

# **RACCOMANDAZIONI PER L'UTILIZZO DELLA DIAGNOSTICA MOLECOLARE IN ALLERGOLOGIA**

*A cura dell'Associazione Italiana degli allergologi e Immunologi territoriali e Ospedalieri (AAIITO)  
e del Gruppo di Studio in Allergologia della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (GdS-ALL SIPMeL)*



# RACCOMANDAZIONI PER L'UTILIZZO DELLA DIAGNOSTICA MOLECOLARE IN ALLERGOLOGIA

Danilo Villalta<sup>1\*o</sup>, Elio Tonutti<sup>2\*</sup>, Nicola Bizzaro<sup>3\*</sup>, Ignazio Brusca<sup>4\*o</sup>, Vittorio Sargentini<sup>5\*</sup>, Riccardo Asero<sup>6o</sup>, Maria Beatrice Bilò<sup>7o</sup>, Giuseppina Manzotti<sup>8o</sup>, Francesco Murzilli<sup>9o</sup>, Antonino Musarra<sup>10o</sup>.

\* Gruppo di Studio in Allergologia della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (GdS-ALL SIPMeL)

o Associazione Italiana degli allergologi e Immunologi territoriali e Ospedalieri (AAIITO)

<sup>1</sup> Allergologia e Immunologia Clinica, Ospedale "S. Maria degli Angeli", Pordenone

<sup>2</sup> Immunopatologia e Allergologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Udine,

<sup>3</sup> Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedali di Tolmezzo, Gemona, San Daniele (UD)

<sup>4</sup> Laboratorio Analisi, Ospedale "Buccheri-La Ferla, Palermo

<sup>5</sup> Laboratorio Analisi, P.T.P, Nuovo Regina Margherita, Roma

<sup>6</sup> Ambulatorio di Allergologia, Clinica San Carlo, Paderno Dugnano (MI)

<sup>7</sup> UOC di Allergologia, Azienda Ospedaliera-Universitaria Ospedali Riuniti-Ancona

<sup>8</sup> Ambulatorio di allergologia, Dipartimento Area Medica, Ospedale di Treviglio (BG)

<sup>9</sup> UOSD di Allergologia, Ospedale S.S. Filippo e Nicola, Avezzano (AQ)

<sup>10</sup> Servizio di Allergologia, Casa della Salute di Scilla (RC)

## Riassunto

Il Gruppo di Studio in Allergologia della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL) e l'Associazione Italiana degli Allergologi e Immunologi territoriali ed ospedalieri (AAIITO) 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 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 tra tutti i componenti che hanno partecipato alla stesura del documento 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, algoritmi diagnostici, dosaggio IgE specifiche, commento interpretativo

## Indice degli argomenti

- La diagnostica molecolare
- Utilità della diagnostica molecolare
- Principali classi di molecole
- Metodi per la diagnostica molecolare
- Diagnostica su microarray
- Raccomandazioni su come usare correttamente la diagnostica molecolare
  - Algoritmi diagnostici nelle allergie respiratorie
  - Algoritmi diagnostici nelle allergie alimentari
  - Algoritmi diagnostici nelle allergie agli imenotteri
- Il commento interpretativo

## Che cos'è la diagnostica molecolare

Dal 1967, anno in cui fu eseguito il primo dosaggio delle IgE specifiche ad opera di Wide e coll. [1], con la nascita del Radioallergosorbent test (RAST), ad oggi, moltissimi progressi sono stati compiuti nel campo della diagnostica allergologica di laboratorio, attraverso varie tappe costituite dallo sviluppo di fasi solide ad 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 sono allergizzanti;*
- *ogni individuo risponde ad un allergene sulla base delle sue 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 ed animali che presentano diversi gradi di omologia strutturale tra di loro. 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*

*ad un'omologia aminoacidica superiore ad almeno il 35-40% e se almeno un frammento minimo di sei aminoacidi è presente sulla struttura primaria di due 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 diverse 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 usate 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 sia dal punto di vista analitico che 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 clinica [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 che, nell'ambito della stessa azienda e tra lotti diversi. Numerosi sono i motivi della difficoltà di standardizzazione degli estratti allergenici, quali le diverse fonti di approvvigionamento, le diverse modalità di estrazione e

purificazione e la possibile presenza nell' estratto di enzimi proteolitici e allergeni contaminanti.

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

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

L'impatto della CRD nella clinica si traduce in quanto segue:

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

## Principali classi di molecole

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

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

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

### *Principali molecole in causa nelle allergie respiratorie*

Le componenti molecolari specifiche maggiori e minori indice di sensibilizzazione primaria ai principali allergeni inalanti sono riportate in Tabella 1. Nella stessa sono anche riportate le molecole cross-reattive quali le profiline, presenti in tutte le cellule eucariote, dotate di elevata omologia e altamente cross-reattive fra tutte le specie di origine vegetale, nonché le polcalcine, presenti solo nei pollini e anch'esse dotate di elevata cross-reattività. Nei pollini, come pure negli alimenti di origine vegetale e nel veleno di imenotteri, sono presenti anche i componenti carboidratici cross-reattivi (CCD). Essi sono componenti in grado di stimolare una risposta anticorpale IgE, ma non di determinare la degranolazione mastocitaria e quindi le manifestazioni cliniche. Le IgE specifiche verso i CCD sono rilevabili solo con i test in vitro e non con i test in vivo. La presenza di IgE verso CCD è quindi causa di apparente polisensibilizzazione nei test in vitro per pollini, alimenti di origine vegetale e imenotteri.

Fra gli allergeni di origine animale, lipocaline e sieralbumine sono anch'esse cross-reattive fra diverse specie.

## Principali molecole in causa nelle allergie alimentari

### 1. Cibi di origine vegetale

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

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

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

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



## 2. *Cibi di origine animale*

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

### *Principali molecole in causa nella allergia agli imenotteri*

Le principali molecole responsabili delle allergie ad imenotteri sono riportate in Tabella 3

## **Metodi per la diagnostica molecolare**

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

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

La diagnostica su *microarray* (ImmunoCAP<sup>®</sup> ISAC), nella sua versione più recente, permette di determinare contemporaneamente e con una piccola quantità di siero (30 microlitri) IgE rivolte verso 112 diverse molecole, 43 delle quali di origine alimentare, numero che sarà sicuramente destinato ad aumentare in futuro [18]. Si tratta di un test che non risponde alla logica di ricercare solo IgE specifiche verso molecole mirate, in base al sospetto clinico,

ma a quella di avere un profilo allergologico il più ampio possibile, ovviamente con il limite del profilo molecolare presente nella matrice. L'interpretazione di questo test, quindi, è più complessa e non scevra di potenziali mis-interpretazioni per cui va riservata a personale con elevate competenze di allergologia molecolare (test di terzo livello) [19]. Il test inoltre è semiquantitativo, calibrato contro uno standard interno e complessivamente di minore accuratezza diagnostica rispetto al test ImmunoCAP [20,21,22].

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

Da un punto di vista meramente economico la diagnostica basata sull'uso del microarray, sulla base degli attuali costi previsti per l'esecuzione dei test, risulta vantaggiosa se la situazione clinica del paziente richiede la ricerca delle IgE specifiche verso un numero di componenti molecolari superiore a 12-13 per rispondere al quesito diagnostico.

