

PRACA POGLĄDOWA

Diagnostyka molekularna w kwalifikacji do immunoterapii swoistej

Component resolved diagnostics in allocation to specific immunotherapy

Maciej Kupczyk

Klinika Chorób Wewnętrznych, Astmy i Alergii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

STRESZCZENIE

Identyfikacja kluczowych alergenów jest niezbędna do kwalifikacji do immunoterapii alergenowej. Diagnostyka molekularna (diagnostyka komponentowa) umożliwia szczegółowe profilowanie molekularne poliklonalnej IgE u konkretnego pacjenta. Zastosowanie diagnostyki molekularnej w alergologii umożliwia pogłębienie diagnostyki, ustalenie prawidłowego rozpoznania, ocenę rokowania i ryzyka związanego z danym rodzajem uczulenia oraz zastosowanie prawidłowego leczenia, w tym kwalifikację do immunoterapii swoistej. Algorytmy diagnostyczne oparte na testach identyfikujących sIgE dla poszczególnych komponent alergenowych, w przeciwieństwie do diagnostyki opartej na ekstraktach alergenowych, pozwalają na odróżnienie rzeczywistego uczulenia (sIgE dla alergenów głównych, które są markerami uczulenia pierwotnego) od reakcji krzyżowej (sIgE dla panalergenów: profiliny, polkalcyny, tropomiozyny). Postawiono hipotezę, że pacjenci bez uczulenia na alergeny główne mogą w praktyce uzyskać mniejsze korzyści terapeutyczne w trakcie immunoterapii swoistej. Uczulenie wyłącznie na panalergeny nie stanowi wskazania do immunoterapii. W niektórych sytuacjach, zwłaszcza u pacjentów z alergią wieloważną, zastosowanie diagnostyki komponentowej może zwiększyć prawdopodobieństwo skutecznej immunoterapii.

SŁOWA KLUCZOWE

diagnostyka komponentowa, immunoterapia swoista, alergologia, panalergeny.

ABSTRACT

Identification of key allergen is vital for allocation to allergen immunotherapy. Molecular allergology (component resolved diagnostics – CRD) allows detailed molecular profiling of the polyclonal IgE in a particular patient. The use of molecular diagnostics in allergology improves sensitivity and specificity of diagnostic procedures, enables assessment of the prognosis and risk associated with a given type of sensitization and enables application of the most appropriate treatment, including qualification for specific immunotherapy. Diagnostic algorithms based on single or multiple molecular IgE tests, in contrast to diagnostic procedures based on allergen extracts, allow discrimination of genuine sensitization (sIgE against major allergens, markers of primary sensitization) from cross-reacting sensitization (sIgE against panallergens: profilins, polkalcins, tropomyosins). It has been hypothesized that patients without sensitization to major allergens may receive

less therapeutic benefit from specific immunotherapy. Sensitization solely to panallergens do not constitute indication for immunotherapy. In some situations, especially in polysensitized patients, application of component-resolved diagnostics may increase the likelihood of successful immunotherapy.

KEY WORDS

component resolved diagnostics, specific immunotherapy, allergy, panallergens.

ADRES DO KORESPONDENCJI

Maciej Kupczyk, Klinika Chorób Wewnętrznych, Astmy i Alergii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi,
ul. Kopcińskiego 22, 90-153 Łódź, e-mail: maciej.kupczyk@umed.lodz.pl

Pod pojęciem diagnostyki molekularnej, nazywanej również diagnostyką komponentową (*component resolved diagnostics* – CRD), rozumiemy ocenę obecności i stężenia przeciwciał immunoglobuliny E (IgE) swoistych dla określonych komponent alergenyw. Zastosowanie diagnostyki molekularnej w alergologii umożliwia pogłębienie diagnostyki, ustalenie prawidłowego rozpoznania, ocenę rokowania i ryzyka związanego z danym rodzajem uczulenia oraz zastosowanie prawidłowego leczenia, w tym kwalifikację do immunoterapii swoistej. Bez wątplenia diagnostyka molekularna stanowi przyszłość diagnostyki alergologicznej. Ostatnie lata przyniosły szereg publikacji dotyczących tego zagadnienia, co ułatwia lekarzom praktykom zrozumienie skomplikowanych wzajemnych zależności pomiędzy głównymi komponentami oraz panalergenami i wykorzystanie tej wiedzy w gabinecie alergologicznym.

