



Prednosti i ograničenja laboratorijske alergološke dijagnostike

Dr. sc. Slavica Dodig, mag. med. biochem.

Profesorica Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u mirovini

E-mail: slavica.dodig@zg.t-com.hr

ORCID: 0000-0002-3419-5171

Dopisni autor

Prim. dr. sc. Darko Richter, dr. med.

Dom zdravlja Zagrebačke županije, Ispostava Zaprešić

ORCID: 0000-0002-6559-9056

Sažetak

Laboratorijska dijagnostika alergija evoluirala je od početnog određivanja broja eozinofilnih granulocita u krvi do sofisticiranijih, osjetljivijih i specifičnijih metoda. Napredak u dijagnostici bilo je otkrivanje imunoglobulina E (IgE), uključujući određivanje najprije koncentracije ukupnoga IgE (ulgE), a potom i koncentracije specifičnoga IgE (slgE) te eozinofilnoga kationskog proteina (ECP). Početkom 21. st. počinju se primjenjivati naprednije metode kao što je komponentna odnosno molekulska dijagnostika kojima se određuje koncentracija slgE-a prema pojedinačnim alergenskim komponentama/molekulama, kao i ispitivanje aktivacije bazofilnih granulocita (BAT) *ex vivo*. Svaka od spomenutih metoda ima svoje domete, odnosno specifične mogućnosti, ali i ograničenja. Određivanje ulgE-a primjenjuje se za probir osoba s povećanom koncentracijom IgE-a; atopija se dokazuje temeljem specifične preosjetljivosti, tj. pozitivnim *prick*-testom i povećanom koncentracijom slgE-a. Pri tome na općenitom kliničkom planu atopija podrazumijeva tri stanja (atopijski dermatitis, astmu, alergijski rinitis) kod kojih se očekuje povećana koncentracija slgE-a. Komponentna dijagnostika otkriva prave i križno-reaktivne alergenske molekule i omogućuje procjenu stupnja težine bolesti. Određivanjem ECP-a i BAT-a ispituje se funkcionalna sposobnost eozinofilnih i bazofilnih granulocita. Opisane metode, osobito komponentna dijagnostika i BAT, značajno pridonose da liječnik na temelju anamneze, kliničke slike i ostalih dijagnostičkih postupaka *in vivo* postavi dijagnozu i primijeni odgovarajuću terapiju. Danas je započela era primjene tehnologija „omike“ (npr. genomike i proteomike) kao i metoda umjetne inteligencije koje, uz umjetnu inteligenciju za analizu podataka, vode u personaliziranu alergološku dijagnostiku.

Ključne riječi: laboratorijska dijagnostika, IgE, komponentna dijagnostika, tehnologije omike, umjetna inteligencija

Advantages and Limitations of Laboratory Allergy Diagnostics

Summary

Laboratory diagnostics of allergies has evolved from the initial determination of eosinophil granulocytes count in the blood to more sophisticated, sensitive and specific methods. Advances in diagnostics was the discovery of immunoglobulin E (IgE), including the determination of the concentration of total IgE (tIgE), and then the concentration of specific IgE (slgE) and eosinophil cationic protein (ECP). At the beginning of the 21st century, more advanced methods began to be used, such as component resolved diagnostics, in which the concentration of slgE to individual allergen components/molecules is measured, as well as testing the activation of basophil granulocytes *ex*



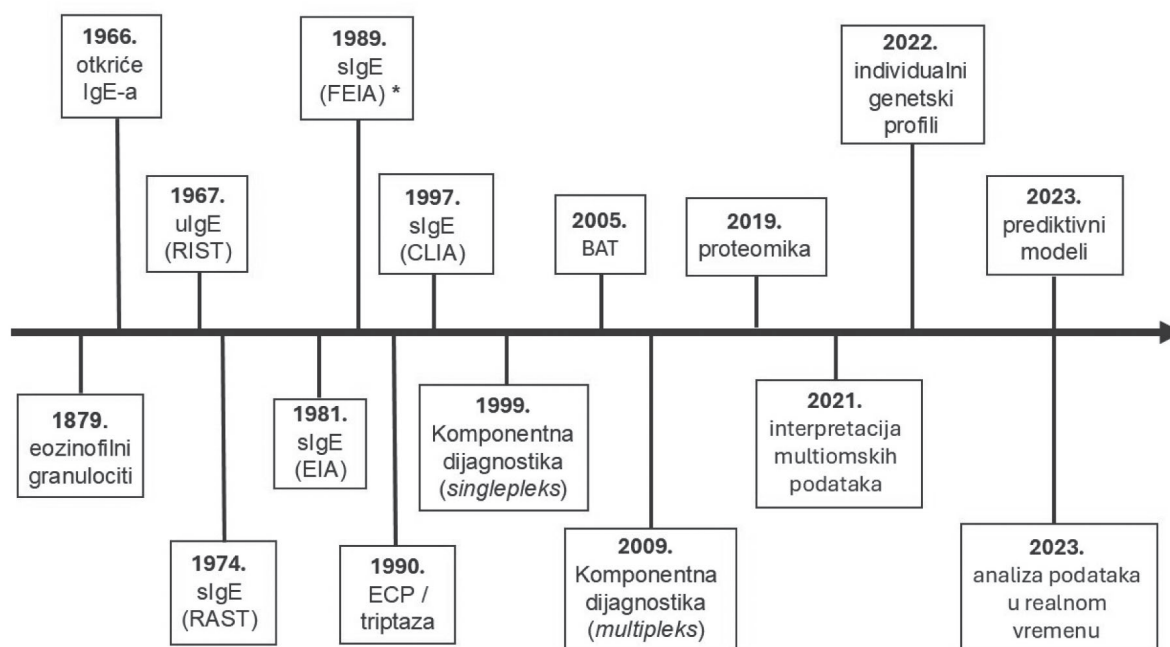
vivo. Each of the mentioned methods has its diagnostic scope, that is, specific advantages, but also limitations as well. Determination of *tIgE* is used to screen people with atopy; *sIgE* indicates the allergens that led to sensitization; component resolved diagnosis detects genuine and cross-reactive allergen molecules. By determining ECP and BAT, the functional ability of eosinophilic and basophilic granulocytes is examined. The described methods, especially component resolved diagnosis and BAT, significantly help the physician, based on the history, clinical picture and other diagnostic procedures *in vivo*, to make a diagnosis and apply appropriate therapy. Today, the era of the application of “omics” technologies (e.g. genomics and proteomics) has begun, which, together with artificial intelligence for data analysis, lead to personalized allergy diagnostics.