### **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 "fattore scatenante" responsabile 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*, alcuni di carattere squisitamente tecnico ed 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 in tutti i test multiplex presenta una diminuita specificità globale;
- 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 (sensibilizzazione asintomatica), 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. Ciò a volte può portare anche ad una inappropriata prescrizione dell’adrenalina autoiniezzabile.
- 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 fra loro ed 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 quello di 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 alla assunzione dell'alimento allergizzante [24]. Per tali motivi, la moderna diagnostica allergologica non può più prescindere dalla diagnostica molecolare. Poiché, però, ad oggi sono state identificate oltre 1000 molecole e un centinaio sono già disponibili in diagnostica, per molti l'approccio alla diagnostica molecolare può risultare difficile. Il nostro scopo, quindi, è quello di proporre degli algoritmi diagnostici semplici per coloro che vogliono approcciare la CRD, con delle esemplificazioni delle più frequenti evenienze nella pratica clinica.

### *Algoritmi diagnostici nelle allergie respiratorie*

Il modello generale di approccio alla CRD nelle allergie respiratorie è schematizzato nella Figura 1.

In casi di polisensibilizzazione, quindi, da un lato vanno ricercate le sensibilizzazioni verso le molecole indice di sensibilizzazione genuina rispetto alle fonti allergeniche risultate positive ai test cutanei o al test in vitro con estratti, dall'altro le molecole causa di reattività crociata [25]. Solo nel caso di IgE specifiche verso le molecole indice di sensibilizzazione genuina possiamo affermare che un soggetto è primariamente sensibilizzato ad una specifica fonte allergenica e quindi potrà essere eligibile all'ITS verso quella specifica fonte allergenica. Qualora, invece, un soggetto risulti positivo a molecole responsabili di cross-reattività (polcalcine, profiline e componenti carboidratici cross-reattivi (CCD) per i pollini, tropomiosine per gli acari), si valuterà di volta in volta, in base alla clinica e alle positività verso le molecole indice di sensibilizzazione genuina, se sarà eligibile per eventuale ITS. Per quanto riguarda la scelta di che polcacina o profilina usare, dal momento che esiste una elevata omologia fra le molecole presenti nelle diverse fonti allergeniche [26,27], in genere basta avere a disposizione una sola di queste molecole. La scelta di quale molecola preferenzialmente usare sarà dettata dalla valutazione della fonte allergenica causa più frequente di sensibilizzazioni nella zona in cui si opera. Nella maggior parte del territorio italiano si tratta delle Graminaceae e quindi si userà Phl p 12 come profilina e Phl p 7 come polcalcina. In alcune zone del nord Italia la maggior fonte di

sensibilizzazione a queste molecole è rappresentata dalla betulla per cui si userà rispettivamente Bet v 2 e Bet v 4.

Da quanto sopra si evince come abbia senso procedere con la diagnostica molecolare solo nel caso si ipotizzi una ITS, altrimenti il maggior costo della stessa non ritrova un riscontro pratico nel trattamento del paziente.

Di seguito vengono riportati alcuni esempi pratici di algoritmi diagnostici:

- a. Soggetto con sintomatologia stagionale che al test cutaneo e/o al test in vitro risulta *polisensibilizzato a pollini* (es Graminaceae, betulla, parietaria, olivo, ambrosia, assenzio, cipresso): si cercheranno le molecole indice di sensibilizzazione genuina (nel caso dell'esempio citato Phl p 1, Phl p5 (Graminaceae), Bet v 1 (betulla), Par j 2 (parietaria), Amb a 1 (ambrosia), Art v 1 (assenzio), Cup a 1 (cipresso) e quelle responsabili di eventuali cross-reattività fra pollini (profiline e polcalcine). Qualora lo stato di apparente polisensibilizzazione sia stato evidenziato con un test in vitro si eseguirà anche la ricerca dei CCD (MUXF3 - epitopo glicosilato della bromelina). In base al risultato del test si valuterà, in associazione alla clinica, se proporrà ITS e per quale/i allergeni [28,29].
- b. Soggetto con sintomi perenni con *positività ad acari* al test cutaneo e/o al test in vitro, con o meno sensibilizzazioni ad altri allergeni: anche se in molti casi di positività ad acari la diagnostica molecolare non è indispensabile per avviare una prescrizione di ITS, essa lo diventa in casi particolari [30]. In tali casi si valuterà se un soggetto è sensibilizzato agli allergeni maggiori degli acari (Der p 1, Der p 2, Der p 23) o alla tropomiosina (Der p 10 o Pen a 1). Se è positivo agli allergeni maggiori può essere considerata l'ipotesi dell'ITS, mentre la sola sensibilizzazione a tropomiosina esclude tale ipotesi, in quanto non è certa una sensibilizzazione primaria agli acari [31]. Purtroppo per quanto riguarda gli acari, non abbiamo ancora a disposizione altre molecole che possono avere un ruolo importante nella sensibilizzazione e quindi allo stato attuale la diagnostica molecolare non è ancora del tutto discriminante.
- c. Soggetto con apparente polisensibilizzazioni al test cutaneo e/o in vitro ad *epiteli animali* (cane, gatto, cavallo). Nel caso degli epitelii animali abbiamo a disposizione alcune molecole indice di sensibilizzazione specie-specifica come la secretoglobulina (uteroglobina) del gatto (Fel d 1) o la arginin- esterasi (kallikreina) (Can f 5) del cane. Le lipocaline (Can f 1, Can f 2, fel d 4, Equ c 1), invece, sono molecole omologhe [32] 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 basta testarne una come molecola indice (es Can f 1). E' 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. E' utile, inoltre, avere a disposizione anche la molecola Fel d 2 (siero-albumina) che è una molecola presente in forma omologa anche nella carni, in particolare in quella del maiale. Soggetti con sensibilizzazione al gatto e positività per tale molecola possono presentare una allergia anche alla carne di maiale (*cat-pork syndrome*) [33].

- 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 nel 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* [34]. La sensibilizzazione a tale molecola, quindi, è un ottimo indicatore per la prescrizione di una 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 a all'asma allergico, viene annoverata anche l'aspergillosi brocopolmonare (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 ed Asp f 6 si associano più specificamente ad ABPA [35].
- e. Soggetti con positività ai test cutanei e/o sierologici per *latex*. Attualmente abbiamo a disposizione per la diagnostica varie molecole (Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5, Hev b 6.02, Hev b 8, 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. Un paziente, quindi, 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 quest'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 ad 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, etc.) (sindrome latex-frutta) [36].

## *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 ad un paziente con anamnesi positiva per reazione allergica e 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 anche gravi, per cui l'alimento in causa va evitato in qualsiasi sua forma (crudo, cotto, tostato) e prescritta l'adrenalina autoiniezzabile. 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 alla 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 molecole termo- e gastro-labili (PR-10, profilina) presenti nella frutta fresca. Per quanto riguarda le nsLTP in genere si usa la Pru p 3, che è la nsLTP della pesca, alimento maggiormente in causa nella sensibilizzazione primaria alla frutta fresca. In alternativa può essere usata Mal d 3 (nsLTP della mela). Per quanto riguarda le PR-10 può essere usata Pru p 1 (PR-10 della pesca), oppure il suo omologo della betulla (Bet v 1), anche se in alcuni casi potrebbe avere una minore sensibilità [37]. Per quanto riguarda le profiline, si può scegliere indifferentemente una tra Pru p 4 (pesca), Bet v 2 (betulla), Phl p 12 (Phleum pratense). La positività a Pru p 3 indica una sensibilizzazione primaria alla frutta fresca e il paziente è a rischio di reazioni sistemiche in seguito all'ingestione della frutta, soprattutto se non pelata (l'allergene è particolarmente concentrato nella buccia). Qualora, invece, la sensibilizzazione sia rivolta a PR-10, profilina o entrambe, trattasi di una reattività crociata con pollini e la sintomatologia si limiterà in genere alla SOA. La frutta in causa potrà essere assunta cotta, tostata o sotto forma di succo di frutta commerciale (pasteurizzato), in quanto PR-10 e profilina sono labili a calore. Nel caso di contemporanea positività per nsLTP e profilina e/o PR-10 in genere i pazienti accusano una sintomatologia più blanda rispetto a quelli con sola positività per nsLTP (effetto protettivo di

