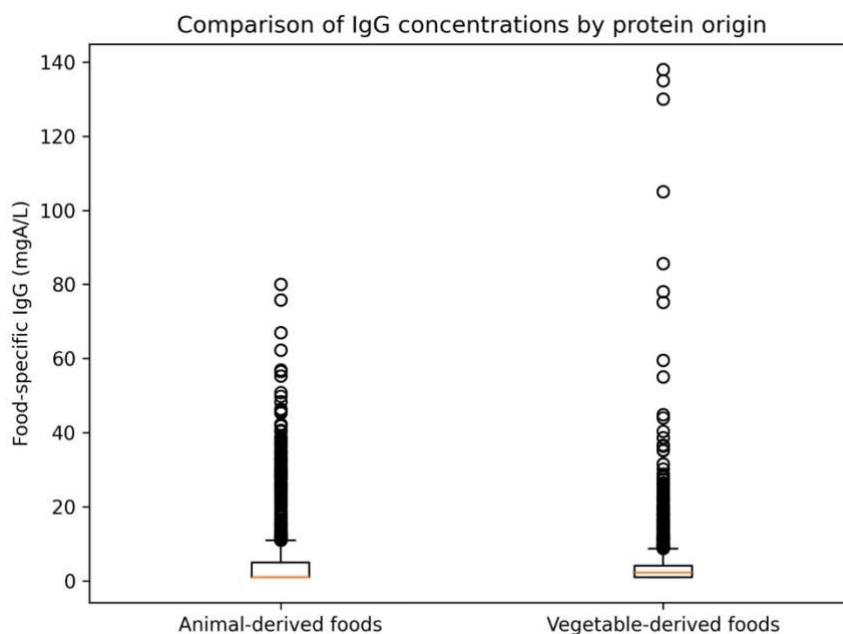


Figura 10. Confronto delle concentrazioni di IgG specifiche per alimento tra cibi di origine animale e cibi di origine vegetale nella popolazione in studio ($n = 240$). I grafici a scatola (boxplot) illustrano le concentrazioni aggregate di IgG (mgA/L) per alimenti di origine animale e vegetale. Gli alimenti di origine vegetale hanno mostrato concentrazioni di IgG significativamente più elevate rispetto a quelli di origine animale (test U di Mann–Whitney, $p < 0,001$).

4.5 Esclusione di profili atipici

La popolazione di riferimento comprendeva inizialmente 250 campioni. L'applicazione del metodo di Tukey basato sull'intervallo interquartile (IQR) ha portato all'esclusione di 10 campioni con profili IgG globalmente atipici, determinando una popolazione finale di 240 campioni, utilizzata per la stima degli intervalli di riferimento secondo l'approccio indiretto.

5. Discussione

Il presente studio ha consentito di definire intervalli di riferimento specifici per la popolazione adulta italiana relativi alle IgG dirette contro antigeni alimentari, mediante un approccio indiretto non parametrico applicato ad una coorte reale di laboratorio. Tale contributo assume particolare rilevanza nel contesto scientifico attuale, caratterizzato da una disponibilità ancora limitata di dati di riferimento e dalla predominanza di studi condotti su popolazioni non europee, differenti per abitudini alimentari, esposizione antigenica e contesto ambientale. La definizione di intervalli contestualizzati risulta pertanto essenziale per un'interpretazione più appropriata dei risultati sia in ambito clinico sia nell'ambito della sanità pubblica.

I risultati ottenuti mostrano come la distribuzione delle IgG specifiche per alimenti sembri riflettere prevalentemente l'esposizione dietetica piuttosto che una risposta immunitaria patologica. Valori più elevati e intervalli di riferimento più ampi sono stati osservati per alimenti largamente rappresentati nella dieta italiana, quali latte vaccino e derivati, frumento e proteine dell'uovo. Tali osservazioni sono coerenti con l'ipotesi secondo cui la produzione di IgG specifiche rappresenti prevalentemente una conseguenza fisiologica dell'esposizione antigenica ripetuta.

