

La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio Italian Journal of Laboratory Medicine

Raccomandazioni per l'utilizzo della diagnostica molecolare in allergologia --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	RIME-D-16-00021R1
Full Title:	Raccomandazioni per l'utilizzo della diagnostica molecolare in allergologia
Article Type:	Review (Rassegna)
Section/Category:	Clinical Section
Keywords:	Allergy, Molecular diagnostics, Component Resolved Diagnostics, Guidelines, Specific IgE
Corresponding Author:	Danilo Villalta, M.D. Allergologia e Immunologia Clinica, ospedale "S. Maria degli Angeli", Pordenone Pordenone, ITALY
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Allergologia e Immunologia Clinica, ospedale "S. Maria degli Angeli", Pordenone
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Danilo Villalta, M.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Danilo Villalta, M.D. Elio Tonutti Nicola Bizzaro Ignazio Brusca Vittorio Sargentini
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	<p>Abstract</p> <p>The Study Group on Allergology of the Italian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine (SIPMeL) developed recommendations on the diagnosis of allergic diseases based on the use of molecular allergenic components. The purpose of this document is to provide the pathologists and the clinicians with information and algorithms enabling a proper use of this second-level diagnostics. In the face of greater economic commitments, for which its indiscriminate use must be absolutely avoided, molecular diagnostics allows definition of the exact sensitization profile of the allergic patient.</p> <p>The methodology followed to develop these recommendations included an initial phase of discussion between all the components of the Study Group to integrate the knowledge derived from scientific evidence, a revision of the recommendations made by Italian and foreign experts, and the subsequent production of this document to be disseminated to all those who deal with allergy diagnostics.</p> <p>Riassunto</p> <p>Il Gruppo di Studio in Allergologia della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL) propone alcune raccomandazioni di diagnostica di laboratorio delle malattie allergiche, basate sull'utilizzo di algoritmi diagnostici relativi all'impiego delle componenti allergeniche molecolari. Lo scopo è quello di fornire ai patologi e ai clinici informazioni che consentano un utilizzo appropriato di questa diagnostica, che può essere ragionevolmente considerata di secondo livello e che, a fronte di un</p>

maggior impegno economico, per il quale deve esserne assolutamente evitato l'impiego indiscriminato, permette di delineare il corretto profilo di sensibilizzazione del paziente allergico.

Il percorso metodologico seguito è costituito da una fase iniziale di discussione tra tutti i componenti del Gruppo di Studio per integrare le conoscenze derivate dalle evidenze scientifiche, dalla revisione da parte di esperti italiani e stranieri e dalla successiva produzione del presente documento da diffondere a tutti coloro che si occupano di diagnostica allergologica.

Coflitti di interessi: nessuno

[Click here to view linked References](#)

1 **Raccomandazioni per l'utilizzo della diagnostica molecolare in Allergologia**

2 3 **Recommendations for the use of molecular diagnostics in the diagnosis of allergic diseases**

4
5
6 Danilo Villalta¹, Elio Tonutti², Nicola Bizzaro³, Ignazio Brusca⁴ e Vittorio Sargentini⁵,
7 per il Gruppo di Studio in Allergologia della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di
8 Laboratorio (GdS-ALL SIPMeL)
9

10
11 ¹ Allergologia e Immunologia Clinica, Ospedale "S. Maria degli Angeli", Pordenone, Italia

12 ² Immunopatologia e Allergologia, Azienda Sanitaria Universitaria Integrata, Udine, Italia

13 ³ Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale San Antonio, Tolmezzo (UD), Italia

14 ⁴ Laboratorio Analisi, Ospedale "Buccheri-La Ferla, Palermo, Italia

15 ⁵ Laboratorio Analisi, P.T.P, Nuovo Regina Margherita, Roma, Italia

16

17
18 **Indirizzo per la corrispondenza**

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

Riassunto Il Gruppo di Studio in Allergologia della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL) propone alcune raccomandazioni di diagnostica di laboratorio delle malattie allergiche, basate sull'utilizzo di algoritmi diagnostici relativi all'impiego delle componenti allergeniche molecolari. Lo scopo è fornire ai patologi e ai clinici informazioni che consentano un utilizzo appropriato di questa diagnostica, che può essere ragionevolmente considerata di secondo livello e che, a fronte di un maggiore impegno economico, per il quale deve esserne assolutamente evitato l'impiego indiscriminato, permette di delineare il corretto profilo di sensibilizzazione del paziente allergico.

Il percorso metodologico seguito è costituito da una fase iniziale di discussione fra tutti i componenti del Gruppo di Studio per integrare le conoscenze derivate dalle evidenze scientifiche, dalla revisione da parte di esperti italiani e stranieri e dalla successiva produzione del presente documento da diffondere a tutti coloro che si occupano di diagnostica allergologica.

Parole chiave Allergia · Diagnostica molecolare · *Component resolved diagnosis* · Linee guida · IgE specifiche

42 **Abstract**

43 The Study Group on Allergology of the Italian Society of Clinical Pathology and Laboratory
44 Medicine (SIPMeL) developed recommendations on the diagnosis of allergic diseases based on the
45 use of molecular allergenic components. The purpose of this document is to provide the
46 pathologists and the clinicians with information and algorithms enabling a proper use of this
47 second-level diagnostics. In the face of greater economic commitments, for which its indiscriminate
48 use must be absolutely avoided, molecular diagnostics allows definition of the exact sensitization
49 profile of the allergic patient.

50 The methodology followed to develop these recommendations included an initial phase of
51 discussion between all the components of the Study Group to integrate the knowledge derived from
52 scientific evidence, a revision of the recommendations made by Italian and foreign experts, and the
53 subsequent production of this document to be disseminated to all those who deal with allergy
54 diagnostics.

55
56
57
58
59 **Key words** Allergy · Molecular diagnostics · Component Resolved Diagnosis · Guidelines ·
60 Specific IgE

Che cos'è la diagnostica molecolare

Dal 1967, anno in cui fu eseguito il primo dosaggio delle IgE specifiche a opera di Wide et al [1], con la nascita del radioallergosorbent test (RAST), a oggi moltissimi progressi sono stati compiuti nel campo della diagnostica allergologica di laboratorio, attraverso varie tappe costituite dallo sviluppo di fasi solide a elevata capacità legante, dall'uso di traccianti enzimatici legati ad anticorpi anti-IgE monoclonali e di curve di calibrazione eterologhe tarate sullo standard IgE WHO 75/502 (test di seconda generazione) [2, 3] e dall'introduzione di sistemi diagnostici per la determinazione delle IgE specifiche caratterizzati da un'elevata sensibilità analitica e da una totale automazione (test di terza generazione) [4].

A partire dalla metà degli anni '90, in parallelo allo sviluppo delle tecniche proteomiche, si è assistito alla nascita dell'allergologia molecolare, che ha fornito diverse conferme e numerose nuove conoscenze in campo allergologico [5]. In particolare occorre tenere presente che:

- molti allergeni sono caratterizzati da un'elevata complessità antigenica;
- un estratto allergenico è costituito da una miscela di proteine di cui solo una parte è allergizzante;
- ogni individuo risponde a un allergene in base alle proprie caratteristiche genetiche. Pertanto, un epitopo in grado di sensibilizzare un certo paziente potrebbe non avere lo stesso potere nei confronti di un altro;
- esistono numerosi allergeni cross-reattivi variamente distribuiti tra piante e animali che presentano diversi gradi di omologia strutturale. Si ritiene che si possa avere una cross-reattività (fenomeno in cui lo stesso anticorpo può riconoscere due allergeni differenti) se ci si trova di fronte a un'omologia aminoacidica superiore ad almeno il 35-40% e se almeno un frammento minimo di 6 aminoacidi è presente sulla struttura primaria di 2 differenti allergeni;
- tra i diversi epitopi è possibile distinguere quelli costituiti da sequenze lineari di aminoacidi da quelli costituiti da determinanti conformazionali, in cui gli aminoacidi presenti su differenti punti della sequenza aminoacidica, in seguito al ripiegamento della proteina, possono ritrovarsi vicini a costituire una nuova struttura con caratteristiche tali da poter essere riconosciuta come antigene da un anticorpo. Le IgE tendono a riconoscere essenzialmente epitopi di tipo conformazionale e questo spiega perché, nell'ambito delle allergie alimentari, solo le componenti molecolari che sono resistenti alla denaturazione (cottura e/o digestione) e che pertanto mantengono inalterata o quasi la loro struttura secondaria e terziaria, e quindi gli epitopi rilevanti, possono causare allergie spesso gravi e sistemiche nei pazienti sensibilizzati;
- esistono notevoli differenze nei pattern di sensibilizzazione molecolare tra le differenti aree geografiche, per cui un risultato di positività con test estrattivo può sottendere a positività differenti con diverso significato clinico [6, 7].

La disponibilità di allergeni ricombinati e/o estrattivi altamente purificati ha così permesso di passare da una diagnostica tradizionale, che utilizza estratti allergenici, alla diagnostica molecolare o *component resolved diagnosis* (CRD) in cui vengono utilizzate le singole molecole allergeniche, il che permette di definire in maniera dettagliata le molecole bersaglio della reattività IgE [8].

Utilità della diagnostica allergologica molecolare

L'utilizzo della CRD presenta notevoli vantaggi dal punto di vista sia analitico sia clinico.

Infatti, nonostante il marcato miglioramento dei sistemi diagnostici avvenuto negli ultimi anni, la concordanza tra i metodi di dosaggio delle IgE specifiche con estratti non è elevata e sussistono significative discrepanze tra dati analitici e clinici [9]. Il problema principale è la difficoltà di ottenere un'elevata purificazione e standardizzazione degli estratti allergenici che presentano una certa variabilità nel contenuto delle molecole allergeniche, sia tra aziende diverse sia nell'ambito della stessa azienda e tra lotti diversi. Numerosi sono i motivi della difficoltà di standardizzazione

1 degli estratti allergenici, quali le diverse fonti di approvvigionamento, le diverse modalità di
2 estrazione e purificazione e la possibile presenza nell'estratto di enzimi proteolitici e allergeni
3 contaminanti.

4 Le molecole, invece, hanno una composizione allergenica ben definita, sono quantificabili, prive di
5 componenti aggiuntive non allergeniche e, se ottenute con la tecnica ricombinante, hanno il
6 vantaggio di poter essere riprodotte immoificate e in quantità praticamente illimitata nel tempo. Ne
7 conseguono una maggiore facilità di standardizzazione dei metodi diagnostici e una riduzione
8 notevolissima della variabilità inter-lotto.

9 I maggiori vantaggi ottenibili dalla diagnostica molecolare sono comunque senz'altro quelli di
10 natura clinica. Tramite la CRD, infatti, è possibile ottenere lo specifico profilo allergologico di
11 ciascun paziente [10]. Ciò permette, nei soggetti che con la diagnostica tradizionale appaiono
12 apparentemente polisensibilizzati, di distinguere le sensibilizzazioni primarie o genuine (co-
13 sensibilizzazioni) dalle cross-reattività, dovute alla presenza di IgE verso molecole condivise ad alta
14 omologia strutturale (es. pan-allergeni) [11].

15 L'impatto della CRD nella clinica ha le seguenti importanti ripercussioni:

- 16 - nell'allergia agli **inalanti** l'identificazione del/dei sensibilizzante/i primario/i permette la
17 corretta selezione dei pazienti eleggibili per l'immunoterapia specifica (ITS) e la corretta
18 formulazione della stessa [12, 13];
- 19 - nell'allergia agli **alimenti** la CRD permette la valutazione del rischio di gravità della
20 reazione. Pazienti sensibilizzati a molecole termo- e gastro-stabili sono a rischio di reazioni
21 sistemiche e dovranno evitare l'assunzione dell'alimento sia cotto sia crudo, mentre i
22 soggetti sensibilizzati a molecole termo- e gastro-labili in genere presentano solo sindrome
23 orale allergica (SOA) e possono assumere gli alimenti se cotti, tostati o sotto forma di succo
24 di frutta commerciale [14];
- 25 - nell'allergia al **latex** la CRD permette di distinguere i pazienti primariamente sensibilizzati
26 alle proteine del latex da quelli che presentano una reattività con l'allergene estrattivo
27 dovuta a sensibilizzazione al solo pan-allergene profilina. Solo i primi necessitano percorsi
28 latex-free [15];
- 29 - nell'allergia al **veleno di imenotteri** la CRD può permettere l'identificazione della reale
30 sensibilizzazione sulla base della presenza delle molecole specifiche e ciò può essere di
31 grande ausilio nella scelta dell'ITS più appropriata [16].

32 Principali classi di molecole

33 Negli ultimi anni sono state identificate, sequenziate e clonate mediante l'uso di tecniche di biologia
34 molecolare numerose molecole che sono oggi disponibili per la diagnostica di laboratorio e per
35 diverse di esse è stata definita la struttura tridimensionale tramite risonanza magnetica e
36 cristallografia a raggi X. La lista delle molecole è aggiornata costantemente nell'*Official list of
37 allergens* dell'*International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature sub-
38 committee del WHO* (WHO/IUIS) [<http://www.allergen.org>].

