

Les biopuces multi-allergéniques

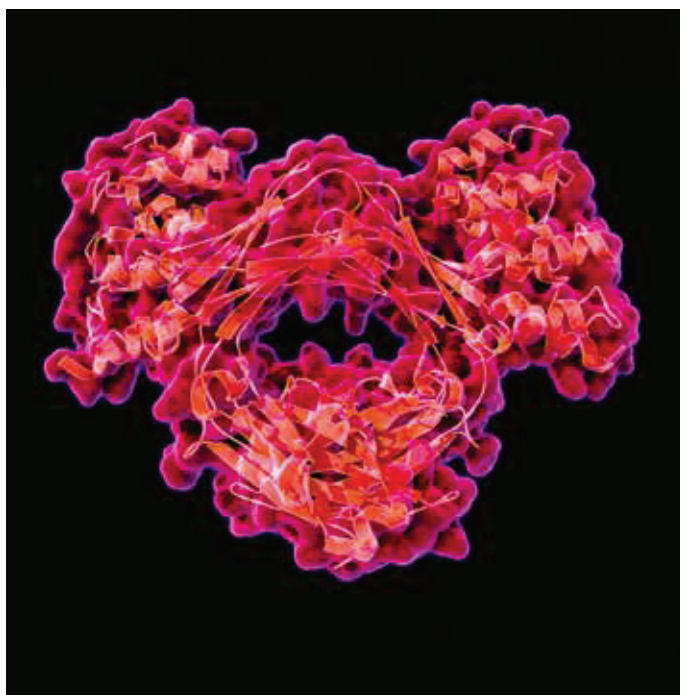
Lorna Garnier

Laboratoire d'Immunologie, Hôpital Lyon Sud, Hospices civils de Lyon, 165 chemin du Grand-Revoynet, 69310 Pierre-Bénite, France.

E-mail: lorna.garnier@chu-lyon.fr (L. Garnier).

RÉSUMÉ

Le dosage des immunoglobulines de type E (IgE), dites spécifiques des réactions d'hypersensibilité IgE dépendantes, fait maintenant partie intégrante du diagnostic étiologique de l'allergie. Dans les années 1990, le clonage et la caractérisation des allergènes moléculaires et l'évolution parallèle des technologies de type « microarray » ont conduit au développement des premières biopuces multi-allergéniques. Ces tests ont ainsi permis d'établir des profils de sensibilisation pour chaque patient en recherchant simultanément des IgE spécifiques dirigées contre plus de 100 allergènes différents, ce qui a été une avancée majeure sur le plan épidémiologique et diagnostique. Néanmoins, ces technologies présentent quelques limites, concernant notamment la sensibilité et la quantification (tests semi-quantitatifs). En raison de leur coût, de leurs avantages et inconvénients, les biopuces multi-allergéniques doivent être réservées à des indications cliniques particulières, notamment chez les patients polysensibilisés présentant des allergies multiples ainsi que pour l'exploration d'anaphylaxies idiopathiques.



© SCIENCE SOURCE / BSIP

MOTS CLÉS

- allergène moléculaire
- biopuce
- composant moléculaire
- IgE spécifique

KEYWORDS

- component resolved diagnosis
- molecular allergens
- biochip
- specific IgE

ABSTRACT

Multiallergenic microarrays

The immunoglobulin E-type (IgE) assay, so-called specific for IgE-dependent hypersensitivity reactions, is now an integral part of the etiological diagnosis of allergy. In the 1990s, the cloning and characterization of molecular allergens and the parallel evolution of microarray technologies led to the development of the first multi-allergenic biochips. These tests have made it possible to establish sensitization profiles for each patient by simultaneously searching for specific IgE directed against more than 100 different allergens which has been a major breakthrough in epidemiological and diagnostic terms. Nevertheless, these technologies have some limitations, especially concerning sensitivity and quantification (semi-quantitative assays). Due to their cost, advantages and disadvantages, multi-allergenic biochips must be reserved for particular clinical indications, especially in polysensitized patients with multiple allergies and for the exploration of idiopathic anaphylaxis.

