

PNEUMOLOGIA PEDIATRICA

CITOLOGIA NASALE

La citologia nasale
Un adolescente con polmoniti ricorrenti

Sindrome polline-alimenti, rinite allergica e asma
stagionale in età pediatrica: una relazione complessa



INDICE

Editoriale

View point

Francesca Santamaria

La citologia nasale

Nasal cytology

Matteo Gelardi, Massimo Landi

Un adolescente con polmoniti ricorrenti

An adolescent with recurrent pneumonia

Emilia Cirillo, Roberta Romano, Giovanni Galasso, Giuliana Giardino, Vera Gallo, Carmine Mollica, Claudio Pignata1

Sindrome polline-alimenti, rinite allergica e asma stagionale in età pediatrica: una relazione complessa

Pollen-food syndrome, seasonal allergic rhinoconjunctivitis and asthma in childhood: a complex link

Carla Mastroianni, Marilena Garrubba, Chiara Greco, Carlotta Povesi-Dascola, Dora Di Mauro, Carlo Caffarelli

3

4

14

19

Pneumologia Pediatria

Volume 16, n. 61 - marzo 2016

Direttore Responsabile

Francesca Santamaria (Napoli)

Direzione Scientifica

Stefania La Grutta (Palermo)
Luigi Terracciano (Milano)

Segreteria Scientifica

Silvia Montella (Napoli)

Comitato Editoriale

Angelo Barbato (Padova)
Filippo Bernardi (Bologna)
Alfredo Boccaccino (Misurina)
Attilio L. Boner (Verona)
Mario Canciani (Udine)
Carlo Capristo (Napoli)
Fabio Cardinale (Bari)
Salvatore Cazzato (Bologna)
Renato Cutrera (Roma)
Fernando M. de Benedictis (Ancona)
Fulvio Esposito (Napoli)
Mario La Rosa (Catania)
Massimo Landi (Torino)
Gianluigi Marseglia (Pavia)
Fabio Midulla (Roma)
Luigi Nespoli (Varese)
Giorgio L. Piacentini (Verona)
Giovanni A. Rossi (Genova)
Giancarlo Tancredi (Roma)
Marcello Verini (Chieti)

Editore

Giannini Editore
Via Cisterna dell'Olio 6b
80134 Napoli
e-mail: editore@gianninispa.it
www.gianninieditore.it

Coordinamento Editoriale

Center Comunicazioni e Congressi
Srl
e-mail: info@centercongressi.com
Napoli

Realizzazione Editoriale e Stampa

Officine Grafiche F. Giannini & Figli
SpA
Napoli

© Copyright 2015 by SIMRI
Finito di stampare nel mese di febbraio 2016

La citologia nasale

Nasal cytology

Matteo Gelardi¹, Massimo Landi²

¹ *UOS di Rinologia, Azienda Ospedaliera Policlinico-Universitario, Bari*

² *Pediatria di famiglia Torino, collaboratore di Ricerca presso Unità di Ricerca di Pneumologia e Allergologia Pediatrica (PAP), Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare (IBIM), Consiglio Nazionale delle Ricerche, Palermo*

Corrispondenza: Massimo Landi **email:** landi@alma.it

Riassunto La citologia nasale è uno strumento diagnostico molto utile in ambito rinologico, essendo in grado di rilevare le modificazioni cellulari dovute a stimoli sia irritativi (chimici o fisici), sia infiammatori. In questi ultimi anni la citologia nasale ha permesso di identificare nuove entità nosologiche, denominate riniti cellulari, come la rinite non allergica con eosinofili (NARES), la rinite non allergica con mastociti (NARMA), la rinite non allergica con neutrofili (NARNE) e la rinite non allergica con eosinofili e mastociti (NARESMA). Il rinocitogramma è in grado di distinguere le diverse forme di rinite allergica e non (il termine vasomotorio è comprensivo di entrambe le forme) e può suggerire il trattamento adeguato (farmaci o immunoterapia). La tecnica è facile da eseguire (*nasal scraping*, successiva colorazione con May-Grunwald-Giemsa e lettura con microscopio ottico) ed è quindi particolarmente adatta per i bambini. Tale considerazione suggerisce l'utilità di un uso sistematico della citologia nasale nella diagnostica dei disturbi nasali in pediatria, al fine di raggiungere una diagnosi corretta ed impostare un approccio terapeutico razionale; infatti, questi due elementi sono fondamentali per evitare complicazioni e per migliorare la qualità di vita del piccolo paziente.

Parole chiave: Citologia nasale, rinite allergica, riniti cellulari, riniti sovrapposte.

Key words: Nasal cytology, allergic rhinitis, cellular rhinitis, overlapped rhinitis.

IL RAZIONALE DELLA CITOLOGIA NASALE

Da circa un secolo la citologia nasale costituisce oggetto di interesse in ambito sia clinico sia scientifico. La citologia nasale nasce infatti alla fine dell'800, quando H. Gollash nel 1889 interpretò i numerosi eosinofili presenti nel secreto nasale di un paziente affetto da asma bronchiale come elementi importanti nella patogenesi di questa malattia (1). Ma il vero impulso alla citodiagnostica nasale si ebbe nel 1927 dalla segnalazione di C. Eyermann, che rilevò la presenza di granulociti eosinofili nelle secrezioni nasali di pazienti allergici e ne sottolineò l'importanza diagnostica (2). Da allora, infatti, grande importanza si attribuisce al riconoscimento di specifici citotipi nelle diverse patologie nasali (3, 4). Pertanto, la citologia nasale rappresenta uno strumento molto utile, di facile attuazione e non invasivo per la diagnosi delle rinopatie di tipo sia vasomotorio, sia infettivo o irritativo, essendo in grado di rilevare le modificazioni cellulari presenti a livello della mucosa nasale. Essa rappresenta, pertanto, una metodica in grado di fornire informazioni cellulari che sono veri e propri *markers* rappresentativi di diversi quadri infiammatori.