L'analisi esplorativa condotta in funzione dell'origine proteica degli allergeni ha inoltre evidenziato una tendenza a concentrazioni di IgG più elevate nei confronti degli alimenti di origine vegetale rispetto a quelli di origine animale. Questo dato non deve essere interpretato come espressione di una maggiore reattività patologica verso i vegetali, ma può plausibilmente riflettere differenze nelle caratteristiche biochimiche delle proteine, nella loro resistenza alla digestione e, conseguentemente, nella durata dell'esposizione antigenica a livello intestinale. Una possibile spiegazione potrebbe essere rappresentata da differenze nelle caratteristiche biochimiche delle proteine alimentari e nelle modalità di esposizione dietetica, aspetti che meritano ulteriori approfondimenti. Al contrario, diverse proteine di origine animale, come quelle del pesce e del pollame, risultano altamente digeribili e sembrano associate a risposte IgG sistemiche più contenute, come suggerito dai livelli mediamente inferiori e dalla minore dispersione osservata nello studio. Complessivamente, tali risultati indicano che le diverse proteine alimentari non siano equivalenti nella capacità di indurre una risposta IgG misurabile [24][25].

Nel loro insieme, i dati ottenuti rafforzano l'interpretazione delle IgG alimento-specifiche quali marcatori di esposizione antigenica piuttosto che indicatori di patologia.

5.1 Permeabilità intestinale ed esposizione antigenica

Un ulteriore elemento interpretativo riguarda il possibile ruolo della barriera intestinale nella modulazione dei livelli di IgG specifiche dirette contro antigeni alimentari. La letteratura suggerisce che un aumento della permeabilità intestinale possa favorire il passaggio di antigeni luminali attraverso l'epitelio, determinando una maggiore esposizione del sistema immunitario e una conseguente attivazione della risposta anticorpale sistemica [24][25].

In questo contesto, è stato ipotizzato che differenti proteine alimentari possano determinare livelli diversi di esposizione antigenica. È tuttavia fondamentale sottolineare come tale fenomeno non implichi necessariamente la presenza di una condizione patologica, potendo piuttosto rappresentare una variabilità fisiologica o subclinica nell'interazione tra dieta e sistema immunitario. In accordo con le posizioni espresse dalle società allergologiche, le IgG alimentari sono infatti considerate principalmente un marker di esposizione antigenica piuttosto che un indicatore di ipersensibilità alimentare. Di conseguenza, l'aumento delle IgG alimentari dovrebbe essere interpretato principalmente come espressione di una maggiore esposizione antigenica, senza che ciò corrisponda automaticamente a manifestazioni allergiche o a quadri di intolleranza clinicamente definiti.

In tale prospettiva, lo studio di Uhde et al. sulla sensibilità al grano non celiaca può essere considerato un modello utile per comprendere questo possibile assetto fisiopatologico [26]. In tale lavoro, soggetti che riferivano sintomi correlati all'ingestione di grano, pur in assenza di celiachia, mostravano segni di danno enterocitario e di attivazione immunitaria sistemica, suggerendo una possibile compromissione della funzione di barriera intestinale. Questo quadro supporta l'ipotesi secondo cui un'alterazione della barriera possa facilitare una maggiore esposizione del sistema immunitario agli antigeni luminali, inclusi quelli di origine alimentare.

In questa ottica, le IgG alimentari non andrebbero pertanto interpretate come indicatori specifici di reazioni avverse nei confronti di singoli alimenti, bensì come possibile espressione indiretta di un aumentato contatto immunologico con antigeni della dieta, modulato dalle caratteristiche di permeabilità della barriera intestinale e dalla conseguente risposta immunitaria. Lo studio sulla sensibilità al grano non celiaca non costituisce una dimostrazione diretta di tale meccanismo, ma rappresenta un esempio utile a illustrare come un'alterazione della barriera intestinale possa teoricamente influenzare il profilo anticorpale verso antigeni alimentari.