► Historique : de la détection des IgE dans le sérum aux biopuces

Les technologies de microarrays sont apparues relativement récemment dans le diagnostic de l'allergie, ouvrant les portes à la détection simultanée d'IgE spécifiques dans le sérum de patients vis-à-vis d'un large panel d'allergènes. Toutes les techniques actuellement développées reposent sur le même principe : immobilisation des allergènes sur un même support, mise en contact avec le sérum du patient et révélation à l'aide d'un anticorps marqué. La première publication sur le sujet remonte à 2002 [1].

La technologie utilisée consistait à immobiliser 94 allergènes moléculaires, natifs et recombinants sous forme de microspots sur une lame de verre. La surface de cette lame était rendue réactive aux amines en utilisant du silane conventionnel revêtu d'un polymère aminoréactif permettant une fixation covalente efficace des protéines et une accessibilité optimale aux anticorps (VBC-Genomics, Vienne). Après une première phase d'incubation avec le sérum d'un patient et une phase de lavage pour éliminer les protéines non fixées, la révélation s'effectuait avec un anticorps anti-IgE marqué avec un fluorochrome (anticorps monoclonal murin anti-IgE marqué avec de l'Alexa fluor 546). Après un second lavage, la fluorescence émise était détectée à l'aide d'un scanner (laser et photomultiplicateur) permettant ainsi de déterminer la spécificité des IgE présentes dans le sérum du patient et d'établir un profil de sensibilisation. Sur la base de cette approche, un codéveloppement avec Phadia a conduit à la biopuce Isac (*Immuno Solid-phase Allergen Chip*).

► Tests actuellement disponibles

Le test Immunocap Isac (Thermo Fisher Scientific) a été la première biopuce multi-allergénique disponible sur le marché en France. Le nombre d'allergènes présents sur ce test a augmenté progressivement au fil des années.

En 2008, ce test permettait la recherche d'une sensibilisation vis-à-vis de 103 allergènes moléculaires (natifs et recombinants) (**figure 1**). Ce test est maintenant constitué de 112 allergènes fixés sous forme de spots (diamètre env. 200 µm) en triplicats sur une lame de verre. Chaque lame comprend quatre sites réactionnels permettant de réaliser quatre tests. La technologie utilisée est semblable à celle décrite dans le paragraphe précédent. La quantité d'allergène par spot est d'environ 50 à 200 femtogrammes (1 à 2 µg pour les tests unitaires en moyenne). La calibration s'effectue à l'aide d'un sérum standard, testé comme un sérum de patient à chaque nouveau lot ou tous les trente jours. Ce sérum standard

est un sérum de patient, déplété en IgE, contenant un mélange de 14 anticorps monoclonaux chimériques homme/souris. Ces anticorps, ayant une partie constante Fc epsilon humaine, sont dirigés contre 14 allergènes moléculaires différents. Leurs concentrations sont connues et choisies pour couvrir l'étendue de la gamme de mesure. Ce sérum est étalonné de manière croisée, à l'aide des tests unitaires qui sont eux-mêmes rattachés par interpolation à la seconde préparation internationale de référence (IRP) 75/502 ou à la troisième norme internationale 11/234 équivalente de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) pour l'immunoglobuline E du sérum humain. Ainsi, pour un sérum donné, la fluorescence émise pour chaque allergène est rapportée à la courbe d'étalonnage et permet

Le test Immunocap Isac a été la première biopuce multi-allergénique disponible sur le marché en France

Figure 1. Test Isac.

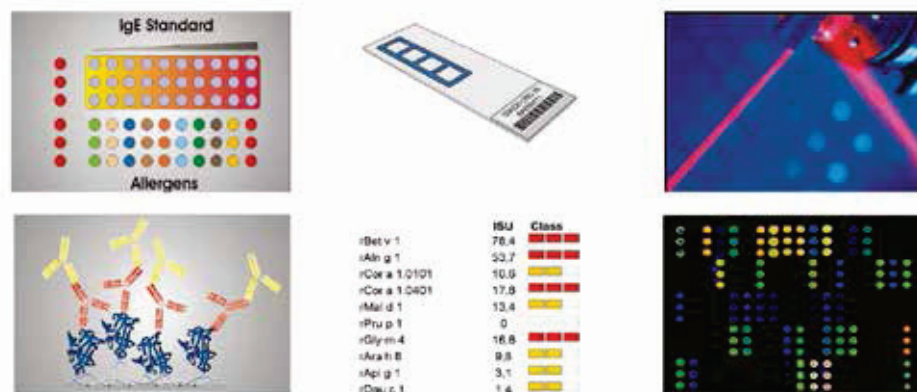


Figure 2. Test Alex.



