

La diagnosi di allergia respiratoria: buon uso dei mezzi attuali e nuovi strumenti diagnostici

F. Bruni, L. Balanzoni, G. Parolin, A.L. Boner

Clinica Pediatrica, Università di Verona

Riassunto

Si è dimostrata l'importanza sia per i pediatri allergologi e/o pneumologi, sia per i pediatri di base, di identificare correttamente gli allergeni responsabili di asma nei loro pazienti. La combinazione di storia clinica ed esame obiettivo insieme alla determinazione della presenza di IgE specifiche sia mediante prick test sia mediante test sierici, può essere utilizzata per stabilire l'eziologia di patologie allergiche. Altri test quali ad esempio la misurazione delle IgE totali, la conta degli eosinofili nel sangue e la misurazione dell'Ossido Nitrico esalato (eNO) possono essere la spia iniziale di patologia atopica e pertanto possono essere utilizzati per ricerca o occasionalmente in pazienti particolarmente difficili.

Summary

The diagnosis of respiratory allergy: good use of the current means and new diagnostic instruments

The importance both for allergologist and/or pneumologist pediatricians and for general pediatricians to correctly identify allergens determining asthma in their patients has been clearly demonstrated.

Allergy can be suspected by clinical history, physical examination, and etiology can be further documented by means of skin prick test and serum tests for specific IgE determination.

Second line tests, that can be helpful in the initial evaluation of atopic disease or sporadically in complicated cases, are the quantification of serum total IgE, blood eosinophils number, and NO exhalation test.

Introduzione

La possibilità di seguire e studiare coorti di bambini dalla nascita all'età di manifestazione dell'asma, ha permesso di concludere che l'atopia è un fattore di rischio sia per lo sviluppo di asma¹, sia per la sua persistenza², sia per la severità clinica delle manifestazioni³. Difatti, i livelli di IgE, la conta degli eosinofili nel sangue periferico e la reattività agli *skin prick test* sono maggiori nei soggetti affetti da asma severa rispetto ai pazienti in cui la malattia ha manifestazioni più lievi o rispetto ai controlli⁴. L'atopia che si manifesta durante l'infanzia può essere considerata un marker predittivo della severità dell'iperresponsività bronchiale che comparirà in seguito⁵. Inoltre livelli di funzionalità respiratoria ridotti, un aumento di prevalenza di ipereattività bronchiale (IB) e maggior severità della sintomatologia respiratoria sono stati osservati in pazienti con positività agli *skin*

prick test rispetto a coloro che risultavano negativi⁶.

Nonostante ciò, di recente si è messo in discussione il fatto che l'esposizione ad un allergene provochi sensibilizzazione a quel allergene e che la ripetuta esposizione all'allergene in soggetti già sensibilizzati provochi infiammazione delle vie aeree ed IB con conseguente sviluppo d'asma⁷. Quindi è stato proposto che alla base vi sia una predisposizione genetica all'asma e che questa possa incrementare la suscettibilità dei soggetti a sensibilizzarsi nei confronti degli allergeni^{8,9}. Comunque recentemente è stato documentato che il rischio di presentare IB in età scolare è molto più elevato nei bambini che diventano allergici precocemente agli acari e che la funzionalità respiratoria è molto più compromessa nei soggetti sensibili esposti a dosi elevate di allergene rispetto a quelli che ugualmente sensibili sono esposti a dosi basse di allergene o rispetto ai soggetti non sensibili¹⁰.

Per di più l'esposizione ad allergeni verso i quali i pazienti asmatici sono reattivi, è associato alla frequenza d'ospedalizzazione¹¹ e alle crisi potenzialmente fatali^{12,13}. Pertanto il rapporto di causa ed effetto tra esposizione all'allergene, sensibilizzazione e comparsa di malattia viene fortemente rafforzato. Per tale motivo è importante individuare la presenza di sensibilizzazione atopica nei bambini asmatici per impartire consigli riguardo l'allontanamento dall'allergene, la prescrizione della terapia antinfiammatoria nei periodi di esposizione e l'eventuale programmazione dell'immunoterapia specifica¹⁴.