Keywords: laboratory diagnostics, IgE, component resolved diagnostics, omics technologies, artificial intelligence

1. Uvod

Iako bi se povijesno gledano početak laboratorijske dijagnostike alergija mogao pripisati Paulu Ehrlichu koji je 1879. godine uveo diferencijalno bojenje i mikroskopski pregled eozinofilnih granulocita (1), početak specifične laboratorijske dijagnostike ipak se povezuje s otkrićem imunoglobulina E (IgE), koji su 1966. god. otkrili te opisali godinu dana kasnije Kimishige i Teruko Ishizaka (2). Najprije se određivala koncentracija ukupnog IgE-a (*uIgE*), a od 1974. god. i koncentracija

specifičnih IgE-a (*sIgE*) prema ekstraktima alergena. S usavršavanjem imunokemijskih metoda mijenjale su se i metode za određivanje IgE-a (*uIgE*-a i *sIgE*-a), od radioizotopnih (RIST, od engl. *radioimmunosorbent test*; RAST, od engl. *radioallergosorbent test*), enzim-imunokemijskih (EIA, od engl. *enzyme-immunoassay*), do fluoro-enzim-imunokemijskih (FEIA, od engl. *fluoroenzyme-immunoassay*) i kemiluminiscentnih (CLIA, od engl. *chemiluminescent immunoassay*) metoda (slika 1).



Slika 1. Vremeplov laboratorijske dijagnostike alergija. BAT – test aktivacije bazofilnih granulocita (od engl. *basophil activation test*); CLIA – kemiluminiscentni imunokemijski test (od engl. *chemiluminescent immunoassay*); ECP – eozinofilni kationski protein (od engl. *eosinophil cationic protein*); EIA – enzim-imunokemijski test (od engl. *enzyme-immunoassay*); FEIA – fluoro-enzim-imunokemijski test (od engl. *fluorescent enzyme immunoassay*); RIST – radioimmunosorbent test (od engl. *radioimmunosorbent test*); RAST – radioallergosorbent test (od engl. *radioallergosorbent test*); *sIgE* – specifični IgE. * = zlatni standard.



U specijaliziranim kliničkim laboratorijima se od 1999. godine primjenjuje komponentna (molekulska) dijagnostika za određivanje koncentracije sIgE-a prema pojedinačnim alergijskim molekulama, a od 2009. kao multiparametrijska metoda istodobnog određivanja sIgE-a prema većem broju alergijskih molekula (3). Testom BAT, koji se u laboratorijskoj praksi počeo primjenjivati 2005. godine, prati se aktivacija i degranulacija bazofilnih granulocita u uvjetima *ex vivo* (4). Parametri laboratorijske dijagnostike alergija mogu se upotrijebiti kao dijagnostički, prognostički, prediktivni i/ili farmakodinamski biomarkeri.¹

U vrijeme brzog razvoja laboratorijske medicine zadnjih su se godina počele primjenjivati metode iz područja omike (genomike, proteomike, epigenomike, transkriptomike, metabolomike)² kao i modeli umjetne inteligencije (npr. strojno učenje, dubinsko učenje, neuronske mreže, statističko grupiranje i dr.).³ Zajedničko svojstvo spomenutih metoda je analiza ogromne količine laboratorijskih i kliničkih podataka. U alergologiji u kojoj se preklapaju genetika, imunologija, biokemija, klinička i laboratorijska medicina, važno je poznavati domete laboratorijske alergološke dijagnostike, kako bi se dobiveni rezultati mogli racionalno primijeniti u dijagnostici i terapiji svakoga pojedinog pacijenta.

2. Eozinofilni granulociti i eozinofilni kationski protein

U osoba s alergijom prisutna je eozinofilija manjeg ili većeg stupnja, kao pokazatelj

migracije eozinofilnih granulocita iz koštane srži u cirkulaciju, a potom u tkiva zahvaćena alergijskom upalom. U zahvaćenim se tkivima nakupljaju unutar 24 sata nakon izloženosti uzročnome alergenu. Stoga prvih nekoliko sati od početka akutne alergijske reakcije njihov broj u cirkulaciji može biti normalan, sve dok novi eozinofilni granulociti ne dospiju iz koštane srži. Povećan broj eozinofilnih granulocita u obrisku nosne sluznice, iskašljaju ili induciranom iskašljaju je biomarker kako alergijske upale tako i stupnja težine alergijske upale (5). Određivanje broja eozinofilnih granulocita je jednostavno, dostupno, jeftino i ne zahtijeva dodatnu opremu. Nedostaci postupka odnose se na nisku specifičnost, činjenicu da ne pokazuje stupanj aktivacije ili degranulacije te da ima veliku intraindividualnu varijabilnost.

Osim broja eozinofilnih granulocita u cirkulaciji danas se određivanjem koncentracije eozinofilnoga kationskog proteina, ECP-a, citotoksičnog produkta velikih granula eozinofilnih granulocita, prati njihova funkcionalna aktivnost. ECP bolje od periferne eozinofilije ukazuje na intenzitet alergijske upale. Pri tome valja znati da su najviše koncentracije zabilježene kod metazoarnih parazitoza. Najkorisniji je u prilagođavanju kortikosteroidne terapije kod astme i stjecanju uvida u intenzitet alergijske upale kod atopijskog dermatitisa (6). Za razliku od broja eozinofilnih granulocita, ECP odražava aktivaciju eozinofilnih granulocita. Svakodnevna je praksa pokazala da zbog intraindividualnih cirkadijalnih i sezonskih varijacija koncentracije ECP-a postoje ograničenja/

1 Dijagnostički biomarkeri ukazuju na prisutnost bolesti. Prognostički biomarkeri predviđaju progresiju ili ishod bolesti bez obzira na primijenjenu terapiju. Prediktivni biomarkeri označavaju vjerojatnost učinkovitosti određene terapije. Farmakodinamski biomarkeri pokazuju farmakološku aktivnost lijeka, je li došlo do učinka lijeka i omogućuju prilagođavanje doze lijeka u stvarnom vremenu.

2 *Genomika* je interdisciplinarno područje molekularne biologije usmjereno na strukturu, funkciju, evoluciju, mapiranje i uređivanje genoma; *Transkriptomika* podrazumijeva proučavanje transkriptoma organizma, tj. zbroja svih njegovih RNA transkriptata. *Proteomika* je interdisciplinarna znanost koja proučava proteine, posebno proteom, koji obuhvaća cijeli skup proteina koje proizvodi organizam ili stanica. *Metabolomika* proučava male molekule ili metabolite unutar bioloških sustava poput stanica, tkiva ili bioloških tekućina. *Epigenomika* ispituje utjecaj okolišnih faktora na regulaciju gena.

3 Umjetna inteligencija – simulacija procesa ljudske inteligencije pomoću strojeva ili računalnih sustava; strojno učenje (*machine learning*) – poddomena umjetne inteligencije koja usmjerena na razvoj algoritama i modela koji pomažu strojevima da uče iz podataka i predviđaju trendove i ponašanja bez ljudske pomoći; dubinsko učenje (*deep learning*) – poddomena strojnog učenja primjenjuje umjetne neuronske mreže za obradu i analizu značajne količine podataka; neuronske mreže (*neural network*) – tehnika dubinskog učenja dizajnirana da nalikuje strukturi ljudskog mozga; statističko grupiranje (*clustering*) – metoda strojnog učenja koja automatski dijeli skup podataka na grupe (klustere) na temelju sličnosti između uzoraka.



nedostaci određivanja ECP-a (7). Da bi se izbjegle predanalitičke interferencije, bilo kliničke (eozinofilija uzrokovana parazitima, virusne infekcije, terapija kortikosteroidima, početak alergena-specifične imunoterapije, AIT) ili laboratorijske (temperatura i duljina zgrušavanja uzorka krvi, vrsta uzorka, tj. serum a ne plazma, hemoliza, lipemija), potrebno je standardizirati uzorkovanje krvi i obradu uzorka. Pod tim uvjetima ECP se može primijeniti kao prognostički, prediktivni i farmakodinamski biomarker.