© Macro Array Diagnostics

d'évaluer de manière semi-quantitative la quantité d'IgE spécifiques de cet allergène qui est exprimée en unité arbitraire : ISU-E.

Basée sur cette même technologie, la biopuce MedALL (*Mechanisms of the Development of Allergy*) a été développée dans le cadre du projet européen du même nom, pour la surveillance et le suivi des profils de sensibilisation IgE/IgG vis-à-vis de plus de 170 composants

moléculaires dans des cohortes de naissance. Cette biopuce avait la particularité de présenter une meilleure sensibilité, en comparaison au test Isac [2,3]. Le test Alex (*Macro Array Diagnostics*) est apparu beaucoup plus récemment sur le marché. Ce test est composé à la fois d'extraits et d'allergènes moléculaires. La prise d'essai de sérum est légèrement plus importante que celle de l'Isac (100 µL vs 30 µL), mais ce test présente un nombre plus important d'allergènes (302 : 118 extraits et 184 allergènes moléculaires). Ces allergènes sont fixés sur des nanobilles immobilisées en spot unique sur une membrane de nitrocellulose, cette membrane étant elle-même fixée sur une cartouche rectangulaire (figure 2). Chaque cartouche permet la réalisation d'un test, de manière indépendante. L'utilisation de nanobilles permet d'optimiser la stratégie de couplage pour chaque allergène et ainsi d'optimiser la présentation de cet allergène aux IgE spécifiques. Lors de la première étape d'incubation, un réactif, contenant des résidus glucidiques de la broméline fixés à l'albumine, permet d'inhiber les IgE dirigées contre les déterminants carbohydrate ou *Cross-Reactive Carbohydrate Determinants* (CCD). Cela permet de s'affranchir des positivités liées à ces IgE observées pour les allergènes glycosylés. La quantité d'allergène par spot est d'environ 2 à 20 ng. Le mode de révélation est colorimétrique (anticorps monoclonaux murins anti-IgE couplés à une enzyme, la phosphatase alcaline, activant un substrat colorimétrique : BCIP/NBT). La lecture des spots colorés est ensuite réalisée à l'aide d'une caméra. Les résultats du test Alex sont semi-quantitatifs et exprimés en kUA/L. Ils sont calculés à l'aide des données d'étalonnage spécifiques à chaque lot, normalisées par rapport à une courbe de référence, qui sont intégrées dans le code-barres de chaque cartouche. Les paramètres de courbe pour chaque lot sont ajustés à l'aide de tests de référence internes réalisés avec une préparation de sérum testée sur ImmunoCAP (Thermo Fisher Scientific) contenant des IgE spécifiques dirigées contre plusieurs allergènes. Les résultats Alex sont donc indirectement rattachés à la préparation de référence OMS 11/234 pour l'IgE totale. Ce test permet également d'évaluer la concentration en IgE totales, qui reste une estimation à l'heure actuelle. Pour connaître la concentration en IgE totales de manière précise, il est conseillé de réaliser un dosage en test unitaire.

Le **tableau 1** résume les principales caractéristiques des tests Isac et Alex.

La technologie du test Faber a été également développée par MacroArray Dx. Les allergènes, au nombre de 244 (122 extraits allergéniques et 122 composants moléculaires) sont également couplés à des nanobilles (après activation chimique). Les détails de la technique ne sont pas divulgués par le fabricant. Ces tests ne sont réalisés que par le Caam (*Centri Associati di Allergologia Molecolare*) en Italie.

