

Nuovi criteri orientativi per l'uso appropriato della diagnostica allergologica *in vitro* 4.0. Parte 1: diagnostica di base e avanzata

Diego Faggian¹, Giorgia Antonelli¹, Tiziana Scacchetti², Alessia Cossi¹ per il Gruppo di Studio SIBioC Allergologia di Laboratorio

¹U.O.C. Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università di Padova

²Dipartimento di Patologia Clinica, Ospedale Sant'Agostino Estense-NOCSAE Baggiovara, Modena

ABSTRACT

Updated criteria for the appropriate use of *in vitro* allergy diagnostics 4.0. Part 1: basic and advanced diagnostic

Allergic diseases are among the top chronic diseases in Europe and developing countries, and the World Health Organisation now considers allergy a '*non-communicable, out-of-control disease*' with a possible increase in prevalence of up to 50% in the latest generation. Allergy transversally involves different medical specialities, affecting different organs and apparatuses and opening up to numerous varieties of clinical pictures. In parallel, the Allergy Diagnostic Laboratory is assuming a major role in helping to provide a personalised, targeted and accurate approach for the allergic patient, based on the preliminary detection of an individual sensitisation profile. The aim of this document is to illustrate the whole range of new resources that Laboratory Medicine can provide for initial diagnostic guidance for Allergy, directing selected patients into the appropriate pathway, and referring those who really need an accurate specialist examination to the allergist. In a following document (part 2), specific allergies will be considered: food allergies, allergies to hymenoptera venoms and professional allergies (i.e. latex).

Parole chiave: IgE specifiche; biomarcatori molecolari; sensibilizzazione primaria

INTRODUZIONE

Le malattie allergiche sono ai primi posti tra le patologie croniche in Europa e nei paesi in via di sviluppo. Sebbene già 80 milioni di persone in Europa soffrano di manifestazioni allergiche, più preoccupante è la crescente prevalenza nei bambini in età scolare. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) considera ormai l'allergia una "patologia non trasmissibile, fuori controllo" e le Società Scientifiche del settore temono un possibile incremento della prevalenza fino al 50% nell'ultima generazione (1).

D'altra parte l'allergologia coinvolge trasversalmente specialità mediche diverse, interessando organi e apparati diversi e aprendosi a numerose varietà di quadri clinici. La dermatite atopica, la rinite allergica e l'asma, sono solamente alcuni dei più comuni esempi di queste patologie che, tra l'altro, contraddistinguono in questa precisa sequenza i passaggi chiave della marcia allergica. A fronte di questo scenario, il Laboratorio di Diagnostica Allergologica sta assumendo parallelamente un ruolo di grande importanza nel contribuire a fornire un approccio

personalizzato, mirato ed accurato per il paziente allergico 4.0, basato sulla preliminare rilevazione di un profilo di sensibilizzazione individuale.

Mentre, indubbiamente il ruolo del medico della medicina primaria e/o dello specialista allergologo è insostituibile nella fase anamnestica, nell'attuale prospettiva, è necessario fornire al medico di medicina generale (MMG) o al pediatra di libera scelta (PLS) tutta quella serie di nuove risorse che la Medicina di Laboratorio può soddisfare per il primo orientamento diagnostico basato sulle indagini verso le fonti allergeniche, indirizzando i pazienti selezionati ad un percorso appropriato, ed inviando all'allergologo chi realmente necessita di un approfondimento specialistico accurato. Certamente, in una prospettiva a breve termine, l'ausilio dell'intelligenza artificiale per la gestione dei Big Data consentirà di migliorare la diagnostica e la terapia dei pazienti affetti da malattia allergica.

Lo scopo di questo documento è quello di illustrare l'intera gamma di nuove risorse che la Medicina di Laboratorio può fornire per l'orientamento diagnostico iniziale in campo allergologico.

Corrispondenza a: Diego Faggian, U.O.C. Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università di Padova
Email: diego.faggian@aopd.veneto.it

Ricevuto: 13.10.2023

Revisionato: 09.11.2023

Accettato: 15.12.2023

Publicato on-line: 12.01.2024

DOI: 10.19186/BC_2023.096

In un successivo articolo (parte 2), verranno prese in considerazione allergie specifiche, come le allergie alimentari, le allergie al veleno degli imenotteri e le allergie professionali (lattice).

LE REAZIONI ALLERGICHE ED I LORO MEDIATORI SPECIFICI

Sebbene comunemente il termine allergia venga utilizzato diffusamente, dal punto di vista medico si parla di allergia quando vengono coinvolte le immunoglobuline (risposta umorale) o i linfociti T (risposta cellulare) del sistema immunitario, come raffigurato nella Figura 1.

Le allergie sono le reazioni di ipersensibilità di tipo I, secondo Coombs et al. (2), sono quelle più rapide e talvolta anche le più pericolose. Il loro meccanismo d'azione, che vede le immunoglobuline E reagire all'allergene, ha ispirato le tecniche *in vitro* per la determinazione immunometrica quantitativa delle IgE specifiche.

Il processo che porta alla manifestazione allergica prevede un meccanismo d'azione difasico ed inizia con la sensibilizzazione del soggetto atopico che tende a sviluppare livelli ematici di IgE più elevati. Le IgE neofornite aderiscono alla superficie dei basofili circolanti e alla superficie dei mastociti tissutali localizzati soprattutto a livello delle varie mucose. Lo stadio successivo è quello che potrebbe portare allo sviluppo di manifestazioni allergiche: il legame delle IgE tramite la frazione Fc ai recettori mastocitari lascia libera la frazione Fab deputata al legame con l'antigene. Quando l'antigene lega a ponte due frazioni Fab di due anticorpi contigui ed analoghi si innesca la reazione allergica: il cambiamento conformazionale del complesso

IgE-antigene-IgE-recettore FcεR1 provoca un segnale citoplasmatico che porta alla degranulazione del mastocita, liberazione dei mediatori vasoattivi e flogistici *in primis* l'istamina, i leucotrieni, le prostaglandine, la triptasi, le chimasasi, e così via. L'attività di tali mediatori induce nel complesso broncoconstrizione, vasodilatazione, aumentata permeabilità capillare, edema delle vie superiori ed incremento dell'attività secretoria mucosale.

Immunoglobuline diverse sono coinvolte invece nelle reazioni di tipo II e III, dove le IgG, ad esempio, vengono massicciamente prodotte in conseguenza di stimoli allergenici continui. È il caso di alcune malattie respiratorie professionali causate da veicoli di piccole dimensioni in grado di provocare alveoliti o glomerulonefriti.

L'EVOLUZIONE DEGLI ESAMI DI LABORATORIO

La diagnostica di laboratorio delle allergopatie si avvale di un ampio ventaglio di analisi che ha recentemente visto un forte sviluppo degli esami immunometrici di approfondimento o di 2° livello (3).