3. Ukupni IgE

Određivanje koncentracije ulgE-a u serumu primjenjuje se kao približna metoda probira osoba s atopijom (8). Prednost metode je što je kvantitativna i standardizirana prema standardu Svjetske zdravstvene organizacije. Pri određivanju koncentracije u serumu mjeri se slobodni IgE, a ne onaj vezan na FcεR1 receptore na bazofilnim granulocitima ili mastocitima. Serumska koncentracija ulgE-a zdravih osoba mijenja se od veoma niskih vrijednosti u dojenačkoj dobi (< 20 kIU/L) do višestruko većih vrijednosti poslije desete godine života (< 105 kIU/L) te u odrasloj dobi (< 120 kIU/L). Koncentracija ulgE-a u oko 5% osoba bez atopije veća je od gornjih referentnih granica, a u oko 10% osoba s atopijom koncentracija ulgE-a je unutar referentnih intervala (9). Indeks povećanja koncentracije IgE-a podjednak je u osoba s atopijom i u osoba bez atopije. Vrijednosti ulgE-a unutar referentnih intervala moraju se oprezno tumačiti i zbog varijacija uzrokovanih sezonskoj izloženosti pojedinim alergenima. Referentni intervali za ulgE osim o dobi (8, 9) i geografskom porijeklu ispitanika ovise i o metodama određivanja, kao što su npr. turbidimetrijska metoda, FEIA (referentna metoda za ulgE) i CLIA (10). Zbog toga je za longitudinalno praćenje vrijednosti ulgE u iste osobe njegovu koncentraciju potrebno određivati istom metodom.

Ako postoji opravdana klinička sumnja na alergiju potrebno je odrediti koncentracije slgE-a na moguće uzročne alergene na koje ukazuju

anamneza, klinička slika i rezultati kožnoga ubodnog testa. Prednosti određivanje ulgE-a podrazumijevaju probir pacijenata s atopijom, procjenu rizika za alergiju i stupanj težine simptoma alergije. Potrebno je imati u vidu činjenicu da se kod preosjetljivosti na sezonske inhalacijske alergene vršna koncentracija ulgE-a dostiže 4 do 6 tjedana nakon vrhunca peludacije; najmanje vrijednosti postoje prije sezone peludacije. Nakon 50. godine života koncentracija IgE-a postupno se smanjuje. Budući da ulgE može biti nespecifično povećan i u raznim drugim stanjima (niska specifičnost kod npr. parazitoze, maligne bolesti) njegova dijagnostička vrijednost ovisi o ukupnom kliničkom i laboratorijskom kontekstu.

4. Specifični IgE

Određivanje koncentracije slgE-a provodi se na temelju anamneze, kliničke slike pacijenta, povećanog ulgE-a i rezultata kožnih testova. Cilj je otkriti alergen na koji je pacijent senzibiliziran, pa se slgE može smatrati dijagnostičkim biomarkerom senzibilizacije i dokazom atopije. U tu se svrhu određuju koncentracije slgE-a prema alergenima (ekstraktima alergena) grinja (npr. *Dermatophagoides pteronyssinus*, Der p; *Dermatophagoides farinae*, Der f), raznih peluda stabala (npr. breza – *Betula verrucosa*, Bet v; lijeska – *Corylus avellana*, Cor a), korova (npr. limundžik – *Ambrosia artemisifolia*, Amb a; crni pelin – *Artemisia vulgaris*, Art v), trava (npr. oštrik – *Dactylis glomerata*, Dac g; livadarka – *Poa pratensis*, Poa p), epitela životinja (npr. mačka – *Felix*, Fel d; pas – *Canis*, Can f), plijesni (npr. *Aspergillus fumigatus*, Asp f), hrane (npr. kikirki – *Arachis hypogaea*, Ara h, losos – *Salmon*, Sal s), itd. Pozitivan nalaz znak je senzibilizacije, ali ne nužno i uzrok alergijske reakcije (11). Ako se povećana koncentracija slgE-a može povezati sa simptomima alergije i rezultatima kožnoga *prick* testa, vjerojatno je otkriveni alergen uzrok alergijskih simptoma. Pritom rezultat kožnog testiranja i slgE-a ne moraju uvijek biti sukladni. Razlika proizlazi iz činjenice da je kožni test rezultat lokalne aktivacije mastocita odnosno trenutne kožne reaktivnosti, a slgE odražava sistemsku reakciju,



pri čemu koncentracija slgE-a ovisi o vremenu proteklom od kontakta pacijenta s uzročnim alergenom, primjerice sezonskim alergenima, lijekovima (npr. penicilin) ili alergenima otrova opnokrilaca (pčela, osa, stršljen). Stoga kod određivanja koncentracije slgE-a prema sezonskim alergenima ili IgE-a prema nutritivnim alergenima krv treba uzorkovati od 2 – 3 tjedna do 6 mjeseci nakon početka peludacije odnosno konzumacije namirnice za koju se pretpostavlja da je uzrokovala alergiju, jer su tada vrijednosti najveće (5). Većina istraživanja pokazala je da kožni test ima veću osjetljivost (postotak pozitivnih među stvarno pozitivnim rezultatima) u odnosu na slgE. Dijagnostička specifičnost (postotak negativnih među stvarno negativnim rezultatima) je podjednaka kod oba testa (12). Metodu određivanja slgE-a ne ometa primjena antihistaminika. Analitičke metode mogu pouzdano odrediti koncentraciju slgE-a u rasponu od 0,35 do 100,0 kU_A/L. Umjereno povećanje koncentracije slgE > 3,51 kU_A/L (razred 3), za većinu alergena zahtijeva dodatnu analizu kliničkih podataka i kožnih testova. Značajnim povećanjem smatraju se vrijednosti ≥ 17,5 kU_A/L (razredi 4, 5, 6). Određivanje slgE-a omogućilo je klasifikaciju alergena u dvije skupine: i) glavne (*major*) alergene, koji mogu inducirati kožni ubodni test u > 90 % alergičnih osoba i ii) sporedne (*minor*) alergene koji daju pozitivni *prick* test u < 20 % osoba alergičnih na isti alergenski izvor, npr. pelud breze ili jaje. Cjelogodišnja izloženost manjim dozama alergena (npr. grinje iz kućne prašine) inducira veću sintezu slgE-a nego sezonska izloženost većem broju peludnih alergena.