Parlando di rinopatie vasomotorie è necessario ricordare come il termine "vasomotorio" significhi semplicemente "naso ribelle" e che pertanto al suo interno si collocano le riniti sia allergiche, sia non allergiche, meglio definite come riniti "cellulari", in base al tipo di cellula presente (5, 6). Proprio nell'ambito delle riniti cellulari, la citologia nasale ha permesso, in questi ultimi anni, di identificare nuove entità nosologiche, come la rinite non allergica con eosinofili (NARES), la rinite non allergica con mastociti (NARMA), la rinite non allergica con neutrofili (NARNE) e la rinite non allergica con eosinofili e mastociti (NARESMA) (7-9). La citologia nasale consente inoltre di monitorare nel tempo il paziente, di modulare la terapia e di correlare la flogosi con la storia clinica del paziente. Pertanto, la citologia nasale permette di rilevare le variazioni cellulari di un epitelio esposto a irritazioni di tipo fisico-chimiche (10, 11),

acute o croniche, o a flogosi di diversa natura (allergica, virale, batterica o fungina) (12, 13). Ad aumentare l'interesse per questa diagnostica ed a permetterne la diffusione hanno contribuito da un lato la semplicità con cui vengono realizzati i prelievi, dall'altro la scarsa invasività, che consentono l'eventuale ripetizione dell'esame, spesso necessaria nel *follow-up* delle patologie vasomotorie e nel monitoraggio dell'efficacia di alcuni trattamenti medico-chirurgici. Essendo, inoltre, una metodica semplice, sicura, non cruenta e poco costosa, presenta le caratteristiche ideali per un'applicazione ambulatoriale, da effettuare in tutte le fasce di età. La mucosa nasale è costituita di un epitelio pseudostratificato ciliato composto di cellule ciliate, mucipare, striate e basali (figura 1).

Fig. 1. La mucosa nasale è costituita di un epitelio pseudostratificato ciliato composto di cellule ciliate (elemento cellulare più differenziato), mucipare, striate e basali.

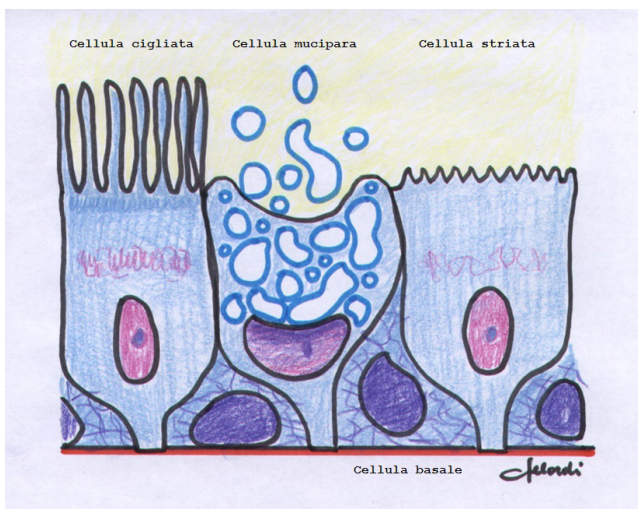
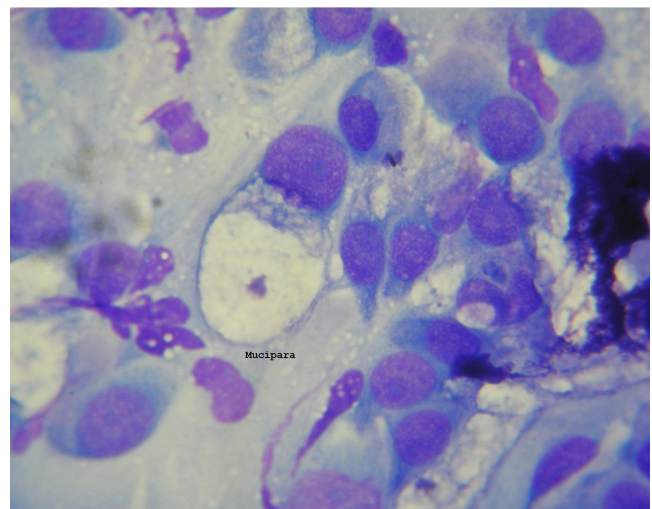


Fig. 2. Cellula mucipara (goblet cell) con evidente presenza di mucina al suo interno.



La cellula ciliata è l'elemento cellulare più differenziato della mucosa nasale (14) ed insieme alla cellula mucipara (figura 2) costituisce la prima linea di difesa delle vie aeree (sistema muco-ciliare).

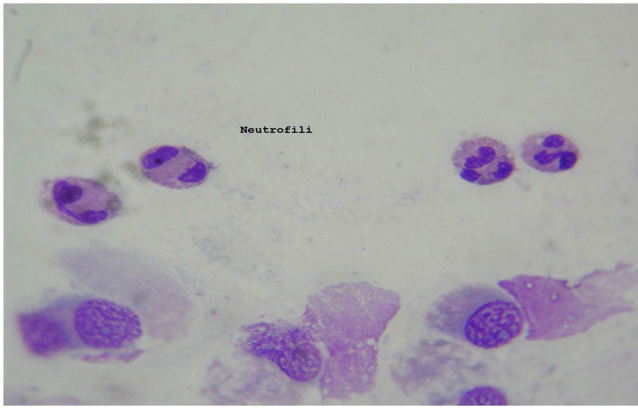
La diagnostica citologica si basa su un assioma fondamentale: la mucosa nasale, nell'individuo sano, è costituita dai quattro citotipi che normalmente compongono l'epitelio pseudostratificato ciliato precedentemente descritto e non presenta mai altri elementi cellulari tranne che sporadici neutrofili (figura 3).

Fig. 3. Esame citologico nasale normale. Sono presenti alcune cellule ciliate e rari neutrofili.



I granulociti si presentano all'osservazione microscopica con le stesse caratteristiche che hanno nel sangue periferico. Pertanto, i granulociti neutrofili presentano, nella loro forma caratteristica, un nucleo polilobato e un citoplasma con granulazioni neutrofile e qualcuna azzur-

Fig. 4. Granulociti neutrofili con il caratteristico nucleo polilobato.



a quelle dei neutrofili, che, dopo colorazione, assumono colore rosso-arancio. Come precedentemente detto, la loro presenza nella mucosa nasale ha sempre un significato patologico; possono essere infatti scarsamente presenti, come nella flogosi allergica minima persistente (15, 16), o numerosi, come nella rinite allergica (figura 5), nella NARES e nella NARESMA ed inoltre spesso possono essere anche degranulati.

Fig. 5. Eosinofili in degranulazione. Sono evidenti i granuli acidofili di colore rosso-arancione sparsi al di fuori del citoplasma.

