



## **Il microarray proteomico per la determinazione delle IgE specifiche su molecole allergeniche: il Test ISAC su una popolazione pediatrica**

Elena Chiodi, Giovanni Raimondo Pieri, Amelia Mascolo, Vania Giunta,  
Mara De Amici, Silvia Caimmi, Antonietta Marchi, Gian Luigi Marseglia

*Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia*

---

### ***Il microarray proteomico per la determinazione delle IgE specifiche su molecole allergeniche: il Test ISAC su una popolazione pediatrica***

L'allergia è un tipo di reazione immunitaria messa in atto dall'organismo nei confronti di sostanze normalmente presenti nell'ambiente: gli allergeni. Possiamo distinguere reazioni IgE mediate, miste e non IgE mediate, quest'ultime sono preponderanti. Esistono diverse famiglie di allergeni: vegetali, animali, muffe, farmaci e sostanze chimiche. È semplice comprendere le reazioni crociate tra allergeni appartenenti alla stessa famiglia, mentre per comprendere le reazioni crociate tra allergeni appartenenti a famiglie e specie diverse, sono stati creati i panallergeni: sostanze presenti in famiglie tassonomicamente non correlate, aventi in comune un determinante, che possono creare sensibilizzazione allergica e reazioni crociate. La diagnosi di allergia è basata su un'anamnesi accurata e sulla ricerca di sostanze a cui il paziente è stato sensibilizzato tramite l'utilizzo di metodiche in vivo (SPT) e in vitro (IgE totali e specifiche) che però sono di difficile standardizzazione. Un'importante innovazione biotecnologica è rappresentata dagli allergeni ricombinanti: molecole allergeniche prodotte da un estratto allergenico. In questo studio abbiamo utilizzato il microarray proteomico: un test multianalitico che ci permette di effettuare un'analisi simultanea di anticorpi allergene specifici. Abbiamo considerato un campione di 223 bambini (65% maschi e 39% femmine), seguiti presso la clinica Pediatrica del San Matteo, dei quali abbiamo raccolto l'anamnesi e i risultati dei test (SPT, IgE specifiche e microarray test); tutti i pazienti sono sintomatici o multi-sintomatici in relazione agli allergeni. Abbiamo soffermato l'attenzione sull'allergia alimentare, in particolare sull'allergia alla nocciola, poiché la sua incidenza è in continuo aumento tra i bambini. La nocciola presenta numerose proteine allergeniche: allergeni maggiori (Cor a1, Cor a8 e Cor a9) responsabili di reazioni sistemiche gravi e allergeni minori (profiline, oleosine e CCD). Nel nostro studio è emerso che la nocciola presenta un'importante e complessa cross-reattività e che la maggior parte dei nostri piccoli pazienti presenta sintomatologia orale e pollinosa. Infine abbiamo svolto un'analisi statistica dei dati raccolti: è emersa una forte correlazione positiva tra gli SPT o le IgE specifiche e il microarray test. Questa nuova metodica apporta molti vantaggi in campo allergologico pediatrico.

### ***The proteomic microarray for the detection of specific IgE on allergenic molecules: ISAC Test on a pediatric population***

Allergy is an immunologic reaction of the body against substances normally present in the environment: the allergens. We identified IgE-mediated reactions, mixed reactions and not IgE-mediated reactions, the last one are the most common. There are different allergen families: plants, animals, moulds, drugs and chemicals. It's easy to un-

derstand the cross- reactions between allergens of the same family, while the explanations of reactions between allergenes of different families and species has been led using panallergens: substances present in family not tassonomically related, which have in common a determinant, can trigger allergic sensitization and cross reactions. Diagnosis of allergy is based on accurate anamnesis and on the search of substances which caused sensibilization using in vivo (SPT) and in vitro tests (total and specific IgE) but these tests are difficult to be standardized. An important biotechnological innovation is represented by recombinant allergens: allergenic substances produced by an allergenic extract. In this study we have used the proteomic microarray: a multianalytic test which allows to analyze simultaneously antibodies against specific allergenes. We considered a group of 223 children (65% males and 39% females) from Pediatric Department of San Matteo, we collected anamnesis and some tests' results: SPT, specific IgE and microarray test; all the patients are symptomatic or multi-symptomatic in relation to the allergens. We focused on hazelnut allergy, because its incidence is growing up in childhood. Hazelnut has a lot of allergen components: major allergens (Cor a1, Cor a8 and Cor a9) which are responsible of serious systemic reactions and minor allergens (profilines, oleosines and CCD). In our study we realized that hazelnut has an important and complex cross-reaction and that the most of our young patients has oral symptoms and pollinosys. Finally we arranged statistic analysis of collected data: we found a strong positive relationship between the SPT or specific-IgE and microarray test. With this new method rises a lot of advantages in pediatric allergology.