L'utilizzo della storia clinica per la valutazione di atopia

Un indizio importante per sospettare la presenza di atopia nei bambini asmatici è la storia clinica di dermatite atopica e la sensibilizzazione all'uovo durante l'infanzia¹⁵. A tal riguardo, valori di IgE specifiche per uovo maggiori di 2 KU/L, associati a familiarità per atopia, hanno un valore predittivo positivo per sensibilizzazione nei confronti di allergeni inalanti all'età di 3 anni del 78%¹⁵⁻¹⁷. E' stato dimostrato che domande dettagliate, formulate da allergologi esperti e rivolte ai genitori per predire la sensibilizzazione ad allergeni inalanti nei loro figli, generalmente hanno una specificità (capacità di individuare i soggetti liberi da malattia) di circa l'80% e tuttavia una non buona sensibilità (capacità di individuare i veri positivi) che varia dall'11% al 56% a seconda degli allergeni¹⁸. In uno studio, per esempio, la domanda: "il tuo bambino sta peggio quando si fanno i letti?" fallisce il rilevamento dei bambini sensibilizzati nei confronti degli acari della polvere nell'88,9% dei casi. Sembra pertanto che domande specifiche abbiano un valore limitato nel predire la sensibilizzazione a specifici allergeni, ma ci sono d'aiuto nell'escludere l'allergia¹⁸. In un altro studio condotto su bambini asmatici, l'accuratezza diagnostica (capacità di individuare sia i veri positivi, sia i veri negativi) è del 65%, 50% e del 56% rispettivamente per gatto, acari della polvere e graminacee¹⁹. Pertanto la storia positiva per allergia è considerata un predittore insufficiente di una risposta positiva ai test di allergia di scarso conto e sembra che tener conto della severità dell'asma non migliori il risultato¹⁹. In generale i questionari sono meno sensibili nel predire la sensibilizzazione nei confronti degli acari della polvere rispetto ai pollini ed agli animali domestici. Tuttavia è stato dimostrato che in bambini allergici agli acari della polvere la risposta positiva a una combinazione di domande quali ad esempio il peggioramento dei sintomi quando la casa viene pulita e i letti vengono fatti ed il miglioramento negli ambienti esterni e secchi aumenta la sensibilità della storia clinica dal 29,8% al 54,2%²⁰. Generalizzando, tuttavia, i genitori e i pazienti hanno scarsa capacità di predire correttamente la risposta positiva agli *skin prick test* verso inalanti mentre sono in grado di predire la risposta

negativa con ragionevole accuratezza²¹. Inoltre, quando si analizza la storia clinica di atopia in bambini asmatici, si deve prendere in considerazione la possibilità di trovarsi di fronte a pazienti con sensibilizzazione asintomatica, ciò può interessare dall'8% al 30% della popolazione generale²².

Skin prick test

Gli *skin prick test* sono la metodica più comune e meno costosa per testare l'allergia di tipo immediato. La risposta agli *skin prick test* dipende da una serie di variabili che spaziano dalla standardizzazione e dalla potenza degli estratti all'effetto del trattamento farmacologico, inoltre includono l'abilità dell'operatore e i differenti dispositivi che vengono utilizzati per pungere la cute²³. In generale l'utilizzo di differenti metodiche per pungere la cute e di diversi tipi di allergeni può portare a risultati errati che includono sia falsi positivi, sia falsi negativi²⁴⁻²⁷. Gli *skin prick test* possono essere eseguiti sia durante la prima infanzia^{28,29}, sia durante o al di fuori della stagione dei pollini in pazienti sensibilizzati nei confronti di allergeni dell'esterno³⁰. Non è necessario ripeterli in quanto utilizzando la stessa metodica e gli stessi estratti, risultati discordanti si hanno al massimo nell'1% dei casi³¹. La metodica assai diffusa di asciugare semplicemente la lancetta tra un test e l'altro può portare ad un numero inaccettabile di falsi positivi che va da 12,5% a 67,5%³². Pertanto, bisognerebbe utilizzare lancette diverse per testare allergeni diversi.