39 In base alla nomenclatura internazionale, un allergene viene codificato utilizzando le prime tre
40 lettere del genere, seguito da una singola lettera indicante la specie e da un numero indicante la
41 cronologia della purificazione allergenica (es. *Phleum pratense*: Phl p 1; Phl p 5 ecc.).

42 Si calcola che le molecole allergeniche possano appartenere a oltre 120 distinte famiglie proteiche,
43 ma è bene sottolineare che gli allergeni responsabili della maggior parte delle reazioni allergiche
44 sono ristretti a poche famiglie con un limitato numero di funzioni biologiche [17].

45 Principali molecole in causa nelle allergie respiratorie

46 Le componenti molecolari specifiche maggiori e minori indice di sensibilizzazione primaria ai
47 principali allergeni inalanti sono riportate nella **Tabella 1**. Nella stessa sono anche riportate le

1 molecole cross-reattive quali le profiline, presenti in tutte le cellule eucariote, dotate di elevata
2 omologia e altamente cross-reattive fra tutte le specie di origine vegetale, nonché le polcalcine,
3 presenti solo nei pollini e anch'esse dotate di elevata cross-reattività. Nei pollini, come pure negli
4 alimenti di origine vegetale e nel veleno di imenotteri, sono presenti anche i componenti
5 carboidratici cross-reattivi (CCD). Essi sono componenti in grado di stimolare una risposta
6 anticorpale IgE, ma non di determinare la degranolazione mastocitaria e quindi la manifestazione
7 clinica. Le IgE specifiche verso i CCD sono rilevabili solo con i test *in vitro* e non con i test *in vivo*.
8 La presenza di IgE verso CCD è quindi causa di apparente polisensibilizzazione nei test *in vitro* per
9 pollini, alimenti di origine vegetale e imenotteri.
10 Tra gli allergeni di origine animale, lipocaline e sieroalbumine sono anch'esse cross-reattive tra
11 diverse specie.
12
13
14
15

16 *Principali molecole in causa nelle allergie alimentari*

17 *1. Cibi di origine vegetale*

18 Le principali classi di molecole associate a sensibilizzazione genuina agli alimenti di origine
19 vegetale sono principalmente termo- e gastro-stabili e appartengono alle seguenti famiglie:

- 20 a. *non specific Lipid Transfer Proteins* (nsLTP), appartenenti alle PR-14, che
21 caratteristicamente si trovano nelle parti vicine alla buccia della frutta. Rappresentano
22 l'allergene più importante della sensibilizzazione alla frutta fresca. Le nsLTP della famiglia
23 delle *Rosaceae* sono dotate di elevata omologia;
- 24 b. *2S Albumine* (superfamiglia delle Prolamine); sono piccole proteine di deposito (*storage*
25 *proteins*), estremamente stabili, e rappresentano gli allergeni maggiori delle allergie alla
26 frutta secca. L'omologia strutturale è limitata tra le diverse specie, ma è elevata tra anacardi
27 e pistacchio, tra sesamo e papavero, tra le *Brassicaceae* e raggiunge il 60% tra noci e
28 nocciole;
- 29 c. Viciline (*7S Globuline*) [superfamiglia delle Cupine]: proteine di deposito estremamente
30 resistenti al calore e alla digestione peptica, responsabili di allergia a frutta secca e a bacelli;
- 31 d. Legumine (*11S Globuline*) [superfamiglia delle Cupine]: proteine di deposito, anch'esse
32 dotate di elevata resistenza al calore e alla digestione peptica, responsabili di allergia a
33 frutta secca e a bacelli. L'omologia di sequenza delle legumine presenti in diverse specie è
34 maggiore rispetto a quella delle viciline;
- 35 e. gliadine (ω -5 gliadina) [superfamiglia delle Prolamine]: responsabili di allergia al grano
36 (anafilassi indotta da esercizio fisico).

37 Le molecole responsabili di cross-reattività con i pollini sono molecole termo-e gastro-labili e in
38 genere si associano alla presenza di una sintomatologia limitata al cavo orale (sindrome orale
39 allergica-SOA) e appartengono alle seguenti classi molecolari:

- 40 a. PR-10 (Bet v 1 e omologhi), presenti in molti alimenti di origine vegetale. Il sensibilizzante
41 primario in genere è il polline della betulla;
- 42 b. profiline, pan-allergene diffuso in tutte le cellule eucariote, con elevata omologia tra le
43 diverse specie. I sensibilizzanti primari sono in genere i pollini delle *Graminaceae* e delle
44 *Betulaceae*;
- 45 c. taumatine, appartenenti alle PR-5, di incerto significato clinico anche se a volte sono state
46 messe in relazione a SOA. Nel corso della trattazione non saranno prese in considerazione.

47 *2. Cibi di origine animale*

1 Le principali classi molecolari responsabili delle allergie di origine animale sono riportate nella
2 **Tabella 2**. Con l'eccezione della beta-lattoglobulina e dell'alfa-lattoalbumina, esse sono tutte
3 resistenti al calore.
4

5 *Principali molecole in causa nell'allergia agli imenotteri*

6 Le principali molecole responsabili delle allergie a imenotteri sono riportate nella **Tabella 3**.
7

8 **Metodi per la diagnostica molecolare**

9 La diagnostica molecolare in laboratorio può essere eseguita utilizzando due diverse strategie: a)
10 diagnosi mirata attraverso l'utilizzo di singole componenti molecolari (monoplex), b) diagnosi non
11 mirata tramite l'utilizzo di matrici di allergeni precostituite su *microarray* (multiplex).
12

13 La prima è una diagnostica che presuppone, nella maggioranza dei casi, una conoscenza clinica del
14 paziente da parte dello specialista o del medico curante e che mira all'approfondimento di un
15 fondato sospetto diagnostico basato sull'anamnesi e sui test diagnostici di primo livello; serve in
16 particolare a verificare se una positività a un estratto ottenuta mediante l'utilizzo di test cutanei o
17 attraverso il dosaggio delle IgE specifiche sia dovuta a un allergene genuino, che identifica una
18 sensibilizzazione primaria (genuina) verso una specifica sorgente allergenica, o a un pan-allergene
19 (allergene cross-reattivo). Ha il vantaggio che può essere eseguita sulla stessa piattaforma analitica,
20 di essere quantitativa, altamente automatizzata, con la quale vengono ricercate le IgE specifiche
21 verso gli allergeni estrattivi, anche applicando algoritmi che prevedono un approccio di tipo *reflex*
22 *test*, e consente, laddove possibile, attraverso l'esecuzione di pochi e mirati dosaggi analitici, un
23 utilizzo altamente appropriato delle risorse economiche. Con tale approccio, però, si rischia,
24 identificando solo i componenti ricercati, di non verificare o di sottostimare la presenza di altre
25 sensibilizzazioni non sospettate.
26

27 La diagnostica su microarray attualmente disponibile sul mercato (ImmunoCAP[®] ISAC,
28 ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), nella sua versione più recente, permette di
29 determinare contemporaneamente e con una piccola quantità di siero (30 microlitri) IgE rivolte
30 verso 112 diverse molecole, 43 delle quali di origine alimentare, numero che sarà sicuramente
31 destinato ad aumentare in futuro [18]. Si tratta di un test che non risponde alla logica di ricercare
32 solo IgE specifiche verso molecole mirate in base al sospetto clinico, ma a quella di avere un profilo
33 allergologico il più ampio possibile, ovviamente con il limite del profilo molecolare presente nella
34 matrice. L'interpretazione di questo test, quindi, è più complessa e non scevra di potenziali mis-
35 interpretazioni, pertanto va riservata a personale con elevate competenze di diagnostica molecolare
36 (test di terzo livello) [19]. Il test è inoltre semiquantitativo, calibrato contro uno standard interno e
37 complessivamente di minore accuratezza diagnostica rispetto al test ImmunoCAP [20-22].
38

39 I due sistemi diagnostici non devono essere considerati in alternativa l'uno all'altro, ma possono
40 coesistere affiancati nel laboratorio di allergologia ed essere utilizzati di volta in volta, tenendo
41 conto delle particolari situazioni cliniche, del numero di molecole da testare, della disponibilità
42 delle stesse e delle competenze specialistiche [23].
43

44 Da un punto di vista meramente economico la diagnostica che utilizza il microarray, sulla base degli
45 attuali costi previsti per l'esecuzione dei test, risulta vantaggiosa se la situazione clinica del paziente
46 richiede la ricerca delle IgE specifiche verso un numero di componenti molecolari superiore a 12-13.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Diagnostica su microarray (ImmunoCAP® ISAC): quando utilizzarla (vantaggi e svantaggi)

Si può prevedere l'utilizzo di ImmunoCAP® ISAC quando ci si trova di fronte a situazioni cliniche particolarmente complesse e di non facile inquadramento. In particolare può essere raccomandato:

- nei pazienti con sensibilizzazioni multiple, non facilmente inquadrabili in base ai dati anamnestici, al risultato dei test cutanei e del dosaggio delle IgE specifiche, in cui, per avere un profilo allergologico chiaro, sia necessario il dosaggio di un numero di molecole superiore a 12-13 (motivo economico);
- qualora sia necessario testare molecole attualmente non disponibili nel sistema monoplex (es. Pen m 2 e Pen m 4 nelle allergie ai crostacei);
- nella rivalutazione di pazienti in immunoterapia iposensibilizzante che non mostrano benefici clinici significativi, in cui può essere opportuno rivalutare l'identità dei o del "fattori/e scatenanti/e" responsabili/e della sintomatologia allergica;
- nei casi di anafilassi "idiopatica" per scoprire eventuali sensibilizzazioni non identificate con i test tradizionali;
- in casi pediatrici, qualora non sia possibile avere a disposizione la quantità di siero necessaria per la determinazione con il sistema monoplex;
- negli studi epidemiologici, al fine di disporre del più ampio pannello possibile di sensibilizzazioni per ciascun paziente;

Occorre però tenere presente alcuni inconvenienti che possono derivare dall'uso del *microarray*, taluni di carattere squisitamente tecnico e altri di tipo diagnostico-interpretativo. In particolare:

- attualmente il test non è ancora automatizzato e quindi è indaginoso e maggiormente soggetto a possibili errori in fase analitica;
- il test è meno sensibile rispetto al monoplex;
- come tutti i test multiplex presenta una diminuita specificità globale;
- non sono presenti programmi di VEQ per la valutazione dei risultati ottenuti;
- ci si può imbattere in positività inattese, soprattutto per molecole che sono potenzialmente responsabili di gravi reazioni allergiche, senza che il paziente abbia in precedenza manifestato alcun sintomo (e quindi di dubbio significato clinico), con difficile gestione del dato analitico sia da parte del clinico che deve comunicare la positività e la sua potenziale pericolosità, sia da parte del paziente che potrebbe averne una ricaduta sulla sua qualità di vita;
- difficoltà di interpretazione dei risultati e rischio di scarsa fruibilità degli stessi, in particolare per chi non ha una buona conoscenza delle molecole e del loro significato diagnostico. Non è infatti assolutamente banale orientarsi tra 112 differenti molecole, molte delle quali strettamente collegate tra loro e altre assolutamente indipendenti. Per ovviare a questo inconveniente sono stati sviluppati e sono disponibili sistemi esperti, utili per una corretta interpretazione del test proteomico.

Raccomandazioni su come usare correttamente la diagnostica molecolare

Lo scopo della diagnostica molecolare è identificare correttamente il profilo allergologico del paziente. Ciò ha come importanti conseguenze: a) nelle allergie da inalanti la corretta identificazione degli allergeni causali e quindi la corretta prescrizione dell'ITS e b) nelle allergie alimentari la predizione del rischio clinico in seguito all'assunzione dell'alimento allergizzante [24]. Per tali motivi, la moderna diagnostica allergologica non può più prescindere dalla diagnostica

1 molecolare. Poiché, però, a oggi sono state identificate oltre 1000 molecole e un centinaio sono già
2 disponibili in diagnostica, per molti l'approccio alla diagnostica molecolare può risultare difficile. Il
3 nostro scopo è quindi proporre degli algoritmi diagnostici semplici per coloro che vogliono
4 approcciare la CRD, con esemplificazioni delle più frequenti evenienze nella pratica clinica.

