

Revisió

Diagnòstic molecular de l'al·lèrgia: noves perspectives per a l'abordatge clínic i de laboratori del pacient al·lèrgic

Mariona Pascal Capdevila

Servei d'Immunologia, Centre de Diagnòstic Biomèdic (CDB), Hospital Clínic de Barcelona

Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona

Índex

1. La resposta al·lèrgica mitjançada per la immunoglobulina E
2. Diagnòstic de la reacció al·lèrgica mitjançada per la immunoglobulina E
3. Diagnòstic molecular o diagnòstic basat en components
4. Nomenclatura dels components al·lèrgics
5. Diagnòstic molecular i al·lèrgia alimentària
6. Sistemes múltiple: micromatrius de proteïnes i microesferes
7. Noves perspectives: epítops al·lèrgics
8. Conclusions
9. Bibliografia

1. La resposta al·lèrgica mitjançada per la immunoglobulina E

La resposta al·lèrgica s'origina arran del reconeixement d'un element innoeu com a estrany o nociu per part del sistema immunitari de l'individu. Les reaccions al·lèrgiques es defineixen com a reaccions d'hipersensibilitat i en funció del mecanisme implicat es classifiquen en els tipus I a IV, d'acord amb la classificació de Gell i Coombs (1). L'al·lèrgia mitjançada per la immunoglobulina E (d'ara endavant IgE) és la més freqüent, i en conseqüència la més estudiada, i es classifica com a reacció d'hipersensibilitat de tipus I o immediata (1). Els antígens en la resposta al·lèrgica reben el nom d'al·lèrgens i es caracteritzen per desencadenar específicament respostes immunològiques de tipus Th2 (limfòcits T col·laboradors o *helper* de tipus 2) que portaran a la producció de la IgE específica contra l'antigen. Es desconeix quines són les característiques concretes que confereixen a una molècula la seva capacitat al·lèrgica (2).

Els al·lèrgens són captats i processats per les cèl·lules presentadores de l'antigen (fonamentalment, cèl·lules dendrítiques) i es produeix una diferenciació dels limfòcits Th0 (*naïve*) a Th2 que, gràcies al perfil de citocines secretat i altres factors concomitants, desencadenaran un canvi d'isotip en el limfòcit B, el qual començarà a produir i secretar IgE (1). Aquesta immunoglobulina s'uneix principalment al seu receptor d'alta afinitat (FcεRI), que es troba a la superfície dels mastòcits en els teixits i dels basòfils circulants, cèl·lules efectores claus de la resposta al·lèrgica. L'estat d'unió de la IgE al seu receptor es coneix com a estat de sensibilització. Quan l'organisme entra de nou en contacte amb l'al·lèrgen, aquest és reconegut i captat per les IgE de la

superfície dels mastòcits i dels basòfils. La unió de dues IgE al corresponent al·lèrgen suposa l'activació del receptor (fenomen conegut com entrecruament o en anglès *crosslinking*) que, a través d'una cascada de senyalització complexa, provocarà l'activació cel·lular, la qual suposa una alliberació ràpida de mediadors proinflamatoris preformats (com ara la histamina, la triptasa i altres quimases, etc.) que es troben continguts en grànuls dins del seu citoplasma, així com la producció de nous mediadors en les hores que segueixen a l'activació cel·lular (com els eicosanoides, els leucotriens i les prostaglandines). Aquests mediadors són els responsables de l'aparició immediata de les manifestacions clíniques de l'al·lèrgia, les quals poden ser molt variades en funció del tipus d'al·lèrgen i de la seva via d'entrada a l'organisme, la qual condicionarà quins són els mastòcits que s'activaran. Així doncs, l'activació dels mastòcits de forma generalitzada, amb una alliberació sistèmica d'histamina i altres mediadors, o bé a nivell local, com per exemple a nivell de la mucosa respiratòria o digestiva, marcarà la simptomatologia que presenti l'individu. Per exemple en la mucosa digestiva es pot produir diarrea, vòmits, etc.; en la mucosa respiratòria, broncoconstricció i dificultat respiratòria, rinitis, etc.; i en les reaccions generalitzades, urticària amb o sense angioedema i anafilaxi (2, 3).