IgE totali e specifiche

La misura delle IgE totali, inserita nel repertorio di ogni laboratorio clinico, non viene più utilizzata per la diagnosi differenziale di allergia, tuttavia viene associata all'esame delle IgE allergene-specifiche per completare il profilo di sensibilizzazione del paziente. Il significato e l'utilità di questa determinazione sono stati recentemente rivalutati nel contesto della diagnostica molecolare, perché meglio correlabile alla concentrazione

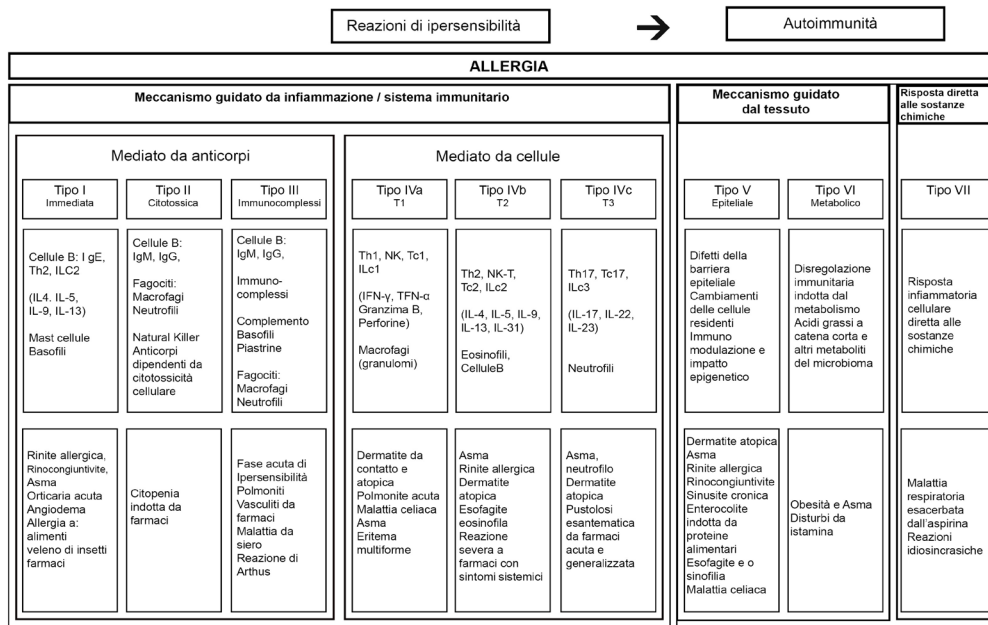


Figura 1

Nuova nomenclatura delle malattie allergiche. L'ipersensibilità è una reazione indesiderabile o dannosa che nasce da una reazione eccessiva del sistema immunitario o da una disfunzione cellulare tissutale. L'allergia è una reazione abnorme o esagerata a stimoli esogeni che coinvolge molti tipi di reazioni di ipersensibilità che possono essere mediate da anticorpi, da cellule, da meccanismi tissutali (epiteliali o metabolici) o risposte dirette a sostanze chimiche.. (modificata da Jutel M et al. Nomenclature of allergic diseases and hypersensitivity reactions: Adapted to modern needs: An EAACI position paper. Allergy 2023; 78:2851-2874)

ematica delle IgE specifiche monomolecolari. In aggiunta, la determinazione delle IgE totali consente di calcolare il rapporto tra IgE specifiche e totali (ratio analysis) (4) e il controllo dei valori soglia per l'utilizzo dei farmaci biologici. Va ricordato che le IgE totali possono aumentare in particolari condizioni a prescindere dallo stato allergico, come in alcune dermatiti e nelle parassitosi intestinali. In ogni caso, i livelli di IgE totali hanno mostrato il seguente modello di distribuzione tra individui adulti non-atopici e atopici (5): <25 kU/L nell'84% dei non-atopici; >100 kU/L nel 78% degli atopici. Di conseguenza nell'adulto si assume come valore limite 100 kU/L.

Un avanzamento rilevante riguarda la misura delle IgE specifiche, che ha acquisito prestazioni analitiche impensabili solamente alcuni anni fa, non rappresentando più un carico di lavoro manuale con lunghi tempi di esecuzione. Le tecnologie attuali hanno reso possibile un abbattimento totale dei tempi di risposta ed un livello di precisione che è divenuto nel tempo equiparabile alle determinazioni di chimica clinica (6). D'altra parte il livello di informatizzazione raggiunto anche per questo tipo di esami multiparametrici, ha consentito una forte riduzione degli errori pre e post-analitici.

A differenza degli esami *in vivo*, che si avvalgono dell'uso degli allergeni per le prove cutanee (7), il laboratorio utilizza attualmente tecnologie che garantiscono una qualità estesamente controllata nel tempo e altamente standardizzata dei preparati allergenici che vengono impiegati nel rispetto delle indicazioni di standardizzazione degli estratti allergenici secondo Linee Guida CLSI (8). Successivamente la stabilizzazione dell'estratto allergenico su un supporto ad elevata capacità di legame (9-11), la determinazione quantitativa secondo il 3° International Standard 11/234 WHO (già 2° IRP WHO 75/502) per IgE umane, come deciso dal WHO Expert Committee on Biological Standardization (12), ed i risultati espressi in kU/L (1 U=2,42 ng) (11,12), hanno costituito acquisizioni fondamentali per raggiungere prestazioni di precisione intraserie <5%, e tra le serie <10% (13-14).

Altri biomarcatori

Accanto alla misura delle IgE troviamo la determinazione quantitativa dei marcatori di degranulazione mastocitaria come la triptasi (la proteina più abbondante nei mastociti) che ha contemporaneamente acquisito nuovi significati clinici e un limite di rilevamento <1,0 µg/L. Livelli di base elevati di triptasi nel siero e/o una mastocitosi non manifesta, possono costituire fattori di rischio nei pazienti con anamnesi di reazioni gravi, come per esempio, nell'immunoterapia per veleno di imenottero. Livelli elevati di triptasi, anche nei campioni *post mortem*, possono indicare una reazione anafilattica fatale come causa del decesso e sono di valido apporto nella medicina forense. Allo stato dell'arte la determinazione della triptasi è utile per (15-39):

- valutare il rischio di reazioni avverse pericolose, soprattutto contro i veleni di insetto ed i farmaci anche con meccanismo d'azione non-IgE mediato;

- valutare il rischio di reazioni allergiche sistemiche peroperatorie da farmaci antibiotici, farmaci anestetici e lattice;

- confermare l'anafilassi in medicina legale;

- diagnosticare e monitorare la mastocitosi.

Linee guida ufficiali per quanto riguarda la diagnosi, la prevenzione ed il trattamento sono state stabilite nel documento dell' European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI) del 2014 (40). Il WHO ha stabilito altresì che un livello basale sierico di triptasi >20 µg/L costituisce uno dei quattro criteri minori per la diagnosi di mastocitosi sistemica (41-43).

Un altro marcatore di flogosi è la Proteina Cationica degli Eosinofili (ECP) che identifica, tramite il rilevamento indiretto degli eosinofili attivati nel sangue periferico, il livello infiammatorio causato per esempio dall'essfoliazione delle cellule epiteliali nelle vie respiratorie (44-46). L'ECP è di fatto un mediatore utile per il monitoraggio della terapia asmatica antinfiammatoria, tuttavia, ancora oggi, la standardizzazione della procedura di stabilizzazione del prelievo ematico è un fattore di incertezza. Tale standardizzazione, infatti, rappresenta una forte criticità, fonte di verosimile errore pre-analitico, qualora la procedura, che prevede la centrifugazione del prelievo entro 2 ore, non venisse rispettata. Infatti, tale errore favorirebbe un incremento dell'attività cellulare durante il processo di coagulazione *in vitro*. In questo senso si auspica l'avvento di un marcatore di pari utilità come l'eosinophil derived neurotoxin (EDN), noto anche come eosinophil protein-X (EPX) ma di maggiore facilità d'impiego a livello pre-analitico. Un nuovo affidabile biomarcatore di infiammazione eosinofila delle vie aeree, determinabile con una tecnica non invasiva è la misura dell'Ossido Nitrico esalato (FeNO) (47).