5 6 *Algoritmi diagnostici nelle allergie respiratorie*

7
8 Il modello generale di approccio alla CRD nelle allergie respiratorie è schematizzato nella **Figura 1**.
9 In casi di polisensibilizzazione, quindi, vanno ricercate da un lato le sensibilizzazioni verso le
10 molecole indice di sensibilizzazione genuina rispetto alle fonti allergeniche risultate positive ai test
11 cutanei o al test *in vitro* con estratti, dall'altro le molecole causa di reattività crociata [25]. Solo nel
12 caso di riscontro di IgE specifiche verso le molecole indice di sensibilizzazione genuina possiamo
13 affermare che un soggetto è primariamente sensibilizzato a una specifica fonte allergenica e quindi
14 potrà essere eligibile all'ITS verso quella specifica fonte allergenica. Qualora, invece, un soggetto
15 risulti positivo a molecole responsabili di cross-reattività (polcalcine, profiline e componenti
16 carboidratici cross-reattivi (CCD) per i pollini, tropomiosine per gli acari), si valuterà di volta in
17 volta, in base alla clinica e alle positività verso le molecole indice di sensibilizzazione genuina, se
18 sarà eligibile per eventuale ITS. Per quanto riguarda la scelta di quale polcacina o profilina
19 utilizzare, dal momento che esiste un'elevata omologia tra le molecole presenti nelle diverse fonti
20 allergeniche [26, 27], in genere è sufficiente avere a disposizione una sola di queste molecole. La
21 scelta di quale molecola utilizzare sarà dettata dalla valutazione della fonte allergenica causa più
22 frequente di sensibilizzazioni nella zona in cui si opera. Nella maggior parte del territorio italiano si
23 tratta delle *Graminaceae* e quindi si userà Phl p 12 come profilina e Phl p 7 come polcalcina. In
24 alcune zone del Nord Italia la maggiore fonte di sensibilizzazione a queste molecole è rappresentata
25 dalla betulla, per tanto si utilizzeranno rispettivamente Bet v 2 e Bet v 4.

26
27 Da quanto sopra si evince come abbia senso procedere con la diagnostica molecolare solo nel caso
28 si ipotizzi di procedere a ITS, altrimenti il maggiore costo di questa diagnostica non è giustificabile.
29 Di seguito vengono riportati alcuni esempi pratici di algoritmi diagnostici:

- 30
31
32
33
34 a. soggetto con sintomatologia stagionale che al test cutaneo e/o al test *in vitro* risulta
35 *polisensibilizzato a pollini* (es. *Graminaceae*, betulla, parietaria, olivo, ambrosia, assenzio,
36 cipresso): è indicato ricercare le molecole indice di sensibilizzazione genuina (nel caso
37 dell'esempio citato Phl p 1, Phl p5 (*Graminaceae*), Bet v 1 (betulla), Par j 2 (parietaria),
38 Amb a 1 (ambrosia), Art v 1 (assenzio), Cup a 1 (cipresso) e quelle responsabili di eventuali
39 cross-reattività tra pollini (profiline e polcalcine). Qualora lo stato di apparente
40 polisensibilizzazione sia stato evidenziato con un test *in vitro* si eseguirà anche la ricerca dei
41 CCD (MUXF3 - epitopo glicosilato della bromelina). In base al risultato del test si valuterà,
42 in associazione alla clinica, se proporre ITS e per quale/i allergene/i (in genere non più di
43 2/3 allergeni) [28, 29];
44
45
46 b. soggetto con sintomi perenni con *positività ad acari* al test cutaneo e/o al test *in vitro*, con o
47 meno sensibilizzazioni ad altri allergeni: in tal caso si valuterà se il paziente è sensibilizzato
48 agli allergeni maggiori degli acari (Der p 1, Der p 2) e alla tropomiosina (Der p 10 o Pen a
49 1). Se è positivo agli allergeni maggiori può essere considerata l'ipotesi dell'ITS, mentre la
50 sola sensibilizzazione a tropomiosina esclude tale ipotesi, in quanto non è certa una
51 sensibilizzazione primaria agli acari [30]. Purtroppo per quanto riguarda gli acari, non
52 abbiamo ancora a disposizione altre molecole che possono avere un ruolo importante nella
53 sensibilizzazione e quindi allo stato attuale la diagnostica molecolare non è ancora del tutto
54 discriminante;
55
56
57 c. soggetto con apparente polisensibilizzazioni al test cutaneo e/o *in vitro* a *epiteli animali*
58 (cane, gatto, cavallo). Nel caso degli epitelii animali sono disponibili alcune molecole indice
59 di sensibilizzazione specie-specifica come la secretoglobulina (uteroglobina) del gatto (Fel d
60 1) o l'arginin-esterasi (kallitreina) (Can f 5) del cane. Le lipocaline (Can f 1, Can f 2, fel d 4,
61
62
63
64
65

- Equ c 1), invece, sono molecole omologhe [31] e possono essere causa di reattività a più fonti allergeniche animali e quindi non in grado di identificare la fonte primaria di sensibilizzazione; in genere è sufficiente testarne una come molecola indice (es Can f 1). È interessante il caso delle positività a Can f 5, in quanto, essendo un antigene di origine prostatica, se non associato ad altra positività per il cane (Can f 1), può permettere al soggetto sensibilizzato di tenere in casa cani di sesso femminile. È utile, inoltre, avere a disposizione anche la molecola Fel d 2 (siero-albumina), che è una molecola presente in forma omologa anche nelle carni, in particolare in quella del maiale. Soggetti con sensibilizzazione al gatto e positività per tale molecola possono presentare un'allergia anche alla carne di maiale (*cat-pork syndrome*) [32];
- d. soggetti con positività ai test cutanei e/o *in vitro* per muffe (*Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*). La sensibilizzazione ad Alt a 1 è presente nell'80-100% dei casi di sensibilizzazione primaria all'*Alternaria alternata* e c'è maggiore correlazione tra clinica e presenza di tale molecola in atmosfera che tra clinica e presenza delle spore di *Alternaria* [33]. La sensibilizzazione a tale molecola, quindi, è un ottimo indicatore per la prescrizione di un'ITS per l'*Alternaria*. Per l'*Aspergillus* abbiamo a disposizione più molecole (Asp f 1, Asp f 2, Asp f 3, Asp f 4 e Asp f 6). Tale muffa può essere responsabile di uno spettro di manifestazioni respiratorie che vanno dall'aspergillosi allergica all'aspergilloma, fino ad arrivare all'aspergillosi invasiva. Relativamente alle manifestazioni su base allergica, oltre alla rino-sinusite e all'asma allergico, viene annoverata anche l'aspergillosi broncopolmonare (ABPA), un quadro più complesso e severo, in particolare nei pazienti con fibrosi cistica. Asp f 1 e Asp f 3 in genere si associano alle prime due condizioni, mentre Asp f 2, ma in particolare Asp f 4 e Asp f 6, si associano più specificamente ad ABPA [34];
- e. soggetti con positività ai test cutanei e/o sierologici per *latex*. Attualmente sono disponibili per la diagnostica varie molecole (Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5, Hev b 6.01, Hev b 6.02, Hev b 8, Hev b 9, Hev b 11). Con l'eccezione di Hev b 8, tutte le altre molecole possono associarsi ad allergia genuina al *latex*. Hev b 8, invece, è una profilina e come tale labile al calore e quindi viene alterata durante i processi di produzione dei manufatti in *latex*. Pertanto, un paziente sensibile al *latex*, ma positivo solo a questa molecola, non è soggetto alle restrizioni prescritte ai soggetti sensibilizzati alle altre molecole del *latex* (percorsi *latex-free*). Per quanto riguarda queste ultime, in genere la sensibilizzazione a Hev b 1 ed Hev b 3 si trova più frequentemente in soggetti giovani con spina bifida; le sensibilizzazioni a Hev b 5 ed Hev b 6 sono gli allergeni maggiormente in causa nelle sensibilizzazioni in adulti; Hev b 5, Hev b 6, Hev b 11 sono responsabili delle reazioni crociate con alcuni tipi di frutta (kiwi, avocado, banana, castagna ecc.) [sindrome *latex-frutta*] [35].

Algoritmi diagnostici nelle allergie alimentari

Il modello generale di approccio alla CRD nelle allergie alimentari è schematizzato nella Figura 2. In questo caso, di fronte a una positività con l'estratto (test cutaneo o *in vitro*), al fine di valutare l'eventuale rischio clinico associato all'assunzione accidentale dell'alimento, vanno definite le specifiche positività allergeniche. Nel caso di positività a molecole i cui epitopi allergenici sono stabili al calore e/o alla digestione gastrica (es. nsLTP, cupine, 2S-albumine, parvalbumine, tropomiosine, ovomucoide, caseine), il paziente può essere potenzialmente soggetto a reazioni sistemiche, pertanto l'alimento in causa va evitato in qualsiasi sua forma (crudo, cotto, tostato). Qualora, invece, la sensibilizzazione sia legata alla presenza di IgE specifiche verso molecole termo-labili e/o gastro-labili (es. PR-10, profilina, ovoalbumina, lattealbumina), l'alimento in causa può essere assunto se cotto, tostato o se sottoposto a pastorizzazione. Di seguito vengono riportati alcuni esempi pratici di algoritmi diagnostici.

- a. *Soggetto con sintomi legati all'assunzione di frutta fresca* e relativa positività ai test cutanei e/o al test *in vitro*: andranno ricercate le molecole termo- e gastro-stabili (nsLTP) e le

1 molecole termo- e gastro-labili (PR-10, profilina) presenti nella frutta fresca. Per quanto
2 riguarda le nsLTP in genere si utilizza la Pru p 3, che è la nsLTP della pesca, alimento
3 maggiormente in causa nella sensibilizzazione primaria alla frutta fresca. In alternativa può
4 essere usata Mal d 3 (nsLTP della mela). Per quanto riguarda le PR-10 può essere utilizzata
5 Pru p 1 (PR-10 della pesca), oppure il suo omologo della betulla (Bet v 1), anche se in alcuni
6 casi potrebbe avere una minore sensibilità [36]. Per quanto riguarda le profiline, si può
7 scegliere indifferentemente una tra Pru p 4 (pesca), Bet v 2 (betulla), Phl p 12 (Phleum
8 pratense). La positività a Pru p 3 indica una sensibilizzazione primaria alla frutta fresca e il
9 paziente è a rischio di reazioni sistemiche in seguito all'ingestione della frutta, soprattutto se
10 non pelata (l'allergene è particolarmente concentrato nella buccia). Qualora, invece, la
11 sensibilizzazione sia rivolta a PR-10, profilina o entrambe, trattasi di una reattività crociata
12 con pollini e la sintomatologia si limiterà in genere alla SOA. La frutta in causa potrà essere
13 assunta cotta, tostata o sotto forma di succo di frutta commerciale (pasteurizzato), in quanto
14 PR-10 e profilina sono labili a calore. Nel caso di contemporanea positività per nsLTP e
15 profilina e/o PR-10 in genere i pazienti accusano una sintomatologia più blanda rispetto a
16 quelli con sola positività per nsLTP (effetto protettivo di PR-10 e profiline) [7, 37]. Qualora
17 ci si trovi di fronte a pazienti asintomatici con sola positività al test *in vitro* è probabile la
18 presenza di IgE specifiche per CCD e quindi si ricercheranno le IgE specifiche per MUXF3.
19
20 b. *Soggetto con sintomi legati all'assunzione di frutta secca* e relativa positività ai test cutanei
21 e/o ai test *in vitro*:
22

23
24 b1. *positività alla nocciola*. Vanno ricercate le molecole termo- e gastro-stabili
25 indice di sensibilizzazione primaria, quali Cor a 14 (2S-albumina), Cor a 9
26 (cupina), Cor a 8 (nsLTP), nonché PR-10 e profilina (vedi sopra) indice di cross-
27 reattività con i pollini. I pazienti con sensibilizzazioni agli allergeni termo- e
28 gastro-stabili sono a rischio di reazioni severe e devono evitare l'assunzione della
29 nocciola sotto qualsiasi forma. I soggetti sensibilizzati a PR-10 e profilina o a
30 entrambe al più possono presentare una SOA e possono assumere la nocciola se
31 tostata;
32

33
34 b2. *positività alla noce*. Le molecole termo- e gastro-stabili indice di
35 sensibilizzazione primaria a disposizione sono Jug r 1 (2S-albumina) e Jug r 3
36 (nsLTP). A queste vanno aggiunte PR-10 e profilina (vedi sopra) per valutare
37 eventuale cross-reattività con pollini. L'interpretazione del dato ricalca quanto
38 descritto per la nocciola;
39

40 b3. *positività alla noce brasiliana*. L'unica molecola a disposizione per la
41 valutazione della sensibilizzazione primaria è Ber e 1 (2S-albumina). A questa va
42 affiancata la ricerca di sensibilizzazione a PR-10 e profilina (vedi sopra) e
43 l'interpretazione ricalca quanto descritto per la nocciola;
44

45 b4. *positività a pistacchio o anacardio*. La molecola termo- e gastro-stabile
46 indice di sensibilizzazione primaria a disposizione è Ana o 3 (2S-albumina
47 dell'anacardio, che ha un'elevatissima omologia con la 2S-albumina del
48 pistacchio) [38]. A questa va affiancata la ricerca di PR-10 e profilina (vedi
49 sopra) e anche in questo caso l'interpretazione del dato ricalca quanto scritto per
50 la nocciola;
51

52 b5. *positività ad arachide*. In questo caso la gamma di molecole termo- e gastro-
53 stabili, indice di sensibilizzazione primaria, è ampia: Ara h 1 (cupina-vicilina),
54 Ara h 2 (2 S-albumina), Ara h 3 (cupina-legumina), Ara h 9 (nsLTP). Tra queste
55 la molecola più importante è Ara h 2, in quanto presente nella maggior parte
56 (>90%) dei pazienti primariamente sensibilizzati all'arachide [39]. Nell'area
57 mediterranea, però, Ara h 9 sembra rivestire una peculiare importanza [40], per
58 cui va aggiunta ad Ara h 2. A queste molecole va affiancata la ricerca della PR-
59 10 (Ara h 8 o in alternativa Bet v 1) e della profilina. Nel caso di positività ad
60
61
62
63
64
65

Ara h 2 o Ara h 9 l'assunzione di arachidi va assolutamente evitata, mentre nel caso di positività a Ara h 8 (Bet v1) e alle profiline l'arachide può essere assunta se tostata. Esiste un gruppo di pazienti con positività isolata all'Ara h 6 che al momento è dosabile solo tramite test ISAC [41, 42].