PR-10 e profiline) [7,38]. Qualora ci si trovi di fronte a pazienti asintomatici con sola positività al test in vitro è probabile la presenza di IgE specifiche per CCD e quindi si ricercheranno le IgE specifiche per MUXF3. Un caso a sé stante è quello delle reazioni sistemiche da ingestione di sedano, finocchio e spezie diverse nell'ambito della cosiddetta "*mugwort-celery-spice syndrome*". In questo caso la sensibilizzazione primaria è legata ad un allergene minore del peso molecolare di 60 kDa presente nel polline di Artemisia (Compositae) e in forma omologa negli alimenti citati. Allo stato attuale la diagnosi in vitro di tale condizione non è possibile in quanto l'allergene responsabile della cross-reazione è scarsamente caratterizzato e comunque non disponibile in commercio. La diagnosi di tale condizione dovrà indirettamente fondarsi sulla sensibilizzazione primaria ad Artemisia il cui marker è Art v 1 [39-42].

- b. *Soggetto con sintomi legati all'assunzione di frutta secca e relativa positività ai test cutanei e/o ai test in vitro:*
- b1. *Positività alla nocciola.* Vanno ricercate le molecole termo- e gastro-stabili indice di sensibilizzazione primaria, quali Cor a 14 (2S-albumina), Cor a 9 (cupina), Cor a 8 (nsLTP), nonché PR-10 e profilina (vd sopra) indice di cross-reattività con pollini. I pazienti con sensibilizzazioni agli allergeni termo- e gastro-stabili sono a rischio di reazioni severe e devono evitare l'assunzione della nocciola sotto qualsiasi forma. I soggetti sensibilizzati a PR-10 e profilina o a entrambe al più possono presentare una SOA e possono assumere la nocciola se tostata.
  - b2. *Positività alla noce.* Le molecole termo- e gastro-stabili indice di sensibilizzazione primaria a disposizione sono Jug r 1 (2S-albumina) e Jug r 3 (nsLTP). A queste vanno aggiunte PR-10 e profilina (vd sopra) per valutare eventuale cross-reattività con pollini. L'interpretazione del dato ricalca quanto descritto per la nocciola.
  - b3. *Positività alla noce brasiliana.* L'unica molecola a disposizione per la valutazione della sensibilizzazione primaria è Ber e 1 (2S-albumina). A questa va affiancata la ricerca di sensibilizzazione a PR-10 e profilina (vd sopra) e l'interpretazione ricalca quanto descritto per la nocciola
  - b4. *Positività a pistacchio o anacardio.* La molecola termo- e gastro-stabile indice di sensibilizzazione primaria a disposizione è Ana o 3 (2S-albumina dell'anacardio, che ha una elevatissima omologia con la 2S-albumina del pistacchio) [43]. A questa va affiancata la ricerca di PR-10 e profilina (vd sopra) e anche in questo caso l'interpretazione del dato ricalca quanto scritto per la nocciola.



- b5. *Positività ad arachide*. In questo caso la gamma di molecole termo- e gastro-stabili, indice di sensibilizzazione primaria è ampia: Ara h 1 (cupina-vicilina), Ara h 2 (2 S-albumina), Ara h 3 (cupina-legumina), Ara h 9 (nsLTP). Fra queste la molecola più importante è Ara h 2, in quanto presente nella maggioranza (>90%) dei pazienti primariamente sensibilizzati all'arachide [44]. Nell'area mediterranea, però, Ara h 9 sembra rivestire una peculiare importanza [45], per cui va aggiunta ad Ara h 2. A queste molecole va affiancata la ricerca della PR-10 (Ara h 8 o in alternativa Bet v 1) e della profilina. Nel caso di positività ad 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 [46,47].
- 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 ad una maggiore stabilità della PR-10 della soia, Gly m 4, rispetto a PR-10 di altri alimenti [48].
- 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 ( $\omega$ -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. I test con estratti, soprattutto nell'adulto, inoltre, sono poco specifici per le cross-reattività con le Graminaceae [49]. 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 ad una forma specifica di allergia al grano, quale la anafilassi da allergia al grano esercizio indotta. In tale

forma di allergia, l'assunzione di grano è responsabile di sintomi solo se associata ad un esercizio fisico, o in alternativa, a FANS, consumo di alcol o eventi stressanti [50].

- 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 fra le due molecole è alta [51] per cui in genere basta averne a disposizione una. I pesci cartilaginei (razze, torpedini, mante, squali) presentano come allergene la alfa-parvalbumina che mostra una moderata omologia con la beta-parvalbumina e una minore allergenicità [52].  
La positività a parvalbumina conferma la diagnosi di allergia al pesce a lisca e di conseguenza va consigliata l'eliminazione di esso dalla dieta, anche se a volte tonno, halibut, sgombero 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), arginin-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) [53,54]. 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 [55], 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 caseina è correlato con la probabilità di avere sintomi in seguito ad ingestione di latte, nei bambini allergici al latte è utile monitorare il livello di IgE specifiche per valutare la probabilità di una avvenuta tolleranza e/o per decidere quando procedere con il test di tolleranza orale [56].
- h. *Soggetto con sintomi legati ad assunzione di uovo* e positività al test cutaneo e/o al test in vitro: gli allergeni principali dell'uovo sono

rappresentati dall'ovomucoide (Gal d 1), molecola gastro- e termo-resistente e dall'ovoalbumina (Gal d 2), molecola meno resistente al calore. I soggetti sensibilizzati a quest'ultima in genere tollerano gli alimenti ben cotti. Analogamente a quanto descritto per la caseina, il monitoraggio del livello delle IgE specifiche per l'ovomucoide è utile per valutare la probabilità di un'avvenuta tolleranza e/o per decidere quando procedere con il test di tolleranza orale [57].

- i. *Soggetto con sintomi legati ad assunzione di carni rosse*: esistono due diversi tipi di allergie alle carni rosse. Il primo tipo è l'allergia immediata, che ha le caratteristiche di tutte le altre allergie alimentari ed è dovuta alla sensibilizzazioni ad allergeni altamente cross-reattivi come le sieralbumine. Il paradigma di questa forma di allergia è la *cat-pork syndrome* sopra descritta, in cui i sintomi sono scatenati dalla assunzione di carne di maiale, ma non di bue o altri mammiferi, in soggetti sensibilizzati alla sieroalbumina del gatto. In questo caso la diagnosi viene confermata dalla positività delle IgE specifiche verso la sieralbumina di gatto (Fel d 2). Il secondo tipo è l'allergia ritardata alla carne rossa, in cui la reazione compare mediamente dopo 4-6 ore dall'assunzione della carne di mammifero (bue, maiale, agnello, etc.) e l'allergene in causa è un antigene carboidratico (alpha-Gal). La sensibilizzazione non avviene tramite assunzione di carne, ma dopo puntura di una zecca (*Ixodes ricinus* in Europa, *Amblyomma americanum* negli USA) [58,59]. Da poco è a disposizione il test per la ricerca delle IgE specifiche anti-alpha-Gal, diagnostiche per tale forma di allergia.

Uno schema riassuntivo sintetico dei suggerimenti comportamentali in soggetto con sensibilizzazioni alle principali molecole di origine animale, alimentare e del latex è riportato in tabella 4.