Per tutti questi motivi, i *prick test* devono essere eseguiti da medici esperti e in luoghi attrezzati per il trattamento dell'anafilassi, reazione che si può verificare, anche se raramente, durante la procedura³³.

IgE sieriche specifiche

Considerando le difficoltà legate all'esecuzione degli *skin prick test*, la misurazione in vitro dei livelli di IgE specifiche può costituire la metodica di scelta per medici non abituati ad eseguire gli *skin prick test*. In generale indicazioni per l'esecuzione di test in vitro sono: impossibilità dei pazienti a sospendere gli antistaminici, patologie generalizzate della cute quali ad esempio la dermatite atopica, la presenza di orticaria o dermografismo e reazioni a cibo o farmaci che mettano in pericolo la vita del paziente. Sul mercato esistono numerosi test immunologici e l'esecuzione analitica delle diverse metodiche in diversi laboratori può dare risultati poco precisi con un coefficiente di variabilità di risposta che va da 5% a 49%^{34,35}. Il *gold standard* per la misurazione in vitro di IgE specifiche è il Pharmacia CAP System che include un'ampia superficie fase-solida per il legame delle proteine allergizzanti, estratti allergenici ben standardizzati per l'accoppiamento, una soluzione mista di anticorpi anti-IgE policlonali e monoclonali per incrementare il range del test e di conseguenza per ridurre gli errori umani³⁶.

Per semplificare la differenziazione tra bambini sensibilizzati e quelli no, è possibile utilizzare un unico test di laboratorio (Phadiatop o Phadiatop Paediatric) che ci permette di individuare le IgE specifiche per più allergeni contemporaneamente. UniCAP Phadiatop è un mix di allergeni inalanti mentre UniCAP Phadiatop Paediatric include anche allergeni alimentari. Ovviamente queste metodiche ci danno una misurazione di atopia ma non forniscono informazioni verso quali specifici allergeni il paziente è sensibilizzato³⁷. Phadiatop Paediatric non è in grado di distinguere le allergie respiratorie indotte dai pollini della betulla rispetto a quelle indotte da altri alberi, perciò in bambini di età maggiore ai 5-6 anni Phadiatop è da preferirsi al Phadiatop Paediatric³⁸. E' stato dimostrato che la sensibilità e la specificità clinica del Phadiatop sono rispettivamente di 93% e 89% similmente a quelle del UniCAP specific IgE (89% e 91% rispettivamente)³⁹. Questi test sono stati utilizzati per predire lo sviluppo di patologie allergiche in lattanti e bimbi piccoli^{40,41} e per predire la gravità delle manifestazioni cliniche⁴² sebbene l'utilizzo del Phadiatop Paediatric negli studi epidemiologici sia limitato dalla sua bassa sensibilità (22-47%)⁴³. Dal momento che questi test individuano solo i pazienti sensibilizzati da quelli che non lo sono verso i più comuni allergeni, il loro impiego è raccomandato per medici generici in quanto possono essere d'aiuto per decisioni diagnostiche⁴⁴.

Test non specifici

Test non specifici come, ad esempio, la misurazione delle IgE totali e la conta degli eosinofili nel sangue possono essere la spia iniziale di patologia atopica.

Tuttavia, il vasto range di valori di IgE totali riscontrabili in soggetti normali e la considerevole sovrapposizione dei range di valori dei soggetti normali con quello dei soggetti atopici, limita l'utilità diagnostica delle IgE totali sieriche nell'identificazione dei pazienti asmatici atopici⁴⁵.