- c. *Soggetto con sintomi legati ad assunzione di soia* e relativa positività ai test cutanei e/o *in vitro*: le molecole termo- e gastro-stabili responsabili della sensibilizzazione primaria alla soia disponibili in diagnostica sono Gly m 5 (cupina-vicilina) e Gly m 6 (cupina-legumina). Come sopra, a queste va affiancata la ricerca delle molecole indice di cross-reattività con i pollini (PR-10 e profilina). A differenza di quanto riportato sopra per la frutta, nel caso della soia la positività a PR-10 a volte può dare sintomi sistemici, probabilmente legati a una maggiore stabilità della PR-10 della soia, Gly m 4, rispetto a PR-10 di altri alimenti [43].
- d. *Soggetto con sintomi legati ad assunzione di grano*, indipendentemente dalla positività dei test cutanei e/o del test *in vitro*: gli allergeni del grano attualmente riconosciuti sono almeno 27 (non tutti responsabili di allergie alimentari), ma per la diagnostica abbiamo a disposizione solo Tri a 14 (nsLTP) e Tri a 19 (ω -5 gliadina) e la gliadina (mix delle varie gliadine). La diagnostica molecolare, quindi, per quanto riguarda il grano è ampiamente incompleta. In ogni caso, anche i test con gli estratti commerciali sono poco sensibili, in quanto spesso carenti delle gliadine, che vengono perse durante l'estrazione salina. Per avere una maggiore sensibilità, quindi, è bene aggiungere al test con estratto di grano anche il test per le gliadine. Inoltre, test con estratti, soprattutto nell'adulto, sono poco specifici per le cross-reattività con le *Graminaceae* [44]. Anche se sono poche le molecole a disposizione, nel caso dell'allergia alimentare al grano Tri a 14 e Tri a 19 sono molto utili. In particolare, la sensibilizzazione a Tri a 19 è associata a una forma specifica di allergia, quale l'anafilassi da allergia al grano esercizio indotta. In tale forma di allergia, l'assunzione di grano è responsabile di sintomi solo se associata a un esercizio fisico o, in alternativa, a FANS, consumo di alcol o eventi stressanti [45].
- e. *Soggetto con sintomi legati ad assunzione di pesce* e positività al test cutaneo e/o *in vitro*: l'allergene maggiore del pesce è la beta-parvalbumina, di cui sono commercialmente disponibili due molecole (Gad c 1, parvalbumina del merluzzo; Cyp c 1, parvalbumina della carpa). L'omologia tra le due molecole è alta [46], pertanto in genere è sufficiente averne a disposizione una. I pesci cartilaginei (razze, torpedini, trigoni, mante, squali) presentano come allergene l'alfa-parvalbumina, che mostra una moderata omologia con la beta-parvalbumina e una minore allergenicità [47]. La positività a parvalbumina conferma la diagnosi di allergia al pesce a lisca e di conseguenza va consigliata la sua eliminazione dalla dieta, anche se a volte tonno, halibut, sgombro e passera di mare possono essere tollerate, in quanto la loro parvalbumina presenta una minore reattività crociata.
- f. *Soggetto con sintomi legati ad assunzione di crostacei* e positività al test cutaneo e/o *in vitro*. Gli allergeni in causa nell'allergia ai crostacei sono molti: tropomiosina (Pen a 1, Pen m 1), arinin-kinasi (Pen m 2), catena leggera della miosina (Pen m 3), proteina sarcoplasmatica legante il calcio (Pen m 4), troponina C (Pen m 6) e forse altre (es. emocianina) [48, 49]. L'unica molecola oggi a disposizione con il test monoplex è la tropomiosina (Pen a 1), mentre nel test ImmunoCAP-ISAC ci sono anche Pen m 2 e Pen m 4. In caso di positività ai crostacei, quindi, allo stato attuale si cerca solo Pen a 1. Se il test risulta positivo la diagnosi è confermata e l'alimento va escluso dalla dieta, mentre se è negativo, poiché l'allergene è positivo solo in circa il 50% dei casi [50], non può essere esclusa l'allergia.
- g. *Soggetto con sintomi legati ad assunzione di latte* e positività al test cutaneo e/o *in vitro*: gli allergeni più importanti del latte sono la caseina (Bos d 8), l'alfa-lattoalbumina (Bos d 4) e la beta-lattoglobulina (Bos d 5). La caseina è la proteina maggiormente termo- e gastro-stabile e quindi i soggetti sensibilizzati possono avere sintomi anche con i cibi cotti contenenti latte. Le altre due proteine sono, invece, più labili al calore, per cui in genere i cibi contenenti latte, ma ben cotti, sono tollerati. Poiché il livello di IgE specifiche verso la

1 caseina è correlato con la probabilità di avere sintomi in seguito a ingestione di latte, nei
2 bambini allergici al latte è utile il monitoraggio del livello di IgE specifiche per valutare la
3 probabilità di un'avvenuta tolleranza e/o per decidere quando procedere con il test di
4 tolleranza orale [51].

- 5 h. *Soggetto con sintomi legati ad assunzione di uovo* e positività al test cutaneo e/o al test *in*
6 *vitro*: gli allergeni principali dell'uovo sono rappresentati dall'ovomucoide (Gal d 1),
7 molecola gastro- e termo-resistente e dall'ovoalbumina (Gal d 2), molecola meno resistente
8 al calore. I soggetti sensibilizzati a quest'ultima in genere tollerano gli alimenti ben cotti.
9 Analogamente a quanto descritto per la caseina, il monitoraggio del livello delle IgE
10 specifiche per l'ovomucoide è utile per valutare la probabilità di un'avvenuta tolleranza e/o
11 per decidere quando procedere con il test di tolleranza orale [52].
- 12 i. *Soggetto con sintomi legati ad assunzione di carni rosse*: esistono due diversi tipi di allergie
13 alle carni rosse. Il primo tipo è l'allergia immediata, che ha le caratteristiche di tutte le altre
14 allergie alimentari ed è dovuta alla sensibilizzazioni ad allergeni altamente cross-reattivi
15 come le siero-albumine. Il paradigma di questa forma di allergia è la *cat-pork syndrome*
16 sopra descritta, in cui i sintomi sono scatenati dall'assunzione di carne di maiale, ma non di
17 bue o altri mammiferi, in soggetti sensibilizzati alla sieralbumina del gatto. In questo caso
18 la diagnosi viene confermata dalla positività delle IgE specifiche verso la sieralbumina di
19 gatto (Fel d 2). Il secondo tipo è l'allergia ritardata alla carne rossa, in cui la reazione
20 compare mediamente dopo 4-6 ore dall'assunzione della carne di mammifero (bue, maiale,
21 agnello ecc.) e l'allergene in causa è un antigene carboidratico (alpha-Gal). La
22 sensibilizzazione non avviene tramite assunzione di carne, ma dopo puntura di una zecca
23 (*Ixodes ricinus* in Europa, *Amblyomma americanum* negli USA) [53, 54]. Da poco è a
24 disposizione il test per la ricerca delle IgE specifiche anti-alpha-Gal, diagnostiche per tale
25 forma di allergia.

26 Uno schema riassuntivo sintetico dei suggerimenti comportamentali in soggetto con
27 sensibilizzazioni alle principali molecole di origine animale, alimentare e del latex è riportato
28 nella **Tabella 4**.

34 *Algoritmi diagnostici nelle allergie agli imenotteri*

35 Definire correttamente quale veleno sia la causa di una reazione allergica a imenotteri è
36 fondamentale per poter prescrivere un'immunoterapia corretta ed efficace. Qualora ci si trovi di
37 fronte a un'apparente sensibilizzazione multipla (ape/vespidi o *Vespula/Polistes*) ai test intradermici
38 o al dosaggio delle IgE specifiche, non è sempre facile discriminare se si tratta di reale
39 polisensibilizzazione o di cross-reattività. A complicare il quadro, quando la diagnostica è eseguita
40 con test *in vitro*, inoltre, interviene la possibile presenza di IgE specifiche verso i CCD. La metodica
41 di elezione per individuare quale veleno abbia la maggiore rilevanza clinica è la RAST inibizione.
42 Essa consiste nel dosaggio delle IgE specifiche per un dato veleno dopo pre-incubazioni del siero
43 con concentrazioni scalari dei veleni che hanno dato positività *in vitro*. Si ottengono, quindi, delle
44 curve di inibizione che sono funzione della concentrazione del veleno inibente. Valori di inibizione
45 superiori al 70% sono considerati indicativi di una marcata cross-reattività, mentre valori inferiori al
46 25% la escludono. Questo test, comunque, non è in grado di risolvere tutti i casi, oltre a essere
47 indaginoso e costoso e quindi non alla portata di tutti i Laboratori. La CRD in un certo numero di
48 casi può essere di aiuto nel risolvere il quesito. Abbiamo ora a disposizione due molecole per il
49 veleno d'ape (Api m 1, fosfolipasi A₂; Api m 10, icarapina variante 2), due molecole per la *Vespula*
50 (giallone) [Ves v 1, fosfolipasi A₁; Ves v 5, antigene 5] e 1 per il *Polistes dominulus* (Pol d 5,
51 antigene 5) [Tabella 3].

52 In caso di apparente duplice sensibilizzazione al test *in vitro* tra ape e vespidi (Figura 3), l'impiego
53 della diagnostica molecolare è in grado, nella maggioranza dei casi, di distinguere se si tratta di
54 cross-reattività dovute alla presenza di CCD o di co-sensibilizzazione [55].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Meno semplice è la distinzione tra *Vespula* e *Polistes*, vista la cross-reattività tra le specie. In attesa di avere a disposizione Pol d 1, per ora possiamo con un buon indice di confidenza attribuire la sensibilizzazione primaria qualora il livello delle IgE specifiche verso Ves v 5 e Pol d 5 differiscano tra loro significativamente [56].

Il commento interpretativo

La diagnostica molecolare in ambito allergologico è stata una vera rivoluzione, avendo di fatto modificato il concetto di allergia con un linguaggio nuovo e un diverso approccio alla diagnosi e alla terapia. Il riferimento alle famiglie allergeniche e alle rispettive molecole, piuttosto che alle sorgenti allergeniche (piante, alberi, frutta ecc.), può creare non poche difficoltà interpretative ai medici di medicina generale, ma a volte anche a specialisti del settore. Per questi motivi il laboratorio di allergologia deve essere in grado di spiegare il significato dei risultati ottenuti dai test molecolari con un linguaggio chiaro al medico richiedente e, possibilmente, allo stesso paziente. Il commento interpretativo ai test molecolari *in vitro* risulta essere uno *step* fondamentale nell'iter diagnostico del paziente allergico.

Il patologo clinico, comunque, può avere un ruolo nell'inquadramento diagnostico delle patologie allergiche solo se è in grado di ricevere informazioni cliniche associate alla richiesta di IgE specifiche. Senza queste informazioni l'utilizzo di allergeni molecolari rischierebbe di finire nel buco nero della non appropriatezza, con l'unico risultato di un aumento dei costi.

Le modalità con cui vengono richieste le IgE specifiche nei Laboratori di Allergologia in Italia è la seguente:

- 1) richiesta di IgE specifiche per gruppi di allergeni (inalanti, alimenti, imenotteri ecc.) senza alcuna indicazione clinica;
- 2) richiesta di IgE specifiche con indicazione del/i singolo/singoli allergene/i senza alcuna indicazione clinica;
- 3) richiesta di IgE specifiche (per gruppi o per singoli allergeni) con l'indicazione del/i sintomo/i;
- 4) richiesta di IgE specifiche con l'allegato della visita allergologica e dei risultati dei prick test.