Tableau 1. Principales caractéristiques des tests Alex et Isac.

	Alex	ImmunoCAP Isac
Allergènes moléculaires	184	112
Extraits allergéniques	118	0
Quantité protéines/spot	2 à 20 ng	50 à 200 fg
Dosage IgE totales	Oui (3 à 2500 kU/L)	Non
Blocage des CCD	Oui	Non
Volume prise essai	100 µL	30 µL
Mode de lecture	Colorimétrie, amplification enzymatique	Fluorescence sans amplification
Coût scanner	< 5 000 euros	> 30 000 euros
Minimum de test(s) par run	1	4
Nombre de spot(s) par allergène	1	3
Ajout d'allergènes	Aisée	Difficile
Coût du test	+	++
Praticabilité du test	+++	++

Parmi les autres tests existants, le Microtest DX est un test permettant de rechercher des IgE spécifiques dirigés contre 26 composants moléculaires simultanément. Il est entièrement automatisé et requiert lui aussi une faible quantité de sérum (100 µL). L'instrument permet de traiter cinq biopuces simultanément et le système de lecture est un fluorimètre permettant d'obtenir des résultats semi-quantitatifs [4].

D'autres tests sont également en développement et/ou ont fait l'objet de publications [5,6].

► Performances analytiques

Au cours du développement de ces biopuces, et lors de leur mise sur le marché, il a été nécessaire de s'assurer que ces tests aient des performances analytiques satisfaisantes, notamment en termes de spécificité, sensibilité et de reproductibilité.

Ces microtechnologies nécessitent des optimisations pour préserver la fonctionnalité des protéines et maintenir l'accessibilité des épitopes allergéniques aux IgE, tout en minimisant le bruit de fond et avec une amplification du signal suffisante. Du fait de propriétés intrinsèques propres à chaque allergène (taille, charge, solubilité, structure tridimensionnelle), cette optimisation est plus complexe pour les tests multiparamétriques que pour les tests unitaires. Pour cette raison, mais aussi du fait de la faible quantité d'allergènes immobilisée sur le support (rendant le test plus sensible à la compétition avec les IgG), les biopuces multi-allergéniques présentent, en règle générale, une sensibilité moindre que les tests unitaires [7,8].

Concernant la spécificité, une étude récente menée dans différents pays européens et un site sud-africain a montré que le test Isac I12 présentait un très faible pourcentage de résultats faussement positifs (0,014 %) [9].

Dans cette même étude, la variabilité moyenne observée entre les différents sites participants était de 25,5 % avec des CV de 22 %, 27,1 % et 22,4 % pour les concentrations basses, moyennes et élevées respectivement.

De manière générale, les CV répétabilité et la reproductibilité sont plus importants que ceux obtenus avec les techniques de dosage unitaire et sont généralement inférieurs à 15 % et 25 % respectivement (données personnelles et issues du réseau Allergobionet). Il est donc important de tenir compte de cette variabilité pour l'interprétation des résultats, notamment autour du seuil de positivité et pour la comparaison

aux résultats antérieurs. Il est important de respecter scrupuleusement les instructions du fournisseur et de connaître les étapes critiques de la technique pouvant être à l'origine de résultats faussement positifs/négatifs ou induire une variabilité plus importante.

Plusieurs études comparant les résultats de différentes biopuces ou les résultats de ces tests à ceux de tests unitaires et/ou tests cutanés montrent une bonne concordance, notamment pour les allergènes moléculaires [4,10-12].

Néanmoins, du fait des différents procédés de préparation et d'immobilisation des allergènes, et des différences de techniques (notamment en termes de quantité d'allergènes et du mode de révélation), les résultats peuvent également varier d'un test à l'autre et ne sont pas toujours comparables. Des différences de résultats peuvent s'observer

également du fait de la présence d'IgE anti-CCD (l'utilisation d'un réactif inhibant ces IgE permet de s'affranchir des positivités liées à cette spécificité).

Cela illustre la nécessité d'un travail de standardisation afin d'optimiser les performances analytiques de ces biopuces.