Un esame di laboratorio di interesse crescente da applicare in determinati contesti è il test di attivazione dei basofili (BAT) che, grazie ad uno scatenamento allergenico *in vitro*, è utile per valutare le modificazioni cellulari a monte delle reazioni allergiche, siano esse IgE-mediate o non-IgE-mediate (Figura 2). La corretta identificazione dei basofili è consentita dalle diverse possibilità di scelta dei marcatori di superficie o di degranulazione dei basofili: CCR3, CD3, CD123, CD203 e CD63. Un esempio di utile applicazione è quello delle allergie alimentari ma anche delle allergie ai farmaci soprattutto laddove non si abbia a disposizione l'aptene specifico e si sospetti un meccanismo non-IgE-mediato (48). È il caso dei farmaci anti-infiammatori non-steroidici (FANS) che interferendo sul metabolismo dell'acido arachidonico, provocano un aumento della liberazione di leucotrieni, istamina e triptasi sierica. In questo contesto il BAT potrebbe trovare un posizionamento nell'algoritmo diagnostico, evitando lo stress ed il rischio di un esame di provocazione orale in soggetti con riferita ipersensibilità a un FANS. Per quanto concerne le allergie alimentari, alcuni studi hanno mostrato che la risposta dei basofili può essere inibita da un fattore autologo presente nel siero, come le IgG allergene-specifiche, mentre altri studi hanno rafforzato il ruolo dei linfociti T-regolatori allergene-specifici nella risoluzione spontanea dell'allergia al latte vaccino in pediatria (48).

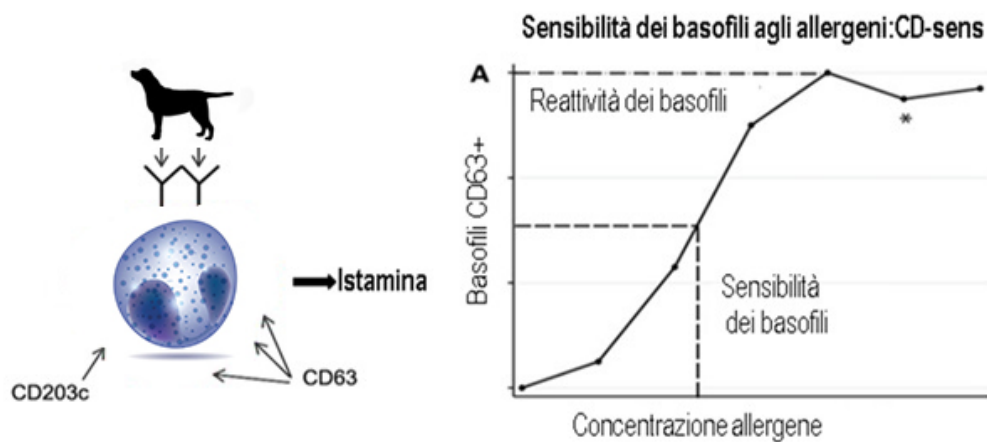


Figura 2

Valutazione della risposta basofila. La reattività basofila è la dose alla quale si ha la massima risposta. La sensibilità dei basofili è la dose alla quale si ha la metà della massima risposta.

* Ad elevate concentrazioni di allergeni, la risposta basofila può essere soppressa. Modificata da Hoffman HJ et. *The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. Allergy 2015;70:1393-405.*

La tecnica del BAT, tuttora molto indagativa, necessita comunque di un lungo processo di standardizzazione che possa poi consentire una definizione più chiara dei livelli decisionali clinici. Pertanto il BAT deve essere considerato un test diagnostico di terzo livello, che richiede specifiche esperienze e competenze professionali.

NUOVI ORIZZONTI: L' ALLERGOLOGIA MOLECOLARE

Da alcuni anni l'allergologia di Laboratorio sta vivendo una rivoluzione tecnologica grazie alla continua disponibilità di nuovi esami per le IgE dirette verso le componenti allergeniche molecolari. Questa rivoluzione, basata su un incremento costante di conoscenze biochimiche delle molecole allergeniche, sta amplificando le conoscenze immunologiche sulle allergie IgE-mediate con un positivo impatto sull'evoluzione della pratica clinica verso la Medicina di Precisione. La Allergologia Molecolare (MA) sta aprendo nuovi scenari (49), sia nelle allergie respiratorie che in quelle alimentari. Il cambiamento si basa su un nuovo approccio in grado di integrare una nuova genetica individuale, con i dati molecolari per una migliore fenotipizzazione ed una corretta scelta dei migliori trattamenti personali (50). La MA è destinata ad una rivoluzione della visione dell'allergologia dal punto di vista biochimico, acquisendo conoscenze più complesse, ma anche molto più utili dal punto di vista clinico.

Fino ad oggi sono state identificate, isolate e caratterizzate centinaia di molecole, molte altre verranno identificate e isolate in futuro. Diversi database sono ormai disponibili su piattaforme web avanzate che ne indicano la nomenclatura, con informazioni botaniche, palinologiche, zoologiche, biochimiche, immunologiche collegati ai rischi clinici potenziali. Per fedeltà alla lista ufficiale dell'International Union of Immunological Societies,

(IUIS, Sottocomitato WHO per la Nomenclatura degli allergeni), la sigla delle singole molecole allergeniche è in lingua latina secondo la classificazione binomiale di C. Linneo (51). In altre piattaforme si ritrovano informazioni sulla distribuzione geografica, le evidenze cliniche e le potenziali cross-reattività (51,52). Centinaia sono anche gli studi sulla MA che vengono regolarmente pubblicati in riviste di rilevanza internazionale.

I biomarcatori per la diagnosi di sensibilizzazione primaria

La MA ci ha messo a disposizione i marcatori specie-specifici di sensibilizzazione primaria della maggior parte delle fonti allergeniche prevalenti (53) ed è essenziale conoscere le implicazioni cliniche di ciascun marcatore molecolare per migliorare l'accuratezza della diagnosi, formulare la prognosi e migliorare le strategie terapeutiche (54).

Il monitoraggio del variegato calendario pollinico italiano e l'applicazione delle competenze sviluppate sull'uso dei marcatori di sensibilizzazione, ci permettono di individuare gli allergeni molecolari di sensibilizzazione primaria verso agenti pollinici responsabili di patologie respiratorie importanti. Ad esempio possiamo citare la determinazione *in vitro* delle IgE anti-Amb a 1 indicativo di sensibilizzazione genuina al polline di Ambrosia, così come la determinazione delle IgE anti-Art v 1 e Art v 3, indicativo di sensibilizzazione genuina al polline di Artemisia. Nel contempo, la determinazione, *in vitro* delle IgE anti-Par j2 rappresenta un marcatore eccellente ad elevata specificità per la sensibilizzazione alla Parietaria.

D'altra parte, a causa di periodi di fioritura in sovrapposizione, come nel caso dell'olivo con le graminacee oppure, nel caso della lanciuola con le stesse graminacee, è possibile dirimere il quesito diagnostico attraverso la misura delle IgE mono-molecolari verso i marcatori stagionali specifici.

I biomarcatori molecolari responsabili delle cross-sensibilizzazioni

Nelle fonti allergeniche, accanto alle molecole specie-specifiche, sono presenti molecole a carattere ubiquitario, che sono diffuse in seno ad una o più specie botaniche o animali.

Inevitabilmente la sensibilizzazione IgE a queste componenti allergeniche, spesso denominate panallergeni, può implicare una cross-allergia più o meno importante. Tra i più importanti panallergeni troviamo le profiline, le polcalcine, le tropomiosine, le albumine ed i Cross-reactive Carbohydrate Determinants (CCD).