La maggior parte dei Laboratori italiani si trova a eseguire la ricerca di IgE specifiche con le modalità indicate ai punti 1 e 2, con il risultato di utilizzare pannelli predefiniti di allergeni estrattivi (massimo 12 allergeni a pannello). Un numero decisamente inferiore di Laboratori riceve per ciascuna richiesta informazioni clinico-anamnestiche. Pochi sono i centri nei quali l'allergologo clinico governa anche il Laboratorio di allergologia, con ovvie ricadute positive nell'iter diagnostico complessivo.

Una possibile risposta alle situazioni di cui al punto 1 e 2 è la compilazione da parte di ciascun paziente con richiesta di IgE specifiche di un breve report anamnestico contenente quesiti tipo: a) sintomi (nasali, oculari, asma, addominali, cutanei ecc.), b) stagionalità, c) associazione con alimenti (quali), d) contatto con animali, e) esecuzione di vista allergologia e prick, f) candidato ITS, g) altro. La scheda può essere compilata al momento del prelievo con il supporto del personale infermieristico. L'avvento della ricetta elettronica può rendere più semplice il percorso: al medico prescrittore, al momento dell'inserimento del test IgE specifiche, potrebbe essere richiesto di barrare una serie di campi contenenti le informazioni clinico-anamnestiche.

La presenza di una scheda anamnestica modifica sostanzialmente le fasi pre-analitiche e post-analitiche del Laboratorio di allergologia: ciascuna richiesta di IgE specifiche deve essere valutata dal patologo clinico (assieme alla richiesta del medico richiedente) o da personale formato *ad hoc*; tale valutazione porta alla scelta personalizzata di pannelli o di singoli allergeni da testare. In base al risultato dei test ottenuti con allergeni estrattivi, il patologo clinico, con competenze

1 allergologiche, può decidere l'integrazione del test anche con allergeni molecolari, se ciò aumenta il
2 valore informativo del referto. Alla fine dell'iter diagnostico il patologo clinico può inserire un
3 referto interpretativo in grado di spiegare i risultati ottenuti e il percorso diagnostico utilizzato.
4 Questa prassi è indubbiamente onerosa in termini di "time consuming", ma è sicuramente la più
5 efficace in termini sia diagnostici sia di ottimizzazione dei costi.

7 **Referti interpretativi combinati all'utilizzo di allergeni molecolari ubiquitari**

8
9 Gli allergeni molecolari cross-reattivi utilizzati più frequentemente sono profiline, PR10, polcalcine.
10 Di seguito vengono proposti dei commenti generici da utilizzare in caso di positività di allergeni
11 molecolari ubiquitari e che devono essere adattati e personalizzati in base alle peculiarità cliniche e
12 diagnostiche di ciascun paziente.

13
14 a) Commento generico in caso di positività per PR-10: *"È presente positività IgE per PR-10.
15 Tale allergene è indice di sensibilizzazione primaria alla betulla (Bet v 1), ma anche di
16 cross-reattività verso frutti, soprattutto quelli appartenenti alla famiglia delle Rosacee; la
17 positività a PR-10 può associarsi a SOA"*.

18
19 b) Commento generico in caso di positività per profiline:
20 *"È presente positività IgE per profiline (Bet v 2/ Phl p12); le profiline sono allergeni ubiquitari del
21 mondo vegetale e possono essere responsabile di cross-reattività tra pollini e frutta/verdura; la
22 positività per profiline può associarsi a SOA"*.

23
24 c) Commento generico in caso di positività per polcalcine (proteine leganti il calcio):
25 *"È presente positività IgE per polcalcine (Bet v 4/Phl p 7); le polcalcine sono pan-allergeni dei
26 pollini e possono essere responsabile di cross-reattività tra pollini."*

27
28 d) Commento generico in caso di positività per CCD:
29 *"È presente positività IgE per la frazione glucidica cross-reattiva delle glicoproteine (CCD). Gli
30 anti-CCD sono anticorpi cross-reattivi diretti contro epitopi ubiquitari presenti in vegetali,
31 invertebrati, frutta, semi, lattice e veleno di imenotteri. Tali anticorpi sono responsabili di positività
32 dei test in vitro, ma sono di scarsa rilevanza clinica"*.

34 35 36 **Referti interpretativi nelle allergie respiratorie combinati all'utilizzo di allergeni molecolari**

37
38 a) Commento al paziente con sintomi stagionali e mono-sensibilizzazione a pollini: *"Il
39 paziente presenta sensibilizzazione IgE primaria a polline di Graminaceae confermata dalla
40 positività agli allergeni molecolari Phl p 1, Phl p 5"* (aggiungere eventualmente gli altri
41 allergeni molecolari primari risultati positivi di *Phleum pratense* quali Phl p 2, Phl p 4, Phl p
42 6, Phl p 11 - o di *Cynodon dactylon* - Cyn d 1). Analoga formulazione in caso di mono-
43 sensibilizzazione per i pollini di betulle (Bet v 1), parietaria (Par j 2), ambrosia (Amb a 1),
44 assenzio (Art v 1), cipresso (Cup a 1), olivo (Ole e 1), lanciuola (Pla l 1).

45
46 b) Commento al paziente con sintomi stagionali e polisensibilizzazione a pollini: *"Il paziente
47 presenta polisensibilizzazione IgE primaria a pollini di Graminaceae, betulla, Cupressaceae
48 e ambrosia, confermata dalla positività ai rispettivi allergeni molecolari Phl p 1, Phl p 5
49 Bet v 1, Cup a 1 e Amb a 1"*.

50
51 c) Commento al paziente con sintomi stagionali, sensibilizzazione primaria a Graminaceae,
52 positività alle profiline e positività IgE (con allergeni estrattivi) ad altri pollini non
53 confermata dai rispettivi allergeni molecolari: *"Il paziente presenta sensibilizzazione IgE
54 primaria a pollini di Graminaceae confermata dalla positività agli allergeni molecolari Phl
55 p 1, Phl p 5; sono risultate positive le IgE per le profiline (Phl p 12), componenti molecolari
56 ubiquitarie presenti nei pollini, nella frutta e nei semi. La positività IgE alle profiline è
57 responsabile della positività (di tipo cross-reattivo) agli altri pollini"*.

58
59
60 d) Commento al paziente con sintomi perenni e positività agli acari (test cutaneo e/o IgE con
61 antigene estrattivo) e positività a Der p 1 e/o Der p 2: *"Il paziente presenta sensibilizzazione*

IgE primaria agli acari confermata dalla positività agli allergeni molecolari Der p 1 e/o Der p 2”.

- e) Commento al paziente con sintomi perenni e positività agli acari (test cutaneo e/o IgE con antigene estrattivo) e negatività a Der p 1 e/o Der p 2: “*La sensibilizzazione IgE primaria agli acari non è stata confermata dagli allergeni molecolari Der p 1 e/o Der p 2. È possibile che il paziente possa essere sensibilizzato verso allergeni molecolari di acari attualmente non disponibili come test diagnostici*” [57].
- f) Commento al paziente con sintomi e sensibilizzazione *in vitro/vivo* a epiteli animali e conferma con allergeni molecolari. Il commento può variare a seconda dei marcatori utilizzati. In caso di positività per Fel d 1 per gatto (uteroglobulina) o Can f 5 per il cane (kallitreina): “*Il paziente presenta sensibilizzazione IgE primaria ad antigeni specifici di gatto/cane confermata dalla positività agli allergeni molecolari Fel d1/ Can f5*”. Qualora il paziente sia positivo all’allergene estrattivo di cane con conferma per il solo allergene molecolare Can f 5 (e negatività per Can f1) si può aggiungere il commento: “*L’allergene Can f 5 è di origine prostatica: il paziente mono-sensibilizzato a Can f 5 può avere contatti con cani di sesso femminile*”. La positività per le lipocaline deve suggerire un commento così orientato: “*Il paziente presenta sensibilizzazione IgE a lipocaline (Can f 1 ecc.), allergeni ubiquitari di animali con pelo. Il paziente può presentare sintomi in presenza di più animali a pelo*”[58]. Ulteriore commento ai test può essere inserito nel caso in cui il paziente, sensibilizzato al gatto, riferisca manifestazioni allergiche all’assunzione di carne di maiale e presenti positività all’allergene molecolare Fel d 2 (siero-albumina): “*La sensibilizzazione all’allergene molecolare di gatto Fel d 2 può associarsi a sintomi legati all’assunzione di carne di maiale; l’allergene Fel d 2 (siero-albumina) è infatti presente anche nella carne suina*”.
- g) Commento al paziente con sintomi respiratori e positività alle muffe (*Alternaria alternata* e *Aspergillus fumigatus*) e conferma con allergeni molecolari. Se positività per Alt a 1 “*Il paziente presenta sensibilizzazione IgE primaria ad Alternaria*”. Se il paziente è positivo a uno o più allergeni molecolari di *Aspergillus* i commenti possono diversificarsi in quanto “*La sensibilizzazione IgE per Asp f 1 e/o Asp f 3 si riscontra più frequentemente in soggetti con rino-sinusite e asma allergico*”. “*La sensibilizzazione IgE per Asp f 2 e/o Asp f 4 e/o Asp f 6 si riscontra più frequentemente in soggetti con aspergillosi bronco-polmonare*”.

Referto interpretativo in casi con positività al latex e conferma con allergeni molecolari

Paziente con positività al solo allergene molecolare Hev b 8: “*La sola positività IgE per Hev b 8 è riconducibile a una reazione cross-reattiva per profiline, allergeni ubiquitari di origine vegetale. Tale positività non provoca reazioni severe al contatto con il lattice, pertanto non sono necessarie procedure “latex free” in ambito sanitario*”[59]. In caso di positività per qualsiasi altro allergene molecolare di latex il referto dovrà indicare: “*Sensibilizzazione IgE primaria al latex confermata dagli allergeni molecolari Hev b...*”.

La positività per l’allergene estrattivo di latex può anche essere provocata dalla presenza di IgE per CCD. In caso di positività IgE per CCD e negatività per tutti gli allergeni molecolari di latex il commento deve indicare che “*La positività all’estratto k 82 è con elevata probabilità legata alla presenza di IgE anti-CCD. Tale positività è di scarsa rilevanza diagnostica, in quanto gli anti-CCD sono anticorpi cross-reattivi diretti contro epitopi glucidici ubiquitari (presenti in vegetali, invertebrati, frutta, lattice); non si può tuttavia escludere in assoluto una positività specifica diretta per componenti minori di latex non disponibili in ambito diagnostico*”.

In presenza di sintomi con alcuni tipi di frutta e positività a Hev b 5, Hev b 6 e Hev b 11 va indicato che “*I sintomi riferiti dal paziente al contatto con frutta (kiwi, avocado ecc.) sono*

1 da ricondurre a reazione crociata da sensibilizzazione primaria al latex e confermata dalla
2 positività per gli allergeni molecolari *Hev b...* ”.

3
4
5
6 **Referti interpretativi nelle allergie alimentari combinati all'utilizzo di allergeni molecolari**