Una concentrazione di eosinofili ematici $\geq 4\%$ è uno dei fattori di rischio minori per lo sviluppo di asma nei bimbi che presentano *wheezing*¹ e la presenza di eosinofilia quando i bimbi sono affetti da bronchiolite da Virus Respiratorio Sinciziale, costituisce un marker positivo per lo sviluppo di *wheezing* persistente nella terza infanzia⁴⁶. Sebbene la causa più comune di eosinofilia nei paesi industrializzati sia riconducibile all'atopia, tuttavia l'eosinofilia si presenta in una vasta gamma di altre patologie che devono essere prese in considerazione ed escluse nel caso in cui la clinica del paziente non sia significativa di patologia atopica⁴⁷.

Per l'identificazione di reazioni infiammatorie atopiche si può procedere anche con la valutazione di alcune molecole secrete in diversi fluidi corporei dagli eosinofili stessi quali, ad esempio, la proteina X eosinofila, la proteina cationica eosinofila, la perossidasi eosinofila o la neurotossina derivante dagli eosinofili⁴⁸.

Sebbene il riscontro di elevati livelli di questi mediatori possa riflettere la presenza di atopia⁴⁹, l'utilizzo di questi marker in studi epidemiologici volti all'identificazione dei soggetti asmatici e atopici è ancora una volta limitato dalla considerevole sovrapposizione tra i valori riscontrati nei controlli e quelli riscontrabili in pazienti sintomatici⁵⁰.

Un altro marker d'infiammazione, che viene sempre più utilizzato come strumento che riflette l'infiammazione a livello delle vie aeree è l'Ossido Nitrico esalato (eNO)⁵¹. L'eNO sembra correlare con l'infiammazione indotta dagli eosinofili in particolar modo nei pazienti atopici esposti a dosi considerevoli di allergene⁵²⁻⁵⁴ anche se minimamente sintomatici⁵⁵. Inoltre la misurazione dell'eNO ha i vantaggi di essere semplice e non invasiva⁵⁵. Tuttavia, sono necessari studi longitudinali prospettici che valutino la correlazione tra questo marker d'infiammazione e la clinica in modo da stabilire l'utilità clinica di questo test⁵¹.

Test di provocazione bronchiale

Test di provocazione bronchiale allergene specifici rappresentano degli strumenti di ricerca frequentemente utilizzati⁵⁶. La provocazione bronchiale induce nei soggetti asmatici con sensibilizzazione specifica verso un allergene, bronco-ostruzione reversibile, infiammazione delle vie aeree e iperresponsività bronchiale ovvero riproduce le caratteristiche classiche dell'asma. La provocazione bronchiale rappresenta l'ultimo *step* per la misurazione della responsività e della reattività bronchiale verso un allergene specifico e può essere utile anche nella valutazione dei casi che presentano storia clinica discordante rispetto ai risultati degli *skin prick test* o delle IgE specifiche sieriche⁵⁷⁻⁵⁹.

I test di provocazione bronchiale possono scatenare grave broncoostruzione, quindi devono essere effettuati solo da medici esperti⁵⁶. Per tale ragione e per l'elevata frequenza di co-morbidità tra asma allergico e rinite allergica^{60,61}, possono essere eseguiti test di provocazione nasale^{62,63} o congiuntivale^{64,65}.

Conclusioni

Gli studi epidemiologici hanno dimostrato chiaramente che la sensibilizzazione ad allergeni perenni è il fattore di rischio di maggior rilevanza per lo sviluppo d'asma rispetto a qualsiasi altro fattore ambientale⁶⁶, persino più importante della storia familiare positiva per asma^{2,66}. Inoltre l'esposizione a quantitativi d'allergene significativi rappresenta un importante fattore di rischio per il peggioramento della sintomatologia e per l'esacerbazioni¹¹⁻¹³. Inoltre si è dimostrata l'importanza sia per i pediatri allergologi e/o pneumologi, sia per i pediatri di base, di corretta identificazione degli allergeni responsabili di asma nei loro pazienti. La combinazione di storia clinica ed esame obiettivo insieme alla determinazione della presenza di IgE specifiche sia mediante *prick test* sia mediante test sierici, può essere

utilizzata per stabilire la diagnosi di patologie allergiche. Altri test possono essere utilizzati per ricerca o occasionalmente in pazienti particolarmente difficili.