Le profiline come la Bet v 2 e il Phl p 12, rappresentano una famiglia di proteine presenti nelle specie del regno vegetale, come polline, cibo vegetale e lattice. Esse mostrano un'ampia reattività crociata delle IgE in tutte le specie anche non imparentate, e quindi le profiline di erba o betulla possono essere utilizzate come marcatori sostitutivi per altre profiline (53-55). Nell'ambito della specifica fonte allergenica, le profiline sono allergeni minori, il che significa che <50% (tipicamente 10-20%) dei pazienti allergici ai pollini è sensibilizzato alla profilina. La sensibilizzazione alla profilina è molto comune tra i pazienti allergici ai pollini delle graminacee e, proprio in questi casi, ritroviamo casi clinici di cross-allergie con alimenti di origine vegetale con sindrome orale allergica (SOA).

Le polcalcine come la Bet v 4 e il Phl p 7, rappresentano una famiglia di proteine presenti in tutti i pollini e mostrano un'ampia reattività crociata delle IgE. Quindi le polcalcine di graminacee e betulla possono essere utilizzate come marcatori sostitutivi per altre polcalcine. Le IgE anti-polcalcine possono determinare sintomi persistenti dovuti alla sovrapposizione delle stagioni polliniche degli alberi, delle erbe e delle graminacee.

Una famiglia a parte di molecole largamente cross-reattive è rappresentata dai CCD. I CCD sono in grado di sensibilizzare pazienti allergici ai pollini, alimenti e veleni d'imenottero, ma raramente possono causare in modo autonomo reazioni allergiche. I CCD fanno parte della struttura delle glicoproteine allergeniche e le IgE specifiche possono essere quantitativamente misurate con il test denominato MUXF3 CCD bromelain. Nella Figura 3 è riportato un esempio di catena N-glicano.

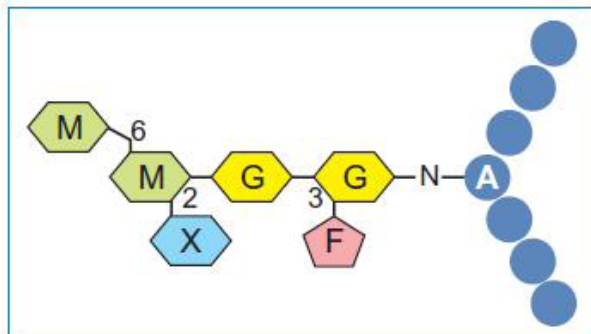


Figura 3

Il MUXF3 CCD Bromelin, è un reagente CCD contenente solamente l'epitopo carboidratico MUXF3 che impedisce il legame degli anticorpi IgE ad altri epitopi della bromelina.

La catena esa-glicanica è legata al peptide di un'asparagina (Asn) ed è composta di due N-acetil-glucosamine (G), due mannosio (M), un 1,3-fucosio (F) e un 1,2-xilosio (X). La catena "MUXF3" è spesso ritrovata nelle glicoproteine del mondo vegetale. Gli estratti allergenici del mondo vegetale contengono frequentemente le molecole di CCD, mentre le componenti prodotte per uso diagnostico con tecnologia ricombinante sono tipicamente CCD-free e quindi più specifiche. Il test MUXFE CCD Bromelain può essere utile per interpretare correttamente la reattività di alcuni sieri di pazienti verso gli alimenti vegetali, il lattice e i veleni d'imenottero, dove è frequente la sensibilizzazione IgE specifica verso determinanti antigenici carboidratici.

PROTOCOLLI DIAGNOSTICI

Nell'ambito clinico l'anamnesi è fondamentale per indirizzare la diagnostica allergologica. I sintomi possono già indirizzare verso il gruppo delle fonti allergeniche sospettabili (respiratorie, alimentari, e così via), mentre la stagionalità o meno dei sintomi seleziona ulteriormente i fattori scatenanti come i pollini oppure gli acari della polvere di casa, gli epiteli animali e le muffe. La familiarità, l'area geografica di residenza, la presenza di animali domestici, lo sport praticato, l'ambiente di lavoro e l'evoluzione clinica sono tutti elementi che rendono più agevole l'approfondimento diagnostico e spesso possono essere decisivi per la terapia. A titolo di esempio di diagnostica allergologia avanzata, qui di seguito sono descritte le allergie di carattere respiratorio descrivendone gli attuali protocolli diagnostici che armonizzano il nuovo approccio molecolare con quello tradizionale basato sulle fonti allergeniche estrattive.

Inalanti perenni

Acari

Gli acari della polvere appartengono al genere *Dermatophagoides* e si differenziano in *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae*. Questi si riproducono prevalentemente in autunno e inverno e concedono una pausa durante i mesi estivi. Esistono anche gli acari delle derrate alimentari che provocano allergie con minore frequenza e vengono quindi comunemente chiamati Acari minori, come l'*Acarus siro*, il *Glycyphagus domesticus*, il *Lepidoglyphus destructor*.

Le recenti acquisizioni sulla diagnostica molecolare ci permettono di approfondire l'algoritmo degli Acari della polvere con tre marcatori di sensibilizzazione primaria ed un importante marcatore di cross-reattività definendo con precisione il profilo di sensibilizzazione molecolare, come riportato nella Tabella 1. La prevalenza del Der p 1 e del Der p 2 nella popolazione sensibilizzata agli acari maggiori è del 70% e dell'80% rispettivamente (56). La prevalenza del Der p 23 è del 74% (57,58) mentre quella del Der p 10 è del 10% (59). Interessante la frequenza di monopositività IgE nella popolazione sensibilizzata agli acari maggiori che è del 6-7% per il Der p 1, del 19-22% per il Der p 2, del 4-6% per il Der p 23 (56-58), solamente del 1% per il Der p 10 (59).

Tabella 1

Marcatori di sensibilizzazione per gli acari della polvere

Acari della polvere	
Esami di 1° livello	<i>Dermatophagoides pteronyssinus e farinae</i> (d1 e d2)
Approfondimento molecolare	Der p 1 Cistein proteasi
	Der p 2 NPC2
	Der p 23 PLP
	Der p 10 Tropomiosina (marcatore di cross-reattività con invertebrati eduli)

NCP2, Proteina C2 Niemann-Pick; PLP, Proteina peritrofinica.

La differenziazione tra i tre marcatori specifici Der p 1, 2 e 23 contribuisce significativamente alla scelta appropriata dell'immunoterapia allergene-specifica (AIT) (60). Nel contempo la scoperta e la recente disponibilità della determinazione del Der p 23 ha consentito di definire meglio il rischio di sviluppo di patologia asmatica (58). Il Der p 10, laddove dominante, deve far sospettare il rischio di un'allergia alimentare ai crostacei, insetti o molluschi.

Derivati animali

La sensibilizzazione ai derivati degli animali è maggiormente circoscritta ai due maggiori animali domestici: gatto e cane. L'allergia al gatto e al cane è considerata uno dei più importanti fattori di rischio per lo sviluppo di asma e rinite. Gli allergeni sono maggiormente presenti nelle forfore, gli epiteli, la saliva e le urine (61).

L'algoritmo per l'approfondimento molecolare dell'allergia agli animali domestici prevede il Fel d 1 e il Can f 1, 2, 4 e 5, come rispettivi marcatori di sensibilizzazione primaria per il gatto e per il cane (Tabella 2) (62). Recenti studi hanno dimostrato che le sensibilizzazioni verso il Fel d 1, il Can f 1 e il Can f 2 sono associate all'incremento del FeNO e del conteggio degli eosinofili. Conseguentemente le sensibilizzazioni alle componenti allergeniche dei derivati animali hanno valore prognostico e sono indicatori di gravità per l'asma (63,64).