- 7
8
9 a) Commento al paziente con positività alla frutta fresca e conferma con allergeni
10 molecolari. In caso di sola positività per PR10 o profiline in soggetti che riferiscono
11 sintomi al contatto con la frutta fresca (*Rosaceae*): *“Il paziente presenta sensibilizzazione*
12 *a PR-10 e/o profiline. Tali positività, indice di cross-reattività pollini/frutta, si associano*
13 *generalmente a sintomi locali (sindrome orale allergica). La cottura della frutta elimina*
14 *l'allergenicità in quanto PR10 e profiline sono labili al calore”*. In caso di positività per
15 le molecole termo e gastro-resistenti (nsLTP) il commento dovrà essere condizionato dal
16 quesito diagnostico: in un paziente che riporta sintomi sistemici all'ingestione di frutta
17 fresca e presenta positività per Pru p 3 (LTP della pesca) il commento può essere: *“È*
18 *presente positività IgE all'allergene molecolare maggiore di pesca Pru p 3 appartenente*
19 *alla famiglia delle ns Lipid Transfer Proteins (nsLTPs); queste molecole sono termo- e*
20 *gastro-stabili e possono essere responsabili di reazioni allergiche anche severe”*.
- 21
22 b) Commento al paziente con positività alla frutta secca e conferma con allergeni
23 molecolari: per l'allergia alla frutta secca, come indicato in precedenza, è disponibile un
24 numero significativo di allergeni molecolari in grado di orientare la diagnosi. A
25 differenza delle profiline, delle PR10 e delle nsLTP, peraltro presenti anche nella frutta
26 secca, l'omologia di sequenza tra le molecole appartenenti alla famiglia delle proteine di
27 deposito (2S-albumine, cupine) è scarsa, pertanto è necessario avere una corretta
28 informazione anamnestica del cibo responsabile dei sintomi per la scelta delle molecole
29 da utilizzare; questo aspetto risulta rilevante al momento della stesura di un commento ai
30 test. In caso di paziente con positività per PR 10 o profiline il commento sarà quello già
31 indicato precedentemente. In presenza invece di positività IgE per nsLTPs, cupine o 2S
32 albumine il commento può essere il seguente: *“L'indagine con allergeni molecolari ha*
33 *dimostrato positività per allergeni specifici di alimenti appartenenti al gruppo delle*
34 *nsLTP (es Jug r 3, Cor a 8) o delle proteine di deposito (es Cor a 4, Cor a 9, Jug r 1, Ses*
35 *i 1) dei semi/frutta a guscio. La sensibilizzazione verso tali allergeni, proteine stabili al*
36 *calore e resistenti agli enzimi digestivi, può associarsi a reazione allergica di tipo*
37 *sistemico”*.
- 38
39 c) Commento al paziente con positività alla soia e conferma con allergeni molecolari: il
40 commento a una positività alla soia può ricalcare quanto indicato per la frutta secca nel
41 caso di positività per le molecole stabili al calore e alla digestione e quindi responsabili
42 di sensibilizzazione primaria quali Gly m 5 (vicilina) e Gly m 6 (legumina). Nel caso
43 invece la positività a sola PR-10, in un soggetto con sintomi da ingestione di soia, il
44 commento può essere così impostato: *“Positività a Gly m 4 (PR10), indice di*
45 *sensibilizzazione crociata con pollini. Tale positività in genere si associa a SOA, ma in*
46 *alcuni casi può associarsi anche a manifestazioni sistemiche”*.
- 47
48 d) Commento al paziente con positività al grano e conferma con allergeni molecolari: la
49 positività agli allergeni estrattivi del grano può essere determinata da IgE anti-profiline
50 (vedi commento specifico) . In presenza, invece, di positività per l'allergene molecolare
51 Tri a 19 (ω -5 gliadina): *“L'analisi con allergeni molecolari ha dimostrato positività per*
52 *Tri a 19. Tale allergene è stato correlato con una specifica forma di allergia alimentare*
53 *al grano indotta da esercizio fisico (oppure da FANS o alcol)”*.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- e) Commento al paziente sintomatico con positività al pesce e conferma con allergeni molecolari: *“Il paziente presenta sensibilizzazione IgE primaria alla parvalbumina di pesce (Gad c 1 e/o Cyp c 1); vista l’elevata omologia delle parvalbumine, reazioni avverse si possono avere con la maggior parte dei pesci a lisca”*.
- f) Commento al paziente sintomatico con positività ai crostacei confermata con allergeni molecolari: *“Il paziente presenta sensibilizzazione IgE primaria ai crostacei confermata dalla positività all’allergene molecolare Pen a 1 tropomiosina; è consigliata l’eliminazione dalla dieta dei crostacei”*. Per il paziente sintomatico positivo agli allergeni estrattivi di crostacei e negativo a Pen a 1: *“La sensibilizzazione IgE primaria ai crostacei non è stata confermata dall’allergene molecolare Pen a 1. È possibile che il paziente possa essere sensibilizzato verso allergeni molecolari di crostacei attualmente non disponibili come test diagnostici”*.
- g) Commento al paziente con positività al latte confermata con allergeni molecolari: *“Il paziente presenta positività IgE alla componente del latte caseina (Bos d 8), proteina stabile al calore responsabile di manifestazioni allergiche anche all’assunzione di latte bollito”*; oppure *“Il paziente presenta positività IgE alle componenti del latte alfa-lattoglobulina (Bos d 4) e/o beta-lattoglobulina (Bos d 5), proteine poco stabili al calore; possibile tolleranza dell’alimento se ben cotto”*.
- h) Commento al paziente con positività all’uovo confermata con allergeni molecolari: *“Il paziente presenta positività IgE alla componente dell’uovo Gal d 1 ovomucoide, proteina stabile al calore e gastro-resistente, responsabile di manifestazioni allergiche anche all’assunzione di uovo ben cotto”* oppure *“Il paziente presenta positività IgE all’ovoalbumina (Gal d 2), proteina labile al calore; possibile tolleranza all’uovo se ben cotto”*.
- i) Commento al paziente con positività alle carni e conferma con allergeni molecolari: in presenza di una reattività IgE all’estratto di carne di maiale e positività all’allergene molecolare Fel d 2 sieralbumina: *“I sintomi riferiti dal paziente all’assunzione di carne di maiale sono da ricondurre a una cross-reattività IgE con sieralbumina di gatto confermata dalla positività all’allergene molecolare Fel d 2 (cat-pork syndrome)”*. In caso di allergia ritardata alla carne rossa indotta da positività ad alpha-Gal: *“Sensibilizzazione ad alpha-Gal. Tale sensibilizzazione può associarsi a un’allergia ritardata (4-6 ore dall’assunzione dell’alimento) alla carne rossa”*.
- In un paziente con sintomi legati all’assunzione di carne di pollo e positività all’allergene Gal d 5 livetina (presente solo su ISAC): *“I sintomi riferiti dal paziente all’assunzione di carne di pollo sono da ricondurre a una cross-reattività IgE con proteine dell’uovo confermata dalla positività all’allergene molecolare Gal d 5 livetina”*.

Referti interpretativi nelle allergie agli imenotteri combinati all’utilizzo di allergeni molecolari

I risultati dei test IgE per gli allergeni molecolari di veleno di imenotteri si devono associare al riscontro anamnestico, ai risultati dei test *in vivo*, dei test *in vitro* con allergeni estrattivi ed eventualmente al test di inibizione. Una positività IgE per CCD può dirimere false positività ottenute con allergeni estrattivi. Il commento può essere per esempio *“È presente positività IgE per la frazione glucidica cross-reattiva delle glicoproteine (CCD). Gli anti-CCD sono anticorpi cross-reattivi diretti contro epitopi ubiquitari presenti nel veleno di imenotteri (oltre che in vegetali, frutta, acari) e spiega la positività per Apis mellifera ottenuta con l’allergene estrattivo, ma non confermata dagli allergeni molecolari di ape*

1 (Api m1, Api m 10). La positività per CCD non ha rilevanza diagnostica. La positività per
2 Ves v 5 supporta la diagnosi di sensibilizzazione a Vespula”. In caso di difficoltà
3 interpretative tra Vespula e Polistes l’utilizzo di Ves v 5 e Pol d 5 può essere di supporto se
4 la differenza del risultato quantitativo di IgE tra le due molecole supera il 45-50% “La
5 concentrazione di IgE per Ves v 5 risulta essere significativamente più elevata di Pol d5.
6 Dai dati di letteratura questo riscontro orienta la diagnosi di sensibilizzazione IgE a veleno
7 di Vespula”.

11 **Referti interpretativi da associare all’utilizzo del microarray**

14 Il *microarray* attualmente in commercio dosa simultaneamente IgE per 112 allergeni
15 molecolari. Il sistema commerciale permette di refertare i risultati indicando, in ordine di stampa, i
16 risultati positivi per gli allergeni molecolari indicativi di sensibilizzazione primaria, i risultati dei
17 molecolari positivi per gli allergeni ubiquitari raggruppati per famiglie allergeniche e
18 successivamente vengono riportati i risultati negativi. La positività per ciascun molecolare viene
19 espressa in unità arbitrarie (ISU) e, in rapporto alla concentrazione, viene stampata una stringa con
20 diverso colore (progressivamente: giallo, arancione, rosso) accanto a ogni risultato positivo; ciò
21 permette visivamente di avere una panoramica generale sulle eventuali polisensibilizzazioni e sulla
22 complessità del risultato.

25 Il test molecolare con tecnica *microarray* va considerato un test di 3° livello riservato allo
26 specialista per dirimere casi dubbi e complessi. I commenti interpretativi a tale test, quindi, oltre a
27 essere potenzialmente molti e non schematizzabili nella presente rassegna, possono essere anche di
28 scarsa utilità, dal momento che il test dovrebbe sempre essere poi interpretato e utilizzato da un
29 allergologo clinico con competenze in diagnostica molecolare.

37 **Appendice**

38 Hanno collaborato alla realizzazione di questo documento, partecipando alla revisione del lavoro, i
39 seguenti componenti del Gruppo di Studio di Allergologia della Società Italiana di Patologia Clinica
40 e Medicina di Laboratorio:

- 41 1. Agostini Pierfrancesco, Patologia Clinica e Laboratorio Analisi, Ospedale don Tonino Bello,
42 Molfetta (BA)
- 43 2. Antico Antonio, Laboratorio Analisi, ULSS 4, Santorso (VI)
- 44 3. Bagnasco Marcello, DIMI, Università di Genova, Genova
- 45 4. Bonaguri Chiara, Laboratorio diagnostica ematochimica, Azienda Ospedaliero-Universitaria,
46 Parma
- 47 5. Caponi Laura, U.O. Laboratorio Analisi Specializzate Azienda Ospedaliero-Universitaria
48 pisana
- 49 6. Caruso Beatrice, Laboratorio Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche Azienda
50 Ospedaliera di Verona
- 51 7. Deleonardi Gaia, Laboratorio Analisi, Ospedale Maggiore, Bologna
- 52 8. Milanese Bruno, Patologia clinica, Desenzano del Garda (BS)
- 53 9. Musso Maura Fabrizia, Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera, Santa Croce, Cuneo
- 54 10. Platzgummer Stefan, Laboratorio centrale, Ospedale Civile di Merano (BZ)

Bibliografia

1. Wide L, Bennich H, Johansson SG (1967) Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen antibodies. *Lancet* 2:1105-1107
2. Pastorello EA, Incorvaia C, Ortolani C et al (1995) Studies on the relationship between the level of specific IgE antibodies and the clinical expression of allergy: I. Definition of levels distinguishing patients with symptomatic from patients asymptomatic allergy to common aeroallergens. *J Allergy Clin Immunol* 96:580-587
3. Paganelli R, Ansotegui IJ, Sastre J et al (1998) Specific IgE antibodies in the diagnosis of atopic disease. Clinical evaluation of a new in vitro test system, UniCAP, in six European allergy clinics. *Allergy* 53:763-768
4. Sodestrom L, Kober A, Ahlstedt S et al (2003) A further evaluation of the clinical use of Specific IgE antibody testing in allergic diseases. *Allergy* 58:921-928
5. Sastre J (2010) Molecular diagnosis in allergy. *Clin Exp Allergy* 40:1442-1460
6. Stumvoll S, Westritschnig K, Lidholm J et al (2003) Identification of cross-reactive and genuine *Parietaria judaica* pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 111:974-979
7. Uasuf CG, Villalta D, Conte ME et al (2015) Different co-sensitizations could determine different risk assessment in peach allergy? Evaluation of an anaphylactic biomarker in Pru p 3 positive patients. *Clin Mol Allergy* 13:30
8. Asero R (2010) Lo stato dell'arte della CRD: cosa sono e a cosa servono i componenti molecolari. *Ligand Assay* 15:12-13
9. Ollert M, Weissenbacher S, Rakoski J, Ring J (2005) Allergen-specific IgE measurement by a continuous random-access immunoanalyzer: interassay comparison and agreement with skin testing. *Clin Chem* 51:1241-1249
10. Iancovici-Kidon M, Tim CF (2007) Component-specific immunoglobulin E in the diagnosis of allergic disease in childhood: more of the same or something more? *Isr Med Assoc J* 9:476-478
11. Hauser M, Roulias A, Ferreira F, Egger M (2010) Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy, Asthma Clin Immunol* 6:1
12. Valenta R, Twaroch T, Swoboda I (2007) Component-resolved diagnosis to optimize allergen-specific immunotherapy in the Mediterranean area. *J Invest Allergol Clin Immunol* 17(Suppl.1):88-92
13. Sastre J (2013) Molecular diagnosis and immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 13:646-650
14. Schmidt Andersen M-B, Hall S, Dragsted LO (2011) Identification of European allergy patterns to the allergen families PR-10, LTP and profilin from Rosaceae fruits. *Clinic Rev Allergy Immunol* 41:4-19
15. Peixinho C, Tavares-Rataldo P, Tomàs MR et al (2008) Latex allergy: new insights to explain different sensitization profiles in different risk groups. *Br J Dermatol* 159:132-136
16. Muller UR, Johansen N, Petersen AB et al (2009) Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and *Vespula* venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m 1 and Ves v 5. *Allergy* 64:543-548
17. Radauer C, Bublin M, Wagner S et al (2008) Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J Allergy Clin Immunol* 121:847-852
18. Harwanegg C, Hiller R (2006) Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: state-of-the-art and future development. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 38:232-236
19. De Knop KJ, Bridts CH, Verweij MM et al (2010) Component-resolved allergy diagnosis by microarray: potential, pitfalls and prospects. *Adv Clin Chem* 50:87-101
20. Gadisseur R, Chapelle JP, Cavalier E (2011) A new tool in the field of in-vitro diagnosis of allergy: preliminary results in the comparison of ImmunoCAP® 250 with the ImmunoCAP® ISAC. *Clin Chem Lab Med* 49:277-280