5.2 IgG alimentari e concetto di “intolleranza”

Un aspetto di particolare rilevanza concerne la distinzione tra presenza di IgG specifiche e condizioni di allergia o intolleranza alimentare. Livelli elevati di IgG non possono infatti essere considerati indicatori diagnostici di allergia alimentare né di intolleranza in senso stretto. Le intolleranze classiche derivano generalmente da alterazioni enzimatiche o metaboliche e non coinvolgono una risposta immunitaria adattativa. Di conseguenza, l'impiego dei test IgG come strumenti diagnostici per le intolleranze alimentari non risulta supportato da evidenze scientifiche consolidate e richiede pertanto estrema cautela interpretativa.

5.3 Confronto con la letteratura internazionale

Il confronto tra studi condotti in diverse popolazioni evidenzia una significativa variabilità negli intervalli di riferimento delle immunoglobuline G (IgG) specifiche per alimenti. In particolare, i valori osservati nella popolazione italiana risultano generalmente inferiori e caratterizzati da una minore dispersione rispetto a quelli riportati in coorti nordamericane. Tra questi, lo studio di Thomas B. Martins et al. ha definito intervalli di riferimento percentile-based per IgG specifiche verso allergeni alimentari, muffe e insetti in 130 adulti sani nordamericani, utilizzando metodiche di immunodosaggio fluorescente automatizzato [16]. Gli autori hanno riportato valori inferiori a 2 µg/mL come limite minimo per tutti gli allergeni, mentre il limite superiore mediano era pari a 12,9 µg/mL, con un'ampia variabilità tra antigeni (da 3,8 µg/mL per il tonno fino a 88,6 µg/mL per le proteine del siero del latte), evidenziando una forte dipendenza dalla natura dell'antigene.

In maniera coerente, anche gli studi di Santos et al. su popolazioni occidentali hanno evidenziato come la distribuzione delle IgG specifiche per alimenti sia estremamente eterogenea e influenzata da molteplici fattori, tra cui abitudini alimentari, frequenza di esposizione agli antigeni e caratteristiche individuali della risposta immunitaria. Tali lavori sottolineano inoltre l'assenza di veri e propri “valori patologici” universalmente validati, evidenziando piuttosto una distribuzione continua dei livelli anticorpali nella popolazione generale [18].

Le differenze osservate potrebbero riflettere differenze nell'esposizione alimentare, nella frequenza di consumo dei diversi alimenti e nelle caratteristiche immunologiche individuali dei soggetti inclusi nello studio. Tali evidenze supportano la necessità di definire intervalli di riferimento contestualizzati geograficamente e culturalmente, evitando l'utilizzo indiscriminato di valori derivati da popolazioni eterogenee.

Analogamente, studi condotti in popolazioni asiatiche hanno confermato pattern immunologici differenti. In particolare, nello studio cinese di Wang et al. non sono state analizzate IgG specifiche per alimenti, bensì le sottoclassi sieriche delle IgG totali (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) in età pediatrica. I risultati hanno evidenziato un incremento progressivo di IgG1 e IgG2 con l'età, mentre IgG3 rimaneva stabile e IgG4 mostrava un'elevata variabilità interindividuale. Sebbene non riferito alla risposta antigene-specifica, lo studio dimostra come anche la distribuzione delle IgG totali vari significativamente tra popolazioni, rafforzando il concetto di eterogeneità immunologica su base etnica e geografica [17].

5.4 IgG4 e tolleranza immunologica

In questo contesto, è fondamentale distinguere il significato delle IgG4 alimentari in condizioni fisiologiche rispetto al loro ruolo ben documentato nell'ambito dell'immunoterapia allergene-specifica. Le IgG4, infatti, non rappresentano un marcatore diagnostico di patologia allergica, bensì sono considerate un elemento caratteristico dei processi di tolleranza immunologica.

Durante l'immunoterapia allergene-specifica, si osserva un incremento delle IgG4 specifiche per l'allergene, associato a una modulazione della risposta immunitaria verso un profilo meno reattivo. Questo fenomeno è parte di un più ampio rimodellamento immunologico che include la riduzione dell'attività delle IgE, la modulazione dell'attività delle cellule T helper e l'induzione di meccanismi regolatori. In tale contesto, le IgG4 possono agire come anticorpi "bloccanti", competendo con le IgE per il legame con l'allergene e riducendo così la degranulazione mastocitaria.