### **Algoritmi diagnostici nelle allergie agli imenotteri**

Definire correttamente quale veleno sia la causa di una reazione allergica ad imenotteri è fondamentale per poter prescrivere una immunoterapia corretta ed efficace. Qualora ci si trovi di fronte ad una apparente sensibilizzazione multipla (ape/vespidi o vespuola/Polistes) ai test intradermici o al dosaggio delle IgE specifiche, non è sempre facile discriminare se si tratta di reale polisensibilizzazione o di cross-reattività. A complicare il quadro, quando la diagnostica è eseguita con test in vitro, inoltre, interviene la possibile presenza di IgE specifiche verso i CCD. Metodiche utili a individuare quale veleno abbia la maggiore rilevanza clinica sono il BAT e la RAST inibizione. Quest'ultima consiste nel dosaggio delle IgE specifiche per un dato veleno dopo pre-incubazioni del siero con concentrazioni scalari dei veleni che hanno

dato positività in vitro. Si ottengono, quindi, delle curve di inibizione che sono funzione della concentrazione del veleno inibente. Valori di inibizione superiori al 70% sono considerati indicativi di una marcata cross-reattività, mentre valori inferiori al 25% la escludono. Questo test, comunque, non è in grado di risolvere tutti i casi, oltre ad essere indaginoso e costoso e quindi non alla portata di tutti i laboratori. La CRD in un certo numero di casi può essere di aiuto nel risolvere il quesito [60]. Abbiamo ora a disposizione varie molecole per il veleno d'ape (Api m 1, fosfolipasi A<sub>2</sub>; Api m 2, ialuronidasi; Api m 3, fosfatasi acida; Api m 5, dipeptidil-peptidasi IV, Api m 10, icarapina variante 2), due molecole per la vespa (gialla) (Ves v 1, fosfolipasi A<sub>1</sub>; Ves v 5, antigene 5) e 1 per il *Polistes dominulus* (Pol d 5, antigene 5) (Tabella 3)

In caso di apparente duplice sensibilizzazione al test in vitro tra ape e vespa (Figura 3), l'uso della diagnostica molecolare è in grado nella maggioranza dei casi distinguere se si tratta di cross-reattività dovute alla presenza di CCD o di co-sensibilizzazione [61].

Meno semplice è la distinzione tra vespa e *Polistes*, vista la cross-reattività fra le specie. [62]

## **Il commento interpretativo**

Il patologo clinico con esperienza allergologica 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. Le modalità con cui vengono richieste le IgE specifiche per allergeni estrattivi nei Laboratori di Allergologia in Italia è la seguente:

- 1) Richiesta di IgE specifiche per gruppi di allergeni (inalanti, alimenti, imenotteri, etc.) senza alcuna indicazione clinica
- 2) Richiesta di IgE specifiche per 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 esegue 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, nei laboratori dove esiste un patologo clinico con competenze allergologiche, è la compilazione da parte del medico non allergologo, che richiede IgE specifiche per allergeni estrattivi, di un breve report anamnestico contenente una serie di quesiti (es. sintomi, stagionalità, esecuzione di vista allergologia e prick, etc.). L'avvento della ricetta elettronica può rendere più semplice il percorso con la richiesta al medico prescrittore di "barrare" una serie di campi contenenti le informazioni clinico/anamnestiche. Ciò può portare il patologo clinico alla scelta personalizzata di pannelli o di singoli allergeni da testare e alla eventuale integrazione dell'indagine con allergeni molecolari. Questa prassi è indubbiamente onerosa in termini di "time consuming" ma è sicuramente la più efficace sia in termini diagnostici che di ottimizzazione dei costi.

La diagnostica molecolare in ambito allergologico ha rappresentato una vera rivoluzione avendo di fatto modificato il concetto di allergia con un linguaggio nuovo ed un diverso approccio alla diagnosi e alla terapia. Questo però può creare non poche difficoltà interpretative sia ai medici non allergologi, che agli specialisti del settore, unici prescrittori di tali esami sulla base dei nuovi LEA. In tale contesto una sinergia tra allergologo e patologo clinico con competenze allergologiche riveste un ruolo importante, anche in funzione della possibilità di fornire un referto interpretativo che possa essere chiaro e semplice da comprendere, sia da parte del paziente che del medico curante.

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

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

a) Commento generico in caso di positività per PR-10:

*"E' presente positività per PR-10. Tale allergene è indice di sensibilizzazione primaria alla betulla (Bet v 1), ma anche di cross-reattività verso frutti, soprattutto quelli appartenenti alla famiglia delle Rosacee; la positività a PR-10 può associarsi a SOA"*

b) Commento generico in caso di positività per profiline:

*"E' presente positività IgE per profiline (Bet v 2/ Phl p12); le profiline sono allergeni ubiquitari del mondo vegetale e possono essere responsabili di*

*cross-reattività fra pollini e frutta/verdura; la positività per profiline può associarsi a SOA”*

c) Commento generico in caso di positività per polcalcine (proteine leganti il calcio):

*“E’ presente positività IgE per polcalcine (Bet v 4/Phl p 7); le polcalcine sono pan-allergeni dei pollini e possono essere responsabile di cross-reattività fra pollini.*

d) Commento generico in caso di positività per CCD:

*“E’ presente positività IgE per la frazione glucidica cross-reattiva delle glicoproteine (CCD). Gli anti-CCD sono anticorpi cross reattivi diretti contro epitopi ubiquitari presenti in vegetali, invertebrati, frutta, semi, lattice e veleno di imenotteri. Tale positività è responsabile di positività dei test in vitro, ma è di scarsa rilevanza clinica”.*

### ***Referti interpretativi nelle allergie respiratorie combinati all’utilizzo di allergeni molecolari***

- a) Commento al paziente con sintomi stagionali e mono-sensibilizzazione a pollini: *“Il paziente presenta sensibilizzazione IgE primaria a polline di Graminaceae confermata dalla positività agli allergeni molecolari Phl p 1, Phl p 5”* (aggiungere eventualmente gli altri allergeni molecolari primari risultati positivi di *Phleum pratense* quali Phl p 2, Phl p 4, Phl p 6, Phl p 11 o di *Cynodon dactylon* - Cyn d 1-). Analoga formulazione in caso di mono-sensibilizzazione per i pollini di betulle (Bet v 1), parietaria (Par j 2), ambrosia (Amb a 1), assenzio (Art v 1), cipresso (Cup a 1), olivo (Ole e 1), lanciuela (Pla l 1).
- b) Commento al paziente con sintomi stagionali e polisensibilizzazione a pollini: *“Il paziente presenta polisensibilizzazione IgE primaria a pollini di Graminaceae, betulla, Cupressacee e ambrosia, confermata dalla positività ai rispettivi allergeni molecolari Phl p 1, Phl p 5 Bet v 1, Cup a 1 e Amb a 1”*
- c) Commento al paziente con sintomi stagionali, sensibilizzazione primaria a Graminaceae, positività alle profiline e positività IgE (con allergeni estrattivi) ad altri pollini non confermata dai rispettivi allergeni molecolari: *“Il paziente presenta sensibilizzazione IgE primaria a pollini di Graminaceae confermata dalla positività agli allergeni molecolari Phl p 1, Phl p 5; sono risultate positive le IgE per le profiline (Phl p 12) componenti molecolari ubiquitarie, presenti nei*

*pollini, nella frutta e nei semi. La positività IgE alle profiline è responsabile della positività (di tipo cross reattivo) agli altri pollini”*