2. Diagnòstic de la reacció al·lèrgica mitjançada per la immunoglobulina E

El diagnòstic de l'al·lèrgia mitjançada per la IgE es basa en la detecció de la IgE específica —i no de la immunoglobulina G4— contra un al·lèrgen en particular (4), normalment identificat o sospitat a partir de la història clínica del pacient. Aquesta IgE específica es pot detectar *in vivo* a la superfície dels mastòcits (mitjançant les proves cutànies, en les quals

s'introdueix una petita quantitat d'al·lergen a la pell per detectar la presència o absència de la IgE específica a la superfície dels mastòcits (5)), o bé *in vitro*, ja sigui mesurant la seva concentració en el plasma¹ (primer per sistemes de mesura basats en mètodes de radioimmunoanàlisis, i després per mètodes no radioactius, com el fluoroenzimoimmunoanàlisis automatitzat ImmunoCAP® (Phadia, ThermoFisher Scientific, Uppsala, Suècia) entre altres mètodes immunoquímics (2, 6), o bé a la superfície dels basòfils (estudi d'activació de basòfils utilitzant la citometria de flux (2, 7).

No obstant, aquestes eines diagnòstiques només ens indiquen un estat de sensibilització del pacient vers a un determinat al·lergen sense informar de la seva implicació clínica. Així doncs, els estudis *in vivo* de provocació al·lergen-específica (ja sigui, oral, conjuntival, bronquial, nasal o subcutània), que consisteixen en l'administració al pacient de l'al·lergen suposadament responsable de la reacció, són d'elecció per confirmar el diagnòstic de l'al·lèrgia, malgrat els seus inconvenients logístics i el risc de desencadenar reaccions greus en el pacient (8).

3. Diagnòstic molecular o diagnòstic basat en components

Tradicionalment el diagnòstic de l'al·lèrgia s'ha realitzat utilitzant extractes complets de fonts al·lèrgèniques, els quals presenten dues limitacions

¹ Nota: Al llarg d'aquest article quan apareix el terme "plasma" es refereix al sistema biològic, mentre el terme "sèrum" s'utilitza habitualment per referir-se al tipus de mostra utilitzat per a la mesura de la concentració d'immunoglobulines. La utilització del terme "plasma" queda justificat en aquest article en base a l'article Candas B, Valero J, Huguet J, Fuentes X. Nomenclatura i unitats de les propietats biològiques. *In vitro veritas* 2011;12:15-78. [ISSN:1697-5421].

importants. En primer lloc, la seva difícil estandardització pel que fa al contingut, malgrat els avenços tecnològics i metodològics dels darrers anys, i en segon lloc, la seva diversitat de contingut, és a dir, que contenen múltiples molècules, algunes al·lèrgèniques (fonamentalment de naturalesa proteica) i altres no al·lèrgèniques (9).

Entre les proteïnes al·lèrgèniques és especialment rellevant tenir en compte que hi ha molècules pròpies de la font al·lèrgènica, que s'identifiquen com a marcadors de sensibilització genuïna a una determinada font al·lèrgènica, i molècules de reactivitat creuada (que són al·lèrgens que estan presents en múltiples fonts al·lèrgèniques diferents, taxonòmicament relacionades o no, i que, degut a la seva elevada homologia de seqüència, són capaces d'induir reactivitat encreuada entre fonts al·lèrgèniques diferents i per tant, entre extractes al·lèrgènics diferents. També s'anomenen *panal·lèrgens* per la seva distribució ubiqua en el regne vegetal o animal) (9, 10).

Així doncs, la utilització d'extractes complets implica que un resultat positiu no clarifica si hi ha una sensibilització genuïna a una font al·lèrgènica en particular o si es tracta d'un fenomen de reactivitat encreuada. Per tant, els extractes ens permeten identificar una sensibilització vers a un determinat al·lergen que ens pot explicar la simptomatologia clínica del pacient, però no ens donen informació de la naturalesa del principal agent responsable, ni ens permeten la previsió de reactivitats encreuades amb altres fonts al·lèrgèniques (11).

