



L'utilizzo degli allergeni ricombinanti nell'iter diagnostico in allergologia pediatrica

Federico Cattaneo, Francesca Compagno, Stella Boghen, Vania Giunta,
Mara De Amici, Antonietta Marchi

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

L'utilizzo degli allergeni ricombinanti nell'iter diagnostico in allergologia pediatrica

Background. L'allergia è un tipo di reazione immunitaria messa in atto contro sostanze normalmente presenti nell'ambiente, gli allergeni, che non sono nocive per la maggior parte della popolazione, ma che sono in grado di provocare eventi morbosi in alcuni soggetti predisposti. Si parla di famiglie allergeniche come il risultato dell'unione degli allergeni con stessa origine (esempio allergeni di origine vegetale, animale, muffe). Se da una parte questa classificazione permette di comprendere le reazioni crociate che si verificano nella stessa famiglia, dall'altra non giustifica quelle esistenti fra famiglie e specie diverse. Questa mancanza è stata colmata con l'individuazione dell'esistenza dei pan-allergeni, ovvero, un gruppo di sostanze, aventi un determinato antigenico comune, presenti in famiglie tassonomiche non correlate, con proprietà biochimiche simili, in grado di dare sensibilizzazione e/o allergia allo stesso modo degli allergeni. Un'innovazione in campo biotecnologico ha permesso la creazione di allergeni ricombinanti. Tali molecole sono state ottenute in laboratorio grazie alla tecnica del DNA ricombinante. Associando da un lato le informazioni derivate dalla metodica dei ricombinanti e dall'altro il concetto di pan-allergeni, si è giunti all'ideazione del *microarray*. Si tratta di un innovativo test diagnostico *in vitro* per l'analisi semi-quantitativa delle IgE specifiche verso un ampio pannello di determinanti allergenici. Lo scopo dello studio è quello di confrontare diversi metodi diagnostici in un gruppo di pazienti pediatrici al fine di comprendere meglio il ruolo che il test *microarray* può avere nella diagnosi allergologica.

Metodi. Lo studio include 96 pazienti pediatrici, di cui il 55% maschi e il 45% femmine, con età media di 10 anni, tutti con sintomi correlati alla sensibilizzazione verso allergeni diversi. Anamnesi e manifestazioni cliniche sono state prese in considerazione e confrontate con le metodiche diagnostiche tradizionali quali *Skin Prick Test*, RAST e successivamente al test *microarray*.

Risultati. Valutare il collegamento tra la positività per un determinato allergene al test molecolare *microarray* e la quantità di IgE (RAST) dello stesso e il risultato clinico al STP. Determinare inoltre il valore di IgE (RAST) per prevedere un risultato positivo o negativo a test *microarray* (*cut-off*).

Conclusioni. L'utilizzo degli allergeni ricombinanti può fornire un contributo significativo per l'allergologia pediatrica nei processi di diagnosi, prognosi e stadiazione della patologia, rendendo più semplice lo sviluppo della medicina preventiva nonché nella selezione della terapia più idonea, e nella creazione di trattamenti individualizzati.

The microarray test in allergologic pediatric diagnosis

Background. Allergy means an immunologic reaction of the body against the substances normally present into the environment (allergens), that are not dangerous for the general population, but are able to cause pathogenetic events in sensitive persons. Nowadays, thanks to the improvement in molecular biology, we get more used to the concept of pan-allergens instead of allergens. It means proteins that form the allergens, and not the entire substance. Therefore we can explain better the cross-reactions that are present in and between allergens families. Purificated molecular by-products, recombinant or of natural source were used for this new method. They are the basis of the microarray test applied to the allergologic field. It is an innovative *in vitro* diagnostic test for the semi-quantitative analysis of the specific IgE toward a broad panel of allergenic determinants. The aim of the study is to compare different diagnostic methods in a group of pediatric patients in order to better understand the role that the microarray test may have in the allergologic diagnosis.

Methods. The study included 96 pediatric patients, males 55%, females 45%, medium age 10y, all of them with symptoms related to the esposition toward different allergens. Anamnesis and clinical manifestation were took into account and compare with SPT, RAST and microarray.

Results. Molecular microarray test find out the linking between its positivity and the amount of IgE (RAST) and the result of SPT. Moreover we were able to determine the IgE value of RAST to predict a positive or negative results at microarray test (cut-off value).

Conclusions. A simple blood test can be used to diagnose allergy with a high level of precision. Considering this we get the immunological profile of the patients and we identify if he is a mono-oligo-polisensitive subject.