Tabella 2

Marcatori di sensibilizzazione per gli animali domestici (gatto e cane)

Gatto	
Esami di 1° livello	Forfora di gatto (e1)
Approfondimento molecolare	Fel d 1 Secretoglobina
	Fel d 4 Lipocalina
	Fel d 7 Lipocalina
	Fel d 2 Siero albumina (marcatore di cross-reattività con carni)
Cane	
Esami di 1° livello	Forfora di cane (e5)
Approfondimento molecolare	Can f 1 Lipocalina
	Can f 2 Lipocalina
	Can f 4 Lipocalina
	Can f 5 Callicreina
	Can f 3 Siero albumina (marcatore di cross-reattività con carni)

Molto interessante il significato della callicreina (Can f 5), una componente prostatica del cane maschio e presente anche nelle sue forfore (65). La callicreina è responsabile della correlata positività con altre fonti allergeniche come il fluido seminale umano.

Dal 19,5 al 42,2% dei pazienti sensibilizzati al cane, sono monosensibilizzati al Can f 5 (66,67): tale quadro clinico suggerisce una efficace soluzione per evitare di somministrare terapia (avoidance therapy), evitando il cane di sesso maschile.

Muffe

Le muffe più importanti sono l'*Alternaria alternata* e l'*Aspergillus fumigatus*. La prima è una specie comune che rappresenta circa il 15% delle spore in atmosfera e si sviluppa di frequente anche sugli alimenti (68). L'*Aspergillus fumigatus* si può considerare ubiquitario essendo presente anche nel suolo, nel materiale organico in decomposizione, nella polvere e nei sistemi di condizionamento aria. Può essere responsabile di uno spettro di manifestazioni respiratorie che vanno dall'aspergillosi allergica, all'aspergilloma fino ad arrivare all'aspergillosi invasiva. I micofiti sporulano in estate-inizio autunno, ma un'anamnesi attenta può valutarne l'esposizione anche in ambienti interni, come abitazioni o luoghi di lavoro, situazioni che rendono i sintomi persistenti.

Le recenti acquisizioni sulla diagnostica molecolare ci permettono di approfondire l'algoritmo per i Micofiti con alcuni marcatori di sensibilizzazione primaria ed un importante marcatore di cross-reattività definendo con precisione il profilo di sensibilizzazione molecolare (Tabella 3)

La sensibilizzazione ad Alt a 1 è presente nel 80-100% dei casi di sensibilizzazione primaria all'*Alternaria alternata* (68). Tale molecola è quindi ottimo indicatore per la prescrizione di una AIT per l'*Alternaria*. Per l'*Aspergillus fumigatus* si conoscono l'Asp f 1, Asp f 2, Asp f 3, Asp f 4 e Asp f 6.

Tra le manifestazioni cliniche, oltre alla rino-sinusite e all'asma allergico, si può riscontrare anche l'aspergillosi broncopolmonare (ABPA) un quadro grave e complesso, in particolare nei pazienti con fibrosi cistica (69). Gli allergeni Asp f 1 e Asp f 3, in genere, si associano alla rino-sinusite e all'asma allergico, mentre Asp f 2 e in particolare Asp f 4 ed Asp f 6, si associano più specificamente a ABPA (70).

Inalanti stagionali

Nel caso di sospette allergie respiratorie a carattere stagionale, è fondamentale conoscere e tenere in considerazione le stagionalità polliniche nella propria area geografica. In Italia le differenze fito-geo-climatiche sono particolarmente rilevanti tanto che le stagioni di fioritura delle piante di interesse allergologico, sono spesso sovrapposte e variabili; nonostante ciò è possibile approssimare le stagioni di pollinazione in tardo-invernale, primaverile ed estiva.

Ovviamente l'esame obiettivo è importante nella fase acuta, mentre può essere silente quando l'esposizione all'allergene è modesta o assente, come per esempio

al di fuori della stagione pollinica. Cipresso, frassino, nocciolo, carpino e betulacee hanno una fioritura tardo-invernale/primaverile precoce. Parietaria, graminacee, olivo, quercia, platano, lanciola e chenopodio hanno una fioritura primaverile. Artemisia, ambrosia e salsola hanno una fioritura estiva. Ovviamente, a causa dell'attuale situazione climatologica, i calendari pollinici stanno subendo importanti amplificazioni tali da diventare in alcuni casi, quasi perenni come la parietaria nel meridione. Oggi la distribuzione dei calendari pollinici è disponibile on-line con elaborazioni aggiornate praticamente in tempo reale su tutto il territorio italiano. (<https://www.pollinieallergia.net/bollettino-pollini.php>)

Graminacee

L'allergia alle graminacee rappresenta uno degli esempi più evidenti di cross-reattività tra specie similari. Sono infatti più di 120 le specie polliniche di queste angiosperme in Italia. L'area con maggiore prevalenza è soprattutto la pianura Padana, seguita dalla zona pre-alpina, il nord-adriatico, la Sardegna ed il centro Tirreno (70).

Sono state individuate nella Coda di topo (*Phleum pratense*), nella Erba canina (*Cynodon dactylon*), nella Gramigna dei prati (*Poa pratensis*) e nella Bambagiona (*Holcus Lanatus*) le quattro principali specie botaniche capostipiti delle graminacee che vanno incluse in un pannello minimale ad elevata efficienza diagnostica già al 1° livello.

Le recenti acquisizioni sulla diagnostica molecolare ci permettono di approfondire l'algoritmo delle Graminacee con tre marcatori di sensibilizzazione primaria ed almeno due importanti marcatori di cross-reattività (Tabella 4).

Tabella 3

Marcatori di sensibilizzazione per le muffe

		Muffe
Esami di 1° livello	<i>Alternaria alternata</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i> (m6 e m3)	
Approfondimento molecolare	Alt a 1	Glicoproteina acidica
	Asp f 1	Mitogillina
	Asp f 2	PLF
	Asp f 3	PMP
	Asp f 4	
	Asp f 6	Superossido dismutasi (marcatore di cross-reattività con altre muffe)

PLF, *Pinus massoniana-Liquidamber formosana mixed forest*; PMP, *Platelet Microbicidal Protein*.

Tabella 4

Marcatori di sensibilizzazione per le graminacee

		Graminacee
Esami di 1° livello	Coda di topo (g6), Erba canina (g2), Gramigna dei prati (g8), Bambagiona (g13)	
Approfondimento molecolare	Cyn d 1	Gruppo 1 graminacee
	Phl p 1	Gruppo 1 graminacee
	Phl p 5	Gruppo 5 graminacee
	Phl p 7	Polcalcina (marcatore di cross-reattività con altri pollini)
	Phl p 12	Profilina (marcatore di cross-reattività con pollini e alimenti vegetali)
	Asp f 6	Superossido dismutasi (marcatore di cross-reattività con altre muffe)

La prevalenza del Cyn d 1 e del Phl p 1 nella popolazione sensibilizzata alle graminacee è del 75-90% e del 80% rispettivamente. La prevalenza del Phl p 5 è del 65-85% mentre quella del Phl p 7, polcalcina e Phl p 12, profilina, è del 10% e 10-30% rispettivamente (71).

La sensibilizzazione alla profilina si associa alla SOA mentre la sensibilizzazione alla polcalcina ha valore prognostico per il rischio di asma. L'eventuale mono sensibilizzazione ad uno solo di questi panallergeni deve indurre il medico a rivalutare il quadro clinico allo scopo di ricercare altrove il marcatore di sensibilizzazione primaria (62).

La differenziazione tra i tre marcatori specifici Cyn d 1, Phl p 1 e Phl p 5 consente di confermare la genuina sensibilizzazione alla relativa graminacea ed è raccomandata per un'appropriata prescrizione dell'AIT (71, 72).