L'aplicació dels avenços de les últimes dècades en la bioquímica i la biologia molecular al camp de l'al·lèrgia ha permès anar més enllà i poder caracteritzar les proteïnes responsables de la resposta

al·lèrgica. Actualment es disposa de proteïnes purificades, obtingudes de fonts naturals, i també de proteïnes recombinants, obtingudes per mètodes de genètica molecular, que en la majoria dels casos tenen propietats immunològiques comparables als seus equivalents naturals (11-13).

Múltiples estudis han permès adoptar el concepte que una font al·lèrgica (per exemple, en al·lèrgia alimentària, l'aliment) ha de ser interpretada com una mescla de diferents components al·lèrgics (proteïnes) que a nivell individual poden tenir més o menys rellevància clínica. Així, el *component* es considera l'autèntic agent responsable de la sensibilització i és la base del diagnòstic molecular, també anomenat *diagnòstic basat en components* (de l'anglès *component-resolved diagnosis*, CRD) que pretén detectar la IgE específica contra un determinat component i no per l'extracte complet, proporcionant, no només un diagnòstic molt més acurat del pacient al·lèrgic, sinó també la possibilitat d'identificar els millors candidats per a propòsits terapèutics (disseny de la immunoteràpia al·lèrgen-específica) (13).

Així doncs, el diagnòstic molecular o diagnòstic basat en components ha revolucionat el camp de l'al·lèrgia en els darrers anys, obrint noves perspectives en l'abordatge diagnòstic i terapèutic del pacient al·lèrgic (11).

4. Nomenclatura dels components al·lèrgics

El subcomitè de nomenclatura dels al·lèrgens de l'Organització Mundial de la Salut i la Unió Internacional de Societats Immunològiques va introduir unes guies per a facilitar la nomenclatura sistemàtica dels components de les fonts al·lèrgiques (9).

El procediment per anomenar els components al·lèrgics es basa en utilitzar les tres primeres lletres (encara que de vegades se'n facin servir quatre per evitar confusions, com 'Cand' i 'Can' per *Candida* i *Canis*, respectivament) del gènere de la font al·lèrgica (*Dermatophagoides*, per exemple) i combinant-lo amb la primera o les dues primeres lletres del nom identificador de l'espècie (*pteronissinus*, per exemple) seguit d'un nombre en xifres aràbigues que reflecteix l'ordre en què l'al·lèrgen s'ha aïllat. Els al·lèrgens de diferents espècies dins d'un mateix gènere, o entre gèneres filogenèticament relacionats però similars en base a la seva seqüència, utilitzen les mateixes seqüències numèriques. Per exemple, els al·lèrgens de tipus cisteïna-proteasa dels àcars de la pols domèstica, com *Dermatophagoides pteronissinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Euroglyphus maynei* i *Blomia tropicalis*, es refereixen individualment com a Der p 1, Der f 1, Eur m 1 i Blo t 1 respectivament, o col·lectivament com a Grup 1 dels al·lèrgens dels àcars (9).

5. Diagnòstic molecular i al·lèrgia alimentària

El diagnòstic molecular està resultant especialment útil en múltiples àrees específiques de la malaltia al·lèrgica, com l'al·lèrgia als himenòpters o la pol·linosi (permetent orientar millor la indicació de la immunoteràpia al·lèrgen específica), però especialment en el diagnòstic de l'al·lèrgia alimentària (11). En els darrers anys s'han realitzat múltiples estudis centrats en l'aplicació del diagnòstic molecular en l'al·lèrgia alimentària i també en la identificació de perfils de sensibilització diferents en funció de l'àrea geogràfica (14-18).