W praktyce w diagnostyce alergenyw najczęściej korzystaliśmy dotychczas z ekstraktów alergenyw. Ekstrakt alergenyw pochodzi z danego źródła alergenyw (np. trawy, seler, kot) i jest mieszaniną różnych białek, w tym komponent alergenyw będących markerem uczulenia na dane źródło alergenyw, panalergenów reagujących krzyżowo, innych białek, które nie mają znaczenia w alergologii oraz różnych zanieczyszczeń. Ekstrakty alergenyw wykorzystuje się do punktowych testów skórnych, testów śródskórnych, prowokacji donosowych, a także do produkcji preparatów do immunoterapii swoistej. W wielu publikacjach zwrócono uwagę na różnice w zawartości istotnych klinicznie komponent pomiędzy kolejnymi seriami ekstraktów pochodzących od jednego producenta oraz pomiędzy różnymi producentami. Standaryzacja ekstraktów opiera się na oznaczeniu wybranych alergenyw głównych, a opisywana zmienność może prowadzić do niezgodności pomiędzy testami skórnymi i oznaczeniami sIgE. Pod pojęciem komponenty alergenyw rozumiemy alergen (najczęściej

białko), które indukuje produkcję sIgE. Nazwa komponenty składa się z trzech członów: dwóch pochodzących od nazwy łacińskiej źródła alergenyw (np. Der p od *Dermatophagoides pteronyssinus*) oraz cyfry, która zwykle oznacza kolejność odkrycia, a niekoniecznie świadczy o istotności klinicznej danej komponenty alergenyw. Fragment łańcucha aminokwasowego, który wiąże się ze swoistym IgE dla danego alergenyw, nazywany jest epitopem. Duże podobieństwo sekwencji aminokwasów i ich struktury przestrzennej pomiędzy różnymi źródłami alergenyw prowadzi do sytuacji, w której sIgE łączy się z determinantami pochodzącymi z różnych źródeł alergenyw. W klinice zjawisko homologii struktury alergenyw powoduje wystąpienie reakcji krzyżowych – objawów alergicznych po kontakcie z różnymi, zwykle spokrewnionymi źródłami alergenyw. Powszechnie występujące komponenty alergenyw o dużym stopniu homologii nazywane są panalergenami (np. profiliny, polkalcyny). Często stosuje się również pojęcie alergenyw głównego, czyli alergenyw, który stymuluje wytwarzanie sIgE u ponad 50% pacjentów uczulonych na dane źródło alergenyw. W przypadku diagnostyki molekularnej istotniejsze wydaje się pojęcie markera uczulenia. Potwierdzenie obecności przeciwciał sIgE przeciwko tej głównej komponente alergenyw świadczy o uczuleniu pierwotnym na dane źródło alergenyw i umożliwia różnicowanie z powszechnie występującymi reakcjami krzyżowymi.

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA W ALERGOLOGII

W praktyce alergologicznej diagnostyka molekularna umożliwia postawienie prawidłowej diagnozy, ułatwia ocenę ryzyka związanego z danym rodzajem uczulenia i pozwala na dobór alergenyw do immunoterapii swoistej.