Iako smanjenje koncentracije slgE-a nakon AIT-a nije linearno, slgE je važan pokazatelj imunosne promjene (13, 14). Zbog stimulacija imunosnog sustava prolazno se povećava koncentracija slgE-a unutar prvih tri do šest mjeseci (15). Od 6. do 12. mjeseca koncentracija se stabilizira te se zbog supresije Th2-odgovora, sinteza

slgE-a smanjuje, pa se i koncentracija u serumu postupno smanjuje i zamjenjuje IgG4 blokadnim protutijelima. Dvije do tri godine od početka AIT-a koncentracije slgE se smanje za 30 – 50 %. Nastavkom AIT-a koncentracije slgE se i dalje lagano smanjuju, ali se nikad sasvim ne izgube. Kod većine pacijenata se dvije do pet godina od početka AIT-a prati značajno smanjenje slgE-a u odnosu na početne vrijednosti (16). Prema tome, slgE je i farmakodinamski biomarker.

Budući da vrijednosti parametara koji se određuju imunokemijskim metodama ovise o primijenjenoj metodi, pri longitudinalnom praćenju koncentracije slgE-a potrebno je primijeniti istu metodu (npr. FEIA ili CLIA). Međutim, bolji pokazatelj uspjeha AIT-a je određivanje IgG4 i BAT-a. Kliničko poboljšanje uočava se već u prvih 3 – 6 mjeseci, a nerijetko i prije toga (2 mjeseca). Brže reagiraju simptomi alergijskog rinokonjunktivitisa (2 mjeseca), nego astme (6 – 12 mjeseci), i poboljšanje prije nastupa kod alergije na pelud i grinje, nego plijesni i životinjske dlake. Učinak obično potraje nekoliko godina nakon prekida AIT-a, ali se zatim slgE ponovno povećava (17). Ograničenja određivanja slgE-a odnose se na činjenicu da se upotrebljavaju ekstrakti alergena, pa se ne mogu razlikovati pravi i križno-reaktivni alergeni.

5. Komponentna dijagnostika

Značajan napredak u laboratorijskoj dijagnostici alergija predstavlja komponentna (CRD, od engl. *Component Resolved Diagnostics*) ili molekulska dijagnostika, kod koje se određuje koncentracija slgE-a prema pojedinačnim alergenim molekulama, što znači da omogućuje procjenu obrasca alergijske senzibilizacije na molekularnoj razini (11, 18). Do sada je izoliran ili proizveden veći broj prirodnih⁴ odnosno rekombinantnih⁵ molekula pojedinih alergenskih proteina koje se primjenjuju u testu, kao što su npr. molekule breze *Betula*

4 Molekule prirodnih (*natural*, n) alergena dobivaju se pročišćavanjem alergenskih ekstrakata kemijskim, kromatografskim, elektroforetskim i/ili imunoafinitetnim metodama. Tako se dobivaju npr. alergenske molekule proteina breze (Bet v1), ambrozije (nAmb a1), kikirikija (Ara h 8), mlijeka (nBos d 4, nBos d 5, nBos d 6, nBos d 8), itd.

5 Rekombinantne alergenske komponente proizvode se metodama genetskog inženjerstva. Služe za dobivanje npr. rekombinantnih (r) alergenskih molekula, npr. breze (rBet v1, rBet v2, rBet v4, itd.), ose (rVes v 1, rVes v 3, rVes v 5), lateksa (rHev b 5) pčelinjeg otrova (rApi m1, rApi m2, rApi m10).



verrucosa (8 molekula, npr. Bet v 1, Bet v 2, Bet v 4), livadne mačice *Phleum pratense* (12 molekula, npr. Phl p 1, Phl p 4,), masline *Olea europea* (15 molekula, npr. Ole e 1, Ole e 7, Ole e 9), grinje *Dermatophagoïdes pteronyssinus* (> 20 molekula, npr. Der p 1, Der p 2, Der p 10). Alergenske molekule su prema kemijskoj strukturi proteini odnosno peptidi i pripadaju različitim vrstama/porodicama (19), od kojih su neke prikazane u tablici 1.

Molekule alergena mogu biti prave i križno-reaktivne. Križna reaktivnost definira se kao sposobnost slgE-a da se osim na prave alergenske molekule veže na druge homologne alergenske molekule. Dok će prave alergenske molekule u osoba s atopijom pokrenuti klinički

značajne simptome alergije (npr. anafilaksiju ili angioedem, urtikariju), križno-reaktivne molekule potaknut će slabi imunski odgovor, odnosno blaže kliničke simptome, npr. oralni alergijski sindrom (OAS). OAS je sindrom koji nastaje u križnim reakcijama između inhalacijskih alergenskih molekula peluda stabala, korova i trava i nutritivnih alergenskih molekula sirovog voća i povrća. Primjerice, osobe s dokazanom preosjetljivošću na molekule Amb a 8 i Bet v 2 mogu imati križnu reakciju s alergenskim molekulama lubenice, dinje, krastavaca, tikve (20). Slično, alergenska molekula breze Bet v 1 (uzročnik alergije dišnih putova), uzrokuje OAS zbog križne reaktivnosti s molekulama sirovih plodova jabuke, trešnje, kruške, kikirikija (Mal d 1, Pru ar 1, Pyr c 1, Ara h 8). Termička obrada i

Tablica 1. Pripadnost pojedinih alergenskih molekula različitim proteinskim porodicama.*

Vrsta proteina	Inhalacijske molekule	Nutritivne molekule
Skladišni proteini sjemena	lijeska: Cor a 9, Cor a 11, Cor a 14	kikiriki: Ara h 1, Ara h 2, Ara h3, Ara h 4, Ara h 6, Ara h 7; orah: Jug r 1, Jug r 2, Jug r 6
Nespecifični lipidni transportni proteini	limundžik: Amb a 6; crni pelin: Art v 3; maslina: Ole e 7; crkvina: Par j 1	breskva: Pru p 3; kikiriki: Ara h 9; jabuka: Mal d 3, orah: Jug r 3
PR -10 (<i>Pathogenesis Related</i>) – proteini koje biljka sintetizira u obrani od patogena	breza: Bet v 1; lijeska: Cor a 1; hrast: Que a 1	kikiriki: Ara h 8; jabuka: Mal d 1, marelica: Pru ar 1, mrkva: Dau c 1, soja: Gly m 4
Profilini	breza: Bet v 2; lijeska: Cor a 2; hrast: Que a 2; livadna mačica: Phl p 1; limundžik: Amb a 8; crni pelin: Art v 4	jabuka: Mal d 4; breskva: Pru p 4; kikiriki Ara h 5
Lipidni vezni proteini	grinja: Der p 2, Der p 13; limundžik: Amb a 6	
Lipokalini	govedo: Bos d 2; pas: Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 6 mačka: Fel d 4, Fel d 7	govedina: Bos d 5, Bos d 6
Polkalcini	livadna mačica: Phl p 7, Cyn d7; limundžik: Amb a 9, Amb a 10; crni pelin: Art v 5; breza: Bet v 3, Bet v 4; maslina Ole e 3, Ole e 8	
Enzimi	limundžik: Amb a 1, Amb a 2, Amb a 11, Amb a 12; breza: Bet v 6, Bet v 7	
Proteini slični defenzinu	limundžik: Amb a 4; crni pelin: Art v 1	
Serumski albumini	pas: Can f 3; mačka: Fel d 2; kokoš: Gal d 5	
Tropomiozini	grinje: Der p 10, Der f 10	

* Upravo je poznavanje pripadnosti pojedinim vrstama proteina važno, jer o vrsti alergenske molekule i posljedičnoj alergičnosti ovisi težina simptoma alergije. Preosjetljivost uzrokovana stabilnim proteinima (skladišnim proteinima sjemena i nespecifičnim transportnim proteinima) predstavlja rizik za pojavu težih simptoma. Ako je preosjetljivost uzrokovana labilnim proteinima (npr. proteinima-10 koji se odnose na patogene i profilinima) pacijent će imati blaže, lokalne simptome.



zakiseljavanje sirovog voća i povrća (svježi gusti napitak) spriječiti će pojavu OAS-a.