Erbe

Le composite, le urticacee, le chenopodiacee, le amarantacee e le plantaginacee, rappresentano le varie famiglie di erbe, più o meno infestanti, che si distribuiscono in maniera eterogenea sul territorio italiano. Tra le urticacee, la Parietaria presenta una diffusione importante ormai anche al Nord ed un impatto clinico frequentemente indirizzato verso le crisi asmatiche. Tra le composite è fortemente emergente l'Ambrosia, aggressiva e molto infestante che ha colonizzato soprattutto le regioni nord-occidentali con fioritura nel periodo tardo-estivo.

Sono state individuate nella *Parietaria judaica* o *officinalis*, nell'Ambrosia (*Ambrosia elatior*), nell'Assenzio selvatico (*Artemisia vulgaris*), nella Lanciuola (*Plantago lanceolata*), nell'Erba cali (*Salsola kali*) e nel Farinaccio (*Chenopodium album*) le principali specie botaniche rappresentative di questo largo gruppo di famiglie erbacee che vanno incluse in un pannello minimale ad elevata efficienza diagnostica già al 1° livello.

Le recenti acquisizioni sulla diagnostica molecolare ci permettono di approfondire l'algoritmo includendo i rispettivi marcatori di sensibilizzazione primaria e due importanti marcatori di cross-reattività (Tabella 5).

Tabella 5

Marcatori di sensibilizzazione per le erbe

Erbe	
Esami di 1° livello	<i>Parietaria Judaica</i> o <i>Officinalis</i> (w21 o w 19), Ambrosia (w1), Assenzio selvatico (w6), Lanciuola (w9), Erba cali (w11)
	Par j 2 LTP
	Amb a 1 Pectato liasi
	Art v 1 Defensina
	Art v 3 LTP
Approfondimento molecolare	Pla I 1 Tripsina inibitore
	Sal k 1 Pectin metilesterasi
	Che a 1 Tripsina inibitore
	Phl p 7 Polcalcina (marcatore di cross-reattività con altri pollini)
	Phl p 12 Profilina (marcatore di cross-reattività con pollini e alimenti vegetali)

LTP, Lipid Transfer Protein.

Nell'area mediterranea la prevalenza di sensibilizzazione al Par j 2 nei pazienti allergici alla Parietaria è circa l'80% (48). Art v 1 è prevalente fino al 95% dei pazienti allergici all'Assenzio dipendendo dalle regioni geografiche, mentre Art v 3 può essere responsabile di "pollen-food syndromes" associate con allergie alle erbe (73).

Approssimativamente circa il 67% degli individui con IgE specifiche per *Salsola kali* è sensibilizzato al Sal k 1 (74), rappresentante maggiore delle chenopodiacee distribuite maggiormente nei litorali meridionali con fioritura estiva.

La sensibilizzazione alla profilina si associa alla sindrome orale allergica mentre la sensibilizzazione alla polcalcina ha valore prognostico per il rischio di asma. L'eventuale mono sensibilizzazione ad uno solo di questi panallergeni deve indurre il medico a rivalutare il quadro clinico allo scopo di ricercare altrove il marcatore di sensibilizzazione primaria (68).

Alberi

L'ordine delle *Fagales* rappresenta certamente il gruppo di alberi ad alto fusto più frequente in Italia con oltre 150 specie diverse molto simili tra loro (Betulla, Ontano, Nocciolo, Faggio, Quercia e Carpino) e con elevato livello di cross-reatzione tra i rispettivi pollini (54). La prevalenza delle pollinosi alle *Fagales* raggiunge il 36% nel nord Italia. Si aggiungono a questo gruppo le *Cupressacee*, le *Oleacee* e le *Platanacee* con una prevalenza che raggiunge il 28% nel centro Italia, il 25% nel sud ed il 9% nel sud rispettivamente (74).

Dal punto di vista palinologico sono stati individuati nella Betulla, nel Cipresso, nell'Olivo e nel Platano, i principali alberi che vanno inclusi in un pannello minimale ad elevata efficienza diagnostica già al 1° livello.

Le recenti acquisizioni sulla diagnostica molecolare ci permettono di approfondire l'algoritmo includendo i rispettivi marcatori di sensibilizzazione primaria e due importanti marcatori di cross-reattività (Tabella 6).

La prevalenza di sensibilizzazione al Bet v 1 nei pazienti allergici alla betulla raggiunge il 95% (53).

Tabella 6*Marcatori di sensibilizzazione per gli alberi*

Esami di 1° livello	Alberi	
	Betulla (t3), Cipresso (t23), Olivo (t9), Platano (t11)	
Approfondimento molecolare	Bet v 1	PR-10
	Cup a 1	Pectato liasi
	Ole e 1	Tripsina inibitore
	Pla a 1	Inibitore dell'invertasi
	Bet v 4	Polcalcina (marker di cross-reattività con altri pollini)
	Bet v 2	Profilina (marker di cross-reattività con pollini e alimenti vegetali)

PR-10, pathogenesis related proteins 10.

Si deve ricordare che la Bet v 1 è anche una molecola presente in vegetali come le *Apiacee* (sedano, carota), le *Corylacee* (nociola), le *Rosacee* (mela, pera, pesca, albicocca, ciliegia,...) e le *Fabacee* (arachidi, soia). Questo giustifica l'elevato livello di allergie alimentari concomitanti, di carattere locale, nei pazienti con allergie al polline delle betulacee (80%) (75). Ole e 1 e Pla a 1 raggiungono rispettivamente il 70% ed il 90% di prevalenza nei pazienti allergici all'Olivo ed al Platano. Per quanto riguarda il Cup a 1, marcatore altamente specie-specifico, emergono valori di prevalenza variabili che dipendono fortemente dalle regioni geografiche considerate.

La sensibilizzazione alla profilina si associa a SOA mentre la sensibilizzazione alla polcalcina ha valore prognostico per il rischio di asma. L'eventuale mono sensibilizzazione ad uno solo di questi panallergeni deve indurre il medico a rivalutare il quadro clinico allo scopo di ricercare altrove il marcatore di sensibilizzazione primaria (71). La differenziazione tra i marcatori specifici Bet v 1, Cup a 1, Ole e 1 e Pla a 1, consente di confermare la genuina sensibilizzazione al relativo polline ed è raccomandata per un'appropriata prescrizione dell'AIT (72,74).

CONCLUSIONI

Nel complesso scenario che contraddistingue la gestione clinica delle malattie allergiche, il Laboratorio di Diagnostica allergologica sta assumendo un ruolo di fondamentale importanza nel divenire della diagnostica di precisione attraverso le recenti tecnologie ricombinanti e le continue acquisizioni scientifiche nel settore della biologia molecolare. In seguito allo sviluppo di tecnologie che hanno consentito determinazioni quantitative con saggi calibrati contro standard WHO, la determinazione delle IgE specifiche ha raggiunto la capacità di distinguere cloni monomolecolari che permettono livelli di precisione diagnostica decisamente più avanzati rispetto al passato. A questi promettenti biomarcatori si aggiungono le conferme diagnostiche con marcatori sempre più utili come la tripsina, riconosciuta tra l'altro come criterio diagnostico nella mastocitosi e le speranze di nuovi marcatori ematici come la EDN), che possano affiancare il test del FeNO nello studio dell'infiammazione eosinofila delle vie aeree. Aspettative promettenti sono riservate al BAT che è candidabile ad un supporto aggiuntivo nella diagnosi delle allergie alimentari.