Zastosowanie diagnostyki komponentowej zwiększa dokładność diagnostyczną w wybranych przypadkach klinicznych. Testy oparte na ocenie poszczególnych komponent alergenowych charakteryzują się wyższą czułością w przypadku tych istotnych klinicznie komponent, których zawartość w ekstrakcie alergenowym może być stosunkowo niska. Może to wynikać z metod obróbki ekstraktu przez producenta i właściwości fizykochemicznych alergenu. Przykładami są komponenty Api m 10 (istotny w immunoterapii jadem pszczoły) lub Der p 10 oraz Der p 23 (istotne w przypadku uczulenia na roztozce kurzu domowego). Casset i wsp. [1] przeanalizowali ekstrakty alergenowe *D. pteronyssinus* od 10 różnych producentów. Tylko alergeny Der p 1 i Der p 2 zostały wykryte we wszystkich ekstraktach, choć ich stężenie i wzajemne proporcje różniły się istotnie. Co najmniej jeden z czterech alergenów (Der p 5, 7, 10 i 21) nie został wykryty w 8 na 10 ocenianych ekstraktów alergenowych. Warto zwrócić uwagę, że brak Der p 10 (tropomiozyny) w diagnostyce utrudnia rozpoznanie potencjalnie istotnej klinicznie alergii krzyżowej na krewetki i owoce morza. Badane ekstrakty charakteryzowały się różną aktywnością w przypadku testów skórnych. Występowały wyniki fałszywie ujemne. Autorzy pracy wyciągnęli wniosek, że dostępne ekstrakty alergenowe roztoczy charakteryzują się dużą zmiennością składu alergenowego, mogą nie zawierać istotnych klinicznie alergenów, a także prowadzić do trudności diagnostycznych. Prezentowana praca jasno pokazuje potencjalne przyczyny rozbieżności pomiędzy wynikami testów skórnych różnych producentów i rozbieżności pomiędzy oznaczeniem sIgE z ekstraktami a wynikami dobrze zdefiniowanych oznaczeń poszczególnych komponent alergenowych. Należy jednak podkreślić, że dostępne metody diagnostyki molekularnej nie umożliwiają rozpoznania uczulenia na wszystkie znane komponenty alergenowe. Dobór komponent jest różny u poszczególnych producentów, choć zwykle czyni się starania, aby uwzględnić te komponenty, które mają istotne znaczenie w klinice. Z roku na rok poszerza się również panel komponent w komercyjnie dostępnych testach.

Kolejnym atutem diagnostyki pogłębionej o analizie uczuleń na poszczególne komponenty alergenowe jest możliwość oceny ryzyka związanego z danym typem alergii. Dobrym przykładem jest diagnostyka alergii pokarmowych, np. na orzechy arachidowe. U dwóch pacjentów z dodatnimi wynikami sIgE przy użyciu ekstraktu orzecha ziemnego obraz reakcji alergicznej uogólnionej wiąże się raczej z obecnością sIgE przeciwko np. komponente Ara h 2 (2S albumina), Ara h 3 (11S globulina), a obecność sIgE przeciwko komponente Ara h 8 (białko PR-10, homolog Bet v 1) najczęściej jest związana z obrazem alergii wziewnej (np. alergiczny nieżyt błony śluzowej nosa w sezonie pylenia brzozy, a alergia na brzozę może

być w tym przypadku uczuleniem pierwotnym) i stosunkowo łagodną klinicznie reakcją – zespołem alergii jamy ustnej po spożyciu orzechów ziemnych. Diagnostyka komponentowa jest szczególnie przydatna w przypadku ciężkich uogólnionych reakcji alergicznych o nieznannej etiologii. Analizując znaczenie kliniczne i obraz reakcji uczuleniowej, można pokusić się o stopniowanie ryzyka wystąpienia ciężkich reakcji, co jest związane z alergią na białka termostabilne, zwłaszcza 2S albuminy oraz 7S i 11S globuliny, a także oleozyny, defensyny, tropomiozyny i białka należące do grupy ns LTP (białek przenoszących lipidy). Uczulenie na białka termolabilne (ulegające rozpadowi w trakcie obróbki termicznej), takie jak PR-10 oraz profiliny i polkalcyny, wiąże się raczej z łagodniejszym obrazem zespołu alergii jamy ustnej po spożyciu surowych owoców lub warzyw.

Diagnostyka molekularna może mieć znaczenie w identyfikacji kluczowego alergenu, a także doborze składu preparatu do immunoterapii swoistej. Pogłębienie standardowej diagnostyki alergologicznej o elementy diagnostyki molekularnej może być wskazane w pierwszej kolejności u pacjentów, u których nie obserwuje się optymalnej poprawy klinicznej w kolejnych latach prawidłowo prowadzonej immunoterapii.