U praksi se primjenjuju dva oblika komponentne dijagnostike, kao *singlepleks-* i *multipleks-* metoda. Metodom *singlepleks* određuje se koncentracija slgE-a prema pojedinačnim alergenskim molekulama, a multiparametrijskom *multipleks-* metodom istodobno se određuje koncentracija slgE-a prema većem broju komponenti. Dijagnostički testovi u multiparametrijskom formatu, primjerice *ImmunoCAP Immuno-Solid phase Allergen Chip* (ISAC™), *Allergy Explorer* (ALEX™) i EUROLINE omogućuju istovremenu detekciju velikog broja slgE-a prema alergenskim komponentama. ISAC™ metodom FEIA detektira ~ 112 komponenti; ALEX2™ određuje više od 170 parametara, kombinira ekstrakte i komponente te detektira ugljikohidratne determinante alergena (engl. *cross-reactive carbohydrate determinants*, CCD); EUROLINE metodom CLIA određuje specifične panele te kombinira ekstrakte i pojedinačne komponente (20, 21, 22). Rezultati dobiveni metodom ISAC izražavaju se u polukvantitativnim jedinicama ISU (*ISAC Standardized Units*) u četiri kategorije: i) < 0,3 ISU (nemjerljiva koncentracija slgE-a; nema senzibilizacije); ii) 0,3 – 0,9 ISU (mala koncentracija slgE-a); iii) 1,0 – 1,9 ISU (umjereno povećana koncentracija slgE-a); iv) ≥15 ISU (značajno povećana koncentracija slgE-a) (20). Rezultati metode ALEX2™ izražavaju se kvantitativno u jedinicama kU_A/L u pet razreda, a rezultati dobiveni metodom EUROLINE izražavaju se polukvantitativno u arbitrarnim jedinicama u pet razreda. Metoda ISAC (FEIA) je zlatni standard za komponentnu dijagnostiku.

Prednosti CRD-a temelje se na činjenici da omogućuje otkrivanje senzibilizacije na pojedinačne alergenske molekule, da razlikuje prave od križno-reaktivnih molekula i samim time predviđa stupanj težine bolesti, da pomaže u procjeni rizika za anafilaksiju, npr. određivanje molekula kikirikija (jaka

reakcija na Ara h 2 naspram slabe reakcije na Ara h 8) (23). Osim toga CRD je koristan u anamnestički nejasnim situacijama i kod polisenzibilizacije. Koncentracija slgE-a prema pojedinačnim alergenskim molekulama može se smatrati dijagnostičkim, prognostičkim i prediktivnim biomarkerom. Multiparametrijska metoda istodobno daje: i) široki profil alergena koji se dobiva i uobičajenim određivanjem slgE-a prema ekstraktu; ii) profil pojedinačnih alergeničnih molekula (pravih i križno-reaktivnih); iii) negativan nalaz slgE-a prema širokom profilu nealergeničnih molekula. Time se laboratorijska dijagnostika alergija približava personaliziranoj, preciznoj medicini (24). Racionalna primjena CRD-a može biti vrlo korisna za pacijenta ukoliko dobije ispravno tumačenje cjelovitog nalaza. U suprotnom, ta metoda može biti samo nepotrebno korištenje skupih testova. U ograničenja CRD-a mogu se ubrojiti složena interpretacija za koju je potrebno odgovarajuće znanje i iskustvo, manja osjetljivost *multipleks-* testova u odnosu na *singlepleks-* testove i cijena (oko 250 – 300 €) koja ograničava široku dostupnost metodologije. Iako se u svakodnevnoj praksi pojavljuju različiti oblici CRD-a, temeljem primjene različitih imunokemijskih metoda stanovitu prednost treba dati metodama koje primjenjuju osjetljiviji FEIA⁶ naspram metoda koje primjenjuju spektrofotometrijsku (kolorimetrijsku) metodu⁷ (24).

6. Test aktivacije bazofilnih granulocita

BAT je funkcionalni test koji procjenjuje može li ispitivani alergen koji se veže uz IgE na bazofilnom granulocitu potaknuti njegovu aktivaciju i degranulaciju (24). Aktivacijskim biljegom smatra se oslobođeni CD203c⁸, a degranulacijskim biljegom se smatra je CD63 oslobođen iz lizosoma.

U testu za stimulaciju mogu se upotrebljavati ekstrakti alergena i pojedinačne alergenske

6 ImmunoCAP ISAC

7 ALEX, EUROLINE

8 Klaster diferencijacije, CD (engl. *cluster of differentiation*)



molekule različitih izvora – npr. lijekova (cefalosporini, H₂ blokatori i mišićni relaksansi), otrova opnokrilaca, hrane (kikiriki) (25). Test ima veću specifičnost kod stimulacije s pojedinačnim alergenskim komponentama (4). Uvođenjem metode protočne citometrije značajno se poboljšala stanična dijagnostika *ex vivo*, tako da se u svakodnevnoj praksi nakon aktivacije bazofilnih granulocita metodom protočne citometrije određuju upravo CD203c i CD63. Interpretacija rezultata BAT-a temelji se na postotku bazofilnih granulocita koji pokazuju ekspresiju biljega CD63 i CD203c nakon stimulacije specifičnim alergenom. Referentne vrijednosti ovise o vrsti alergena i nisu međunarodno standardizirane. Granična vrijednost CD63+ bazofilnih granulocita može varirati ovisno o specifičnom alergenu, ponekad u rasponu od 4 do 15%. U okviru testa obrađuju se negativna (fiziološka otopina s fosfatnim puferom) i pozitivna (anti-F_{Cε}R1-protutijela) kontrola te izračunava stimulacijski indeks (omjer aktivacije s alergenom i negativne kontrole) koji treba biti ≥ 2 . BAT ima dijagnostičko, prediktivno i farmakodinamsko značenje (25). Prednost BAT-a odnosi se na činjenicu da se tim kvantitativnim testom mjeri funkcionalna aktivacija bazofilnih granulocita *in vitro* te da test ima visoku dijagnostičku specifičnost (i varijabilnu osjetljivost) za klinički relevantne alergene. Test je siguran za pacijenta jer ne zahtijeva izloženost alergenu *in vivo*. BAT omogućuje procjenu rizika od anafilaksije kod primjene lijekova, kod uboda opnokrilaca ili kod primjene nekih lijekova. Tjedan dana prije uzorkovanja krvi za BAT potrebno prekinuti terapiju kortikosteroidima, anti-IgE antitijelima i imunosupresivnim lijekovima. Nedostatak BAT-a odnosi se na potrebu analize svježe krvi; preporučuje se da se krv obradi unutar četiri do 24 sata od uzorkovanja krvi. Ako bi krv dulje stajala (npr. 24 sata) dobit će se lažno negativni rezultati (26, 27).