In questo documento è stato affrontato il vasto campo delle malattie allergiche respiratorie ponendo l'attenzione soprattutto alle forme IgE mediate. La diagnostica molecolare consente già oggi, come non mai prima, di distinguere sensibilizzazioni primarie, dalle cross-sensibilizzazioni, sia di tipo polline-polline che di tipo polline-alimento. Nello scopo di facilitare il compito del laboratorio nella gestione degli esami di approfondimento diagnostico a livello molecolare, sono stati riportati gli algoritmi per le sospette sintomatologie inalatorie perenni causate dagli acari, dai derivati animali e dalle muffe. Sono stati altresì riportati gli algoritmi per le sospette sintomatologie inalatorie stagionali causate dai pollini delle graminacee, delle erbe e degli alberi.

Il profilo di sensibilizzazione molecolare contenuto nel referto di Laboratorio rappresenta un valore aggiunto che integrato al contesto clinico del paziente proietta la diagnostica allergologica verso la medicina di precisione. Il processo di identificazione e caratterizzazione di centinaia di molecole allergeniche è ancora in corso e arricchisce ogni giorno gli archivi delle banche dati della WHO e dell'International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) Allergen Nomenclature Sub-Committee (<http://www.allergen.org/>). L'aumento delle informazioni che vengono acquisite quotidianamente sul piano della biologia molecolare rappresenterà un settore dove sarà vantaggioso applicare l'utilizzo dell'intelligenza artificiale, con auspicabili benefici nella corretta interpretazione dei molteplici profili di sensibilizzazione molecolare dei pazienti affetti da malattie allergiche con sensibilizzazioni complesse.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno

BIBLIOGRAFIA

1. Muraro A. EAACI Advocacy Manifesto. Tackling the allergy crisis in Europe www.veroval.info/EEACI_Advocacy_Manifesto
2. Coombs RR, Gell PG. : Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In: Gell PG, Coombs RR, Edts, Clinical Aspects of Immunology, Oxford: Blackwell, 1963.
3. Faggian D, Brusca I, Cinti B, Caruso B, Dente B, Mazzarello MG, et al. per il Gruppo di Studio SIBioC "Allergologia di Laboratorio. Determinazione delle immunoglobuline E specifiche. *Biochim Clin* 2018;42:74-78

4. Pascal M, Moreno C, Dávila I, Tabar AI, Bartra J, Labrador M et al. Integration of in vitro allergy test results and ratio analysis for the diagnosis and treatment of allergic patients (INTEGRA). *Clin Transl Allergy* 2021; e12052
5. Pascal M, Moreno C, Dávila I, Tabar AI, Bartra J, Labrador M, et al. Integration of in vitro allergy test results and ratio analysis for the diagnosis and treatment of allergic patients (INTEGRA). *Clin Transl Allergy* 2021;e12052.
6. Zetterström O, Johansson SGO. IgE concentrations measured by PRIST in serum of healthy adults and in patients with respiratory allergy. *Allergy* 1981;36:537-47.
7. Faggian D. Valutazione del sistema UNICAP 1000 per il dosaggio in completa automazione delle IgE specifiche. *Biochim Clin* 2004;28:337-44.
8. Vlieg-Boerstra BJ, van de Weg WE, van der Heide S, Dubois AE. Where to prick the apple for skin testing? *Allergy* 2013;68:1196-8.
9. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Analytical Performance Characteristics and Clinical Utility of Immunological Assays for Human Immunoglobulin E (IgE) Antibodies and Defined Allergen Specificities; approved guideline. CLSI document I/LA20. CLSI Wayne, PA, 2016.
10. Yman L. Standardization of in vitro methods. *Allergy* 2001;56:70-4.
11. Ahlstedt S. Understanding the usefulness of specific IgE blood tests in allergy. *Clin Exp All* 2002;32:11-6.
12. Johansson SGO. ImmunoCAP Specific IgE test: an objective for research and routine allergy diagnosis. *Expt Rev Mol Diagn* 2004;4:270-3.
13. Thorpe S, Heath A, Fox B, Patel D, Egner W The 3rd International Standard for serum IgE: international collaborative study to evaluate a candidate preparation. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:1283-9.
14. Wood RA, Segall N, Ahlstedt S, Williams PB. Accuracy of IgE antibody laboratory results. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;99:34-41.
15. Pal B, Szecsi, Stender S. Comparison of immunoglobulin e measurements on immulite and immunocap in samples consisting of allergen-specific mouse-human chimeric monoclonal antibodies towards allergen extracts and four recombinant allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2013;162:131-4.
16. Schwartz, LB. Diagnostic Value of tryptase in anaphylaxis and mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006; 26:451-63.
17. Valent P, Akin C, Arock M, Brockow K, Butterfield JH, Carter MC et al. Definitions, criteria and global classification of mast cell disorders with special reference to mast cell activation syndromes: a consensus proposal. *Int Arch Allergy Imm* 2012;157:215-25.
18. Akin C and Valent P. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis in 2014. *Immunol Allergy Clin N Am* 2014;34:207-18.
19. Ruëff, F, Przybilla B, Biló MB, Müller U, Scheipl F, Aberer W, et.al. Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: Importance of baseline serum tryptase –a study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:1047-54.
20. Simons FE, Arduzzo LR, Biló MB, Cardona V, Ebisawa M, El-Gamal YM et al. International consensus on (ICON) anaphylaxis. *World Allergy Organ J* 2014;7:9.
21. Simons FE, Arduzzo LR, Dimov V, Ebisawa M, El-Gamal YM, Lockey RF et al. World Allergy Organization Anaphylaxis Guidelines: 2013 update of the evidence base. *Int Arch Allergy Immunol* 2013;162:193-204.
22. Ruëff, F, Vos B, Oude Elberink J, Bender A, Chatelain R, Dugas-Breit S, et.al. Predictors of clinical effectiveness of hymenoptera venom immunotherapy. *Clin and experimental allergy* 2014;44:736-46.
23. Valent P. Mastocytosis: a paradigmatic example of a rare disease with complex biology and pathology. *Am J Cancer Res* 2013;3:159-72.
24. Carter MC, Metcalfe DD, Komarow HD. Mastocytosis. *Immunology and allergy clinics of North America* 2014 34:181-96.
25. Florian S, Krauth MT, Simonitsch-Klupp I. Indolent systemic mastocytosis with elevated serum tryptase, absence of skin lesions, and recurrent severe anaphylactoid episodes. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;136:273-80.
26. Frieri M, Quershi M.. Pediatric Mastocytosis: a review of the literature. *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol* 2013;26:175-80.
27. González de Olano D, de la Hoz Caballer B, Núñez López R. Prevalence of allergy and anaphylactic symptoms in 210 adult and pediatric patients with mastocytosis in Spain: a study of the Spanish network on mastocytosis (REMA). *Clin Exp Allergy* 2007; 37:1547-55.
28. Brockow K, Jofer C Behrendt JH, Ring J. Anaphylaxis in patients with mastocytosis: a study on history, clinical features and risk factors in 120 patients. *Allergy* 2008;63:226-32.
29. Alvarez-Twose I, de Olano DG, Sánchez-Muñoz L, Clinical, biological, and molecular characteristics of clonal mast cell disorders presenting with systemic mast cell activation symptoms. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:1269-78.
30. Carter MC, Metcalfe DD. Paediatric mastocytosis. *Arch Dis Child* 2002;86:315-9.
31. Schwartz LB, Yunginger JW, Miller JS, Bokhari R, Dull D The time course of appearance and disappearance of human mast cell tryptase in the circulation after anaphylaxis. *J Clin Invest* 1989;83:1551-5.
32. Min H, Moxley G, Neale MC, Schwartz LB. Effect of sex and haplotype on plasma tryptase levels in healthy adults. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:48-51.
33. Komarow HD, Hu Z, Brittain E, Uzzaman A, Gaskins D, Metcalfe DD. Serum tryptase levels in atopic and nonatopic children. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:845-7.
34. Metcalfe DD. Regulation of normal and neoplastic human mast cell development in mastocytosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2005;116:185-204.
35. Schwartz LB, Lewis RA, Austen KF. Tryptase from human pulmonary mast cells. *J Biol Chem* 1981;256:11939-43.
36. Pereira PJ, Bergner A, Macedo-Ribeiro S, Huber R, Matschiner G, Fritz H, Sommerhoff CP, Bode W. Human beta-tryptase is a ring-like tetramer with active sites facing a central pore. *Nature* 1998; 392:306-11.
37. Yunginger JW, Nelson DR, Squillace DL, Jones RT, Holley KE, Hyma BA et al Laboratory Investigation of Deaths Due to Anaphylaxis. *J Forensic Sci* 1991;36 857-65.
38. Low I, Stables S. Anaphylactic deaths in Auckland, New Zealand: a review of coronial autopsies from 1985 to 2005. *Pathology* 2006;38:328-32.
39. Van der Linden PWG, Hack CE, Poortman J, Vivié-Kipp YC, Struyvenberg A, van der Zwan JK Insect-sting challenge in 138 patients: relation between clinical severity of anaphylaxis and mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:110-8.
40. Sperr WR, Jordan JH, Fiegl M, Escribano L, Bellas C, Dirnhöfer S et.al. Serum Tryptase Levels in Patients with Mastocytosis: Correlation with mast Cell Burden and Implication for Defining the Category of Disease. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;128:136-41.
41. Moscato G, Pala G, Cullinan P, Folletti I, Gerth van