- d) Commento al paziente con sintomi perenni e positività agli acari (test cutaneo e/o IgE con 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/o Der p 23”*
- 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 e/o Der p 23: *“La sensibilizzazione IgE primaria agli acari non è stata confermata dagli allergeni molecolari Der p 1 e/o Der p 2 e/o Der p 23. E’ possibile che il paziente possa essere sensibilizzato verso allergeni molecolari di acari attualmente non disponibili come test diagnostici”* [63].
- 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 (kallicroreina): *“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, etc.), allergeni ubiquitari di animali con pelo. Il paziente può presentare sintomi in presenza di più animali a pelo”*[64]. Ulteriore commento ai test può essere inserito nei casi 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”*
- 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 ad 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 aspergilloso 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 ad una reazione cross-reattiva per profiline, allergeni ubiquitari di origine vegetale. Tale positività non provoca reazione severa al contatto con il lattice pertanto non sono necessarie procedure “latex free” in ambito sanitario”*[65]. 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 e 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, etc.) sono da ricondurre a reazione crociata da sensibilizzazione primaria al latex e confermata dalla positività per gli allergeni molecolari Hev b....”*

### ***Referti interpretativi nelle allergie alimentari combinati all’utilizzo di allergeni molecolari***

- a) Commento al paziente con positività alla frutta fresca e conferma con allergeni molecolari. In caso di sola positività per PR10 o profiline in soggetti che riferiscono sintomi al contatto con la frutta fresca



(Rosacee): “ *Il paziente presenta sensibilizzazione a PR-10 e/o profiline. Tali positività, indice di cross-reattività pollini/frutta, si associano generalmente a sintomi locali (sindrome orale allergica). La cottura della frutta elimina l’allergenicità in quanto PR10 e profiline sono labili al calore*”. In caso di positività per le molecole termo e gastro-resistenti (nsLTP) il commento dovrà essere condizionato dal quesito diagnostico: in un paziente che riporta sintomi sistemici all’ingestione di frutta fresca e presenta positività per Pru p 3 (LTP della pesca) il commento può essere: “*E’ presente positività IgE all’allergene molecolare maggiore di pesca Pru p 3 appartenete alla famiglia delle ns Lipid Transfer Proteins (nsLTPs); queste molecole sono termo e gastro-stabili e possono essere responsabili di reazioni allergiche anche severe*”.

- b) Commento al paziente con positività alla frutta secca e conferma con allergeni molecolari. Per l’allergia alla frutta secca, come indicato in precedenza, sono disponibili un numero significativo di allergeni molecolari in grado di orientare la diagnosi. A differenza delle profiline, delle PR10 e delle nsLTP, peraltro presenti anche nella frutta secca, l’omologia di sequenza tra le molecole appartenenti alla famiglia delle proteine di deposito (2S-albumine, cupine) è scarsa per cui è necessario avere una corretta informazione anamnestica del cibo responsabile dei sintomi per la scelta delle molecole da utilizzare; questo aspetto risulta rilevante al momento della stesura di un commento ai test. In caso di paziente con positività per PR 10 o profiline il commento sarà quello già indicato precedentemente. In presenza invece di positività IgE per nsLTPs, cupine o 2S albumine il commento può essere il seguente: “*L’indagine con allergeni molecolari ha dimostrato positività per allergeni specifici di alimenti appartenenti al gruppo delle nsLTP (es Jug r 3, Cor a 8) o delle proteine di deposito (es Cor a 4, Cor a 9, Jug r 1, Ses i 1) dei semi/ frutta a guscio. La sensibilizzazione verso tali allergeni, proteine stabili al calore e resistenti agli enzimi digestivi, può associarsi a reazione allergica di tipo sistemico*”.
- c) Commento al paziente con positività alla soia e conferma con allergeni molecolari: il commento ad una positività alla soia può ricalcare quanto indicato per la frutta secca nel caso di positività per le molecole stabili al calore e alla digestione e quindi responsabili di sensibilizzazione primaria quali Gly m 5 (vicilina) e Gly m 6 (legumina). Nel caso invece la positività a sola PR-10, in un soggetto con sintomi da ingestione di

soia, il commento può essere così impostato: *“Positività a Gly m 4 (PR10), indice di sensibilizzazione crociata con pollini. Tale positività in genere si associa a SOA, ma in alcuni casi può associarsi anche a manifestazioni sistemiche”*.

- d) Commento al paziente con positività al grano e conferma con allergeni molecolari: la positività agli allergeni estrattivi del grano può essere determinata da IgE anti-profiline (vedi commento specifico). In presenza, invece, di positività per l'allergene molecolare Tri a 19 ( $\omega$ -5 gliadina): *“L'analisi con allergeni molecolari ha dimostrato positività per Tri a 19. Tale allergene è stato correlato con una specifica forma di allergia alimentare al grano indotta da esercizio fisico (oppure da FANS o alcol)”*.
- 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. E' 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 alla 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 ad 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 ad una 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 ad 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 ad esempio *“E' presente positività IgE per la frazione glucidica cross-reattiva delle glicoproteine (CCD). Gli anti-CCD sono anticorpi cross reattivi diretti contro epitopi ubiquitari presenti in 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 (Api m1, Api m 10). La positività per CCD non ha rilevanza diagnostica. La positività per Ves v 5 supporta la diagnosi di sensibilizzazione a Vesputa”.* In caso di difficoltà interpretative tra vesputa e Polistes l'utilizzo di Ves v 5 e Pol d 5 può essere di supporto se la differenza del risultato quantitativo di IgE tra le due molecole supera il 45%-50% *“La concentrazione di IgE per*

*Ves v 5 risulta essere significativamente più elevata di Pol d5. Dai dati di letteratura questo riscontro orienta la diagnosi di sensibilizzazione IgE a veleno di Vespula”*

### ***Referti interpretativi da associare all'utilizzo del microarray***

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

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

## **Appendice:**

Hanno collaborato alla realizzazione di questo documento, partecipando alla revisione del lavoro:

- a. Per il Gruppo di Studio di Allergologia della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio:
  1. Agostini Pierfrancesco, Patologia Clinica e Laboratorio Analisi, Ospedale don Tonino Bello, Molfetta (BA)
  2. Antico Antonio, Laboratorio Analisi, ULSS 4, Santorso (VI)
  3. Bagnasco Marcello, DIMI, Università di Genova, Genova
  4. Bonaguri Chiara, Laboratorio diagnostica ematochimica, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Parma
  5. Caponi Laura, U.O. Laboratorio Analisi Specializzate Azienda Ospedaliero-Universitaria pisana
  6. Caruso Beatrice, Laboratorio Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche Azienda Ospedaliera di Verona
  7. Deleonardi Gaia, Laboratorio Analisi, Ospedale Maggiore, Bologna
  8. Milanese Bruno, Patologia clinica, Desenzano del Garda (BS)
  9. Musso Maura Fabrizia, Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera, Santa Croce, Cuneo
  10. Platzgummer Stefan, Laboratorio centrale, Ospedale Civile di Merano (BZ)
  
- b. Per l'Associazione Italiana degli Allergologi e Immunologi Clinici Territoriali ed Ospedalieri (AAIITO)
  1. Giovannini Michele, UOC di Pneumologia, Azienda AUSL, Modena
  2. Montera Maria Carmela, Allergologia e Immunologia Clinica, Ospedale "G. Fucito" Mercato San Severino. Azienda Ospedaliera Universitaria S. Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona, Salerno
  3. Muratore Lionello, UOC Allergologia e Immunologia Clinica, Ospedale Vito Fazzi, Lecce
  4. Polillo Battista Roberto, UOS Allergologia PTP Nuovo Regina Margherita, ASL Roma 1
  5. Quercia Oliviero, Unità di allergologia, Ospedale di Faenza
  6. Voltolini Susanna, UO Allergologia, IRCCS Azienda Ospedale-Università S. Martino, Genova
  7. Zedda Maria Teresa, Medico di Medicina Generale, ASL 8, Cagliari
  8. Cecchi Lorenzo, UOSD Allergologia e Immunologia Clinica, USL Toscana Centro, Prato
  9. Cortellini Gabriele, UOC di Medicina Interna e Reumatologia, Azienda Sanitaria della Romagna, Rimini.
  10. Di Paolo Camilla, SSVD Allergologia, ASST Spedali Civili di Brescia