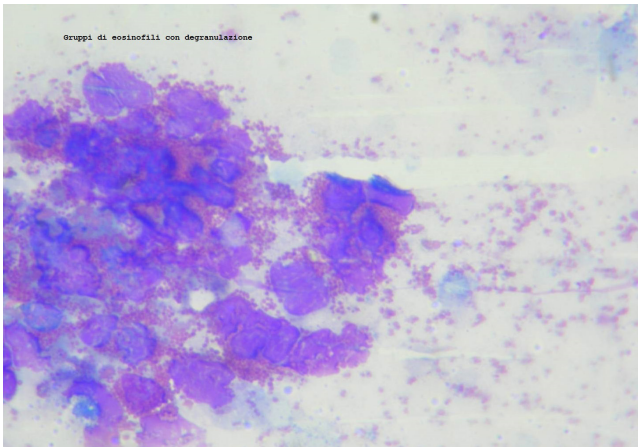
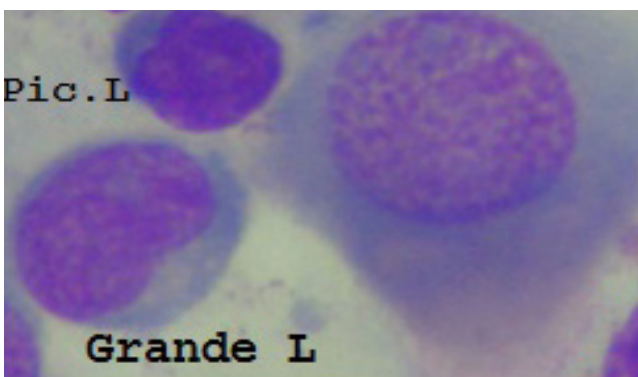


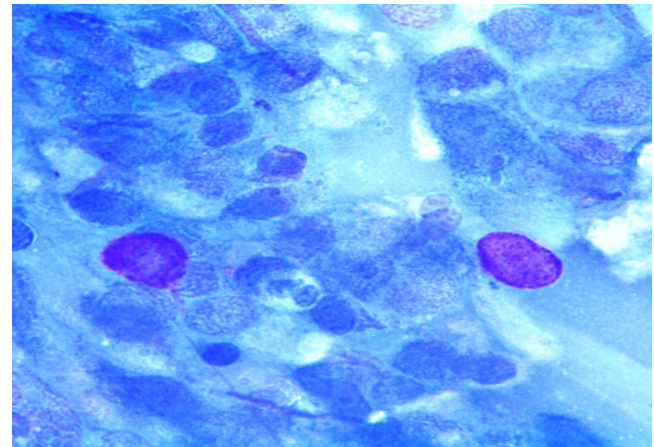
Fig. 7. Piccolo e grande linfocita con il citoplasma quasi interamente occupato dal nucleo con il caratteristico aspetto reniforme.



rofila (figura 4). Essi possono, inoltre, essere presenti nell'esame citologico normale anche in un certo numero, avendo principalmente la funzione di fagocitosi (batteri e particolato). Il loro aumento persistente deve essere monitorato, potendo rappresentare un aspetto infiammatorio della mucosa e contribuire alla persistenza dell'infiammazione mediante il rilascio di enzimi litici.

Il riscontro di eosinofili, mastcellule, batteri, spore ed ife micotiche nel rinocitogramma rappresenta un chiaro segno di patologia nasale. I granulociti eosinofili presentano classicamente un nucleo bilobato ed un citoplasma ricco di granulazioni, più grandi rispetto

Fig. 6. Mastociti con le caratteristiche granulazioni basofile di colore blu-viola.



Come gli eosinofili, anche i mastociti non sono presenti nella mucosa nasale normale. Alla microscopia ottica si presentano di colore blu-viola, con un nucleo centrale ed un citoplasma caratterizzato da granuli violacei (figura 6).

I mastociti sono responsabili della fase immediata della reazione allergica (rilascio di istamina e triptasi), caratterizzata da rinorrea acquosa e starnutazione, ed anch'essi possono essere visibili in degranulazione. I linfociti possono essere presenti nell'esame citologico nasale in quanto responsabili della risposta immunitaria (umorale e cellulo-mediata). Come nel sangue periferico, si presentano all'osservazione come grandi o piccoli linfociti (figura 7).

Fig. 8. Batteri bastoncelliformi liberi.

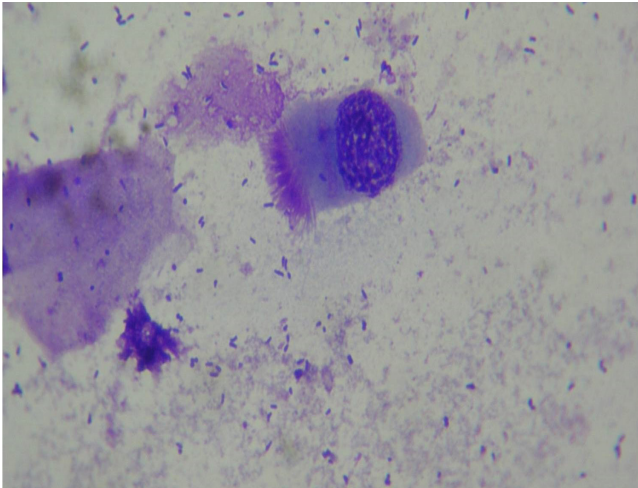


Fig. 9. Batteri cocchiformi racchiusi nel biofilm.

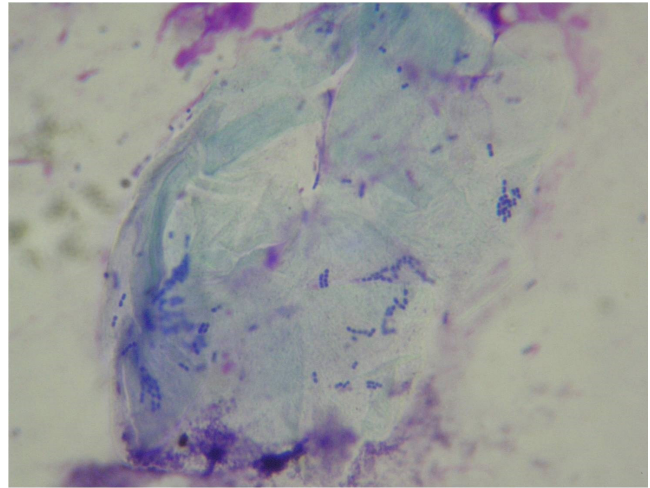
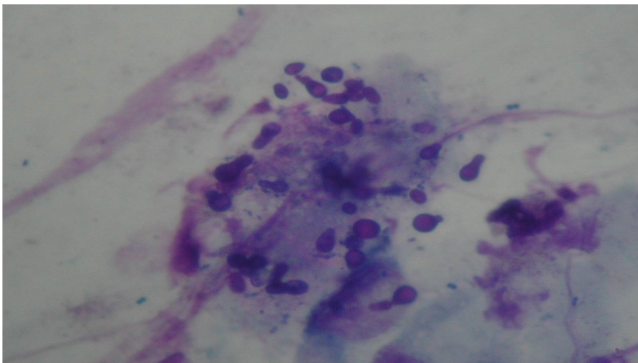


Fig. 10. Presenza di numerosi miceti con la caratteristica forma a “caciotta”.