References

1. Castro-Rodriguez JA, Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD. A clinical index to define risk of asthma in young children with recurrent wheezing. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162:1403-6.
2. Sears MR, Greene JM, Willian AR, Wiecek EM, Taylor DR, Flannery EM, et al. A longitudinal, population-based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood. *N Engl J Med* 2003; 349:1414-22.
3. Rasmussen F, Taylor DR, Flannery EM, Cowan JO, Green JM, Herbison GP, et al. Risk factors for hospital admission for asthma from childhood to young adulthood: a longitudinal population study. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:220-7.
4. Kelly WJ, Hudson I, Phelan PD, Pain MC, Olinsky A. Atopy in subjects with asthma followed to the age of 28 years. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85:548-57.
5. Van Asperen PP, Kemp AS, Mukhi A. Atopy in infancy predicts the severity of bronchial hyperresponsiveness in later childhood. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85:790-5.
6. Clough JB, Williams JD, Holgate ST. Effect of atopy on the natural history of symptoms, peak expiratory flow, and bronchial responsiveness in 7- and 8-year-old children with cough and wheeze. A 12-month longitudinal study. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:755-60.
7. Pearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy. *Thorax* 1999; 54:268-72.
8. Patino CM, Martinez FD. Interactions between genes and environment in the development of asthma. *Allergy* 2001; 56:279-86.
9. Crestani E, Guerra S, Wright AL, Halonen M, Martinez FD. Parental asthma as a risk factor for the development of early skin test sensitization in children. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:284-90.
10. Illi S, von Mutius E, Lau S, Niggeman B, Gruber C, Wahn. Perennial allergen sensitization early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study. *Lancet* 2006; 368:763-70.
11. Dales RE, Cakmak S, Judek S, Dann T, Coates F, Brook JR, et al. Influence of outdoor aeroallergens on hospitalization for asthma in Canada. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:303-6.
12. Bush RK, Prochnau JJ. *Alternaria*-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:227-34.
13. Black PN, Udy AA, Brodie SM. Sensitivity to fungal allergens is a risk factor for life-threatening asthma. *Allergy* 2000; 55:501-4.
14. Saltoun C. Update on efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinitis and asthma. *Allergy and Asthma Proc* 2002; 23:377-80.
15. Nickel R, Kulig M, Forster J, Bergmann R, Bauer CP, Lau S, et al. Sensitization to hen's egg at the age twelve months is predictive for allergic sensitization to common indoor and outdoor allergens at the age of three years. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:613-7.
16. Tariq SM, Matthews SM, Hakim EA, Arshad SH. Egg allergy in infancy predicts respiratory allergic disease by 4 years of age. *Pediatr Allergy Immunol* 2000; 11:162-7.
17. Rhodes HL, Sporik R, Thomas P et al. Early life risk factors for adult asthma: a birth cohort study of subjects at risk. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:720-5.
18. Murray AB, Milner RA. The accuracy of features in the clinical history for predicting atopic sensitization to airborne allergens in children. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96:588-96.
19. Carter ER, Pulos E, Delaney J, Matheson EJ, Moffitt DR. Allergy history does not predict skin test reactivity in asthmatic children. *J Asthma* 2000; 37:685-90.
20. Murray AB, Milner RA. Are combinations of questions better than individual questions for detecting sensitization to mite allergen? *Pediatric Allergy Immunol* 1996; 7:147-50.
21. Li JT, Andrist D, Bamlet WR, Wolter TD. Accuracy of patient prediction of allergy skin test results. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 85:382-4.
22. Bodtger U. Prognostic value of asymptomatic skin sensitization to aeroallergens. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4:5-10.
23. Wood AR. Skin testing: making the most of every prick. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 88:347-9.
24. Rhodius R, Wickens K, Cheng S, Crane J. A comparison of two skin test methodologies and allergens from two different manufactures. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 88:374-9.
25. Nelson HS, Lahr J, Buchmeier A, McCormick D. Evaluation of devices for skin prick testing. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101:153-6.
26. Adinoff AD, Rosloniec DM, McCall LL, Nelson HS. A comparison of six epicutaneous devices in the performance of immediate hypersensitivity skin testing. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84:168-74.
27. Zarei M, Remer CF, Kaplan MS, Staveren AM, Lin CK, Razo E, et al. Optimal skin prick wheal size for diagnosis of cat allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; 92:604-10.
28. Van Asperen PP, Kemps AS, Mellis CM. Skin test reactivity and clinical allergen sensitivity in infancy. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73:381-6.
29. Menardo JL, Bousquet J, Rodiere M, Astruc J, Michel FB. Skin test reactivity in infancy. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75:646-51.
30. Sin BA, Inceoglu O, Mungan D, Celik G, Kaplan A, Misirligil Z. Is it important to perform pollen skin prick tests in the season? *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 86:382-6.
31. Devenney I, Falth-Magnusson K. Skin prick test in duplicate: is it necessary? *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 87:386-9.
32. Piette V, Bourret E, Bousquet J, Demoly P. Prick tests to aeroallergens: is it possible simply to wipe the devices between tests? *Allergy* 2002; 57: 940-2.
33. Vanin E, Zanconato S, Baraldi E, Marczazzo L. Anaphylactic reaction after skin-prick testing in an 8-year-old boy. *Pediatr Allergy Immunol* 2002; 13:227-8.
34. Williams PB, Barnes JH, Szeinbach SL, Sullivan TJ. Analytic precision and accuracy of commercial immunoassays for specific IgE: establishing a standard. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:1221-30.
35. Szeinbach SL, Barnes JH, Sullivan TJ, Williams PB. Preci-