---

## **Introduzione**

Negli ultimi decenni sono state introdotte importanti innovazioni in campo allergologico che hanno consentito di migliorare la specificità diagnostica e terapeutica. Ecco qui di seguito elencate: i panallergeni, gli allergeni ricombinanti e il microarray proteomico. I panallergeni sono proteine presenti in famiglie non tassonomicamente correlate, ma riconosciute dai pazienti ad esse sensibilizzate, indipendentemente dall'alimento assunto. Il miglioramento delle conoscenze ha dimostrato che tra tutti gli alimenti, a seconda delle diverse proteine che possono essere implicate, l'allergenicità e gravità delle reazioni associate, è spesso legata alle proprietà fisico-chimiche [1-2]. Gli allergeni ricombinanti sono molecole allergeniche prodotte biotecnologicamente, identificate a partire da un estratto allergenico [3-5]. Alcuni studi in vivo nell'uomo hanno dimostrato la capacità degli allergeni ricombinanti di ottenere test cutanei positivi e di stimolare gli organi bersaglio [6-7]. L'utilizzo degli allergeni ricombinanti permette di distinguere, tra le IgE policlonali dirette contro l'estratto allergenico classico, gli anticorpi IgE specifici di un composto molecolare definito. Inoltre permette di stabilire per ciascun paziente lo spettro di specificità delle IgE [8]. Si può affermare che gli allergeni ricombinanti hanno migliorato le conoscenze riguardanti le proteine allergeniche, definito famiglie di allergeni, spiegato le cross-reazioni e mostrato che alcuni profili di sensibilizzazione variano a seconda della regione in cui un individuo vive [9]. Un'altra importante innovazione in campo allergologico è rappresentata dal microarray proteomico (ImmunoCAP ISAC). L'ImmunoCAP ISAC consiste in un supporto solido di vetro con quattro siti di reazione (7mm x 7mm), ciascuno circondato da una maschera protettiva e idrofoba di teflon, che impedisce la contaminazione di liquidi fra i diversi siti di reazione. La superficie del vetrino è studiata in modo tale da permettere un fissaggio ottimale alle proteine che scatenano le allergie senza che per questo venga alterata la loro funzionalità biologica [10]. Sul chip ogni allergene è fissato in triplice copia in ogni sito di reazione. In totale le molecole che vengono testate per ogni singola determinazione sono 103, fornendo così un'ampia gamma di risultati provenienti dalle 40 fonti allergeniche oggi più comuni. Per il test sono utilizzati 20 µl di siero del paziente da esaminare. Pertanto, la possibilità di poter utilizzare sangue capillare nell'ambito della Pediatria è un grande vantaggio, perché permette di effettuare un test diagnostico valido con una procedura minimamente invasiva [11]. Prima di iniziare il saggio, ogni vetrino contenente 4 identici microarray è lavato intensamente per 40 minuti in modo da rimuovere eventuali allergeni non covalentemente legati alla superficie. Poi,