Za pouzdan nalaz važno je vrijeme uzorkovanja krvi u odnosu na pojavu simptoma. U akutnoj alergijskoj reakciji (neposredno nakon pojave simptoma) bazofilni granulociti mogu biti „degranulirani“ što ima za posljedicu lažno

negativan nalaz BAT-a. Sedam dana od pojave simptoma u cirkulaciji su prisutni funkcionalni bazofilni granulociti, tako da se BAT može učiniti u to vrijeme. Da bi se kod pacijenata s anafilaksijom uzrokovanom antibioticima dobio pouzdan nalaz BAT-a treba učiniti nekoliko tjedana nakon primjene antibiotika, idealno nakon 3 do 4 tjedna (28).

7. Triptaza

Beta-triptaza je proteaza koja se oslobađa iz sekretornih granula mastocita. Vrijednosti se u serumu/plazmi povećavaju unutar 30 do 60 minuta nakon početka anafilaktičke epizode. Vrijednosti se vraćaju na referentne vrijednosti nakon 24 sata (29). Kod sumnje na anafilaksiju, krv se uzorkuje trokrotno: i) unutar 15 do 180 minuta kod akutnog događaja; ii) nakon 3 do 6 sati za otkrivanje mogućih komplikacija; iii) 1 – 2 tjedna nakon anafilaksije, kada bi koncentracija trebala biti unutar normalnih granica. Određivanje aktivnosti triptaze ima dijagnostičku i prognostičku vrijednost.

Triptaza je korisna i kod provokacijskih pokusa kao dodatni objektivni kriterij, osobito kod alergije na lijekove. To je elektivna situacija u kojoj je moguće usporediti povećanje aktivnosti triptaze u odnosu na bazalnu vrijednost. Vrijednost triptaze mjeri se prije početka provokacije i nakon njega s koracima podizanja provokacijske doze. Značajnim porastom smatra se koncentracija koja premaši $1,2 \times$ bazalna koncentracija ($\mu\text{g/L}$) + 2 – primjerice ako je bazalna koncentracija bila $7,0 \mu\text{g/L}$, tada je značajno povećanje $1,2 \times 7,0 + 2 = 10,4 \mu\text{g/L}$ (30), što predstavlja relevantni nalaz koji ukazuje na degranulaciju mastocita, iako se referentne vrijednosti razlikuju među laboratorijima ($< 11,0$ odnosno $< 13,5 \mu\text{g/L}$). Naime, oko 95 % zdravih osoba ima koncentraciju triptaze $< 13,5 \mu\text{g/L}$ (kod oko 90 % zdravih koncentracija je $< 9,8 \mu\text{g/L}$).

U tablici 2 prikazani su skupni podatci o dometu, snazi i ograničenjima laboratorijskih alergoloških parametara koji se određuju u specijalističkim kliničkim laboratorijima.

**Tablica 2.** Dometi i ograničenja parametara iz područja laboratorijske alergološke dijagnostike.

Metoda	Što se određuje?	Vrsta biomarkera	Prednosti	Ograničenja/nedostatci
Eozinofilni granulociti	broj eozinofilnih granulocita	prognostički	jednostavno, dostupno, jeftino i ne zahtijeva dodatnu opremu.	niska specifičnost, ne pokazuje stupanj aktivacije ili degranulacije, intraindividualna varijabilnost
Eozinofilni kationski protein	aktivacija, degranulacija odnosno funkcionalna sposobnost eozinofilnih granulocita	prognostički, farmakodinamski	odraz aktivacije eozinofilnih granulocita, ne samo njihovog broja; korelacija s upalom u dišnim putevima; omogućuje praćenje terapije	predanalitičke interferencije: kliničke (intraindividualne varijacije, parazitoze, viroze, terapija kortikosteroidima, početak alergena-specifične imunoterapije) i analitičke (temperatura i duljina zgrušavanja uzorka krvi, vrsta uzorka, tj. serum a ne plazma, hemoliza, lipemija)
Ukupni IgE	slobodni IgE u serumu	dijagnostički	standardiziran prema standardu Svjetske organizacije	nije specifičan, može biti normalan u osoba s alergijom ili povećan u osoba bez alergije; vrijednosti mogu varirati ovisno o metodi; izražena intra- i inter-individualna varijabilnost; ne može zamijeniti kožni test ni slgE;
Specifični IgE	IgE prema pojedinim alergenima; identifikacija senzibilizacije	dijagnostički, farmakodinamski	identificira senzitivaciju na alergene (ekstrakte); omogućuje praćenje uspjeha imunoterapije	ne razlikuje senzibilizaciju od kliničke alergije; vrijednosti mogu varirati ovisno o metodi
Komponentna dijagnostika	IgE prema alergenskim molekulama; predviđanje težine reakcije, razlikovanje pravih i križno-reaktivnih molekula	dijagnostički, prognostički, prediktivni	precizna analiza alergenskih komponenti; identifikacija rizičnih proteina; bolje odluke o imunoterapiji; razlikuje prave od križno-reaktivnih molekula; predviđa stupanj težine bolesti, procjenjuje rizik za anafilaksiju	cijena, složena interpretacija – potrebno odgovarajuće znanje i iskustvo; manja osjetljivost multipleks-testova u odnosu na singlepleks-testove
Test aktivacije bazofilnih granulocita	aktivacija i degranulacija bazofilnih granulocita u prisutnosti alergena <i>ex vivo</i> (osobito lijekova i hrane); koristan kada je slgE negativan	dijagnostički, prediktivan	mjeri funkcionalnu aktivaciju basofilnih granulocita <i>in vitro</i> ; visoka specifičnost za klinički relevantne alergene	složena metoda (<i>ex vivo</i>); potrebna skupa oprema; ograničena dostupnost; zahtijeva svježnu krv, nije rutinski dostupan; standardizacija varira među laboratorijima; za većinu alergena interpretacija nije standardizirana
Triptaza	degranulacija mastocita	dijagnostički, prognostički	zbog brze dinamike (unutar 30–120 min nakon alergijske reakcije), pomaže u potvrdi akutne reakcije; razlikuje IgE-posredovanu anafilaksiju od drugih epizoda šoka ili urtikarije	nije specifična za alergiju (povećana kod mastocitoze); predanalitičke interferencije – važno je vrijeme uzorkovanja krvi (1–4 sata nakon reakcije); u suprotnom vrijednosti mogu biti normalne → kriva dijagnoza)



8. Budućnost laboratorijske dijagnostike alergija

Osnovno polazište napredne umjetne inteligencije je informatička tehnologija, koja objedinjuje računalne sustave (hardver, softver, perifernu opremu), programske jezike, obradu i pohranu podataka te ujedno zahtijeva odgovarajuće stručnjake informatičke tehnologije (31).