Un travail de standardisation est nécessaire afin d'optimiser les performances analytiques de ces biopuces

► Avantages et limites des biopuces multi-allergéniques

L'avantage principal des micropuces est de permettre la détection d'IgE spécifiques dirigées contre un large spectre d'allergènes et notamment d'allergènes moléculaires en utilisant une faible quantité de sérum. Il y a cependant certaines limites liées notamment au format de ces tests. La première est que ces tests sont pour la plupart semi-quantitatifs et moins sensibles que les tests unitaires existants. Comme évoqué précédemment, les performances analytiques en termes de répétabilité et de fidélité intermédiaire peuvent varier selon les allergènes et peuvent être moins bonnes qu'avec les tests unitaires. La réalisation et la gestion des contrôles qualité sont plus complexes du fait du nombre important d'allergènes.

Une autre limite est le fait de travailler avec un panel fixe d'allergènes. De ce fait, certains allergènes d'intérêt, selon le profil du patient, peuvent ne pas être présents dans le test. Il peut alors être nécessaire de compléter l'exploration avec des tests cutanés et/ou unitaires.

Enfin, l'interprétation est plus complexe qu'un test unitaire, notamment pour un prescripteur peu initié, car ces tests peuvent identifier de nouvelles sensibilisations non recherchées pour lesquelles se pose la question de

la pertinence clinique. À noter que la mise en évidence d'IgE spécifiques d'un allergène ne permet de conclure qu'à une sensibilisation. Le diagnostic d'allergie reste avant tout retenu avec la clinique.

Concernant les extraits allergéniques, les limites restent les mêmes que celles observées pour un test unitaire à savoir que les procédés de fabrication peuvent parfois détériorer et éliminer un composant allergénique lors de la préparation et être à l'origine d'un manque de sensibilité. Cela peut être corrigé en enrichissant l'extrait ou en modifiant le procédé de préparation. Une autre manière de contourner ce problème est de faire figurer le/les composants moléculaires sous-représentés dans l'extrait sur la biopuce. Il est également important de s'assurer de l'absence de contamination pour les extraits allergéniques et/ou les allergènes moléculaires natifs purifiés.

Comme vu précédemment, un des principaux avantages des biopuces multi-allergéniques est de pouvoir tester simultanément plus de cent allergènes avec très peu de sérum. En comparaison avec les tests unitaires pour un même nombre d'allergènes testés, ces tests permettent d'obtenir des résultats plus rapidement, avec un temps technique réduit, et un coût moindre. Actuellement en France, la réalisation d'une biopuce multi-allergénique est équivalente en termes de coût à 15 tests unitaires. De plus, lorsque le contexte clinique le nécessite, ces tests permettent de rechercher de multiples sensibilisations indépendamment des règles de prescription imposées par la nomenclature. À noter qu'à ce jour ce test est inscrit sur la liste complémentaire des examens de biologie médicale. Il est donc probable qu'il soit inscrit dans la nomenclature des actes de biologie médicale (NABM) à plus ou moins long terme.

La mise en évidence de sensibilisation non attendue, permettant parfois d'expliquer l'histoire clinique, est également un des avantages de ces tests. Ce point est détaillé dans la partie suivante.

Enfin, l'apport des allergènes moléculaires, largement représentés sur ces tests, est maintenant clairement décrit et prouvé : ils permettent d'améliorer la sensibilité du test dans certains cas mais surtout la spécificité en comparaison aux extraits. Ils permettent également d'identifier des sensibilisations vis-à-vis d'allergènes majeurs, en faveur d'une sensibilisation primaire, et des réactions croisées pouvant orienter la prise en charge thérapeutique.

Il faut également souligner que certains allergènes moléculaires utiles au diagnostic et ou à la prise en charge du patient figurent uniquement sur ces biopuces.