Tra gli agenti della flogosi, i più frequentemente presenti nella mucosa nasale sono i batteri, che in genere colonizzano il vestibolo ed il rinofaringe, dove non è presente un sistema di *clearance* muco-ciliare, e che possono presentarsi all’osservazione sotto forma di elementi tondeggianti (cocchi) o a bastoncello, come i difteroidi, l'*haemophilus* o lo *pseudomonas*. Sono di frequente riscontro soprattutto in età pediatrica e possono essere visibili allo stato libero (figura 8) o raccolti in biofilm (17) (figura 9).

Il biofilm, o macchia infettiva, si presenta come una struttura di color ciano al cui inter-

no sono contenuti i batteri. Rappresenta una forma di difesa da parte dei microrganismi, che all’interno del biofilm risultano meno aggredibili dai chemioterapici. Occasionalmente sono riscontrabili miceti sotto forma di lieviti (figura 10) o di ife.

TECNICA DEL PRELIEVO CITOLOGICO, ALLESTIMENTO DEL PREPARATO ED OSSERVAZIONE AL MICROSCOPIO

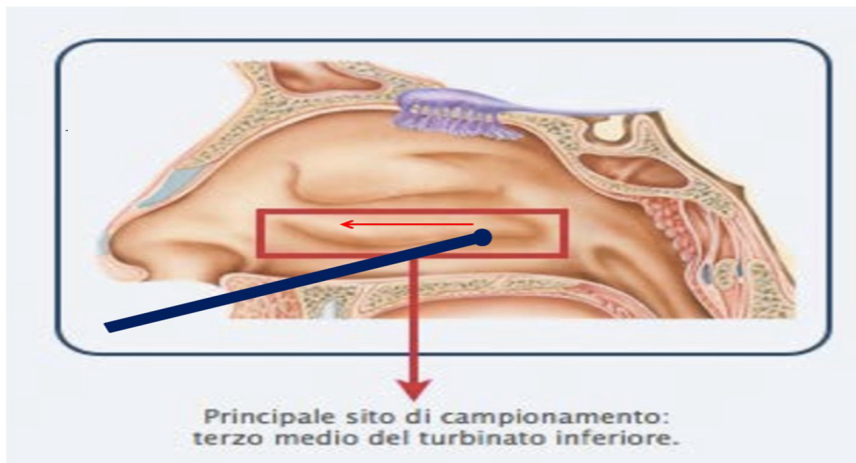
La tecnica citologica prevede i seguenti momenti:

- prelievo, detto anche campionamento;
- processazione, che comprende la fissazione e la colorazione;
- osservazione microscopica.

Il prelievo citologico consiste nella raccolta di cellule superficiali della mucosa nasale e ciò può essere effettuato sia con l’ausilio di un tampone sterile, come quello comunemente utilizzato per eseguire un tampone orofaringeo, sia con l’utilizzo di una piccola *urette* (*scraping*) in materiale plastico monouso (Rhino-probe® o meglio, in quanto prodotto italiano e meno costoso, il *Nasal Scraping*®) (18). Il campionamento va effettuato in corrispondenza della porzione media del turbinato inferiore, notoriamente sede del giusto rapporto tra cellule ciliate e mucipare (1/4 a favore delle ciliate) (figura 11).

Solitamente, nel caso di piccoli pazienti, si preferisce il tampone nasale allo *scraping* in quanto più agevole e meno fastidioso, riservando lo *scraping* ai pazienti più collaboranti. Il campionamento va effettuato sempre sotto attenta visione, in rinoscopia anteriore, per mezzo di uno *speculum* nasale e di una buona illuminazione. Come già precisato, non essendo una metodica cruenta, non richiede alcun tipo di anestesia. Una volta effettuato il campionamento, il materiale cellulare viene disteso su un vetrino portaoggetti, fissato mediante asciugatura all’aria

Fig. 11. *Tecnica del prelievo: lieve pressione e scorrimento in senso postero-anteriore con il nasal scraping (o con spatola nel caso del brushing) sulla superficie mediale del turbinato inferiore.*



e successivamente colorato secondo il metodo di May-Grunwald-Giemsa (MGG). Tale metodo di colorazione è quello solitamente utilizzato, in quanto in grado di colorare tutte le componenti cellulari della mucosa nasale, le cellule dell'immuno-flogosi (neutrofili, eosinofili, linfociti e mastcellule), i batteri, le spore micotiche e le ife fungine. La tecnica di colorazione richiede un tempo di circa 30', anche se oggi sono disponibili sistemi di colorazione rapida (MGG QUICK STAIN - Bio-Optica® - Milano -

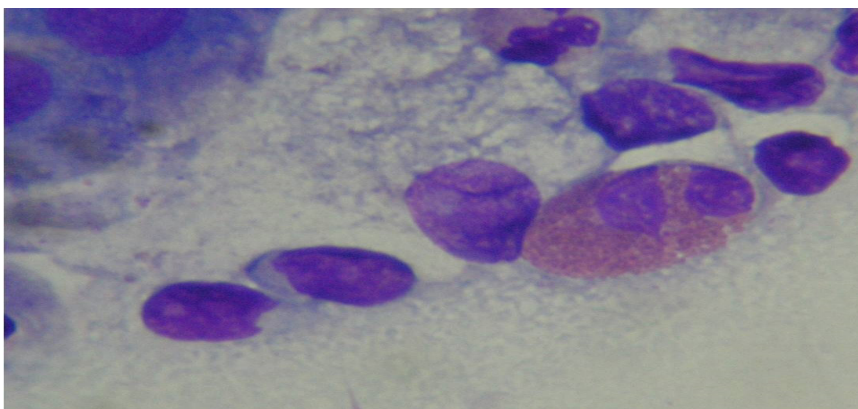
Italia) che, in un tempo estremamente breve (20-30"), permettono una buona colorazione cellulare.