- sion and accuracy of commercial laboratories' ability to classify positive and/or negative allergen-specific IgE results. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 86:373-81.
36. Williams PB. Usefulness of specific IgE antibody tests: a progress report. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 91:518-24.
 37. Matricardi PM, Fattorossi A, Nisini R, Le Moli S, Castagliuolo PP, D'Amelio R. A new test for specific IgE to inhalant allergens (Phadiatop) in the screening of immediate respiratory hypersensitivity states. *Ann Allergy* 1989; 63:532-5.
 38. Lilja G, Kusoffsky E, Johansson SG, Oman H. Screening of atopic allergy in 5-year-old-children a comparison of the diagnostic properties of Phadiatop Paediatric and Phadiatop Allergy 1995; 50:316-21.
 39. Paganelli R, Ansotegui IJ, Sastre J, et al. 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* 1998; 53:763-8.
 40. Kotaniemi-Syrjanen A, Reijonen TM, Romppanen J, Korhonen K, Savolainen K, Korppi M. Allergen-specific immunoglobulin E antibodies in wheezing infants: the risk for asthma in later childhood. *Pediatrics* 2003; 111:255-61.
 41. Wever-Hess J, Kouwenberg JM, Duiverman EJ, Hermans J, Wever AM. Prognostic characteristics of asthma diagnosis in early childhood in clinical practice. *Acta Paediatr* 1999; 88:827-34.
 42. Wickman M, Ahlstedt S, Lilja G, van Hage Hamsten M. Quantification of IgE antibodies simplifies the classification of allergic disease in 4-year-old children. A report from the prospective birth cohort study – BAMSE. *Pediatr Allergy Immunol* 2003; 14:441-7.
 43. Lilja G, Oman H, Johansson SG. Development of atopic disease during childhood and its prediction by Phadiatop Paediatric. *Clin Exp Allergy* 1996; 26:1073-9.
 44. Williams PB, Siegel C, Portnoy J. Efficacy of a single diagnostic test for sensitization to common inhalant allergens. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 86:196-202.
 45. Baldacci S, Omenaas E, Oryszczyn MP. Allergy markers in respiratory epidemiology. *Eur Respir J* 2001; 17:773-90.
 46. Ehlenfeld DR, Cameron K, Welliver RC. Eosinophilia at the time of respiratory syncytial virus bronchiolitis predicts childhood reactive airway disease. *Pediatrics* 2000; 105:79-83.
 47. Rothenberg ME. Eosinophilia. *New Eng J Med* 1998; 338:1592-600.
 48. Venge P. Monitoring the allergic inflammation. *Allergy* 2004; 59:26-32.
 49. Gore C, Peterson CG, Kissen P et al. Urinary eosinophilic protein X, atopy, and symptoms suggestive of allergic disease at 3 years of age. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:702-8.
 50. Tauber E, Halmerbauer G, Frischer T, Gartner C, Horak F Jr, Veiter A, et al. Urinary eosinophil protein X in children: the relationship to asthma and atopy and normal values. *Allergy* 2000; 55:647-52.