En concret, l'aplicació del diagnòstic molecular en l'al·lèrgia alimentària ens permet, no només identificar sensibilitzacions genuïnes respecte als fenòmens de reactivitat encreuada, sinó també,

identificar la naturalesa de la proteïna responsable de la reacció al·lèrgica i avaluar el seu potencial per a desencadenar reaccions lleus o sistèmiques, en funció de les seves propietats fisicoquímiques (especialment la resistència a la temperatura i a la digestió gàstrica) (11). Això condiciona l'abordatge clínic del pacient amb al·lèrgia alimentària, de forma que, si detectem una sensibilització genuïna a un sol aliment molt probablement només resultarà necessària una dieta d'exclusió d'un sol aliment, mentre que si detectem que el component responsable de la reacció al·lèrgica és una proteïna de reactivitat encreuada amb implicació clínic en múltiples aliments, aleshores la dieta d'exclusió probablement s'haurà d'estendre a tots ells. Addicionalment, si detectem que el responsable de la reacció al·lèrgica és una proteïna termosensible es pot valorar la possibilitat que l'individu toleri l'aliment cuit (ja que l'al·lèrgen s'haurà degradat i haurà perdut la seva capacitat de desencadenar la reacció al·lèrgica), i per tant, només caldria evitar l'aliment cru, evitant una major repercussió nutricional.

Per exemple, un pacient acudeix a la consulta d'al·lèrgia i descriu determinats símptomes de reacció al·lèrgica després de la ingesta de cacauets, que en ocasions es localitzen a la cavitat oral (com ara pruija i edema labial), en d'altres a nivell digestiu (com dispèpsia funcional, diarrea, etc.) i en d'altres són generalitzats (com urticària i anafilaxi). Tradicionalment, s'utilitzaria per l'examen un extracte complet de la font al·lèrgica (en aquest cas el cacauet sencer) que conté múltiples molècules, algunes al·lèrgiques i altres no. Dins el conjunt de proteïnes al·lèrgiques podem distingir entre molècules que són específiques d'una espècie (per al cacauet —*Arachis hypogaea*—, les molècules Ara h 1, Ara h 2 i Ara h 3) i molècules de reactivitat

encreuada (Ara h 8, una proteïna de tipus profil·lina, i Ara h 9 una proteïna de tipus LTP (de l'anglès *lipid transfer protein*) [18]. La detecció de la IgE específica contra les molècules específiques d'una espècie ens indicaria una sensibilització genuïna (i en principi limitada) al cacauet, mentre que la detecció de la IgE específica contra els al·lèrgens de reactivitat encreuada ens marcaria la possibilitat que aquest pacient patís també reaccions al·lèrgiques en posar-se en contacte amb les seves proteïnes homòlogues en altres aliments vegetals, com ara la profil·lina i la proteïna de tipus LTP del préssec (Pru p 4 i Pru p 3, respectivament), o de l'avellana (Cor a 2 i Cor a 8, respectivament), entre moltes altres. Es postula que la IgE específica de molècules de reactivitat encreuada que es genera inicialment en resposta al sensibilitzador primari, en aquest cas el cacauet perquè detectem també sensibilització a proteïnes específiques d'una espècie, provoca que l'individu se sensibilitzi també a les proteïnes de reactivitat encreuada homòlogues en altres espècies, és a dir, les reconegui també com a antigens nocius i generi IgE específica com a resposta, amb la possibilitat de desencadenar símptomes també amb aquestes altres fonts al·lèrgiques i no només amb el cacauet, font que origina el procés (fenomen de reactivitat encreuada) (9). Així doncs, l'ús tradicional d'extractes complets amb totes les molècules barrejades limita la precisió en el diagnòstic i la possibilitat d'identificar reaccions al·lèrgiques genuïnes respecte als fenòmens de reactivitat encreuada que poden tenir o no tenir significació clínic (11).