■ Indications

L'approche diagnostique retenue par l'*European Academy of Allergy and Clinical Immunology* (EAACI) pour l'exploration des allergies est l'approche « U-Shaped » [13]. Celle-ci consiste dans un premier temps à réaliser un interrogatoire bien mené sur les antécédents du patient, un examen clinique, puis des tests cutanés et/ou des dosages d'IgE spécifiques choisis en fonction de l'histoire clinique (démarche « descendante »). À la suite de cette première étape, la recherche d'IgE spécifiques dirigées contre des allergènes moléculaires peut être réalisée pour mieux définir le profil de sensibilisation du patient, évaluer le risque de sévérité et d'évolution de l'allergie et guider la prise en charge thérapeutique. La mise en évidence de sensibilisation à des panallergènes /eurallergènes, fréquemment à l'origine de réactivités croisées, doit amener à rechercher des marqueurs de sensibilisation primaire de la source allergénique concernée (par exemple, une sensibilisation à la profiline et/ou la polcalcine de la phléole doit amener à rechercher une sensibilisation à Phl p 1 et Phl p 5, marqueurs de sensibilisation primaire aux pollens de graminées). L'interrogatoire doit également être élargi en recherchant d'éventuels symptômes à d'autres sources allergéniques contenant des allergènes de la même famille moléculaire que celui initialement identifié.

Si les sensibilisations sériques et/ou cutanées sont peu nombreuses, le recours au dosage unitaire d'IgE spécifiques est le plus souvent suffisant. Il n'est pas pertinent de doser les IgE spécifiques d'un allergène en dehors du contexte clinique de suspicion d'allergie. Le recours à une biopuce multi-allergénique (étape « ascendante »), basé sur l'exploration de la réactivité IgE vis-à-vis d'un large panel d'allergènes, peut être envisagé en cas de réactivités multiples mises en évidence par TC ou par des tests biologiques d'orientation, notamment pour les patients présentant une polyallergie. Cela permet d'avoir une vue d'ensemble plus rapidement pour affiner le diagnostic et guider la prise en charge.

Les biopuces sont également particulièrement utiles lorsque les tests cutanés ne sont pas praticables ou ininterprétables (patients sous antihistaminiques, dermatographisme, atteinte cutanée étendue dont la dermatite atopique, etc.).

Par ailleurs, si, malgré un interrogatoire bien mené, les premières explorations réalisées ne permettent pas d'expliquer une réaction anaphylactique, la réalisation d'une biopuce multi-allergénique présente un intérêt pour identifier l'allergène étant à l'origine de cette réaction.

Les biopuces
sont également
particulièrement utiles
lorsque les tests cutanés
ne sont pas praticables
ou ininterprétables

Dans une étude réalisée chez 110 patients ayant une anaphylaxie dite idiopathique, la réalisation d'une biopuce multi-allergénique a permis d'identifier un allergène ayant une forte probabilité d'être à l'origine de la réaction chez 20 % des patients [14]. Les allergènes les plus fréquemment incriminés étaient l'oméga-5-gliadine du blé et les allergènes de la crevette. La biopuce utilisée pour cette étude était l'ISAC 103. Il est probable que ce pourcentage de 20 % soit plus important avec les biopuces actuellement sur le marché, qui présente un nombre plus important d'allergènes moléculaires. Enfin, ces tests multiparamétriques sont des outils très intéressants pour la réalisation d'études épidémiologiques. Ils ont été également un outil précieux pour étudier la marche atopique et les facteurs prédictifs d'évolution vers un asthme ou une allergie [2,3]. Le suivi des immunothérapies allergéniques semble également être une indication à évaluer, puisque ces tests pourraient permettre d'évaluer l'effet « bloquant » des IgG spécifiques par compétition avec les IgE, les allergènes n'étant pas en excès sur les biopuces multi-allergéniques [15]. La recherche simultanée des IgE et des IgG4 spécifiques a même été décrite pour une de ces biopuces [4].

Conclusion

Les biopuces multi-allergéniques sont des outils très intéressants dans le diagnostic de l'allergie. Cependant, notamment du fait d'un manque de standardisation, la connaissance des caractéristiques et performances de ces tests est primordiale pour une juste prescription et une bonne interprétation des résultats.