21. Villalta D, Conte M, Asero R et al (2013) Isolated IgE reactivity to native walnut vicilin-like protein (nJug r 2) on ISAC™ microarray is due to cross-reactive carbohydrate epitopes. *Clin Chem Lab Med* 51:1991-1995
22. Goikoetxea MJ, D'Amelio CM, Martínez-Aranguren R et al (2016) Is microarray analysis really useful and sufficient to diagnose nut allergy in the Mediterranean area? *J Investig Allergol Clin Immunol* 26:31-39
23. Melioli G, Marcomini L, Agazzi A et al (2010) Diagnostica allergologica e CRD: il ruolo del laboratorio di patologia clinica. *Ligand Assay* 15:52-65
24. Canonica GW, Ansotegui IJ, Pawankar R et al (2013) A WAO-ARIA-GA²LEN consensus document on molecular based allergy diagnostics. *World Allergy Organ J* 6:17
25. Douladiris N, Savvatianos S, Roumpedaki I et al (2013) A molecular diagnostic algorithm to guide pollen immunotherapy in Southern-Europe: towards component-resolved management to allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 162:163-172
26. Valenta R, Hayek B, Seiberler S et al (1998) Calcium-binding allergens: from plants to man. *Int arch Allergy Immunol* 117:160-166
27. Villalta D, Asero R (2010) Sensitization to pollen pan-allergen profiling: Is the detection of Immunoglobulin E to multiple homologous proteins from different sources clinically useful? *J Investig Allergol Clin Immunol* 20:591-595
28. Asero R (2012) Component- resolved diagnosis-assisted prescription of allergen-specific immunotherapy: a practical guide. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 44:183-187
29. Ciprandi G, Incorvaia C, Frati F; Italian Study Group on Polysensitization (2015) Management of polysensitized patient: from molecular diagnostics to biomolecular immunotherapy. *Exp Rev Clin Immunol* 11:973-976
30. Resch Y, Weghofer M, Seiberler S et al (2011) Molecular characterization of Der p 10: a diagnostic marker for broad sensitization in house dust mite allergy. *Clin Exp allergy* 41:1468-1477
31. Virtanen T, Kinnunen T, Ritkönen-Nissinen M (2012) Mammalian lipocalins allergens-insights into their enigmatic allergenicity. *Clin Exp Allergy* 42:494-504
32. Voltolini S, Spigno F, Cioè A et al (2013) Bovine serum albumin: a double allergy risk. *Eur Ann allergy Clin Immunol* 45:144-147
33. Feo Brito F, Alonso AM, Carnés J et al (2012) Correlation between Alt a 1 levels and clinical symptoms in *Alternaria alternate*-monosensitized patients. *J Invest Allergol Clin Immunol* 22:154-159
34. Cramer R, Hemmann S, Ismail C et al (1998) Disease-specific recombinant allergens for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Int Immunol* 10:1211-1216
35. van Gasse AL, Mangodt EA, Faber M et al (2015) Molecular allergy diagnosis: status anno 2015. *Clin Chim Acta* 444:54-61
36. Villalta D, Asero R (2010) Is the detection of multiple Bet v1-homologous food allergens by means of microarray clinically useful? *J Allergy Clin Immunol* 125:1158-1161
37. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V et al (2011) Pru p 3-sensitized Italian peach-allergic patients are less likely to develop severe symptoms when also presenting IgE antibodies to Pru p 1 and Pru p 4. *Int Arch Allergy Immunol* 156:362-372
38. Savvatianos S, Konstantinopoulos AP, Borgå A et al (2015) Sensitization to cashew nut 2S albumin, Ana o 3, is highly predictive of cashew and pistachio allergy in Greek children. *J Allergy Clin Immunol* 136:192-194
39. Klemans RJ, van Os-Menderdorp H, Blankenstijn M et al (2015) Diagnostic accuracy of specific IgE to components in diagnosing peanut allergy: a systematic review. *Clin Exp Allergy* 45:720-730
40. Krause S, Reese G, Randow S et al (2009) Lipid Transfer Protein (Ara h 9) as a new peanut allergen relevant for a Mediterranean allergic population. *J Allergy Clin Immunol* 124:771-778
41. Pedrosa M, Boyano-Martínez T, García-Ara C et al (2015) Utility of specific IgE to Ara h 6 in peanut allergy diagnosis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 115:108-112

42. Kukkonen AK, Pelkonen AS, Mäkinen-Kiljunen S et al (2015) Ara h 2 and Ara 6 are the best predictors of severe peanut allergy: a double-blind placebo-controlled study. *Allergy* 70:1239-1245
43. Kleine-Tebbe J, Vogel L, Crowell DN et al (2002) Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1-related PR-10 protein in soybean, SAM22. *J Allergy Clin Immunol* 110:797-804
44. Matricardi PM, Bockelbrink A, Beyer K et al (2007) Primary versus secondary Immunoglobulin E to soy and wheat in the multi-centre allergy study cohort. *Clin Exp Allergy* 38:493-500
45. Morita E, Kunie K, Matsuo H (2007) Food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Dermatol Sci* 47:109-117
46. Bugajska-Schretter A, Grote M, Vangelista L et al (2000) Purification, biochemical, and immunological characterisation of a major food allergen: different immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound forms of carp parvalbumin. *Gut* 46:661-669
47. Poulsen LK, Hansen TK, Nørgaard A et al (2001) Allergens from fish and egg. *Allergy* 56 (Suppl.67):39-42
48. Pascal M, Grishina G, Yang AC et al (2015) Molecular diagnosis of shrimp allergy: efficiency of several allergens to predict clinical reactivity. *J Allergy Clin Immunol Pract* 3:521-529
49. Giuffrida MG, Villalta D, Mistrello G et al (2014) Shrimp allergy beyond tropomyosin in Italy: Clinically relevance of arginine kinase, sarcoplasmic calcium binding protein and hemocyanin. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 46:172-177
50. Asero R, Mistrello G, Amato S et al (2012) Shrimp allergy in Italian adults. A multicenter study showing a high prevalence of sensitivity to novel high molecular weight allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 157:3-10
51. Bartnikas LM, Sheehan WJ, Hoffman EB et al (2012) Predicting food challenge outcomes for baked milk: role of specific IgE and skin prick testing. *Ann Allergy Asthma Immunol* 109:309-313
52. Benhamou AH, Caubet JC, Eigenmann PA et al (2010) State of the art and new horizons in the diagnosis and management of egg allergy. *Allergy* 65:283-289
53. Steinke JW, Platts-Mills TAE, Commins SP (2015) The alpha-gal story: lesson learned from connecting the dots. *J Allergy Clin Immunol* 135:589-596
54. Villalta D, Pantarotto L, Da Re M et al (2016) High prevalence of sIgE to galactose- α 1,3-galactose in rural pre-Alps area: a cross-sectional study. *Clin Exp Allergy* 46:377-380
55. Muller U, Schmid-Grendelmeier P, Hausmann O, Helbling A (2012) IgE to recombinant allergens Api m1, Ves v 1, and Ves v 5 distinguish double sensitization from crossreaction in venom allergy. *Allergy* 67:1069-1073
56. Ollert M, Blank S (2015) Anaphylaxis to insect venom allergy: role of molecular diagnostics. *Curr Allergy Asthma Rep* 15:26
57. Resh Y, Michel S, Kabesch M et al (2015) Different IgE recognition of mite allergen components in asthmatic and nonasthmatic children. *J Allergy Clin Immunol* 136:1083-1091
58. Liccardi G, Bilò MB, Manzi F et al (2015) What could be the role of molecular-based allergy diagnostics in detecting the risk of developing allergic sensitization to furry animals? *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 47:163-167
59. Schuler S, Ferrari G, Schmid-Grendelmeier P, Harr T (2013) Microarray-based component-resolved diagnosis of latex allergy: isolated IgE-mediated sensitization to latex profilin Hev b8 may act as confounder. *Clin Transl Allergy* 283:7022-7023

Fonte allergenica	Componente specifica maggiore	Componente specifica minore	Componente cross-reattiva
Graminacee (<i>Phleum pratense</i>)	Phl p1* Phl p5*	Phl p 2* Phl p 4* Phl p 6* Phl p 11*	Phl p7 (polcalcina)* Phl p 12 (profilina)*
Graminaceae (<i>Cynodon dactylon</i>)	Cyn d 1*		Cyn d 7 (polcalcina) Cyn d 12 (profilina)
Betulla (<i>Betula verucosa</i>)	Bet v 1*	Bet v 6*	Bet v 2 (profilina)* Bet v 4 (polcalcina)*
Parietaria judaica	Par j 2 (nsLTP)*	Par j 1 (nsLTP)	Par j 3 (profilina) Par j 4 (polcalcina)
Olivo (<i>Olea europea</i>)	Ole e 1*	Ole e 7 (nsLTP)* Ole e 9 (1-3 beta-gluconase)*, Ole 5, Ole 6, Ole 10, Ole 11	Ole e 2 (profilina) Ole e 3 (polcalcina) Ole e 8 (polcacina)
Cipresso (<i>Cupressus arizonica</i>)	Cup a 1*		
Assenzio (<i>Artemisia vulgaris</i>)	Art v 1 (defensin-like protein)*	Art v 3 (nsLTP)* Art v 6	Art v 4 (profilina) Art v 5 (polcalcina)
Ambrosia (<i>Ambrosia artemisiifolia</i>)	Amb a 1 (pectate-lyase)*	Amb a 3 Amb a 4 (defensin-like protein) Amb a 6 (nsLTP)	Amb a 8 (profilina) Amb a 9 (polcalcina)
Lanciola (<i>Plantago lanceolata</i>)	Pla l 1*		Pla l 2 (profilina)
Platano (<i>Platanus acerifolia</i>)	Pla a 1**	Pla a 2** Pla a 3 (nsLTP)	
Dermatophagoides pt.	Der p 1 (cistein-proteasi)* Der p 2 (NPC2)* Der p 23	Der p 3, Der p 4, Der p 5, Der p 6, Der p 7, Der p 8, Der p 9, Der p 11, Der p 14, Der p 15, Der p 18, Der p 21, Der p 24	Der p 10 (tropomiosina)* Der p 20 (arginin-kinasi)
Epitelio di gatto (<i>Felis domesticus</i>)	Fel d 1* (secretoglobulina)	Fel d 3 (cistatina) Fel d 5 (IgA) Fel d 6 (IgG) Fel d 7 Fel d 8	Fel d 2 (sieroalbumina)* Fel d 4 (lipocalina)*
Epitelio di cane (<i>Canis familiaris</i>)	Can f 1 (lipocalina)*	Can f 5 (kallicroina)*	Can f 2 (lipocalina)* Can f 6 (lipocalina) Can f 3 (sierolbumina)*
Alternaria alternata	Alt a 1*	Alt a 3, Alt a 4, Alt a 5, Alt a 6, Alt a 7, Alt a 8, Alt a 10, Alt a 12, alt a 13, Alt a 14, Alt a 15	
Latex	Hev b1*, Hev b 3* Hev b 5*, Hev b 6*	Hev b 4, Hev b 7, Hev b 9*, Hev b 11*, Hev b 12, Hev b 13, Hev b 14. Hev b 15	Hev b 8 (profilina)*

Tabella 1 Principali molecole identificate nelle fonti allergeniche inalatorie più importanti

*Molecole attualmente disponibili per diagnostica monoplex.