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA W KWALIFIKACJI DO IMMUNOTERAPII SWOISTEJ

Najnowsze standardy Europejskiej Akademii Alergii, Astmy i Immunologii Klinicznej dotyczące immunoterapii (IT) swoistej [2] podkreślają, że podstawą kwalifikacji pacjenta do tej metody leczenia jest korelacja charakterystycznych objawów choroby alergicznej z dowodami na mechanizm reakcji zależnej od IgE. Celem diagnostyki jest identyfikacja głównego alergenu lub alergenów odpowiedzialnych za występowanie objawów i dobór optymalnego składu szczepionki. Wśród wymienianych metod diagnostycznych pojawiają się punktowe testy skórne lub oznaczenie sIgE. Alternatywną metodą może być prowokacja donosowa lub dospójówkowa. Diagnostyka komponentowa wspomniana jest jako metoda, która będzie miała większe znaczenie w przyszłości. W podobnym tonie wypowiadają się autorzy zaleceń Polskiego Towarzystwa Alergologicznego [3]. Z kolei opublikowane już w 2014 roku zalecenia Niemieckiego Towarzystwa Alergologicznego [4] jasno wskazują, że potwierdzenie uczulenia na komponenty alergenowe będące markerem uczulenia pierwotnego (alergeny główne), w przeciwieństwie do obecności sIgE reagujących z panalergenami, może być pomocne w identyfikacji ważnych alergenów i ocenie wskazań do immunoterapii swoistej. Wśród głównych alergenów wymienione zostały: Bet v 1 (brzoza),

Phl p 1/5 (tymotka/trawy), Der p 1/2 (roztocze kurzu domowego), Alt a 1 (*Alternaria*), Ole e 1 (oliwka, ale jako marker uczulenia na jesion, ze względu na wysoką homologię struktury), Art v 1 (bylica) oraz Amb a 1 (ambrozja). Jako panalergeny, które mogą dać dodatnie wyniki testów skórnych i oznaczeń sIgE z ekstraktami alergenowymi, ale nie powinny być traktowane jako wskazanie do immunoterapii, wymieniono profiliny (Amb a 8, Ara h 5, Bet v 2, Cor a 2, Hev b 8, Phl p 12, Tri a 12) oraz polkalcyny (Aln g 4, Amb a 9, Art v 5, Bet v 4, Phl p 7). Najważniejsze alergeny główne i panalergeny istotne w kwalifikacji do immunoterapii w Polsce przedstawiono w tabeli 1.

Podsumowując – potwierdzenie obecności sIgE reagujących z alergenami głównymi lub współistnienie sIgE reagujących z alergenami głównymi i panalergenami potencjalnie zwiększa przewidywaną skuteczność immunoterapii, a obecność sIgE reagujących wyłącznie z panalergenami nie powinno prowadzić do uwzględnienia danego źródła alergenowego w składzie preparatu do IT. Autorzy cytowanych standardów stwierdzają, że diagnostyka komponentowa może być szczególnie pomocna u pacjentów z alergią wieloważną, a pacjenci bez alergii na alergeny główne mogą odnieść mniejszą korzyść z zastosowania immunoterapii swoistej. Zwrócono jednak uwagę, że nie ma dokładnych badań prospektywnych potwierdzających tę tezę. Warto w tym miejscu wspomnieć, że pojawiają się również głosy o potencjalnym znaczeniu panalergenów w immunoterapii. Asero i wsp. [5] stwierdzili, że do 50% pacjentów z alergiami pyłkowymi jest uczulonych na co najmniej 1 z dwóch istotnych panalergenów pyłkowych: profilinę lub polkalcynę, i przeanalizowali zawartość tych panalergenów w ekstraktach stosowanych do immunoterapii. Większość badanych ekstraktów pyłkowych (m.in. ekstrakt brzozy, traw, oliwki, bylicy) zawierała profilinę, a tylko ekstrakt traw zawierał polkalcynę. Podsumowując – autorzy pracy sugerowali, że w niektórych przypadkach panalergen może być głównym alergenem indukującym objawy kliniczne u pacjentów, a jego brak w preparacie stosowanym w trakcie immunoterapii może się wiązać z bra-