Introduzione

La rivoluzione scientifica rappresentata dalla descrizione del genoma umano è stata largamente facilitata dall'utilizzo della tecnologia del *microarray* sul DNA, che ha reso possibile la mappatura genetica in breve tempo. Tale nuova tecnica è stata estesa successivamente dalla genetica molecolare alla proteomica, permettendo la creazione dello *Human Proteome Project*, un progetto che mira a determinare la funzione delle diverse proteine, quale elemento essenziale nel processo diagnostico e nelle decisioni terapeutiche. Applicate in ambito allergologico, le tecniche di *microarray* hanno generato un nuovo paradigma, l'allergia molecolare, in cui l'approccio patogenico si basa sulla genetica funzionale e sulla trasmissione del segnale intercellulare. La patologia allergica, considerata da un punto di vista molecolare, è un primo segno di "medicina *ad personam*". Inoltre, i suoi enormi potenziali saranno importante ausilio nei processi di diagnosi, prognosi e stadiazione della patologia, nonché nella selezione della terapia più idonea, rendendo più semplice lo sviluppo della medicina preventiva e nella creazione di trattamenti individualizzati.

Proprio per testare l'utilità della medicina molecolare in ambito allergologico, abbiamo condotto uno studio presso la Clinica Pediatrica della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia. Sono stati valutati 96 pazienti in età pediatrica seguiti presso l'Ambulatorio di Immuno-Allergologia Pediatrica. Nel campione in esame tutti i pazienti risultano sintomatici in relazione all'esposizione a diversi allergeni e la maggior parte di essi sono multi sintomatici.

Le tecniche diagnostiche che utilizzano allergeni ricombinanti o purificati contenendo tutti gli epitopi, o perlomeno i più importanti, delle loro controparti naturali possono essere consigliate come test di *screening* [1-2]. La complessità degli epitopi necessari per una diagnosi certa, infatti, può essere assicurata con un numero limitato di proteine allergeniche, il che conferma che una buona percentuale di pazienti può essere correttamente diagnosticata con l'utilizzo di pochi ricombinanti allergenici. Ciò ha reso possibile stabilire un pannello standard di allergeni per specifiche tipologie di sensibilizzazione [3-8]. Comunque, l'utilità dei componenti allergenici (naturali purificati o ricombinanti) non interessa esclusivamente il processo diagnostico, ma anche la standardizzazione degli estratti, rendendo possibi-

le determinare il loro contenuto, quantificando ciascun componente allergenico contenuto. Inoltre, i componenti allergenici possono essere utili per approfondire le ricerche sui singoli allergeni e sulla loro funzione, così da poter sviluppare nuove strategie per migliorare l'immunoterapia. La diagnosi di disordini allergici anticorpi-mediati si basa sull'esistenza di un'anamnesi compatibile con i sintomi allergici e con la dimostrazione di una sensibilizzazione del paziente utilizzando tecniche *in vivo* ed *in vitro*, per determinare le IgE specifiche, ma anche, se necessario, con l'esecuzione di test di provocazione con un determinato allergene. Le tecniche per la determinazione delle IgE specifiche utilizzano attualmente estratti allergenici, il che comunque si associa a problemi di accuratezza diagnostica, per la difficoltà di standardizzare gli allergeni utilizzati come estratti, e a problemi connessi, per i pazienti polisensibilizzati, con l'incapacità della tecnica di differenziare fra una cross-reattività clinica, una vera co-sensibilizzazione e una cross-reattività immunologica priva di significato clinico. Conoscere il profilo di sensibilizzazione a livello molecolare può essere utilizzato anche per individualizzare la composizione degli estratti per l'immuno-terapia specifica (ITS), con grande accuratezza, valutando e evidenziando eventuali cross-sensibilizzazioni a panallergeni privi di rilevanza clinica. Ugualmente, i *microarray* allergenici potrebbero essere utilizzati nel contesto di un approccio farmaco-proteomico per monitorare l'efficacia dell'ITS, valutando l'evoluzione delle IgE/IgG allergene-specifiche o la comparsa di nuove sensibilizzazioni durante il trattamento, con un impatto notevole sull'evoluzione clinica.