il siero viene dispensato sui pozzetti, e segue un'incubazione di 120 minuti in modo da far aderire efficacemente le IgE del paziente alla piastra. Il passaggio successivo è il posizionamento sul vetrino della soluzione di anticorpi specifici forniti dalla ditta produttrice del kit. L'incubazione dura 120 minuti e a seguire il vetrino può essere definitivamente analizzato. Il legame delle IgE specifiche viene rilevato mediante anticorpi coniugati a fluorocromo eccitato da un laser e quantificato con l'ausilio di un software dedicato [12-14]. L'analisi dei risultati avviene in modo automatico mediante uno scanner che permette l'acquisizione dell'immagine del microarray. Il software elabora automaticamente i dati e crea un report per una lettura facilitata dei dati ottenuti. Nel nostro studio abbiamo soffermato l'attenzione sull'allergia alimentare, in particolare sull'allergia alla nocciola. La nocciola (*Corylus avellana*) appartiene alla famiglia delle noci, che costituiscono un gruppo di alimenti di particolare importanza allergologica. Sono la causa più frequente di anafilassi da alimenti in età pediatrica negli USA [15]. Un recente studio epidemiologico italiano, condotto dalla commissione per le Allergie Alimentari, Anafilassi e Dermatite Atopica della Società Italiana di Immunologia e Allergologia Pediatrica, ha dimostrato un'importanza ancora maggiore per le noci ed in particolare per le nocciole: le noci dopo il latte, erano la seconda causa più frequente di reazione allergica generalizzata da alimenti, responsabili del 16.7% degli episodi e la nocciola costituiva tra tutte le noci la causa più frequente, responsabile di circa il 40% dei casi. L'elevata frequenza di allergia alle nocciole è giustificata probabilmente dal loro elevato consumo [16]. Il valore nutrizionale elevato delle nocciole e la loro palatabilità, giustificano la loro presenza nelle abitudini alimentari dei bambini. Non è infrequente, nei soggetti allergici alle nocciole, il riscontro di allergia o sensibilizzazione allergica nei confronti di altre noci e/o arachidi [17-21]. La nocciola presenta una complessa reattività e numerose molecole allergeniche. Definiamo gli allergeni maggiori (Cor a1, Cor a8 e Cor a9) responsabili di SOA (sindrome orale allergica) e shock anafilattico e gli allergeni minori (Cor a2, Cor a11, Cor a12, Cor a13, Cor a14). Ad oggi tuttavia è possibile dosare solo alcune molecole allergeniche: con l'ImmunoCAP solo Cor a1 e Cor a8; mentre con ImmunoCAP ISAC anche Cor a9. La letteratura evidenzia che la LTP (lipid transfer protein) della nocciola (Cor a8), ha un alto grado di affinità con la LTP della mandorla (62%), della mela (61%), della ciliegia (61%) e della pesca (59%) [22]. Questo spiegherebbe l'importante cross-reattività che si scatena nei soggetti allergici alla nocciola dopo l'ingestione di questa frutta. Altri studi hanno mostrato che la sensibilizzazione alla nocciola si associa fortemente a quella della mandorla, moderatamente a quella per il sesamo e solo debolmente a quella per le arachidi [23-24]. L'allergia alla nocciola può presentarsi con qualunque manifestazione clinica IgE mediata: dalla sindrome orale allergica (SOA) subito dopo l'assunzione dell'alimento, all'orticaria-angioedema, fino alle reazioni allergiche generalizzate. La diagnosi di allergia alla nocciola è basata su un'anamnesi suggestiva e sulla dimostrazione della sensibilizzazione allergica mediante gli SPT o la ricerca delle IgE specifiche. Talvolta, per ottenere una maggiore certezza diagnostica, si può ricorrere al TPO (test di provocazione orale). Allo stesso modo, se la reazione allergica si è verificata da un'oltre un anno, in presenza di IgE specifiche per la nocciola, laddove questo alimento sia stato escluso dalla dieta, è necessario ricorrere al TPO prima di poterlo reintrodurre.

## **Scopo dello studio**

Il procedimento diagnostico si basa sulla pratica clinica e sul laboratorio che ha il ruolo di confermare e di precisare l'eventuale sospetto di malattia allergica. L'impiego della metodica microarray nella diagnostica molecolare allergica ha comportato significativi progressi nella diagnosi delle varie sindromi allergiche, permettendo di ottenere dati altamente specifici sui vari componenti allergenici verso cui i soggetti sono sensibilizzati. Si tratta di un innovativo metodo di diagnostica in vitro per l'analisi semiquantitativa delle immunoglobuline IgE nel plasma o siero umano dirette verso un ampio pannel-

lo di determinanti allergenici. Tuttavia, dal punto di vista metodologico, la validazione e l'identificazione del corretto livello assistenziale a cui utilizzare questa nuova tecnica è ancora in corso. L'obiettivo di questo studio è la comparazione fra diversi iter diagnostici allergologici in un gruppo di pazienti pediatrici al fine di comprendere meglio il ruolo che il test microarray potrebbe svolgere nella diagnostica allergologica e nella applicazione clinica. Al fine di svolgere un'adeguata analisi, effettueremo come prima valutazione un confronto fra le metodiche tradizionali (test in vivo e test in vitro) e la metodica innovativa del microarray (ImmunoCAP ISAC). In un secondo momento andremo anche a cercare eventuali correlazioni fra tutte le metodiche (in vivo e in vitro), oggetto di questo studio.