Proprio questa funzione fisiologica di "marker di esposizione e tolleranza" spiega perché la semplice presenza di IgG4 dirette contro antigeni alimentari, al di fuori di un contesto terapeutico controllato, non possa essere interpretata come indicativa di patologia. Al contrario, come evidenziato dalla EAACI Task Force, tali anticorpi riflettono prevalentemente l'esposizione antigenica ripetuta e i normali processi di adattamento immunologico a livello mucosale.

Ne consegue che l'interpretazione delle IgG4 alimentari come indicatori diagnostici di intolleranza o allergia risulti concettualmente errata, poiché confonde un marcatore fisiologico di tolleranza, ben documentato nell'immunoterapia allergene-specifica, con un presunto segnale di malattia.

In conclusione, il presente studio ha definito intervalli di riferimento italiani per le IgG alimentari, ottenuti dall'analisi di campioni provenienti da soggetti adulti dell'area modenese e valutati nei

confronti di allergeni rappresentativi della dieta italiana; i risultati confermano come tali anticorpi riflettano prevalentemente l'esposizione dietetica, piuttosto che condizioni patologiche. Dal punto di vista della sanità pubblica, l'utilizzo diffuso dei test IgG in assenza di adeguati criteri interpretativi può determinare restrizioni alimentari inappropriate, con potenziali conseguenze nutrizionali, psicologiche ed economiche. La definizione di intervalli di riferimento specifici rappresenta pertanto un passo rilevante verso una maggiore appropriatezza interpretativa, una migliore standardizzazione laboratoristica e un uso più consapevole di tali strumenti. Resta comunque fondamentale ribadire che i test IgG non debbano essere impiegati a fini diagnostici; qualora utilizzati, i risultati devono essere interpretati all'interno di un quadro clinico e di laboratorio adeguatamente contestualizzato.

5.5 Punti di forza e limiti dello studio

Tra i principali punti di forza dello studio si evidenziano l'utilizzo di una popolazione reale di laboratorio e l'impiego di una piattaforma analitica standardizzata, in grado di riflettere le condizioni della pratica clinica quotidiana. L'approccio indiretto adottato, basato su criteri di esclusione predefiniti e sull'analisi percentile, ha inoltre consentito di ottenere stime robuste e clinicamente rilevanti.

Tra i limiti principali devono invece essere considerati la natura retrospettiva dello studio e la dipendenza da dati anamnestici auto-riferiti, potenzialmente associati a bias informativi. Un ulteriore limite dello studio è rappresentato dall'assenza di informazioni dettagliate sulle abitudini alimentari alimentari dei soggetti inclusi, che non ha consentito di correlare direttamente i livelli di IgG con la frequenza di consumo dei singoli alimenti. Tuttavia, l'esclusione dei profili IgG globalmente atipici e l'applicazione di una metodologia rigorosa contribuiscono a ridurre l'impatto di tali criticità.