L'osservazione del vetrino viene effettuata mediante l'utilizzo di un comune microscopio ottico che sia provvisto di obiettivo capace di ingrandire sino a 1000X. Per l'analisi del rinocitogramma si procede con una lettura per campi (non meno di 50), al fine di reperire gli elementi cellulari importanti per la diagnosi (eosinofili, mastcellule, neutrofili, batteri, spore ed altri), calcolando al termine della lettura la percentuale di essi (18-19).

RINITE ALLERGICA

Il paziente affetto da rinite allergica (RA), stagionale o perenne, se stimolato naturalmente o mediante test di provocazione nasale specifico, sviluppa una risposta nasale immediata, cosiddetta *early phase*, ed una tardiva, denominata *late phase* (20, 21). Dal punto di vista microscopico, tali risposte sono sempre caratterizzate da una infiltrazione mucosa di cellule immunoflogistiche (eosinofili, mastcellule, neutrofili e linfociti), che in seguito al rilascio di numerosi mediatori chimici sono causa dei principali sintomi che caratterizzano la malattia IgE-mediata, come prurito, congestione nasale, rinorrea, starnutazione, lacrimazione ed altri sintomi. Quando l'esposizione allergenica è di bassa intensità, ma persistente nel tempo (come è tipico

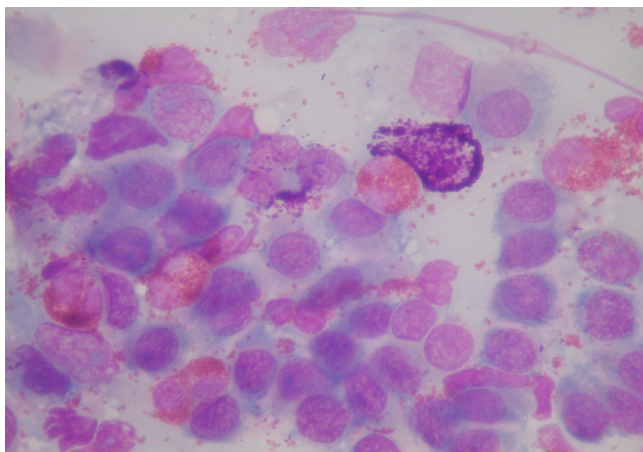
Fig. 12. *Quadro classico di flogosi allergica minima persistente, con rari neutrofili ed un eosinofilo.*



delle riniti perenni), ad esempio da dermatofagoidi, si realizza quella condizione cellulare definita "flogosi minima persistente" (15, 16), caratterizzata da una persistente infiltrazione di neutrofili e, solo in minima parte, di eosinofili (figura 12).

Raramente si riscontrano mastcellule ed importanti segni di degranulazione eosinofilo-mastocitaria, che si traduce clinicamente in una sintomatologia sub-cronica

Fig. 13. *Tipico quadro citologico di rinite allergica, con numerosi eosinofili in parte degranulati ed alcuni mastociti.*

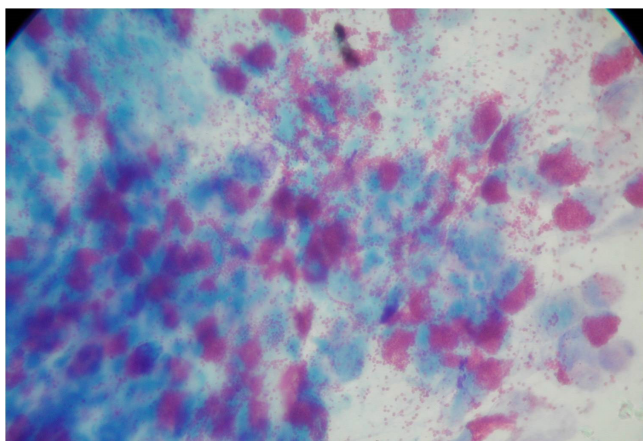


Di converso, se valutato al di fuori della stagionalità, presenterà chiaramente un “silenzio” sia clinico sia citologico, in particolare se saranno trascorsi più di trenta giorni dal termine della pollinazione. In questi casi, per una diagnosi di certezza occorrerà avvalersi o del test di provocazione nasale con allergene specifico oppure, ancor meglio, rimandare lo studio citologico al periodo di massima pollinazione dell’allergene sospetto. Sempre nell’ambito delle riniti allergiche, un dato interessante è emerso nel corso di un nostro studio nel quale è stato rilevato che i soggetti con rinite perenne e i pollinosici monosensibili presentano aspetti differenti per quanto riguarda sia la concentrazione delle cellule immunoflogistiche, sia i valori di resistenza nasale allo studio rinomanometrico (23). In particolare, i pollinosici hanno mostrato livelli più elevati di infiltrazione di cellule immunoflogistiche (eosinofili, neutrofilo e mastcellule) ed un maggior livello di resistenze nasali. Oltre alle differenze nella tipologia cellulare, si sono riscontrate variazioni riguardanti il grado di degranolazione eosinofilo-mastocitaria, che variava a seconda del tipo di polline interessato (graminacee, parietaria, cipresso o olivo), con un maggior grado di degranolazione per i pollini appartenenti alla famiglia delle graminacee.

RINITI CELLULARI (NARNE, NARES, NARMA E NARESMA)

Nella famiglia delle riniti vasomotorie occupano un ruolo importante, oltre alla sopra citata rinite allergica, le riniti cellulari, denominate in base al tipo cellulare predominante. La caratteristica di queste riniti, nella loro forma “pura”, è di non presentare cutipositività o IgE

Fig. 14. *Quadro di NARES con massiccia componente di eosinofili in gran parte in degranolazione.*



che contraddistingue i pazienti affetti da queste forme perenni, dove i sintomi dominanti sono l’ostruzione nasale e la rinorrea mucosa. Alcune differenze si sono tuttavia riscontrate monitorando nel tempo i pazienti allergici agli acari: la componente eosinoflica aumenta nel mese di aprile e di ottobre, periodi in cui gli acari hanno un incremento della replicazione (22). Nelle forme di RA stagionale, il rino-citogramma potrà modificarsi a seconda se il paziente verrà esaminato durante oppure al di fuori del periodo pollinico; nella prima condizione il paziente presenterà tutti i segni clinici della malattia e la citologia nasale sarà caratterizzata da neutrofilo, linfociti, eosinofili e mastcellule, in gran parte degranulati (figura 13).