 51. Zeidler MR, Kleerup EC, Tashkin DP. Exhaled nitric oxide in the assessment of asthma. *Curr Opin Pul Med.* 2004; 10:31-6.
 52. Olin AC, Alving K, Toren K. Exhaled nitric oxide: relation to sensitization and respiratory symptoms. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:221-6.
 53. Silvestri M, Sabatini F, Spallarossa D, Fregonese L, Battistini E, Biraghi MG, et al. Exhaled nitric oxide levels in non-allergic and allergic mono- or polysensitized children with asthma. *Thorax* 2001; 56:857-62.
 54. Silvestri M, Sabatini F, Sale R, Defilippi AC, Fregonese L, Battistini E, et al. Correlation between exhaled nitric oxide levels, blood eosinophilia, and airway obstruction reversibility in childhood asthma are detectable only in atopic individuals. *Pediatr Pulmonol* 2003; 35: 358-63.
 55. Franklin PJ, Turner SW, Le Souef PN, Stick SM. Exhaled nitric oxide and asthma: complex interactions between atopy, airway responsiveness, and symptoms in a community population of children. *Thorax* 2003; 58:1048-52.
 56. Arshad SH. Bronchial allergen challenge: a model for chronic allergic asthma. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:12-5.
 57. Kurtz KM, Hamilton RG, Schaefer JA, Adkinson NF Jr. A hooded exposure chamber method for semiquantitative latex aeroallergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:178-84.
 58. Witterman AM, Mulder M, Aalberse RC, Jansen HM, van der Zee JS. Bronchial allergen challenge in subjects with low levels of allergic sensitization to indoor allergens. *Allergy* 1999; 54:366-74.
 59. Ronborg SM, Mosbech H, Poulsen LK. Exposure chamber for allergen challenge. A placebo-controlled, double-blind trial in house-dust-mite asthma. *Allergy* 1997; 52:821-8.
 60. Peroni DG, Piacentini GL, Alfonsi L, Zerman L, Di Blasi P, Visonà G, et al. Rhinitis in pre-school children: prevalence, association with allergic diseases and risk factors. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:1349-54.
 61. Simon RA. The allergy-asthma connection. *Allergy Asthma Proc* 2002; 23:219-22.
 62. Vinuya RZ. Upper airway disorders and asthma: a syndrome of airway inflammation. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 88:8-15.
 63. Litvyakova LI, Baraniuk JN. Nasal provocation testing: a review. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 86:355-64.
 64. Bonini S, Magrini L, Rotiroli G, Lambiase A, Tomassini M, Rumi C, et al. The eosinophil and the eye. *Allergy* 1997; 52:44-7.
 65. Garcia Robaina JC, Sanchez Machin I, Fernandez-Caldas E et al. Skin tests and conjunctival and bronchial challenges with extracts of *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* in patients with allergic asthma and/or rhinoconjunctivitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 131:182-8.
 66. Peat JK, Li J. Reversing the trend: reducing the prevalence of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:1-10.