kiem optymalnej poprawy klinicznej. Kontynuując ten tok rozumowania, można by jednak wysunąć również inną hipotezę. Czy obecność panalergenów w ekstraktach pyłkowych stosowanych do immunoterapii może się wiązać z ryzykiem indukcji np. zespołu alergii jamy ustnej u pacjentów, u których rozpoczęto immunoterapię w typowym obrazie pyłkowicy, np. alergicznego nieżytu błony śluzowej nosa indukowanego pyłkami brzozy? Zagadnienia te wymagają dalszych badań.

Zastosowanie diagnostyki komponentowej w praktyce klinicznej pokazuje praca Stringari i wsp. [6]. Autorzy zbadali grupę 651 dzieci z objawami alergicznego nieżytu nosa wywołanego uczuleniem na różne pyłki kwalifikowanych do immunoterapii swoistej. Ze względu na wyniki testów skórnych i korelację objawów z sezonem pylenia udało się zakwalifikować do IT 78% badanej grupy (508 dzieci). Poszerzenie diagnostyki o metody diagnostyki molekularnej (wykorzystano molekuly: Phl p 1, Phl p 5, Bet v 1, Cup a 1, Art v 1, Ole e 1, Par j 2 i Phl p 12) umożliwiło dobór potencjalnego preparatu do IT u kolejnych 83 dzieci. Autorzy podkreślili, że zastosowanie diagnostyki molekularnej, obok obrazu klinicznego i podstawowych metod diagnostycznych, może mieć duże znaczenie w codziennej praktyce.

Pogłębia diagnostyka molekularna ma zastosowanie również w immunoterapii jadami owadów błonkoskrzydłych. Standardy EAACI zwracają szczególną uwagę na komponentę Api m 10 [7]. Zalecenie to jest pokłosiem publikacji Frick i wsp. [8], w której przeanalizowano zawartość komponent Api m 1 i Api m 10 w komercyjnie dostępnych preparatach alergenowych stosowanych do immunoterapii u pacjentów uczulonych na jad pszczoły. Brak Api m 10 w ekstrakcie (w 3 na 5 zbadanych próbek) wiązał się z 10-krotnie wyższym ryzykiem niepowodzenia immunoterapii. W praktyce oznaczenie Api m 10 oraz ewentualne zastosowanie preparatu alergenowego zawierającego Api m 10 jest wskazane u pacjentów z niepowodzeniem immunoterapii (reakcja uogólniona po użądleniu polnym). W niektórych ośrodkach oznaczenie to, ze względu na stosunkowo niski koszt, wykonywane

TABELA 1. Alergeny główne będące markerami uczulenia pierwotnego i panalergeny istotne w kwalifikacji do immunoterapii w Polsce

Źródło alergenowe	Marker uczulenia pierwotnego	Panalergeny	
		Profiliny	Polkalcyny
brzoza	Bet v 1	Bet v 2	Bet v 4
tymotka	Phl p 1, Phl p 5	Phl p 12	Phl p 7
bylica	Art v1	Art v 4	Art v 5
		Tropomiozyny	
roztocze	Der p 1, Der p 2, Der p 23	Der p 10	

jest już w trakcie kwalifikacji do immunoterapii jadem pszczoły.