Fig. 15. *Quadro citologico di NARESMA con importante componente eosinoflica e mastocitaria.*

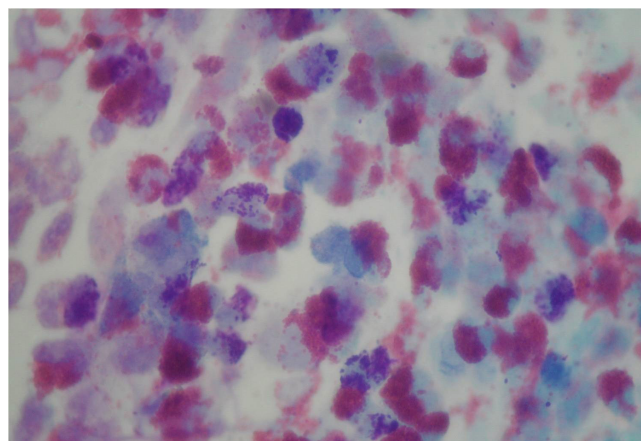


Fig.16. Esempio di NARMA con presenza della sola componente mastocitaria.

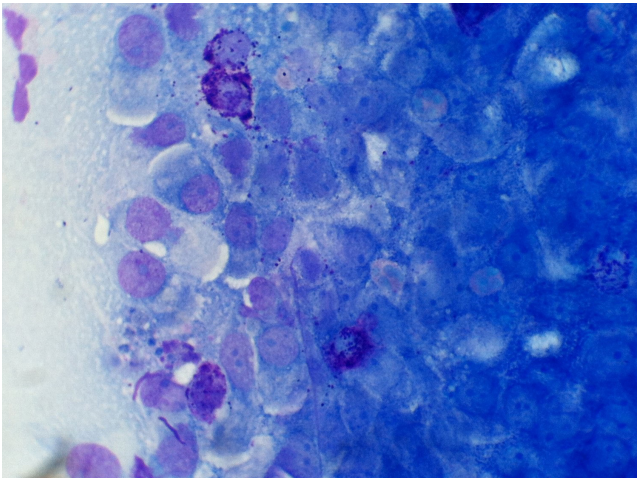
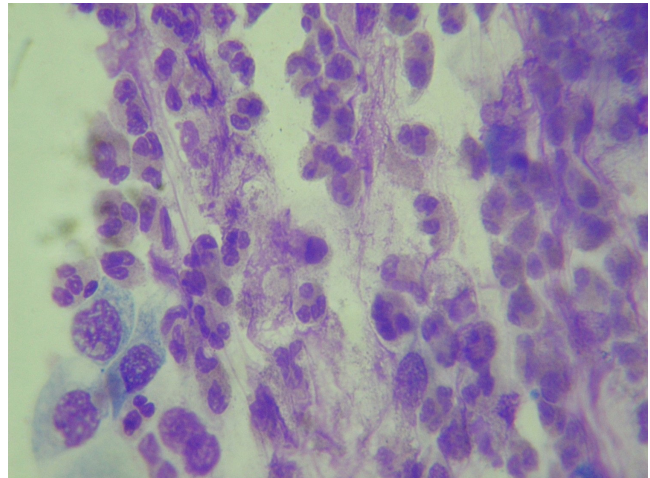


Fig. 17. La presenza di numerosi neutrofilii con assenza di batteri rappresenta il quadro tipico della rinite cellulare di tipo neutrofilo (NARNE).



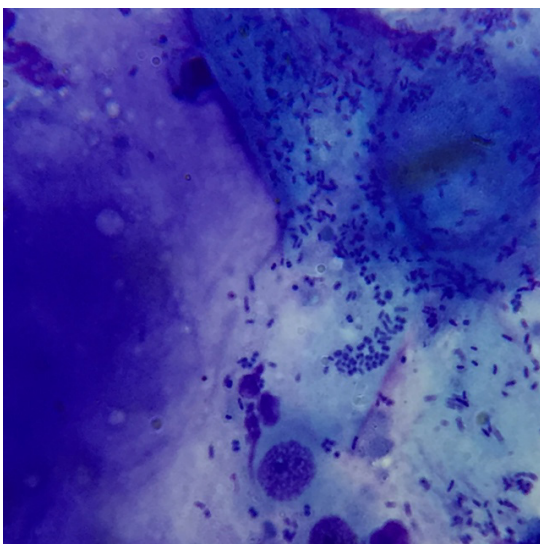
specifiche circolanti per allergeni inalanti. La più nota ed anche la prima descritta è la NARES (*Non Allergic Rhinitis Eosinophilic Syndrome*) (6). In questa forma cellulare, la presenza di granulociti eosinofili è non solo predominante, ma massivamente presente con espressione persino superiore rispetto alla rinite stagionale (figura 14).

Nella NARESMA (*Non Allergic Rhinitis Eosinophilic Mastcell Syndrome*) alla importante presenza eosinofila si aggiunge la componente mastocitaria (figura 15) (7).

Nella NARMA (*Non Allergic Rhinitis Mastcell*) è predominante la componente mastocitaria (figura 16), mentre nella NARNE lo è quella neutrofila (figura 17). Queste forme rappresentano un disturbo cronico progressivo, con sintomatologia intensa, e possono provocare complicanze locali, come otiti e rinosinusiti, o respiratorie, come asma e sindrome rino-bronchiale, e nel tempo evolvere verso la poliposi (24, 25). Poco si conosce della patogenesi di queste forme, che come detto non riconoscono una componente allergica sistemica. Da qualche anno alcuni studi si sono focalizzati sulla presenza di IgE specifiche locali, raggruppando così queste forme nell'entità nosologica delle LAR (*Local Allergic Rhinitis*) (26). Tuttavia, allo stato rimangono ancora molti punti da chiarire su questo aspetto. Al di là della classificazione patogenetica, la citologia nasale rappresenta un *marker* di presenza cellulare: evidenziare la presenza o meno di componenti cellulari specifiche consente una terapia adeguata cellulo-mirata.

RINITI INFETTIVE ED INFIAMMATORIE

Fig. 18. Batteri bastoncelliformi e cocchi liberi ed in biofilm.



Le riniti infettive possono essere di natura batterica, virale o meno frequentemente micotica. Da un punto di vista microscopico, nelle forme batteriche avremo la presenza di batteri in campo libero o racchiusi in biofilm (17, 27, 28) (figura 18) e di numerosi neutrofilii, talvolta in attività macrofagica (figura 19), con in genere una diminuzione delle cellule ciliate.