## Bibliografia

1. Wide L, Bennich H, Johansson SG. Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen antibodies. *Lancet* 1967; 2:1105-7.
2. Pastorello EA, Incorvaia C, Ortolani C, Bonini S, Canonica GW, Romagnani S, et al. 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* 1995; 96:580-7.
3. Paganelli R, Ansotegui IJ, Sastre J, Lange CE, Roovers MHWM, De Groot H, 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.
4. Sodestrom L, Kober A, Ahlstedt S, De Groot H, Lange CE, Paganelli R, et al. A further evaluation of the clinical use of Specific IgE antibody testing in allergic diseases. *Allergy* 2003; 58:921-28.
5. Sastre J. Molecular diagnosis in allergy. *Clinical & Experimental Allergy* 2010; 40:1442-1460.
6. Stumvoll S, Westritschnig K, Lidholm J, Spitzauer S, Colombo P, Duro G, et al. Identification of cross-reactive and genuine *Parietaria judaica* pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:974-9.
7. Uasuf CG, Villalta D, Conte ME, Di Sano C, Barrale M, Cantisano V, et al. 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* 2015;13:30.
8. Asero R. Lo stato dell'arte della CRD: cosa sono e a cosa servono i componenti molecolari. *Ligand Assay* 2010; 15:12-13.
9. Ollert M, Weissenbacher S, Rakoski J, Ring J. Allergen-specific IgE measurement by a continuous random-access immunoanalyzer: interassay comparison and agreement with skin testing. *Clin Chem* 2005; 51:1241-9.
10. Iancovici-Kidon M, Tim CF. Component-specific immunoglobulin E in the diagnosis of allergic disease in childhood: more of the same or something more? *Isr Med Assoc J* 2007; 9:476-8.
11. Hauser M, Roulias A, Ferreira F, Egger M. Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 2010; 6:1.
12. Valenta R, Twaroch T, Swoboda I. Component-resolved diagnosis to optimize allergen-specific immunotherapy in the Mediterranean area. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2007; 17(suppl 1):88-92.

13. Sastre J. Molecular diagnosis and immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013; 13:646-50.
14. Schmidt Andersen M-B, Hall S, Dragsted LO. Identification of European allergy patterns to the allergen families PR-10, LTP and profilin from Rosaceae fruits. *Clinic Rev Allergy Immunol* 2011; 41:4-19.
15. Peixinho C, Tavares-Rataldo P, Tomàs MR, Taborda-Barata L, Tomaz CT. Latex allergy: new insights to explain different sensitization profiles in different risk groups. *Br J Dermatol* 2008; 159:132-6.
16. Muller UR, Johansen N, Petersen AB, Fromberg-Nielsen J, Haeberli G. Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and *Vespa* venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m 1 and Ves v 5. *Allergy* 2009; 64:543-8.
17. Radauer C, Bublin M, Wagner S, Mari A, Breiteneder H. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:847-52.
18. Harwanegg C, Hiller R. Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: state-of-the-art and future development. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2006; 38:232-6.
19. De Knop KJ, Bridts CH, Verweij MM, Hagendorens MM, De Clerck LS, Stevens WJ, et al. Component-resolved allergy diagnosis by microarray: potential, pitfalls and prospects. *Adv Clin Chem* 2010; 50:87-101.
20. Gadisseur R, Chapelle JP, Cavalier E. 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* 2011; 49:277-80.
21. Villalta D, Conte M, Asero R, Da Re M, Stella S, Martelli P. Isolated IgE reactivity to native walnut vicilin-like protein (nJug r 2) on ISACTM microarray is due to cross-reactive carbohydrate epitopes. *Clin Chem Lab Med*. 2013 51(10):1991-5
22. Goikoetxea MJ, D'Amelio C M, Martínez-Aranguren R, Gamboa P, Garcia BE, Gómez F, et al. Is microarray analysis really useful and sufficient to diagnose nut allergy in the Mediterranean area? *J Investig Allergol Clin Immunol* 2016; 26:31-9.
23. Melioli G, Marcomini L, Agazzi A, Bazurro G, Rossi L, Mangraviti S, et al. Diagnostica allergologica e CRD: il ruolo del laboratorio di patologia clinica. *Ligand Assay* 2010; 15:52-65.
24. Canonica GW, Ansotegui IJ, Pawankar R, Schmid-Grendelmeier P, van Hage M, Baena-Cagnani CE, et al. A WAO-ARIA-GA<sup>2</sup>LEN consensus document on molecular based allergy diagnostics. *World Allergy Organ J* 2013; 6:17.

25. Douladiris N, Savvatanos S, Roumpedaki I, Skevaki C, Mitsias D, Papadopoulos NG. A molecular diagnostic algorithm to guide pollen immunotherapy in Southern-Europe: towards component-resolved management to allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 2013; 162:163-172.
26. Valenta R, Hayek B, Seiberler S, Bugajska-Schretter A, Niederberger V, Twardors A, et al. Calcium-binding allergens: from plants to man. *Int arch Allergy Immunol* 1998; 117:160-6.
27. Villalta D, Asero R. 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* 2010; 20:591-5.
28. Asero R. Component- resolved diagnosis-assisted prescription of allergen-specific immunotherapy: a practical guide. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2012; 44:183-7.
29. Ciprandi G, Incorvaia C, Frati F; Italian Study Group on Polysensitization. Management of polysensitized patient: from molecular diagnostics to biomolecular immunotherapy. *Exp Rev Clin Immunol* 2015; 11:973-6.
30. Matricardi P, Kleine-Tebbe J, Hoffmann H, Valenta R, Hilger C, Hofmaier S, et al. EAACI Molecular Allergology user's guide. *Pediatric Allergy Immunol* 2016; 27 (suppl 3): 1-250
31. Resch Y, Weghofer M, Seiberler S, Horak F, Scheibelhofer S, Linhart B, et al. Molecular characterization of Der p 10: a diagnostic marker for broad sensitization in house dust mite allergy. *Clin Exp allergy* 2011; 41:1468-77.
32. Virtanen T, Kinnunen T, Ritkönen-Nissinen M. Mammalian lipocalins allergens- insights into their enigmatic allergenicity. *Clin Exp Allergy* 2012; 42:494-504.
33. Voltolini S, Spigno F, Cioè A, Cagnati P, Bignardi D, Minale P. Bovine serum albumin: a double allergy risk. *Eur Ann allergy Clin Immunol* 2013; 45:144-7.
34. Feo Brito F, Alonso AM, Carnés J, Martin-Martin R, Fernández-Caldas E, Galindo PA, et al. Correlation between Alt a 1 levels and clinical symptoms in *Alternaria alternata*-monosensitized patients. *J investing Allergol Clin Immunol* 2012; 22:154-9.
35. Cramer R, Hemmann S, Ismail C, Menz G, Blaser K. Disease-specific recombinant allergens for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Int Immunol* 1998; 10:1211-6.
36. van Gasse AL, Mangodt EA, Faber M, Sabato V, Bridts CH, Ebo DG. Molecular allergy diagnosis: status anno 2015. *Clin Chim Acta* 2015; 444:54-61.
37. Villalta D, Asero R. Is the detection of multiple Bet v1-homologous food allergens by means of microarray clinically useful? *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125:1158-61.



38. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Scibilia J, Mascheri A, Borgonovo L, et al. 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* 2011;156:362-72.
39. Stager J, Wuthrich B, Johansson SGO. Spice allergy in celery-sensitive patients. *Allergy* 1992; 46:475-8.
40. Heiss S, Fisher S, Muller WD, Weber B, Hirschwahr R, Spitzauer S, et al. Identification of a 60 KDa cross-reactive allergen in pollen and plant-derived food. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98:938-47.
41. Bauer L, Ebner C, Hirschwahr R, Wuthrich B, Pichler C, Fritsch R, et al. IgE cross-reactivity between birch pollen, mugwort pollen and celery is due to at least three distinct cross-reacting allergens: immunoblot investigation of the birch-mugwort-celery syndrome. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 1161-70.
42. Borghesan F, Mistrello G, Amato S, Giuffrida G, Villalta D, Asero R. Mugwort-fennel-allergy-syndrome associated with sensitization to an allergen homologous to Api g 5. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2013; 45:130-7.
43. Savvatanos S, Konstantinopoulos AP, Borgå A, Stavroulakis G, Lidholm J, Borres MP, et al. Sensitization to cashew nut 2S albumin, Ana o 3, is highly predictive of cashew and pistachio allergy in Greek children. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 136:192-4.
44. Klemans RJ, van Os-Menderdorp H, Blankenstijn M, Buijnzeel-Koomen CA, Knol EF, Knust AC, et al. Diagnostic accuracy of specific IgE to components in diagnosing peanut allergy: a systematic review. *Clin Exp Allergy* 2015; 45:720-30.
45. Krause S, Reese G, Randow S, Zennaro D, Quarantino D, Palazzo P, et al. Lipid Transfer Protein (Ara h 9) as a new peanut allergen relevant for a Mediterranean allergic population. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124:771-8.
46. Pedrosa M, Boyano-Martínez T, García-Ara C, Caballero T, Quirce S. Utility of specific IgE to Ara h 6 in peanut allergy diagnosis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2015; 115:108-12.
47. Kukkonen AK, Pelkonen AS, Mäkinen-Kiljunen S, Voutilainen H, Mäkelä MJ. Ara h 2 and Ara 6 are the best predictors of severe peanut allergy: a double-blind placebo-controlled study. *Allergy* 2015; 70:1239-45.
48. Kleine-Tebbe J, Vogel L, Crowell DN, Hausteiner UF, Vieths S. Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1-related PR-10 protein in soybean, SAM22. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:797-804.
49. Matricardi PM, Bockelbrink A, Beyer K, Keil T, Niggemann B, Grüber C, et al. Primary versus secondary Immunoglobulin E to soy and wheat in the multi-centre allergy

study cohort. *Clin Exp Allergy* 2007; 38:493-500.

50. Morita E, Kunie K, Matsuo H. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Dermatol Sci* 2007;47:109-17.

51. Bugajska-Schretter A, Grote M, Vangelista L, Valent P, Sperr WE, Rumpold H, et al. 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* 2000; 46:661-9.

52. Poulsen LK, Hansen TK, Nørgaard A, Vestergaard H, Stahl Skov P, Bindslev-Jensen C. Allergens from fish and egg. *Allergy* 2001; 56 (Suppl 67):39-42.

53. Pascal M, Grishina G, Yang AC, Sanchez-Garcia S, Lin J, Towle D, et al. Molecular diagnosis of shrimp allergy: efficiency of several allergens to predict clinical reactivity. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2015; 3:521-9.

54. Giuffrida MG, Villalta D, Mistrello G, Amato S, Asero R. Shrimp allergy beyond tropomyosin in Italy: Clinically relevance of arginine kinase, sarcoplasmic calcium binding protein and hemocyanin. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2014; 46:172-7.

55. Asero R, Mistrello G, Amato S, Ariano R, Colombo G, Conte ME, et al. Shrimp allergy in Italian adults. A multicenter study showing a high prevalence of sensitivity to novel high molecular weight allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2012; 157:3-10.

56. Bartnikas LM, Sheehan WJ, Hoffman EB, Permaul P, Diuon AF, Friedlander J, et al. Predicting food challenge outcomes for baked milk: role of specific IgE and skin prick testing. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2012; 109:309-13.

57. Benhamou AH, Caubet JC, Eigenmann PA, Nowak-Wegrzyn A, Marcos CP, Reche M, et al. State of the art and new horizons in the diagnosis and management of egg allergy. *Allergy* 2010; 65:283-9.

58. Steinke JW, Platts-Mills TAE, Commins SP. The alpha-gal story: lesson learned from connecting the dots. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135:589-96.

59. Villalta D, Pantarotto L, Da Re M, Conte M, Sjolander S, Borres MP, Marrtelli P. High prevalence of sIgE to galactose- $\alpha$ 1,3-galactose in rural pre-Alps area: a cross-sectional study. *Clin Exp Allergy* 2016; 46:377-80.

60. Köhler J, Blank S, Müller S, Bantleon F, Frick M, Huss-Marp J. et al. Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133:1383-9.

561. Muller U, Schmid-Grendelmeier P, Hausmann O, Helbling A. IgE to recombinant allergens Api m1, Ves v 1, and Ves v 5 distinguish double sensitization from crossreaction in venom allergy. *Allergy* 2012; 67:1069-73.

62. Ollert M, Blank S. Anaphylaxis to insect venom allergy: role of molecular diagnostics. *Curr Allergy Asthma Rep* 2015;15:26.
63. Resh Y, Michel S, Kabesch M, Lupinek C, Valenta R, Vrtala S. Different IgE recognition of mite allergen components in asthmatic and nonasthmatic children. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 136:1083-91.
64. Liccardi G, Bilò MB, Manzi F, Piccolo A, Di Maro E, Salzillo A. 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* 2015; 47:163-7.
65. Schuler S, Ferrari G, Schmid-Grendelmeier P, Harr T. Microarray-based component-resolved diagnosis of latex allergy: isolated IgE-mediated sensitization to latex profilin Hev b8 may act as confounder. *Clin Transl Allergy*. 2013; 283: 7022-3.

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)*
Graminacee ( <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 (kalliereina)*	Can f 2 (lipocalina)* Can f 6 (lipocalina) Can f 3 (sieroalbumina)*
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	
Aspergillus fumigatus	Asp f 1*	Asp f 2*, Asp f 3*, Asp f 4*, Asp f 5, Asp f 6*, Asp f 8, Asp f 10, Asp f 11, Asp f 12, Asp f 13, Asp f 18, Asp f 22	
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).

1. Fonte allergenica	Componente specifica maggiore	Componente specifica minore	Componenti cross-reattive
2. Pesca	Pru p 3 (nsLTP)*	Pru p 7 (pemacleina)	Pru p 1 (PR-10)* Pru p 4 (profilina)*
3. Mela	Mal d 3 (nsLTP)*		Mal d 1 (PR-10)* Mal d 4 (profilina)
4. 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)
5. Noce	Jug r 1 (2S-albumina)* Jug r 2 (vicilina)** Jug r 3 (nsLTP)*	Jug r 4 (legumina)	
6. Noce brasiliana	Ber e 1(2S-albumina)*	Ber e 2 (cupina)	
7. 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 (oleosina) 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)
8. Anacardio (Pistacchio)	Ana o 1 (vicilina) Ana o 2 (legumina)** Ana o 3 (2s-albumina)*		
9. 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)
10. 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)	
11. Grano	Tri a 14 (nsLTP)* Tri a 19 (ω-5 gliadina)*	Tri a 18 (aglüt./isolect.) 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 gliadina*	Tri a 12 (profilina)
12. 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 **	
13. Uova	Gal d 1 (ovomucoide)* Gal d 2 (ovoalbumina)* Gal d 3 (ovotranferrina)*	Gal d 4 (lisozima)* Gal d 5 (livetina) ** Gal d 6 (YGP42) Gal d 7 (catena leggera miosina)	
14. Merluzzo	Gad c 1 (parvalbumina)*	Gad m 2 (enolasi) Gad m 4 (aldolsi)	
15. Anisakis	Ani s 1**	Ani s 2, Ani s 3**, Ani s 4, Ani s 5, Ani s 6	
16. Gamberetto	Pen a 1 (tropomiosina)* Pen m 1 (tropomiosina)**	Pen m 2 (arginin-kinasi)** Pen m 3 (cat. leg. miosina) Pen m 4 (CBP sarcopl.)**	