Z punktu widzenia immunoterapii swoistej ciekawą molekułą jest Der p 23. Jest to trzeci obok Der p 1 i Der p 2 główny alergen roztoczy kurzu domowego. sIgE przeciwko Der p 23 stwierdzane są u około 75% uczulonych na roztocze [9]. Około 5% pacjentów jest uczulonych wyłącznie na Der p 23. Częstocząść ta jest stosunkowo mała (ok. 9 kDa) i zwykle jest jej niewiele w ekstraktach alergenowych, a zastosowanie w tym przypadku diagnostyki komponentowej zwiększa czułość diagnostyczną. Der p 23 reaguje krzyżowo z Der f 23, jest markerem uczulenia pierwotnego, ma związek ze współistnieniem obrazu klinicznego astmy atopowej i ma znaczenie w immunoterapii swoistej. Preparaty alergenowe stosowane do immunoterapii są standaryzowane z uwzględnieniem zawartości molekuł Der p 1 i Der p 2, a zawartość Der p 23 jest zwykle nieznaną. Przykłady Api m 10 i Der p 23 pokazują dodatkowy problem praktyczny. Oprócz opisywanych powyżej różnic w czułości diagnostyki komponentowej w porównaniu z ekstraktami alergenowymi istotną jest informacja na temat zawartości danych komponent w produktach stosowanych do IT. Brak takiej informacji utrudnia dobór optymalnej metody terapeutycznej i może skutkować brakiem odpowiedzi klinicznej na IT.

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA A HISTORIA NATURALNA ALERGI

Diagnostyka molekularna umożliwia poszerzenie naszej wiedzy i analizę historii naturalnej rozwoju alergii. Hatzler i wsp. [10] obserwowali kohortę 820 dzieci urodzonych w 1990 roku, pobierając próbki krwi w 1., 2., 3., 5., 6., 7., 10. i 13. roku ich życia. Spośród tej grupy u 177 dzieci wystąpiły objawy alergicznego nieżytu błony śluzowej nosa z uczuleniem na tymotkę. Obserwując pojawianie się sIgE przeciwko poszczególnym komponentom alergenowym, autorzy stwierdzili, że w pierwszej kolejności (nawet 5 lat przed objawami klinicznymi) można było potwierdzić obecność sIgE przeciwko Phl p 1 u ponad 75% alergików, następnie pojawiały się sIgE przeciwko molekułom: Phl p 4, Phl p 5, Phl p 2 i Phl p 6. Potwierdzenie uczulenia w wieku 3 lat stanowiło czynnik predykcyjny rozwoju alergicznego nieżytu nosa w wieku późniejszym z wartością predykcyjną dodatnią rzędu 68%. Autorzy podkreślili, że monitorowanie za pomocą metod diagnostyki molekularnej umożliwia identyfikację grup ryzyka w okresie przedobjawowym. Kolejni autorzy [11] zwrócili uwagę, że diagnostyka molekularna daje możliwość rozróżnienia podgrup uczulonych na różnym etapie rozwoju choroby alergicznej. Identyfikacja monoalergii, uczulenia na kilka i na wiele alergenów może się wiązać z innym obrazem choroby alergicznej (ryzyko roz-

woju astmy atopowej i zespołu alergii jamy ustnej). Ponadto w przyszłości zastosowanie immunoterapii swoistej będzie możliwe zapewne na jeszcze wcześniejszym etapie rozwoju choroby alergicznej. Dotychczasowe wyniki badań nie umożliwiają jednak wyciągnięcia ostatecznych wniosków dotyczących zastosowania IT w profilaktyce pierwotnej rozwoju alergii w zdefiniowanych grupach ryzyka [12].