**Molecole attualmente disponibili solo nella diagnostica multiplex (ISAC).

Fonte allergenica	Componente specifica maggiore	Componente specifica minore	Componenti cross-reattive
Pesca	Pru p 3 (nsLTP)*	Pru p 7 (pemacleina)	Pru p 1 (PR-10)* Pru p 4 (profilina)*
Mela	Mal d 3 (nsLTP)*		Mal d 1 (PR-10)* Mal d 4 (profilina)
Nocciola	Cor a 14 (2S-albumina)* Cor a 8 (nsLTP)* Cor a 9 (legumina)*	Cor a 6, Cor a 10, Cor a 11(vicilina), Cor a 12 (oleosina), Cor a 13 (oleosina),	Cor a 1 (PR-10)* Cor a 2 (profilina)
Noce	Jug r 1 (2S-albumina)* Jug r 2 (vicilina)** Jug r 3 (nsLTP)*	Jug r 4 (legumina)	
Noce brasiliana	Ber e 1(2S-albumina)*	Ber e 2 (cupina)	
Arachide	Ara h 1 (vicilina)* Ara h 2 (2S-albumina)* Ara h 3 (legumina)* Ara h 9 (nsLTP)*	Ara h 6 (2S-albumina)** Ara h 7 (2S-albumina) Ara h 10 (oleosina) Ara h 11 (olesosina) Ara h 12, Ara h 13, Ara h 14, Ara h 15, Ara h 16, Ara h 17	Ara h 8 (PR-10)* Ara h 5 (profilina)
Anacardio (Pistacchio)	Ana o 1 (vicilina) Ana o 2 (legumina)** Ana o 3 (2s-albumina)*		
Soia	Gly m 5 (vicilina)* Gly m 6 (legumina)*	Gly m 7, Gly m 8 (2S-albumina)	Gly m 4 (PR-10)* Gy m 3 (profilina)
Sesamo	Ses i 1 (2S-albumina)** Ses i 3(vicilina) Ses i 4 (oleosina) Ses i 5 (oleosina) Se i 6 (legumina)	Ses i 2 (2S-albumina) Ses i 7 (legumina)	
Grano	Tri a 14 (nsLTP)* Tri a 19 (ω -5 gliadina)*	Tri a 18 (aglut./isoelect.) Tri a 20 (γ -gliadina) Tri a 25 (tioredoxina) Tri a 26 e 36 (glutenine) Tri a 37 (α -purotionina) Tri a 40 (inib. A-amilasi)** Tri a 41, 42, 43, 44, 45	Tri a 12 (profilina)
Latte	Bos d 4 (α -lattoalbumina)* Bos d 5 (β -lattoglobulina)* Bos d 8 (caseine)*	Bos d 2 (lipocalina) Bos d 3 (S100 CBP) Bos d 6 (sieroalbumina) Bos d 7 (Immunoglobuline) Bos d Lattoferrina **	
Uova	Gal d 1 (ovomucoide)* Gal d 2 (ovoalbumina)* Gal d 3 (ovotranferrina)*	Gal d 4 (lisoizima)* Gal d 5 (livetina) ** Gal d 6 (YGP42) Gal d 7 (catena leggera miosina)	
Merluzzo	Gad c 1 (parvalbumina)*	Gad m 2 (enolasi) Gad m 4 (aldolsi)	
Gamberetto	Pen i 1 (tropomiosina)* Pen m 1 (tropomiosina)**	Pen m 2 (arginin-kinasi)** Pen m 3 (cat. leg. miosina) Pen m 4 (CBP sarcopl.)**	

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Tabella 2 Principali molecole identificate nelle fonti allergeniche alimentari più importanti
*Molecole attualmente disponibili per diagnostica monoplex.
**Molecole attualmente disponibili solo nella diagnostica multiplex (ISAC).

Fonte allergenica	Allergene	Nome biochimico
-------------------	-----------	-----------------

Fonte allergenica	Molecole allergeniche	Suggerimenti comportamentali nei pazienti sintomatici
-------------------	-----------------------	---

<i>Apis mellifera</i>	Api m 1* Api m 2 Api m 3 Api m 4** Api m 5 Api m 6 Api m 7 Api m 8 Api m 9 Api m 10* Api m 11 Api m 12	Fosfolipasi A ₂ Ialuronidasi Fosfatasi acida Mellitina Dipetidil-peptidasi IV CUB serin-proteasi Carbossilesterasi Serin-carbossipeptidasi Icarapina variante 2 Proteina maggiore della pappa reale Vitellogenina
<i>Vespula vulgaris</i> (giallone)	Ves v 1* Ves v 2 Ves v 3 Ves v 5* Ves v 6	Fosfolipasi A ₁ Ialuronidasi Dipeptidil-peptidasi IV Antigene 5 Vitellogenina
<i>Polistes dominulus</i> (vespa)	Pol d 1 Pol d 4 Pol d 5*	Fosfolipasi A ₁ Serin-proteasi Antigene 5
<i>Vespa crabro</i> (calabrone)	Vesp c 1 Vesp c 5	Fosfolipasi A _{1B} Antigene 5

Tabella 3 Principali molecole allergeniche identificate nei veleni di imenotteri.

*Molecole disponibili per la diagnostica monoplex.

**Molecole disponibili solo con diagnostica multiplex (ISAC).

Animali domestici	Fel d 1	Evitare contatto con gatti
	Fel d 2	Evitare contatti con gatti. In alcuni casi ci possono essere reazioni avverse alla carne di maiale (<i>cat-pork syndrome</i>)
	Can f 1, Can f 2, Fel d 4, Equ c 1	Evitare contatto con gatti, cani e cavalli
	Can f 5	È possibile avere contatti solo con cani di sesso femminile
Frutta fresca	Pru p 3 e/o Mal d 3	Evitare la frutta soprattutto se non sbucciata, anche se cotta, tostata o sotto forma di succo di frutta
	Pru p 1, Pru p 4	È possibile assumere frutta purché cotta, tostata o sotto forma di succo di frutta
Frutta secca: Nocciola	Cor a 8, Cor a 9, Cor a 14	Evitare assunzione di nocciola in qualsiasi forma
Frutta secca: Noce	Jug r 1, Jug r 3	Evitare assunzione di noce in qualsiasi forma
Frutta secca: Noce brasiliana	Ber e 1	Evitare assunzione di noce brasiliana in qualsiasi forma
Frutta secca: Pistacchio / anacardio	Ana o 3	Evitare assunzione di pistacchio e anacardio in qualsiasi forma
Frutta secca: Arachide	Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 9	Evitare assunzione di arachide in qualsiasi forma
	Ara h 8	È possibile assumere arachide tostata
	PR-10 e profiline da sole	È possibile assumere frutta secca tostata
Grano	Tri a 19	I soggetti con allergia al grano esercizio indotta non devono eseguire esercizi fisici (o assumere ASA/alcol) nelle successive 4 ore dall'ingestione di grano
Crostacei	Pen a 1, Pen m 1, Pen m 2, Pen m 4	Evitare i crostacei
Pesce	Gad c 1 e/o Cyp c 1	Evitare i pesci a lisca; in alcuni casi possono essere tollerati tonno, sgombro, halibut e passera di mare
Latte	Bos d 8	Evitare i cibi contenenti latte e suoi derivati anche se cotti
	Bos d 4, Bos d 5	Evitare i cibi con latte crudo; sono tollerati i derivati del latte se ben cotti
Uovo	Gal d 1	Evitare tutti i cibi contenenti uova
	Gal d 2	Sono tollerati i cibi contenenti uova purché ben cotti
Soia	Gly m 5, Gly m 6	Evitare assunzione di cibi contenenti soia in qualsiasi forma
Latex	Hev b 1, Hev b 3, Hev b 11	Evitare contatto con lattice
	Hev b 5, Hev b 6.01, Hev b 6.02, Hev b 9	Evitare il contatto con latex. In alcuni soggetti ci possono essere reazioni avverse con kiwi, avocado, banana, castagna
	Hev b 8 da solo	Non è necessario evitare i manufatti in lattice

Tabella 4 Indicazioni schematiche sulle misure da adottare in caso di sensibilizzazione a specifiche molecole allergeniche di origine animale, alimentare e del latex

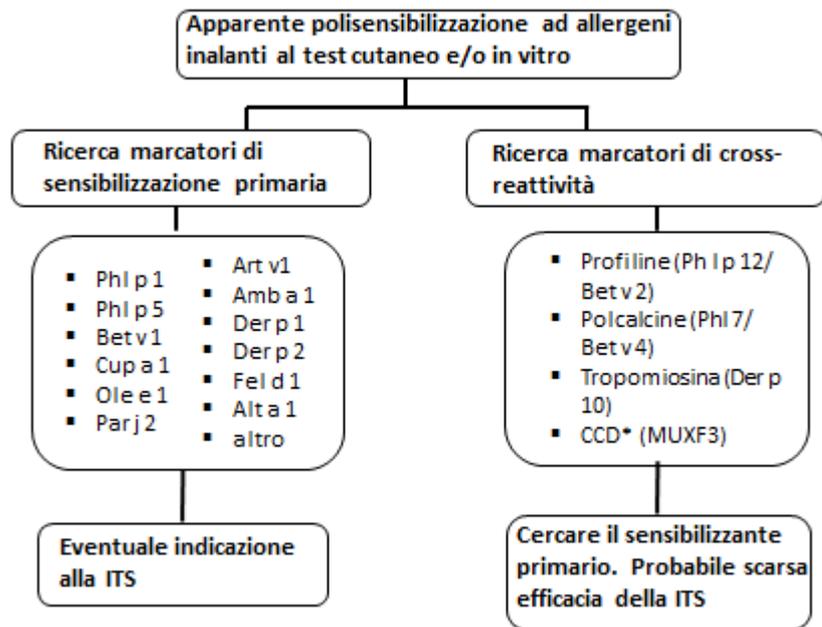


Figura 1 Schema generale dell’algoritmo diagnostico molecolare in caso di apparente polisensibilizzazione ai test cutanei e/o in vitro ad allergeni inalanti.

I marcatori di sensibilizzazione primaria e quelli di cross-reattività verranno scelti di volta in volta in base alle positività ottenute con gli estratti.

*La ricerca dei CCD verrà eseguita in caso di positività dei test *in vitro*.

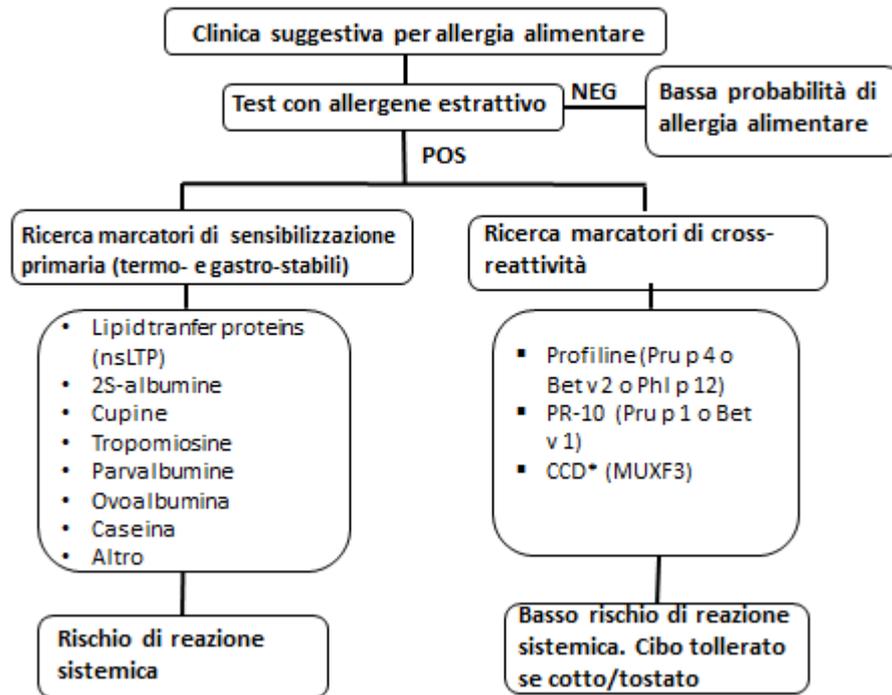


Figura 2 Schema generale dell’algoritmo diagnostico molecolare in caso di apparente polisensibilizzazione ai test cutanei e/o *in vitro* ad allergeni alimentari. I marcatori di sensibilizzazione primaria e quelli di cross-reattività verranno scelti di volta in volta in base alle positività ottenute con gli estratti.
*La ricerca dei CCD verrà eseguita in caso di positività dei test *in vitro*.

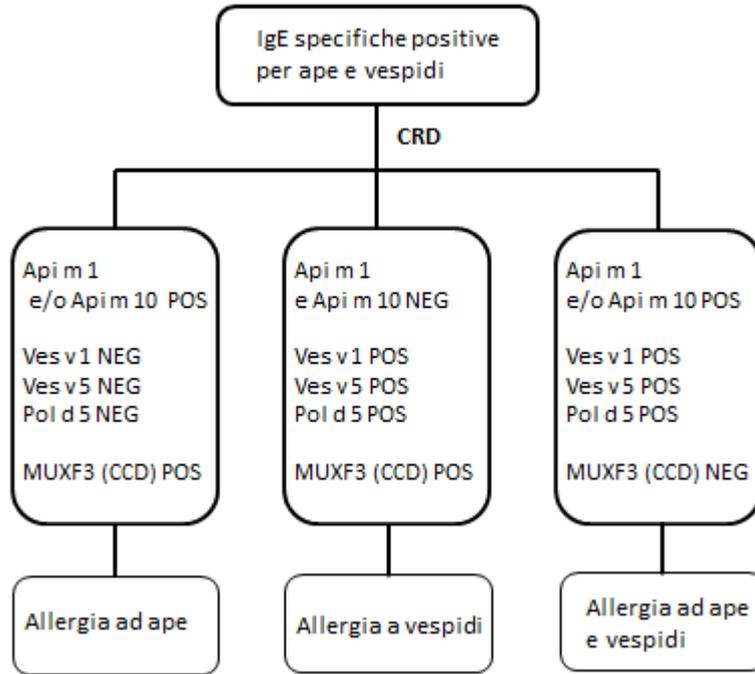


Figura 3 Schema di CRD in caso di duplice positività per ape e vespidi al dosaggio delle IgE specifiche con estratti.