## **Materiali e metodi**

### ***Campioni dello studio***

Lo studio è stato condotto presso la Clinica Pediatrica dell'Università degli Studi di Pavia – Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia. Sono stati esaminati 223 pazienti in età pediatrica seguiti presso l'Ambulatorio di Allergologia Ospedaliera della Clinica Pediatrica. La popolazione in studio è composta da 146 maschi e 77 femmine. L'età mediana del campione è di 9 anni (range 1-22); un solo paziente risulta avere 22 anni, fuori dall'età pediatrica, ma considerato nello studio in quanto fin dall'età infantile è stato seguito presso il nostro ambulatorio. Nel campione in esame tutti i pazienti risultano sintomatici in relazione all'esposizione a diversi allergeni e la maggior parte di essi sono multisintomatici. Possiamo così suddividerlo: 97 pazienti con dermatite atopica, 96 pazienti con rinite o oculorinite, 64 pazienti con broncospasmi ricorrenti, 54 pazienti con asma bronchiale allergica, 47 pazienti con orticaria allergica, 38 pazienti con angioedema, 24 pazienti con sintomatologia respiratoria variabile, 19 pazienti con sintomatologia gastroenterica, 40 pazienti con tosse secca, 13 pazienti con SOA e 7 pazienti con anafilassi. I pazienti sono stati classificati anche in relazione al tipo di allergeni a cui sono sensibilizzati. Fra gli allergeni che più frequentemente sono causa di sintomatologia allergica, abbiamo individuato le Graminaceae (59% dei pazienti), gli alimenti come frutta secca, frutta fresca, le proteine del latte vaccino (79% dei pazienti) e gli acari (42% dei pazienti). Un gruppo di minor rilevanza è risultato allergico al pelo di cane e/o di gatto (27% dei pazienti), alle muffe (3%) e al lattice (14%). La maggior parte dei pazienti in esame risultano multi-sensibilizzati a più fonti allergeniche.

### ***Metodi utilizzati***

Abbiamo raccolto l'anamnesi fisiologica, patologica e familiare dei 223 pazienti con lo scopo di conoscere al meglio la storia clinica di ciascuno di essi. I pazienti sono stati sottoposti ai seguenti esami diagnostici effettuati presso il Laboratorio di Immuno-Allergologia della Clinica Pediatrica: Skin Prick Test, Prick by Prick, IgE specifiche, IgE totali e microarray.

### ***Metodi statistici***

I dati riguardanti i pazienti sono stati caricati su un programma di archiviazione e successivamente la loro elaborazione è stata effettuata con l'ausilio di un programma di statistica (pacchetto MedCalc versione 9.5). Sono state effettuate analisi descrittive (mediana, 25° e 75° percentile) dei valori dei dosaggi di ImmunoCAP ISAC e ImmunoCAP. Il confronto per tutti i parametri indagati è stato valutato con il test di Mann Whitney. Sono inoltre state valutate le variazioni del dosaggio di ImmunoCAP ISAC in funzione della positività degli SPT tramite l'analisi della varianza non parametrica con il test di Kruskal-Wallis. È stata anche ricercata una possibile correlazione tra i valori dei dosaggi di ImmunoCAP ISAC e ImmunoCAP con la valutazione del coefficiente rho di Spearman. Una curva ROC è stata

poi generata per identificare il cut-off dei livelli di IgE specifiche, con il miglior rapporto tra sensibilità e specificità, nel predire la risposta negativa o positiva dell'ISAC. Infine, è stato testato il Chi-Square per studiare l'ipotesi nulla secondo cui la proteina di deposito della nocciola (Cor a9) e le proteine del gruppo PR-10 e LTP (Cor a1 e Cor a8) siano indipendenti, cioè tali che tutte le categorie (esame positivo o negativo) delle proteine PR-10 e LTP abbiano la stessa frequenza al variare della categoria (esame positivo o negativo) della proteina di deposito. Sono stati considerati significativi i valori di  $p < 0.05$ .