Tra le allergie alimentari, l'arachide, *Arachis hypogea*, è stata oggetto di attenzione nella ricerca scientifica, in quanto è un'allergia relativamente comune, tipicamente permanente e spesso severa [9]. Studi recenti americani e inglesi definiscono l'incidenza di tale allergia nei pazienti pediatrici intorno all'1% [10-11]. Tale sintomatologia passa nel 20% in età scolare, nei bambini allergici [12-13]. Le anafilassi fatali registrate negli Stati Uniti additano nel 59% dei casi tra 63 decessi l'arachide come agente eziologico, solo nel 19% di 48 decessi invece nel Regno Unito [14]. L'età più a rischio di reazioni fatali è costituita dagli adolescenti e dai giovani adulti a cui si aggiungono fattori di rischio quali l'asma e il ritardo di somministrazione di adrenalina, durante l'anafilassi. È un alimento ubiquitario e i pazienti allergici, che spesso reagiscono a dosi basse [15], presentano una bassa aspettativa della qualità di vita [16-17]. Sebbene fattori genetici e ambientali sono indubbiamente parzialmente responsabili di atopia, per quanto riguarda le caratteristiche epidemiologiche dell'allergia all'arachide sono state evidenziate caratteristiche genetiche e ambientali che sono specifiche dell'allergia all'arachide [18-19]. La via di sensibilizzazione è l'ingestione di arachide che può derivare dall'assunzione in gravidanza da parte della gestante o durante l'allattamento o dal momento dell'assunzione da parte del paziente lattante-bambino. Alcune teorie che valutano l'aumento dell'allergia all'arachide, considerano anche la sensibilizzazione per via cutanea o inalatoria [20]. I principali metodi per valutare la sensibilizzazione all'arachide sono rappresentati dal SPT e dalle IgE specifiche. Gli studi che valutano la dimensione del pomfo del prick test sono inficiati da numerose variabili, quali l'operatore, le tecniche utilizzate, l'estratto, la modalità di valutazione, l'età, la razza. Le discrepanze tra gli studi possono essere attribuite a numerosi variabili come le procedure che definiscono la positività del challenge e le differenti abilità nelle pratiche regionali. Comunque i risultati mostrano chiaramente che un aumento delle dimensioni del pomfo o un aumento del valore delle IgE specifiche indica un aumento reale dell'allergenicità. Fatta eccezione per i livelli molto elevati di IgE specifiche, è la storia clinica che indirizza nella decisione di procedere a un test di scatenamento alimentare [9]. Va puntualizzato che più studi mostrano che i livelli elevati di IgE non sono correlati alla gravità della sintomatologia clinica. È stata trovata una correlazione clinica di severità utilizzando proteine purificate di arachide (Ara h 1-3, Ara h 6), in particolare con l'Ara h 2 e 6 già a basse concentrazioni e Ara h 1 e 3 a più alte concentrazioni [21].

Scopo del lavoro

Il normale procedimento diagnostico si basa tutt'oggi sulla pratica clinica e sul laboratorio con il ruolo di conferma e precisazione dell'eventuale sospetto di malattia allergica. L'impiego della metodica *microarray* nella diagnostica molecolare allergica (CRD) 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* (IVD) per l'analisi semiquantitativa delle immunoglobuline IgE nel plasma o siero umano dirette verso un ampio pannello 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 di studi. L'obiettivo di questo studio è pertanto 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 in aggiunta anche la sua reale valenza clinica e applicabilità. Al fine di svolgere un'adeguata analisi, si è effettuata come prima valutazione un confronto fra quelle che sono considerate le metodiche tradizionali (test *in vivo* e test *in vitro*) e quella innovativa del *microarray* (ImmunoCAP® ISAC), in particolare: confronto test *in vivo* (SPT) e ImmunoCAP® ISAC, e confronto test *in vitro* (RAST) e ImmunoCAP® ISAC. In un secondo momento si sono cercate le correlazioni fra tutte le metodiche (*in vivo* e *in vitro*) oggetto di questo studio.

Materiali e metodi

Campione dello studio

Lo studio è stato condotto presso la Clinica Pediatrica della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia. Sono stati valutati 96 pazienti in età pediatrica seguiti presso l'Ambulatorio di Immuno-Allergologia della Clinica. La popolazione in studio è composta da 59 maschi e 37 femmine. L'età mediana del campione è di 10 anni (*range* 3-21); un solo paziente risulta avere 21 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 multi sintomatici. Possiamo così suddividerlo: 53 pazienti con Dermatite Atopica, 48 pazienti con Rinite o Oculorinite, 39 pazienti con Broncospasmi ricorrenti, 33 pazienti con Asma Bronchiale Allergica, 24 pazienti con Tosse Secca, 23 pazienti con Orticaria Allergica, 22 pazienti con Angioedema, 20 pazienti con sintomatologia respiratoria variabile (es: bronchiti, sinusiti...), 12 pazienti con sintomatologia gastroenterica (es: diarrea, vomito...), 4 pazienti con Sindrome Orale Allergica, e 2 pazienti con Anafilassi.