- Wijk R, Pignatti P, et al. EAACI Position Paper on assessment of cough in the workplace. *Allergy* 2014;69:292-304
42. Valent P, Akin C, Metcalfe DD. Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and novel emerging treatment concepts. *Blood* 2017;129:1420-7.
 43. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127:2391-405
 44. Horny HP, Akin C, Arber D, et al. Mastocytosis. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, eds. World Health Organization (WHO) Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2016.
 45. Badar A, Saeed W, Hussain MM, Aslam M. Correlation of eosinophil cationic protein with severity of asthma. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2004;16:66-71.
 46. Koh YY, Kang H, Kim CK. Ratio of serum eosinophil cationic protein/blood eosinophil counts in children with asthma: comparison between acute exacerbation and clinical remission. *Allergy Asthma Proc* 2003;24:269-74.
 47. Joseph-Bowen J, de Klerk N, Holt PG, Sly PD. Relationship of asthma, atopy, and bronchial responsiveness to serum eosinophil cationic proteins in early childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1040-5.
 48. Chen FJ, Liao H, Huang XY, Xie CM. Importance of fractional exhaled nitric oxide in diagnosis of bronchiectasis accompanied with bronchial asthma. *J Thorac Dis* 2016;8:992-9.
 49. Rubio A., Vivinus-Nébot M., Bourrier T, Saggio B, Albertini M, Bernard A. Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children. *Allergy* 2011;66:92-100.
 50. Asero R. Plant Food Allergies: A suggested approach to Allergen-Resolved Diagnosis in the clinical practice by identifying easily available sensitization markers. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;138:1-11.
 51. Mirnezami R, Nicholson J, Darzi A. Preparing for precision medicine. *N Engl J Med* 2012;366:489-91.
 52. WHO – IUIS Allergen nomenclature – www.allergen.org (ultimo accesso: novembre 2023).
 53. Allergen Encyclopedia. Scientific Information on Whole Allergens and Allergen Components. <https://www.thermofisher.com/diagnostic-education/hcp/gb/en/resource-center/allergen-encyclopedia.html> (ultimo accesso: novembre 2023).
 54. Sastre J. Molecular diagnosis in allergy. *Clin Exp Allergy* 2010;40:1442-60.
 55. Luengo O, Cardona V. Component resolved diagnosis: when should it be used? *Clin Transl Allergy*. 2014;4:28
 56. Kazemi-Shirazi L, Niederberger V, Linhart B, Lidholm J, Kraft D, Valenta R. Recombinant Marker Allergens: Diagnostic Gatekeepers for the Treatment of Allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;127:259-68
 57. Batard T, Baron-Bodo V, Martelet A, Le Mignon M, Lemoine P, Jain K et al. Patterns of IgE sensitization in house dust mite-allergic patients: implications for allergen immunotherapy. *Allergy* 2016;71:220-9.
 58. Weghofer M, Grote M, Resch Y, Casset A, Kneidinger M, Kopec J et al. Identification of Der p 23, a Peritrophin-like Protein, as a New Major Dermatophagoides pteronyssinus Allergen Associated with the Peritrophic Matrix of Mite Fecal Pellets. *J Immunol* 2013;190:3059-67.
 59. Mueller GA, Randall TA, Glesner J, Pedersen LC, Perera L, Edwards LL et al. Serological, genomic, and structural analyses of the major mite allergen Der p 23. *Clin Exp Allergy* 2016; 46:365-76.
 60. 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.
 61. Mattsson L, Lundgren T, Everberg H, Larsson H, Lidholm J. Prostatic kallikrein: a new major dog allergen. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:362-8.
 62. Bjerg A, Winberg A, Berthold M, Mattsson L, Borres MP, Rönmark E A population-based study of animal component sensitization, asthma, and rhinitis in schoolchildren. *Pediatr Allergy Immunol* 2015;26:557-63.
 63. Asero R, Conte M, Senna GE. Features of sensitization to airborne allergens among extra-European immigrants living in 2 distinct areas of Northern Italy. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2012;44:183-7.
 64. Zahradnik E, Raulf M. Respiratory allergens from furred mammals: environmental and occupational exposure. *Vet Sci* 2017;4:38.
 65. Nwaru BI, Suzuki S, Ekerljung L, Sjölander S, Mincheva R, Rönmark EP et al. Furry animal allergen component sensitization and clinical outcomes in adult asthma and rhinitis. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2019;7:1230-8
 66. Uriarte SA, Sastre J. Clinical relevance of molecular diagnosis in pet allergy. *Allergy* 2016;71:1066-8.
 67. Ukleja-Sokolowska N, Gawronska-Ukleja E, Zbikowska-Gotz M, Socha E, Lis K, Sokolowski Ł, Kuźmiński A et al. Analysis of feline and canine allergen components in patients sensitized to pets. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2016;12:61.
 68. Basagana M, Luengo O, Labrador M, Garriga T, Mattsson L, Lidholm J et al. Component-Resolved Diagnosis of Dog Allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2017;27:185-7.
 69. Feo Brito F, Alonso AM, Carnés J, Martín-Martín R, Fernández-Caldas E, Galindo PA, . Correlation between Alt a 1 levels and clinical symptoms in Alternaria alternate monosensitized patients. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2012;22:154-9.
 70. Canonica GW, Ansotegui IJ, Pawankar R, Schmid-Grendelmeier P, van Hage M, Baena-Cagnani CE, et al. A WAO - ARIA - GA²LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *World Allergy Organization Journal* 2013;6:17.
 71. 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.
 72. Andersson K, Lidholm J. Characteristics and immunology of Grass Pollen Allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;130:87-107.
 73. Valenta R, Twaroch T, Swoboda I. Component-resolved diagnosis to optimize allergen-specific immunotherapy in the Mediterranean area. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007;17:36-40.
 74. Tripodi S, Frediani T, Lucarelli S, Macrì F, Pingitore G, Di Rienzo Businco A et al. Molecular profiles of IgE to Phleum pratense in children with grass pollen allergy: Implications for specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129: 834-49.
 75. Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Webe B. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann N.Y Acad Sci* 2002; 964:47-68.