## Risultati

La raccolta dei dati dei pazienti relativi al tipo e al numero di analisi di laboratorio effettuata ha permesso di svolgere una prima analisi di confronto fra le tecniche in uso di routine (SPT e IgE specifiche) e la nuova metodica microarray ImmunoCAP ISAC. La prima analisi effettuata ha avuto lo scopo di verificare l'eventuale esistenza di un'associazione tra il valore di ISAC e di IgE specifiche e/o il grado di positività dell'SPT. È emersa una correlazione positiva significativa ( $p = 0.0001$ ;  $\rho = 0.301$ ) tra i valori sierici ISAC e IgE specifiche. Inoltre, l'analisi della varianza ha mostrato come i livelli sierici di ISAC aumentassero in modo significativo ( $p < 0.0001$ ) all'aumentare del grado di positività del Prick test. Successivamente, i valori dei dosaggi di ogni molecola allergenica del microarray sono stati suddivisi in due gruppi: il primo gruppo quando il valore era considerato negativo ( $< 0.3$  ISU) e il secondo gruppo quando, viceversa, il valore di ISAC era positivo ( $\geq 0.3$  ISU). Sulla base di questa scomposizione, abbiamo ottenuto un valore sierico delle IgE specifiche significativamente diverso ( $p < 0.0001$ ) nei due gruppi. Dall'analisi della curva ROC, inoltre, si è osservato come la concentrazione sierica di IgE specifiche pari a 1,97 kU/l rappresentasse il migliore cut-off (sensibilità: 72.7%; specificità: 78.7%) in grado di predire una risposta negativa ( $< 0.3$  ISU) o positiva ( $\geq 0.3$  ISU) all'ISAC. Infine, la casistica dei pazienti è stata suddivisa in 3 gruppi: un primo gruppo di 91 pazienti che presentano IgE specifiche e Prick test negativi per la nocciola; un secondo gruppo di 54 pazienti che presenta una discordanza tra il risultato delle IgE specifiche e il risultato del Prick test per la nocciola; infine, un ultimo gruppo di 78 pazienti che presenta sia IgE specifiche che Prick test positivi per la nocciola. Per ciascuno di questi tre gruppi di pazienti è stata valutata la risposta ISAC per le 3 proteine della nocciola: la proteina di deposito (Cor a9) e le proteine PR-10 e LTP (Cor a1 e Cor a8) ed è stata determinata la risposta positiva o negativa del dosaggio. Sulla base di questa suddivisione, sono state create le tabelle di frequenza ed è stato testato il Chi-square. Una  $p < 0.0001$  per il primo gruppo di pazienti (con IgE specifiche e Prick test negativi) ed un valore di  $p = 0.03$  per il terzo gruppo di pazienti (test in vivo ed in vitro positivi) verificano l'ipotesi nulla secondo cui la risposta positiva o negativa per i due gruppi di proteine siano indipendenti. Il test per il secondo gruppo di pazienti (test in vitro ed in vivo discordanti) non dà un valore di  $p$  significativo.

## Discussione

A conclusione del nostro studio, si può affermare che l'utilizzo del microarray proteomico in associazione con i ricombinanti antigenici, apporta molti vantaggi in campo allergologico pediatrico. Dal punto di vista pratico: permette l'analisi di 103 molecole specifiche; necessita di un quantitativo minimo di sangue e determina un miglioramento della quantità di materiale allergenico utilizzato con conseguente standardizzazione del test. Dal punto di vista diagnostico: permette di pervenire ad una corretta diagnosi evitando il confondimento tra sensibilizzazione ed allergia; definisce il profilo immunologico del paziente, identificandolo come soggetto mono-oligo-sensibilizzato. Permette

un'analisi ed una valutazione delle cross-reazioni tra la principali classi di panallergeni e permette di svelare le sensibilizzazioni nascoste che potrebbero mettere il bambino a rischio di reazioni sistemiche gravi. Infine dal punto di vista clinico-terapeutico: consente di scegliere quali pazienti sottoporre al TPO (test di provocazione orale); quali indirizzare ad una immunoterapia specifica, escludendo a priori quelli non responsivi e permette il monitoraggio della terapia. Pertanto, nella cura individuale del paziente pediatrico, si possono scegliere percorsi clinici diversi e si può arrivare ad una diagnosi definitiva con una maggiore appropriatezza diagnostica, preventiva, profilattica e terapeutica.