PODSUMOWANIE

Identyfikacja klinicznie istotnych źródeł alergenów jest kluczowa w trakcie kwalifikacji do immunoterapii swoistej. Diagnostyka oparta na ekstraktach alergenowych może się wiązać z ryzykiem uzyskania wyników fałszywie ujemnych (brak obecności w ekstraktach niektórych klinicznie istotnych molekuł). Zastosowanie diagnostyki komponentowej zwiększa czułość procesu diagnostycznego. W niektórych przypadkach dodatnie wyniki diagnostyki z ekstraktami alergenowymi mogą być efektem obecności panalergenów (np. profiliny, polkalcyny, tropomiozyny). Dobór ekstraktu alergenowego do immunoterapii swoistej na podstawie obecności sIgE przeciwko alergenom głównym – markerom uczulenia pierwotnego – może się wiązać z lepszą skutecznością immunoterapii. Warto zaznaczyć, że dostępne metody diagnostyczne umożliwiają oznaczenie obecności sIgE dla pojedynczych molekuł alergenowych (np. Api m 10), grup molekuł z jednego źródła alergenowego lub z kilku źródeł istotnych klinicznie (np. Polycheck® – komponenty pyłków, roztoczy, mleka, jaja, orzechów) albo wykonanie oznaczeń multipleksowych z całym panelem dostępnych oznaczeń (wskazane np. w przypadku reakcji alergicznych uogólnionych o nieznaną etiologię). Wybór metody oprócz aspektów ekonomicznych zależy od obrazu klinicznego i zasadności doboru badań. Obecnie standardy europejskie nie wymagają bezwzględnego przeprowadzenia diagnostyki molekularnej w kwalifikacji do immunoterapii. Kolejne prace naukowe umożliwią ocenę potencjalnych związków pomiędzy diagnostyką komponentową a skutecznością i bezpieczeństwem immunoterapii swoistej.

KONFLIKT INTERESÓW

Autor nie zgłasza konfliktu interesów.

PIŚMIENNICTWO

1. Casset A, Mari A, Purohit A, et al. Varying composition and content affects the in vivo allergenic activity of commercial Dermatophagoides pteronyssinus extracts. *Int Arch Allergy Immunol* 2012; 159: 253-62.

2. Roberts G, Pfaar O, Akdis CA, et al. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: allergic rhinoconjunctivitis. *Allergy* 2018; 73: 765-98.
3. Kowalski ML. Qualification for allergen specific immunotherapy – an algorithm. *Alergol Pol* 2018; 53: 129-32.
4. Pfaar O, Bachert C, Bufe A, et al. Guideline on allergen-specific immunotherapy in IgE-mediated allergic diseases – S2k Guideline of the German Society for Allergy and Clinical Immunology (DGAKI), the Society for Pediatric Allergy and Environmental Medicine (GPA), the Medical Association of German Allergologists (AeDA), the Austrian Society for Allergy and Immunology (ÖGAI), the Swiss Society for Allergy and Immunology (SGAI), the German Society of Dermatology (DDG), the German Society of Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery (DGHNO-KHC), the German Society of Pediatrics and Adolescent Medicine (DGKJ), the Society for Pediatric Pneumology (GPP), the German Respiratory Society (DGP), the German Association of ENT Surgeons (BV-HNO), the Professional Federation of Paediatricians and Youth Doctors (BVKJ), the Federal Association of Pulmonologists (BDP) and the German Dermatologists Association (BVDD). *Allergo J Int* 2014; 23: 282-319.
5. Asero R, Mistrello G, Amato S. Detection of pan-allergens in commercial pollen extracts for allergen immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2016; 117: 180-5.
6. Stringari G, Tripodi S, Caffarelli C, et al. The effect of component-resolved diagnosis on specific immunotherapy prescription in children with hay fever. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134: 75-81.
7. Sturm GJ, Varga EM, Roberts G, et al. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Hymenoptera venom allergy. *Allergy* 2018; 73: 744-64.
8. Frick M, Fischer J, Helbling A, et al. Predominant Api m 10 sensitization as risk factor for treatment failure in honey bee venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 138: 1663-73.
9. Jimenez-Feijoo R, Pascal M, Moya R, et al. Molecular diagnosis in house dust mite allergic patients suggests clinical relevance of Der p 23 in asthmatic children. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2019 Jul 8; doi: 10.18176/jiaci.0431.
10. Hatzler L, Panetta V, Lau S, et al. Molecular spreading and predictive value of preclinical IgE response to *Phleum pratense* in children with hay fever. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130: 894-901.
11. Matricardi PM, Dramburg S, Potapova E, et al. Molecular diagnosis for allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2019; 143: 831-43.
12. Kristiansen M, Dhami S, Netuveli G, et al. Allergen immunotherapy for the prevention of allergy: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Allergy Immunol* 2017; 28: 18-29.