U budućnosti će se unaprjeđivati i automatizirati postupci istodobnog otkrivanja većeg broja alergenskih molekula (*multipleks* BAT), što će skratiti vrijeme dobivanja standardiziranih i reproducibilnih rezultata BAT-a, omogućiti razlučivanje pozitivnih i negativnih rezultata, optimizaciju graničnih vrijednosti pragova aktivacije bazofilnih granulocita, a bioinformatički algoritmi pridonijet će identificiranju dominantnih alergena unutar multipleks-skupa. Sve će to pridonijeti široj kliničkoj primjeni BAT-a i unaprijediti personaliziranu alergologijsku medicinu (32).

8.1. Tehnologije omike

U budućnosti će tehnologije omike omogućiti sveobuhvatan pogled na molekularne mehanizme koji su ugrađeni u osnove alergijskih bolesti, uključujući genomiku (monogenske i poligenske osnove bolesti, predispoziciju i terapijski odgovor), epigenomiku (utjecaj okolišnih čimbenika na regulaciju gena), proteomiku (profil ekspresije gena, biomarkere upale, strukturne modifikacije alergena, interakcije između proteina i IgE-a), transkriptomiku (ekspresiju upalnih gena i gena koji reguliraju imunost kod različitih fenotipova pacijenta i endotipova⁹ bolesti), metabolomiku (profiliranje malih molekula, uključujući one koje reguliraju upalu i oksidativni stres) (33).

Zahvaljujući novo stečenim spoznajama bit će moguće otkrivati i validirati nove biomarkere pomoću kojih će se definirati obrasci svojstveni endotipovima alergijske upale. Ti će obrasci pridonijeti predviđanju odgovora na liječenje,

potencijalnom pristupu personaliziranoj terapiji i predviđanju ishoda terapije. Integrirani pristup rezultata tehnologije više omika uključuje naprednu bioinformatičku obradu što u konačnici vodi uspješnoj personaliziranoj medicini i razvoju novih terapija (34, 35).

8.2. Napredna umjetna inteligencija

Napredna umjetna inteligencija postupno će se integrirati nakon usklađivanja, validacije i standardizacije pojedinačnih algoritama, koji će se stvarati na temelju znanja specijalista laboratorijske i kliničke medicine te stručnjaka za informacijsku tehnologiju, kao i na temelju medicine utemeljene na dokazima (36). Ključnu ulogu u integraciji naprednih algoritama umjetne inteligencije imat će stručnjaci za informacijsku tehnologiju, uključujući programere potrebnog softvera.

Objedinjavanjem modela umjetne inteligencije (strojnog učenja, dubinskog učenja, neuronske mreže, statističkog grupiranja) s golemim brojem podataka dobivenih procesom laboratorijske dijagnostike alergija (postojećih i budućih metoda), klinički laboratoriji postaju „pametni“ laboratoriji sposobni za sofisticiranu obradu relevantnih rezultata analiza *in vitro* i testova *ex vivo*, kao i identifikaciju kosenzibilizacije, polisenzibilizacije i križne reaktivnosti na molekularnoj razini.

Kad se podatci laboratorijskoga informatičkog sustava integriraju s kliničkim podacima (simptomi, kožni testovi, rezultati ispitivanja plućne funkcije i sl.) svakoga pojedinog pacijenta specijalist alergolog će moći suvereno predviđati razvoj alergijske bolesti, ishod bolesti, primijeniti AIT i predvidjeti ishod terapije, jednom riječju moći će pristupiti personaliziranoj dijagnostici alergija kao i personaliziranoj primjeni lijekova (37, 38). Zahvaljujući svome medicinskom znanju, kompetentan alergolog će nadvladati nedostatke napredne umjetne inteligencije. U konačnici će pacijent iskusiti brojne dobiti,

⁹ *Fenotip* je vanjski izgled nekog organizma, kakav se razvio pod utjecajem vanjskih čimbenika zajedno s genotipom (nasljednim osobinama). *Endotip* je podtip zdravstvenog stanja koji je definiran posebnim funkcionalnim ili patobiološkim mehanizmom. Definira se na osnovi specifičnog patofiziološkog mehanizma, a ne samo kliničkih simptoma.



primjerice bržu i precizniju dijagnostiku, personalizirano liječenje, a pomoću aplikacija na mobilnim uređajima podsjećanje kada uzeti propisati lijek i moguće predviđanje pogoršanja bolesti koje zahtijeva intervenciju alergologa.

Integracija postojećih metoda laboratorijske alergološke dijagnostike kao i onih nadolazećih (omike) i umjetne inteligencije označava novu izazovnu eru medicine označenu poboljšanom dijagnostičkom točnošću, personaliziranom pristupu i novom razumijevanju složenih, još neotkrivenih patomehanizama. Istodobno se otvaraju etička (privatnost podataka) i pravna pitanja (usklađenost s pravnim propisima) (39).