---

### **Bibliografia**

1. Thomas K, Herouet-Guicheney C, Ladics G et al. Evaluating the effect of food processing on the potential human allergenicity of novel proteins: international workshop report. *Food Chem Toxicol* 2007;45(7):1116-1122.
2. Asero R. Plant food allergies: a suggested approach allergen-resolved diagnosis in the clinical practice by identifying easily available sensitization markers. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;138:1-11.
3. Valenta R, Kraft D. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic diseases. *Curr Opin Immunol* 1995;7:751-756.
4. Chapman MD, Smith AM, Vailes LD. Recombinant allergenes for diagnosis and therapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:409-418.
5. Pauli G, Deviller P. Allergènes recombinants. In: *Traité d'Allergologie. Flammarion Médecine-Sciences*; Paris, FR 2003.
6. Van Hage-Hamsten M, Pauli G. Provocation testing with recombinant allergenes. *Methods* 2004;32:281-291.
7. Schmid-Grendelmeier P, Cramer R. Recombinant allergenes for skin testing. *Int Art Allergy Immunol* 2001;125:96-111.
8. Valenta R, Lidholm J, Niederberger V et al. The recombinant allergen-based concept of component resolved diagnostics and immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1999;29:896-904.
9. Metz-Favre C, Rame JM, De Blay F et al. Intérêt des allergènes recombinant pour la prise en charge de patients allergique: cas cliniques. *Rev Franc d'Allerg Immunol Clin* 2007;47:126-128.
10. Pellegrino K, D'Urbano LE. Microarray: una corretta interpretazione per un'accurata diagnosi! *RIAP* 2009;2:5-8.
11. Ott H, Schröder M, Stanzel S et al. Microarray-based IgE detection in capillary blood samples of patients with atopy. *Allergy* 2006;61:1146-1152.
12. Harwanegg CH, Hiller R. Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: state-of-the-art and the future development. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2006;61:1146-1152.
13. Jahn-Schmid B, Harwanegg C, Hiller R et al. Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin. *E Clin Exp Allergy* 2003;33:1443-1449.
14. Wohrl S. The potential of allergen biochips. *Recent Pat Inflam Allergy Drug Discov* 2008;2:186-190.
15. Bock SA, Muñoz-Furlong A, Sampson HA. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J Allergy Clin Immunology* 2001;107:191-193.
16. <<www.aoi.com.au/acotanc/papers/tous-1/author-n-test-htm>>.
17. Ewan PW, Clark AT. Long-term prospective observational study of patients with peanut and nut allergy after participation in a management plan. *Lancet* 2001;357:111-115.
18. Ewan PW. Clinical study of peanut and nut allergy in 62 consecutive patients: new features and associations. *Br Med J* 1996;312:1074-1078.
19. Fleischer DM, Conover-Walker MK, Matsui EC et al. The natural history of tree nut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:1087-1093.
20. Skolnick HS, Conover-Walker MK, Koerner CB et al. The natural history of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:367-374.
21. Sicherer SH, Burks AW, Sampson HA. Clinical features of acute allergic reactions to peanut and tree nuts in children. *Pediatrics* 1998;102:e6.
22. Frauke Schocker Lüttkopf D, Scheurer S, Petersen A et al. Cloning and sequencing of lipid transfer protein from hazelnut (*Corylus avellana*). *8th International Symposium on Problem of Food Allergy*, Venice, IT 2001.
23. Maloney JM, Rudengren M, Ahlstedt S et al. The use of serum-specific IgE measurements for the diagnosis of peanut, tree nut, and seed allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:145-151.
24. Calvani M, Asero R, Bergamini M et al. La diagnosi di allergia alla nocciola. *Immunologia Allergologia pediatrica* 2010;5:21-32.