Metodi utilizzati

Per l'analisi dei pazienti in esame è stata innanzitutto presa in considerazione l'anamnesi (familiare, fisiologica e patologica) in modo da avere un inquadramento clinico di ogni singolo caso. I pazienti del campione sono poi stati sottoposti a varie indagini laboratoristiche eseguite presso il Laboratorio di Immuno-Allergologia della Clinica Pediatrica: *Skin Prick Test*, *Prick by Prick*, *RAST*, *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 RAST. 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 RAST con la valutazione del coefficiente r di Spearman. Una curva ROC è stata poi generata per identificare il *cut-off* dei livelli di RAST, con il miglior rapporto tra sensibilità e specificità, nel predire la risposta negativa o positiva dell'ISAC. Infine, è stato testato il test del chi quadro per studiare l'ipotesi nulla secondo cui le proteine di deposito dell'arachide (n Ara h1, n Ara h2 ed n Ara h3) ed r Ara h8 (gruppo PR-10) siano indipendenti, cioè tali che tutte le categorie (esame positivo o negativo) delle proteine di deposito abbiano la stessa frequenza al variare delle categorie (esame positivo o negativo) della proteina r Ara h8. 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 RAST) 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 RAST e/o il grado di positività dell'SPT. È emersa una correlazione positiva molto forte ($p < 0.0001$; $r = 0.623$) tra i valori sierici ISAC e RAST. 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 (≥ 0.3 ISU). Sulla base di questa scomposizione, abbiamo ottenuto un valore sierico del RAST significativamente diverso ($p < 0.0001$) nei due gruppi. Dall'analisi della curva ROC, inoltre, si è osservato come la concentrazione sierica di RAST pari a 3.58 kU/l rappresentasse il migliore *cut-off* (sensibilità: 71.3%; specificità: 79.8%) in grado di predire una risposta negativa (< 0.3 ISU) o positiva (≥ 0.3 ISU) all'ISAC. Infine, la casistica dei pazienti è stata suddivisa in 3 gruppi: un primo gruppo di 21 pazienti che presentano IgE specifiche e *prick test* negativi per l'arachide; un secondo gruppo di 39 pazienti che presenta una discordanza tra il risultato delle IgE specifiche e il risultato del *prick test* per l'arachide (IgE specifiche positive, ma *Prick test* negativo). Infine, l'ultimo gruppo di 14 pazienti presentava sia IgE specifiche che *prick test* positivi per l'arachide. Per ciascuno di questi tre gruppi di pazienti è stata valutata la risposta ISAC per le 4 proteine dell'arachide: le proteine di deposito (n Ara h1, n Ara h2, n Ara h3) e la proteina PR-10 (r Ara h8) 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 applicato il test del chi-quadro. Una $p = 0.0001$ per il primo gruppo di pazienti (con IgE specifiche e *prick test* negativi) verifica l'ipotesi nulla secondo cui la risposta positiva o negativa per i due gruppi di proteine siano indipendenti. Il test per gli altri due gruppi di pazienti non dà un valore di p significativo.

Discussione

Alla luce dei risultati ottenuti abbiamo potuto constatare che molti sono i vantaggi che questa innovativa metodica, il *microarray*, in associazione all'utilizzo dei ricombinanti antigenici, apporta alla diagnostica e alla terapia in campo allergologico pediatrico. Eccoli elencati in seguito:

1. Utilizzo di un metodica che permette di analizzare in contemporanea 103 molecole.
2. Necessità di un quantitativo minimo di sangue pari a 20 µl.
3. Miglioramento della qualità del materiale utilizzato e quantificazione del contenuto allergenico, con conseguente standardizzazione del test (principale innovazione rispetto agli estratti allergenici fin ad oggi utilizzati).
4. Identificazione qualitativa e quantitativa delle proteine allergeniche responsabili di allergie e sensibilizzazione (impatto diretto di un'analisi di tipo molecolare) con successiva definizione del profilo immunologico di ogni singolo paziente, noto come *spectrotype*.
5. Distinzione fra pazienti mono-, oligo-, o polisensibilizzati, evitando il problema della standardizzazione allergenica e delle false polisensibilizzazioni.
6. Offerta di una differente visione dell'eziologia della patologia allergica utile nell'estendere l'approccio diagnostico dalle fonti allergeniche agli epitopi allergenici (da una classificazione botanica ad una molecolare).
7. Distinzione tra l'immunogenicità dall'allergenicità attraverso l'ingegneria genetica utilizzando varianti ipoallergeniche con bassa reattività IgE, ma con uguale o superiore reattività T cellulare.
8. Analisi e valutazione delle cross-reazioni fra le principale classi di pan-allergeni noti quali PR-10, profiline, LTP, tropomiosina, CCD.
9. Possibilità di svelare sensibilizzazioni nascoste verso gli LTP di alcuni allergeni che potrebbero mettere il bambino a rischio di reazioni sistemiche gravi (per esempio quello della nocciola Cor a8 e quello della pesca nPru p3).
10. Implementazione delle tecniche per giungere ad una corretta diagnosi, evitando il confondimento fra sensibilizzazione e allergia.
11. Indicazioni sulla profilassi e sulle precauzioni, con prevenzione di ulteriori sensibilizzazioni.
12. Identificazione dei pazienti suscettibili di trattamento con immunoterapia specifica (ITS), con esclusione a priori quelli che non sarebbero responsivi.
13. Monitoraggio dell'andamento della terapia.

Nella cura individuale del paziente pediatrico si possono quindi scegliere percorsi clinici diversi e si può arrivare a una diagnosi definitiva con maggiore appropriatezza diagnostica, preventiva, profilattica e terapeutica.

Bibliografia

1. Rodriguez R, Villalba M, Monsalve RI et al. The spectrum of olive pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;125:185-195.
2. Niederberger V, Laffer S, Fröschl R et al. IgE antibodies to recombinant pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 and Bet v 2) account for a high percentage of grass pollen-specific IgE. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:258-264.
3. Schmid-Grendelmeier P, Cramer R. Recombinant Allergens for Skin Testing. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;125:96-111.
4. Niederberger V, Pauli G, Grönlund H et al. Recombinant birch pollen allergens (rBet v 1 and rBet v 2) contain most of the IgE epitopes present in birch, alder, hornbeam, hazel and oak pollen: a quantitative IgE inhibition study with sera from different populations. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:579-591.
5. Spitzauer S. Allergy to mammalian proteins: at the borderline between foreign and self?. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;120:259-269.

6. Cramer R. Recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens: from the nucleotide sequences to clinical applications. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;115:99-114.
7. King TP, Spangfort MD. Structure and biology of stinging insect venom allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;123:183-195.
8. Vrtala S. From allergen genes to new forms of allergy diagnosis and treatment. *Allergy* 2008;63:299-309.
9. Scott H, Sicherer MD, Hugh A et al. Peanut allergy: Emerging concept and approaches for an apparent epidemic. *J Allergy Clin Immunol* 2007;63:299-309.
10. Sicherer SH, Muñoz-Furlong A, Sampson HA. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:1203-1207.
11. Kagan RS, Joseph L, Dufresne C et al. Prevalence of peanut allergy in Primary school children in Montreal, Canada. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:1223-1228.
12. Hourihane JO, Roberts SA, Warner JO. Resolution of peanut allergy: case-control study. *Brit Med J* 1998;316:1271-1275.
13. Skolnick HS, Conover-Walker MK, Koerner CB et al. The natural history of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:367-374.
14. Pumphrey RS, Gowland MH. Further fatal allergic reactions to food in the UK, 1996-2006. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1018-1019.
15. Flinterman AE, Pasmans SG, Hoekstra MO et al. Determination of no-observed-adverse-effect levels and eliciting doses in a representative group of peanut-sensitized children. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:448-454.
16. Primeau MN, Kagan R, Joseph L et al. The psychological burden of peanut allergy as perceived by adult with peanut allergy and the parents of peanut-allergy children. *Clin Exp All* 2000;30:1135-1143.
17. Cohen BL, Noone S, Muñoz-Furlong A et al. Development of a questionnaire to measure quality of life families with a child food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1156-1163.
18. Sicherer SH, Furlong TY, Maes HH et al. Genetics of peanut allergy: a twin study. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:53-56.
19. American academy of pediatric. Committee on nutrition. HYTO allergenic infant formulas. *Paediatrics* 2000;106:346-349.
20. Lack G, Golding Y. Peanut and nut allergy: reduced exposure might increase allergic sensitisation [letter]. *Brit Med J* 1996;313:300.
21. Palmer GW, Dibrn DA Jr, Burks AW et al. Comparative potency of Ara h 1 and Ara h 2 in immunochemical and functional assays of allergenicity. *Clin Imm* 2005;115:302-312.