Actualment no es disposa de cap tractament per a l'al·lèrgia alimentària i la dieta d'exclusió és l'única opció per evitar les reaccions al·lèrgiques en aquests individus (19), si bé, això pot ser realment difícil degut a la diversitat d'aliments que poden estar

implicats i que es poden donar exposicions accidentals que el pacient no pot controlar (20). Retornant a l'exemple anterior, l'abordatge clínic d'un pacient al·lèrgic únicament al cacauet per sensibilització a al·lèrgens espècie-específics (Ara h 1-3) es basa en una dieta d'exclusió d'aquest aliment, sense necessitat de retirar de la dieta la resta de fruits secs, lleguminoses o vegetals. Mentre que en el cas d'un pacient sensibilitzat al component Ara h 9 (proteïna de tipus LTP del cacauet), el pacient pot potencialment estar sensibilitzat i potser patir reaccions al·lèrgiques amb tots els aliments vegetals que continguin proteïnes de tipus LTP, de manera que la dieta d'exclusió d'aliments pot esdevenir molt més complexa i amb una repercussió nutricional significativa.

Un altre aspecte rellevant és que la identificació de la naturalesa de la proteïna responsable de la sensibilització ens permet avaluar el risc que es produeixin reaccions sistèmiques (generalment les més greus) en els individus (11). Per exemple, les profil·lines són proteïnes termolàbils i sensibles a la digestió gàstrica, que es caracteritzen per ocasionar reaccions generalment lleus i restringides a la cavitat oral, mentre que les proteïnes de tipus LTP són molt resistents a la temperatura i a la digestió gàstrica i són capaces d'originar tant reaccions lleus i locals (confont-se amb la reacció tipus d'una profil·lina) com ocasionar en altres ocasions reaccions sistèmiques greus, com l'anafilaxi, que poden comprometre la vida del pacient.

6. Sistemes múltiple: micromatrius de proteïnes i microesferes

Aquest canvi conceptual lligat a l'aplicació de nous sistemes de mesura, com ara aquells basats en les micromatrius (*microarrays*, en anglès) de proteïnes, suposa una nova era pel diagnòstic de l'al·lèrgia. La

utilització de sistemes múltiple, basats en mètodes de micromatrius o de microesferes (21, 22), permeten determinar el perfil global de reactivitat IgE d'un pacient i valorar el seu patró de sensibilització clínic. El perfil complet pot oferir informació complementària als resultats obtinguts mitjançant anàlisis basades en extractes o components al·lèrgics individuals. Si bé, les micromatrius amb un nombre elevat de components al·lèrgics poden ser molt útils en estudis epidemiològics i bàsics, per a la pràctica clínic quotidiana es requereix que les molècules utilitzades per al diagnòstic estiguin adequadament validades per al seu ús en aquest tipus de sistemes i una certa formació en la interpretació dels resultats obtinguts (23).

Actualment només està disponible comercialment un sistema basat en una micromatriu de components al·lèrgics, l'ImmunoCAP ISAC® (Phadia, ThermoFisher Scientific, Uppsala, Suècia) (24). Utilitzant un petit volum de sèrum del pacient (30 µL), aquest sistema permet la mesura (semi-quantitativa) simultània de la IgE específica enfront a 112 components al·lèrgics recombinants o altament purificats, procedents de 51 fonts al·lèrgiques diferents (aliments, pòl·lens, làtex, epitelis, etc.). Això suposa la visualització del ventall de sensibilitzacions que presenta el pacient en un sol mesurament, essent important no només la presència d'IgE específica contra determinats al·lèrgens sinó també la seva absència per poder orientar el diagnòstic i el tractament del pacient.

El diagnòstic basat en un panell molecular d'al·lèrgens és especialment rellevant en aquells pacients polisensibilitzats amb un perfil complex de sensibilització que inclogui múltiples aliments i pòl·lens, segons el diagnòstic al·lèrgològic

convencional a partir d'extractes complets (ja sigui per exàmens cutànics o mesures de la concentració d'IgE específiques en el plasma), ja que ens permet clarificar els veritables causants de la reacció al·lèrgica en aquests pacients i saber si es tracta de sensibilitzacions primàries a múltiples fonts al·lèrgiques o un fenomen de reactivitat encreuada entre elles (25). Així doncs, en el diagnòstic ordinari del pacient polisensibilitzat, tant *in vivo* com *in vitro*, pot ser que no sigui estrictament necessari realitzar determinacions d'IgE específica en amplis panells d'extractes complets (ja siguin taxonòmicament relacionats o no), sinó que cal intentar dirigir els exàmens a realitzar en el pacient buscant el possible sensibilitzador primari d'acord amb l'anamnesi, i avaluant la possibilitat de participació de molècules de reactivitat encreuada, evitant d'aquesta manera un ús irracional de les eines diagnòstiques.