6. Bibliografia

1. Abbas, A.K. *et al.* (2015) *Cellular and molecular immunology: study smart*. 8. ed., internat. ed. Philadelphia, Pa: Elsevier, Saunders (Student consult).
2. Murphy, K. e Weaver, C. (2016) *Janeway 's immunobiology*. 9th edition. New York, NY: Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC.
3. Casali, P. e Schettino, E.W. (1996) «Structure and function of natural antibodies», *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 210, pp. 167–179.
4. Vladutiu, A.O. (2000) «Immunoglobulin D: Properties, Measurement, and Clinical Relevance», *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 7(2), pp. 131–140.
5. Al-Ma' amouri, M.Y. (2023) «A Review Article: Hypersensitivity and its Disorders», *Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology*, 2(3), pp. 168–172.
6. Hage, G. *et al.* (2025) «Food Hypersensitivity: Distinguishing Allergy from Intolerance, Main Characteristics, and Symptoms-A Narrative Review», *Nutrients*, 17(8), p. 1359.
7. Warren, C.M., Jiang, J. e Gupta, R.S. (2020) «Epidemiology and Burden of Food Allergy», *Current Allergy and Asthma Reports*, 20(2), p. 6.
8. Sicherer, S.H. e Sampson, H.A. (2014) «Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment», *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(2), pp. 291–307; quiz 308.
9. Cook, V.E. *et al.* (2024) «Non-immunoglobulin E-mediated food allergy», *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology: Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 20(Suppl 3), p. 70.
10. Misselwitz, B. *et al.* (2013) «Lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and treatment», *United European Gastroenterology Journal*, 1(3), pp. 151–159.
11. Singh, S.K. e Sarma, M.S. (2022) «Hereditary fructose intolerance: A comprehensive review», *World Journal of Clinical Pediatrics*, 11(4), pp. 321–329.
12. Shepherd, S.J. e Gibson, P.R. (2006) «Fructose malabsorption and symptoms of irritable bowel syndrome: guidelines for effective dietary management», *Journal of the American Dietetic Association*, 106(10), pp. 1631–1639.
13. Treem, W.R. (1995) «Congenital sucrase-isomaltase deficiency», *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 21(1), pp. 1–14.
14. Vidarsson, G., Dekkers, G. e Rispen, T. (2014) «IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions», *Frontiers in Immunology*, 5, p. 520.

15. Qin, L. *et al.* (2022) «The clinical significance of allergen-specific IgG4 in allergic diseases», *Frontiers in Immunology*, 13, p. 1032909.
16. Martins, T.B. *et al.* (2016) «Specific Immunoglobulin (Ig) G Reference Intervals for Common Food, Insect, and Mold Allergens», *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 46(6), pp. 635–638.
17. Liu, Z. *et al.* (2018) «A reference interval for serum IgG subclasses in Chinese children», *PloS One*, 13(3), p. e0192923.
18. Santos, A.F. e Brough, H.A. (2017) «Making the Most of In Vitro Tests to Diagnose Food Allergy», *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice*, 5(2), pp. 237–248.
19. Gocki, J. e Bartuzi, Z. (2016) «Role of immunoglobulin G antibodies in diagnosis of food allergy», *Advances in Dermatology and Allergology*, 4, pp. 253–256.
20. Macura, B., Kiecka, A. e Szczepanik, M. (2024) «Intestinal permeability disturbances: causes, diseases and therapy», *Clinical and Experimental Medicine*, 24(1), p. 232.
21. Vita, A.A., Zwickey, H. e Bradley, R. (2022) «Associations between food-specific IgG antibodies and intestinal permeability biomarkers», *Frontiers in Nutrition*, 9, p. 962093.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute (a c. di) (2010) *Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline*. 3. ed. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute (Document / Clinical and Laboratory Standards Institute, EP28-A3c = 28,30).
23. Makler, M.T., Bakke, A.C. e Piper, R.C. (1988) «An enzyme immunoassay for the flow cytometer (FEIA)», *Journal of Immunological Methods*, 108(1–2), pp. 137–143.
24. Herreman, L. *et al.* (2020) «Comprehensive overview of the quality of plant- And animal-sourced proteins based on the digestible indispensable amino acid score», *Food Science & Nutrition*, 8(10), pp. 5379–5391.
25. Leviatan, S. *et al.* (2022) «Allergenic food protein consumption is associated with systemic IgG antibody responses in non-allergic individuals», *Immunity*, 55(12), pp. 2454–2469.e6.
26. Uhde, M. *et al.* (2016) «Intestinal cell damage and systemic immune activation in individuals reporting sensitivity to wheat in the absence of coeliac disease», *Gut*, 65(12), pp. 1930–1937.
27. Stapel, S.O. *et al.* (2008) «Testing for IgG4 against foods is not recommended as a diagnostic tool: EAACI Task Force Report», *Allergy*, 63(7), pp. 793–796.