Le riniti virali sono caratterizzate, da un punto di vista microscopico, dalla presenza di linfociti e da un danno delle cellule ciliate (ciliocitoftoria), con addensamento della cromatina nucleare e comparsa di corpi inclusi e talvolta polinucleazioni (29) (Figura 20).

Le riniti micotiche da *alternaria*, *aspergillus*

Fig. 19. Granulocita neutrofilo in fase di fagocitosi di alcuni batteri.

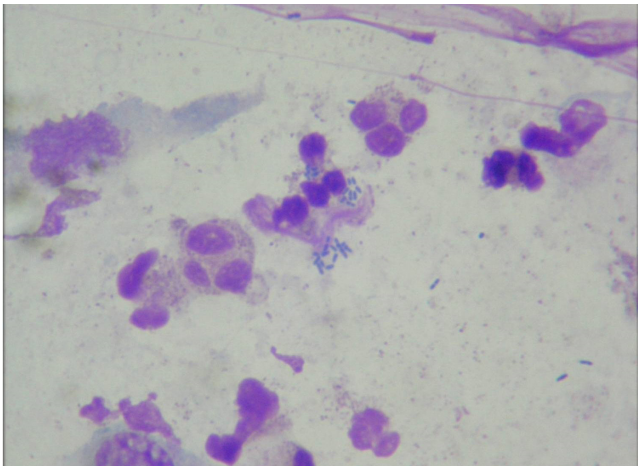


Fig. 20. Cellule ciliate con numerosi nuclei (stimolazione virale).

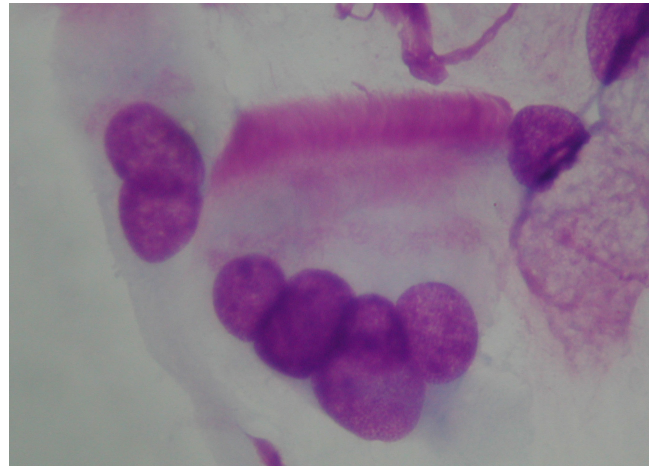


Fig. 21. Classico aspetto “tarlato” del citoplasma di alcune cellule ciliate (danno da spore).

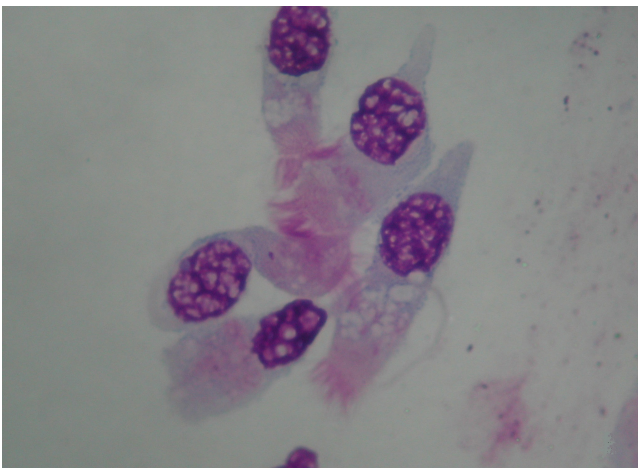
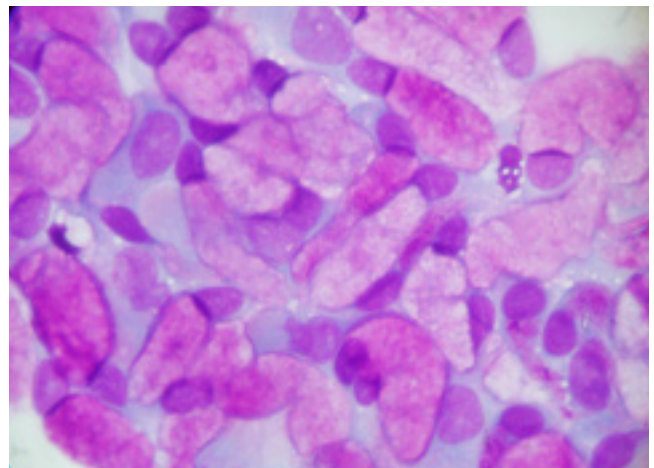


Fig. 22. Metaplasia mucipara osservabile frequentemente in corso di “stress” ambientale (inquinamento, fumo).



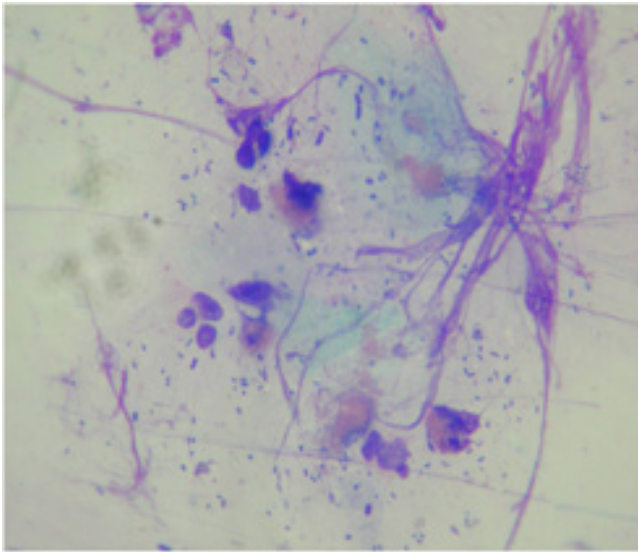
o candida non sono frequenti e possono rappresentare la spia di un deficit immunitario. Le spore possono essere visibili anche ad ingrandimenti medi ed il loro effetto patogeno sulle cellule si evidenzia soprattutto a livello dei nuclei, che presentano un aspetto “tarlato” (Figura 21). Le riniti infiammatorie sono dovute ad irritanti ambientali, prevalentemente inquinanti atmosferici e fumo di tabacco. Il quadro microscopico è caratterizzato principalmente da una metaplasia mucipara (Figura 22).