7. Noves perspectives: epítops al·lèrgics

Addicionalment, gràcies a l'aplicació de nous sistemes de mesura com les micromatrius, s'ha desenvolupat un nou mètode per a la identificació d'epítops en els al·lèrgens a partir de pèptids seqüencials sintètics que representen tota la seqüència de la proteïna al·lèrgica. L'estudi dels epítops B, que corresponen als punts d'unió dels anticossos IgE específics a l'al·lèrgen, obre també noves perspectives de futur per al diagnòstic i tractament de l'al·lèrgia i es considera el proper pas per al desenvolupament de l'al·lèrgia molecular amb perspectives atractives (26-28).

S'han identificat epítops IgE lineals que podrien ser utilitzats com a indicadors de la gravetat clínica, la persistència de l'al·lèrgia, o fins i tot d'ambdós, en alguns pacients amb al·lèrgia alimentària. Per l'al·lèrgia al cacauet, s'ha descrit que una major

diversitat de reconeixement d'epítops s'associa a una reactivitat clínica (29). Una observació similar combinada amb una major afinitat d'unió de la IgE als seus epítops es va descriure en nens amb al·lèrgia alimentària a la llet persistent en comparació amb nens amb l'al·lèrgia alimentària a la llet transitòria (30).

D'altra banda, també s'està treballant en la descripció d'epítops conformacionals amb el mètode d'identificació de mimòtops (31). Utilitzant aquest mètode ja s'han pogut identificar epítops conformacionals d'al·lèrgens majoritaris molt importants com la parvalbúmina del peix (32) i la proteïna de tipus LTP del préssec (Pru p 3) (33), aportant informació rellevant per a la caracterització dels pacients i la seva resposta immunològica.

8. Conclusió

El diagnòstic molecular, o diagnòstic basat en components, suposa doncs una revolució en el camp del diagnòstic de l'al·lèrgia, amb un marcat canvi conceptual que ens porta a un nou abordatge clínic i de laboratori del pacient al·lèrgic, amb importants millores en el diagnòstic i que ens obre perspectives noves i atractives per conèixer millor aquestes malalties i poder desenvolupar en un futur proper noves opcions terapèutiques.

9. Bibliografia

1. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik M, dir. Immunobiology: the immune system in health and disease. New York: Garland Science; 2005.
2. Adkinson NF, Busse WW, Bochner BS, Holgate ST, Simons ER, Lemanske RF, dir. Middleton's Allergy: Principles and Practice. Philadelphia: Elsevier; 2009.
3. Bischoff SC. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. Nat Rev Immunol 2007;7:93-104.