**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
Apis mellifera	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 <sub>2</sub> Ialuronidasi Fosfatasi acida Mellitina Dipeptidil-peptidasi IV CUB serin-proteasi Carbossilesterasi Serin-carbossipeptidasi Icarapina variante 2 Proteina maggiore della pappa reale Vitellogenina
Vespula vulgaris (giallone)	Ves v 1* Ves v 2 Ves v 3 Ves v 5* Ves v 6	Fosfolipasi A <sub>1</sub> Ialuronidasi Dipeptidil-peptidasi IV Antigene 5 Vitellogenina
Polistes dominulus (vespa)	Pol d 1 Pol d 4 Pol d 5*	Fosfolipasi A <sub>1</sub> Serin-proteasi Antigene 5
Vespa crabro (calabrone)	Vesp c 1 Vesp c 5	Fosfolipasi A <sub>1B</sub> 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)

<b>Fonte allergenica</b>	<b>Molecole allergeniche</b>	<b>Suggerimenti comportamentali nei pazienti sintomatici</b>
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 (cat-pork syndrome)
	Can f 1, Can f 2, Fel d 4, Equ c 1	Evitare contatto con gatti, cani e cavalli
	Can f 5	E' 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	E' possibile assumere frutta purchè 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	E' possibile assumere arachide tostata
	PR-10 e profiline da sole	E' 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 purchè 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.

**Apparente polisensibilizzazione ad allergeni inalanti al test cutaneo e/o in vitro e clinica suggestiva per allergopatia respiratoria**

**Ricerca di marcatori di sensibilizzazione primaria**

- Phl p 1
- Phl p 5
- Bet v 1
- Cup a 1
- Ole e 1
- Par j 2
- Art v 1
- Amb a 1
- Der p 1
- Der p 2
- Der p 23
- Fel d 1
- Alt a 1
- Others

**POS**

**Eventuale indicazione alla ITS**

**Ricerca di marcatori di cross-reattività**

- Profilina (Phl p 12/ Bet v 2)
- Polcalcine (Phl 7/ Bet v 4)
- Tropomiosina (Der p 10)
- CCD\* (MUXF3)

**POS**

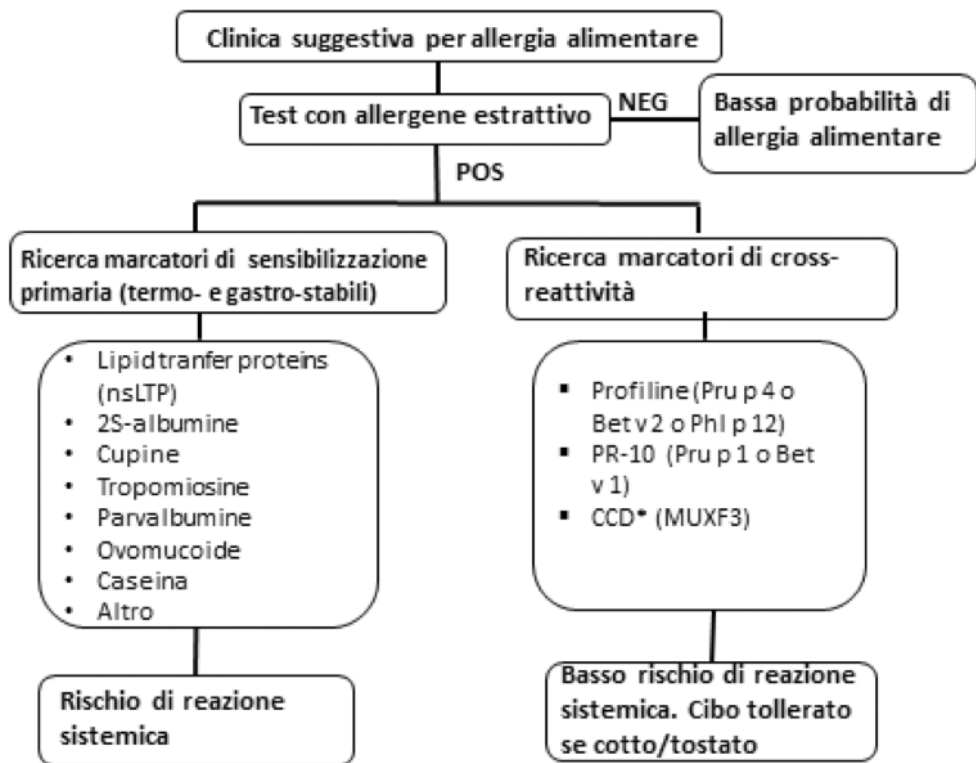
**Cercare il sensibilizzante primario. Probabile scarsa efficacia del ITS**

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

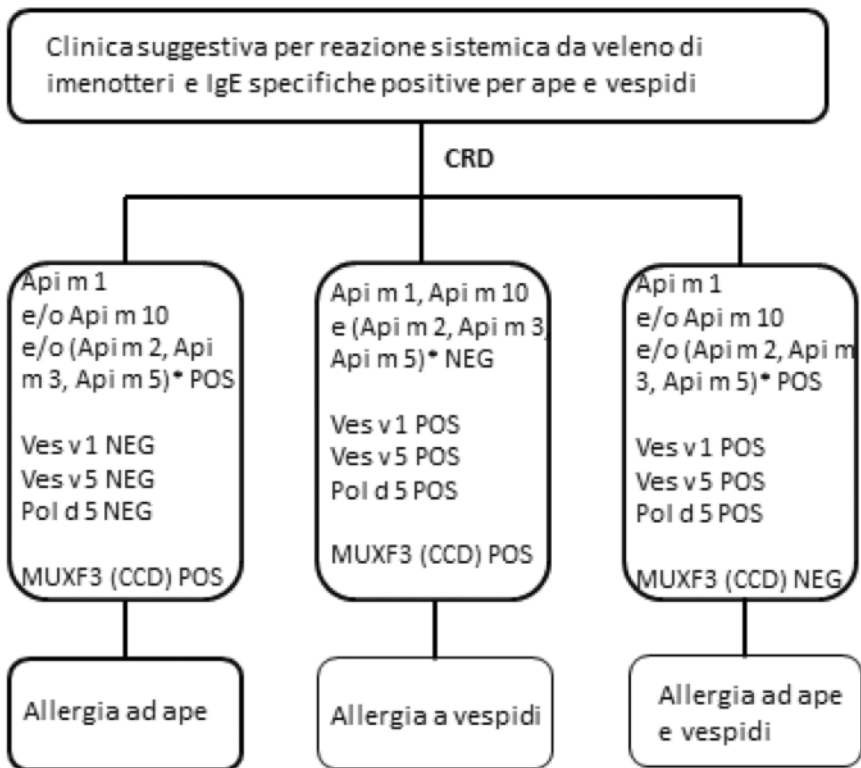
I marcatori di sensibilizzazione primaria e quelli di cross-reattività verranno scelti di volta in volta in base alle positività ottenute con gli estratti.

\*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.  
\*se disponibili.