RINITI SOVRAPPOSTE

Le riniti sovrapposte rappresentano un aspetto importante dal punto di vista sia citologico sia clinico. Con tale termine si intende la sovrapposizione di due entità, per esempio una rinite allergica ed una NARES o una NARESMA oppure una rinite infettiva con sovrapposizione allergica (Figura 23).

L'anamnesi risulta di fondamentale importanza per il corretto inquadramento di queste forme. Una sintomatologia ostruttiva persistente, al di fuori del periodo pollinico per cui il paziente risulta essere positivo, deve far pensare ad una sovrapposizione. È importante ricordare che il prelievo citologico dovrà essere eseguito al di fuori del periodo pollinico. Il mese di novembre risulta essere il migliore, da questo punto di vista, per la scarsità di allergeni pollinici presenti. La presenza di eosinofilia al di fuori del periodo pollinico confermerà la so-

Fig. 23. Quadro di sovrapposizione cellulare con presenza di batteri prevalentemente bastoncelliformi, granulociti neutrofili ed alcuni eosinofili.



vrapposizione con una rinite cellulare (9, 30, 31). Allo stesso modo, in caso di allergia agli acari, giova ricordare che in tali pazienti vi è più frequentemente una flogosi minima persistente, caratterizzata da alcuni neutrofili e pochi eosinofili. Anche in questo caso un incremento di cellule eosinofilo-mastocitarie deve far pensare ad una sovrapposizione con una rinite cellulare.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Gollash H. Fortschritte der Medizin 1889; 7: 361-365.
- (2) Eyer mann C H. Nasal manifestations of allergy. Ann Otol 1927; 36: 808-815.
- (3) Hansel FK. Observation on the cytology of the secretions in allergy of the nose and paranasal sinuses. J Allergy 1934; 5: 357-366.
- (4) Bryan MP, Bryan WTK. Cytologic diagnosis in allergic disorders. Otolaryngol Clin North Am 1974; 7:637-666.
- (5) Malmberg H, Holopainen E. Nasal smear as a screening test for immediate-type nasal allergy. Allergy 1979; 34: 331-337.
- (6) Jacobs RL, Freedman PM, Boswell RN. Non-allergic rhinitis with eosinophilia (NARES syndrome): clinical and immunologic presentation. J Allergy Clin Immunol 1981; 67: 253-257.
- (7) Gelardi M, Maselli Del Giudice A, Fiorella M.L et al. Non-allergic rhinitis with eosinophils and mast cells (NARESMA) constitutes a new severe nasal disorder. Int Journal Immunopathol Pharmacol 2008; 23: 325-331.
- (8) Connell JT. Nasal Mastocytosis. J Allergy 1969; 43: 182-189.
- (9) Gelardi M, Marseglia GL, Landi M, et al. Nasal cytology in children: recent avances. Italian Journal of Pediatr 2012; 38: 51.
- (10) Gluck U, Gebbers JO. Cytopathology of the nasal mucosa in smokers: a possible biomarker of air pollution? Am J Rhinol 1996; 10: 55-57.
- (11) Boysen M, Zadig E, Digerne V, et al. Nasal mucosa in workers exposed to formaldehyde: a pilot study. Br J Indust Med 1990; 47: 116-121.
- (12) Gelardi M, Tomaiuolo M, Cassano M, et al. Virology Journal 2006, 3: 6-10.
- (13) Bickmore JT. Nasal cytology in allergy and infection. Otorhinolaryngol Allergy 1978; 40: 39-46.
- (14) Gelardi M, Cassano P, Cassano M, et al. Nasal cytology: description of hyperchromatic supranuclear stria as a possible marker for the anatomical and functional integrity of the ciliated cell. Am J Rhinol 2003; 5: 263-268.
- (15) Ciprandi G, Buscaglia S, Pesce GP, et al. Minimal persistent inflammation is present at mucosal level in asymptomatic rhinitis patients with allergy due to mites. J Allergy Clin Immunol 1995; 96: 971-979.

- (16) Ricca V, Landi M, Ferrero P, et al. Minimal persistent inflammation is also present in patients with seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 54-57.
- (17) Gelardi M, Passalacqua G, Fiorella ML, et al. Nasal cytology: the “infectious spot”, an expression of a morphological-chromatic biofilm. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30: 1105-1109.
- (18) Gelardi M. Atlas of nasal cytology. Centro Scientifico Editore – 2006.
- (19) Meltzer EO, Jalowayski AA. Nasal cytology in clinical practice. *Am J Rhinol* 1988; 2: 47-54.
- (20) Pelikan Z, Pelikan-Filipek M. Cytologic changes in the nasal secretions during the immediate nasal response. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82: 1103-1112.
- (21) Pelikan Z, Pelikan-Filipek M. Cytologic changes in the nasal secretions during the late nasal response. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 1068-1079.
- (22) Gelardi M, Peroni DG, Incorvaia C, et al. Seasonal changes in nasal cytology in mite-allergic patients. *J Inflamm Res* 2014; 7: 39-44.
- (23) Gelardi M, Maselli Del Giudice A, Candreva T, et al. Nasal resistance and allergic inflammation depend on allergen type. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 141: 384-389.
- (24) Gelardi M, Russo C, Fiorella ML, et al. Inflammatory cell types in nasal polyps. *Cytopathology* 2009; 21: 201-203.
- (25) Gelardi M, Iannuzzi L, Tafuri S, et al. Allergic and non-allergic rhinitis: relationship with nasal polyposis, asthma and family history. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2014; 34: 36-41.
- (26) Rondón C, Campo P, Blanca-López N, et al. More research is needed for local allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2015; 167: 99-100.
- (27) Gelardi M, Fiorella ML, Leo G, et al. Cytology in the diagnosis of rhinosinusitis. *Ped Allergy Immunol* 2007; 18: 50-52.
- (28) Ferguson BJ, Stolz DB. Demonstration of biofilm in human bacterial chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol* 2005; 19: 452-457.
- (29) Gelardi M, Tomaiuolo M, Cassano M, et al. Epstein-barr virus induced cellular changes in nasal mucosa. *Virology* 2006; 3: 6.
- (30) Gelardi M, Fiorella ML, Fiorella R, et al. When allergic rhinitis is not only allergic. *Am J Rhinology* 2009; 23: 312-315.
- (31) Gelardi M. “Overlapped” rhinitis: a real trap for rhinoallergologists. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2014; 46: 234-236.