4. Stapel SO, Asero R, Ballmer-Weber BK, Knol EF, Strobel S, Vieths S, *et al.* Testing for IgG4 against foods is not recommended as a diagnostic tool: EAACI Task Force Report. *Allergy* 2008;63:793-6.
5. EAACI Subcommittee on Skin Tests. Allergen standardization and skin tests. *Allergy* 1993;48:48-82.
6. Web Phadia, 2012: <<http://www.phadia.com/en/Laboratory/Allergy/Products/ImmunoCAP-Assays/>>(accés: 2012-12-05).
7. Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, *et al.* Flow assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy* 2006;61:1028-39.
8. Lieberman JA and Sicherer SH. Diagnosis of food allergy: epicutaneous skin tests, *in vitro* tests, and oral food challenge. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011;11:58-64.
9. Peláez A, Dávila I, dir. Tratado de alergología. Madrid: Ergon; 2007.
10. Hauser M, Roulias A, Ferreira F, Egger M. Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2010;6:1.
11. Sastre J. Molecular diagnosis in allergy. *Clin Exp Allergy* 2010;40:1442-60.
12. Valenta R, Vrtala S, Laffer S, Spitzauer S, Kraft D. Recombinant allergens. *Allergy* 1998;53:552-61.
13. Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Grönlund H. The recombinant allergen based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy* 1999;29:896-904.
14. Fernandez-Rivas M, Bolhaar S, Gonzalez-Mancebo E, Asero R, van Leeuwen A, Bohle B, Ma Y, *et al.* Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:481-8.
15. Hansen KS, *et al.* Component-resolved *in vitro* diagnosis of hazelnut allergy in Europe. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:1134-41.
16. Ballmer-Weber BK, *et al.* Cherry allergy across Europe. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:167-73.
17. Andersen MB, Hall S, Dragsted LO. Identification of European Allergy Patterns to the Allergen Families PR-10, LTP, and Profilin from Rosaceae Fruits. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011;41:1-16.
18. Nicolaou N, Poorafshar M, Murray C, Simpson A, Winell H, Kerry G, *et al.* Allergy or tolerance in children sensitized to peanut: prevalence and differentiation using component-resolved diagnostics. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:191-7.
19. Nowak-Wegrzyn A, Sampson HA. Future therapies for food allergies. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:558-73.
20. Kim JS, Sicherer SH. Living with food allergy: allergen avoidance. *Pediatr Clin North Am* 2011;58:459-70.
21. Shreffler WG. Microarrayed recombinant allergens for diagnostic testing. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:843-9.
22. Pomponi D, Bernardi ML, Liso M, *et al.* Allergen micro-bead array for IgE detection: a feasibility study using allergenic molecules tested on a flexible multiplex flow cytometric immunoassay. *PLoS One* 7:e35697. <doi:10.1371> (accés: 2012-12-05).
23. Salcedo G, Diaz-Perales A. Component-resolved diagnosis of allergy: more is better? *Clin Exp Allergy* 2010;40:836-8.
24. Web Phadia 2012: <<http://www.phadia.com/en/Laboratory/Allergy/Products/ImmunoCAP-ISAC/>> (accés: 2012-12-05).
25. Pascal M, Muñoz-Cano R, Reina Z, *et al.* Lipid Transfer Protein syndrome: clinical pattern, cofactor effect and molecular sensitization profile to plant-foods and pollens. *Clin Exp Allergy* 2012; 42:1529-39.
26. Lin J and Sampson HA. The role of immunoglobulin E-binding epitopes in the characterization of food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009;9:357-63.
27. Lin J, Bardina L, Shreffler WG, Andrae DA, Ge Y, Wang J, *et al.* Development of a novel peptide microarray for large-scale epitope mapping of food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:315-22.
28. Steckelbroeck S, Ballmer-Weber BK, Vieths S. Potential, pitfalls, and prospects of food allergy diagnostics with recombinant allergens or synthetic sequential epitopes. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1323-30.
29. Flinterman AE, Knol EF, Lencer DA, Bardina L, den Hartog Jager CF, Lin J *et al.* Peanut epitopes for IgE and IgG4 in peanut-sensitized children in relation to severity of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:737-43.

30. Wang J, Lin J, Bardina L, Goldis M, Nowak-Wegrzyn A, Shreffler WG *et al.* Correlation of IgE/IgG4 milk epitopes and affinity of milk-specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:695-702.
31. Riemer A, Scheiner O, Jensen-Jarolim E. Allergen mimotopes. *Methods* 2004;32:321-7.
32. Untersmayr E, Szalai K, Riemer AB, Hemmer W, Swoboda I, Hantusch B, *et al.* Mimotopes identify conformational epitopes on parvalbumin, the major fish allergen. *Mol Immunol* 2006; 43:1454-61.
33. Pacios LF, Tordesillas L, Cuesta-Herranz J, Compes E, Sánchez-Monge R, Palacín A, *et al.* Mimotope mapping as a complementary strategy to define allergen IgE-epitopes: peach Pru p 3 allergen as a model. *Mol Immunol* 2008;45:2269-76.