Un travail de standardisation et l'amélioration de la sensibilité de ces tests sont donc des pistes d'amélioration à envisager. Une automatisation pourrait permettre de réduire la variabilité des résultats. Cela est en cours de développement pour le test Alex. Enfin, des équipes travaillent également sur la combinaison de cette technologie de biopuce permettant la détection de sensibilisation et de tests fonctionnels afin d'améliorer les valeurs prédictives positives et négatives de ces tests. ■■

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts en relation avec cet article.

Points à retenir

- ▶ L'avantage principal des micropuces est de permettre la détection d'IgE spécifiques dirigées contre un large spectre d'allergènes et notamment d'allergènes moléculaires en utilisant une faible quantité de sérum.
- ▶ Ces tests mettent en évidence des sensibilisations vis-à-vis d'allergène. Le diagnostic reste avant tout clinique.
- ▶ Les biopuces multi-allergéniques présentent généralement une sensibilité un peu moins bonne et une variabilité plus importante que les tests unitaires dont il faut tenir compte pour l'interprétation des résultats.
- ▶ Les principales indications à retenir pour ces tests sont l'exploration de réactivités multiples mises en évidence par TC ou par des tests biologiques d'orientation, notamment pour les patients présentant une polyallergie, les anaphylaxies idiopathiques et lorsque les tests cutanés ne sont pas réalisables ou ininterprétables.

Références

- [1] Hiller R, Laffer S, Harwanegg C et al. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB J*. 2002;16(3):414-6.
- [2] Skrinio I, Lupinek C, Valenta R et al. The use of the MeDALL-chip to assess IgE sensitization: a new diagnostic tool for allergic disease? *Pediatr Allergy Immunol*. 2015;26(3):239-46.
- [3] Anto JM, Bousquet J, Akdis M et al. Mechanisms of the Development of Allergy (MeDALL): Introducing novel concepts in allergy phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(2):388-99.
- [4] Williams P, Önell A, Baldracchini F et al. Evaluation of a novel automated allergen microarray platform compared with three other allergy test methods. *Clin Exp Immunol*. 2016;184(1):1-10.
- [5] Jeon H, Jung JH, Kim Y et al. Allergen Microarrays for In Vitro Diagnostics of Allergies: Comparison with ImmunoCAP and AdvanSure. *Ann Lab Med*. 2018;38(4):338-47.
- [6] Feyzkhanova G, Voloshin S, Smoldovskaya O et al. Development of a microarray-based method for allergen-specific IgE and IgG4 detection. *Clin Proteomics*. 2017;14:1.
- [7] Canonica GW, Ansotegui IJ, Pawankar R et al. A WAO - ARIA - GA(2) LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *World Allergy Organ J*. 2013;6:17.
- [8] Wohrl S, Vigil K, Zehetmayer S et al. The performance of a component-based allergen-microarray in clinical practice. *Allergy*. 2006;61:633-9.
- [9] van Hage M, Schmid-Grendelmeier P, Skevaki C et al. Performance evaluation of ImmunoCAP® ISAC 112: a multi-site study. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55(4):571-7.
- [10] Buzzulini F, Da Re M, Scala E et al. Evaluation of a new multiplex assay for allergy diagnosis. *Clin Chim Acta*. 2019;493:73-8.
- [11] Heffler E, Puggioni F, Peveri S et al. Extended IgE profile based on an allergen macroarray: a novel tool for precision medicine in allergy diagnosis. *World Allergy Organ J*. 2018;11(1):7.
- [12] Griffiths RLM, El-Shanawany T, Jolles SRA et al. Comparison of the Performance of Skin Prick, ImmunoCAP, and ISAC Tests in the Diagnosis of Patients with Allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2017;172(4):215-23.
- [13] Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ et al. EAACI Molecular Allergy User's Guide. *Pediatr Allergy Immunol*. 2016;27 Suppl 23:1-250.
- [14] Heaps A, Carter S, Selwood C et al. The utility of the ISAC allergen array in the investigation of idiopathic anaphylaxis. *Clin Exp Immunol*. 2014;177(2): 483-90.
- [15] Lupinek C, Wollmann E, Valenta R. Monitoring Allergen Immunotherapy Effects by Microarray. *Curr Treat Options Allergy*. 2016;3:189-203.