Literatura

- Egesten A, Malm J. New light shed on the enigmatic eosinophil granulocyte; A versatile cell of the immune system. *EJIFCC*. 1999;11:6–25.
- Ishizaka K., Ishizaka T. Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *J Immunol*. 1967;99:1187–1198.
- Luengo O, Cardona V. Component resolved diagnosis: when should it be used? *Clin Transl Allergy*. 2014;4:28. doi: 10.1186/2045-7022-4-28.
- Santos AF, Alpan O, Hoffmann HJ. Basophil activation test: Mechanisms and considerations for use in clinical trials and clinical practice. *Allergy*. 2021;76(8):2420–2432. doi: 10.1111/all.14747.
- Dodig S. Laboratorijska dijagnostika alergija. U: Pavić I, ur. *Dijagnostički postupci u pedijatrijskoj pulmologiji*. Medicinska naklada, Zagreb 2025. str. 68–79.
- Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:147–174.
- Zrinski Topić R, Dodig S. Eosinophil cationic protein – current concepts and controversies. *Biochem Med*. 2011;21(2):111–121. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090720.
- Stipić Marković A, Ivković-Jureković I, Dodig S, Batišta I, Barberić M, Topalušić I, i sur. Hrvatske smjernice za *in vitro* dijagnostiku preosjetljivosti posredovane IgE protutijelima. *Acta Med Croat*. 2015;69(2):75–96.
- Dodig S, Richter D, Benko B, Živčić J, Raos M, Nogalo B, i sur. Cut-off values of total serum IgE between nonatopic and atopic children in north-west Croatia. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(5):639–647. doi: 10.1515/CCLM.2006.092.
- Elziény M, Maine GN, Carey-Balough RA, Sun Q. Discrepancies between two total IgE assays and difference in reference intervals in healthy adults. *J Immunol Methods*. 2024;531:113711. doi: 10.1016/j.jim.2024.113711.
- Ansotegui IJ, Melioli G, Canonica GW, Caraballo L, Villa E, Ebisawa M i sur. IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper. *World Allergy Organ J*. 2020;13(2):100080. doi: 10.1016/j.waojou.2021.100557.
- Bignardi D, Comite P, Mori I, Ferrero F, Fontana V, Bruzzone M i sur. Allergen-specific IgE: comparison between skin prick test and serum assay in real life. *Allergol Select*. 2019;3(1):9–14. doi: 10.5414/ALX01891E
- Valenta R, Campana R, Marth K, van Hage M. Allergen-specific immunotherapy: from therapeutic vaccines to prophylactic approaches. *J Intern Med*. 2012;272(2):144–157.
- Durham SR, Shamji MH. Allergen immunotherapy: past, present and future. *Nat Rev Immunol*. 2023;23(5):317–328. doi: 10.1111/j.1365-2796.2012.02556.x.
- Jutel M, Akdis CA. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy*. 2011;66(6):725–732. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02589.x.
- Sahiner UM, Giovannini M, Escribese MM, Paoletti G, Heffler E, Alvaro Lozano M i sur. Mechanisms of allergen immunotherapy and potential biomarkers for clinical evaluation. *J Pers Med*. 2023;13(5):845. doi: 10.3390/jpm13050845.
- Calderon MA, Waserman S, Bernstein DI, Demoly P, Douglass J, Gagnon R i sur. Clinical practice of allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis and asthma: An expert panel report. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020;8(9):2920–2936.e1. doi: 10.1016/j.jaip.2020.04.071.
- Callery EL, Keymer C, Barnes NA, Rowbottom AW. Component-resolved diagnostics in the clinical and laboratory investigation of allergy. *Ann Clin Biochem*. 2019;57(1):26–35. doi: 10.1177/0004563219877434.
- Dodig S, Čepelak I. The potential of component-resolved diagnosis in laboratory diagnostics of allergy. *Biochem Med*. 2018;28(2):020501. doi: 10.11613/BM.2018.021201.
- Dramburg S, Hilger C, Santos AF, de Las Vecillas L, Aalberse RC, Acevedo N i sur. EAACI Molecular Allergy User's Guide 2.0. *Pediatr Allergy Immunol*. 2023;34 Suppl 28:e13854. doi: 10.1111/pai.13854.
- Nösslinger H, Mair E, Oostingh GJ, Ahlgrimm-Siess V, Ringauf A, Lang R. Multiplex Assays in Allergy Diagnosis: Allergy Explorer 2 versus ImmunoCAP ISAC E112i. *Diagnostics (Basel)*. 2024;14(10):976. doi: 10.3390/diagnostics14100976.



22. Sonneveld L J H, Emons J A M, Arends N J T, Landzaat L J, Veenbergen S, Schreurs M W J. ALEX versus ISAC multiplex array in analyzing food allergy in atopic children. *Clin Mol Allergy*. 2022;20(1):10. doi: 10.1186/s12948-022-00177-w.
23. Borres M P, Maruyama N, Sato S, Ebisawa M. Recent advances in component resolved diagnosis in food allergy. *Allergol Int*. 2016;65(4):378–387. doi: 10.1016/j.alit.2016.07.002.
24. Arsenis C, Taka S, Skevaki C. Fundamentals of laboratory diagnostics in allergology. *Allergo J Int*. 2025;34:21–30. doi:10.1007/s40629-025-00323-1.
25. Eberlein B. Basophil activation as marker of clinically relevant allergy and therapy outcome. *Front Immunol*. 2020;11:1815. doi: 10.3389/fimmu.2020.01815.
26. Sturm G J, Kranzelbinder B, Sturm E M, Heinemann A, Groselj-Strele A, Aberer W. The basophil activation test in the diagnosis of allergy: technical issues and critical factors. *Allergy*. 2009;64(9):1319–1326. doi: 10.1111/j.1398-9995.2009.02004.x.
27. Mukai K, Gaudenzio N, Gupta S, Vivanco N, Bendall S C, Maecker H T i sur. Assessing basophil activation by using flow cytometry and mass cytometry in blood stored 24 hours before analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(3):889–899.e11. doi: 10.1016/j.jaci.2016.04.060.
28. Reitmajer M, Strauss A, Klinger C, Maaß M, Kempf W E, Fischer J i sur. Determining the role of basophil activation testing in reported type 1 allergy to beta-lactam antibiotics. *Front Allergy*. 2024;5:1512875. doi: 10.3389/falgy.2024.1512875.
29. Michel M, Klingebiel C, Vitte J. Tryptase in type I hypersensitivity. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2023;130(2):169–177. doi: 10.1016/j.anai.2022.08.996.
30. Mayorga C, Celik G, Rouzair P, Whitaker P, Bonadonna P, Rodriguew-Cernadas J i sur. In vitro tests for drug hypersensitivity reactions. An ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group Position Paper. *Allergy* 2016;71:1103–1134. doi: 10.1111/all.12886.
31. Dodig S, Čepelak I, Dodig M. Are we ready to integrate advanced artificial intelligence models in clinical laboratory? *Biochem Med (Zagreb)*. 2025;35(1):010501. doi: 10.11613/BM.2025.010501.
32. Koren A, Korosec P. Multiplex basophil activation tests for allergy diagnosis: present and future applications. *Front Allergy*. 2025;14;5:1515843. doi: 10.3389/falgy.2024.1515843.
33. Toda M, Ono S J. Genomics and proteomics of allergic disease. *Immunology*. 2002;106(1):1–10. doi: 10.1046/j.1365-2567.2002.01407.x.
34. Radzikowska U, Baerenfaller K, Cornejo-Garcia J A, Karaaslan C, Barletta E, Sarac B E i sur. Omics technologies in allergy and asthma research: An EAACI position paper. *Allergy*. 2022;77(10):2888–2908. doi: 10.1111/all.15412.
35. Saito H, Tamari M, Motomura K, Ikutani M, Nakae S, Matsumoto K i sur. Omics in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2024;154(6):1378–1390. doi: 10.1016/j.jaci.2024.09.023.
36. Fontanella S, Frainay C, Murray C S, Simpson A, Custovic A. Machine learning to identify pairwise interactions between specific IgE antibodies and their association with asthma: A cross-sectional analysis within a population-based birth cohort. *PLoS Med*. 2018;15(11):e1002691. doi: 10.1371/journal.pmed.1002691.
37. Hou H, Zhang R, Li J. Artificial intelligence in the clinical laboratory. *Clin Chim Acta*. 2024;559:119724. doi: 10.1016/j.cca.2024.119724.
38. Undru T R, Uday U, Lakshmi J T, Kaliappan A, Mallamgunta S, Nikhat S S i sur. Integrating artificial intelligence for clinical and laboratory diagnosis – a review. *Maedica (Bucur)*. 2022;17(2):420–426. doi: 10.26574/maedica.2022.17.2.420.
39. Goktas P, Damadoglu E. Future of allergy and immunology: Is artificial intelligence the key in the digital era? *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2025;134(4):396–407.e2. doi: 10.1016/j.anai.2024.10.019.