



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com

Revue française d'allergologie xxx (2014) xxx-xxx

REVUE FRANÇAISE
D'**Allergologie**

Article original

Étude comparative des phénotypes cliniques de l'allergie au poisson selon les profils de sensibilisation moléculaire à la parvalbumine, à l'énolase, à l'aldolase et à la gélatine de poisson

A study comparing the clinical phenotypes of fish-allergic patients with their specific IgE profiles to fish parvalbumin, enolase, aldolase and gelatin

A. Kuehn^{a,*}, C. Metz-Favre^{b,e}, G. Pauli^{c,e}, C. Lehnert-Weber^d, F. Codreanu-Morel^d, F. Hentges^{a,d}, P. Auriol^e, F. Bienvenu^e, C. Braun^e, C. Crepin^e, A. Foessel^e, L. Guenard^b, P. Krieger^b, J.-M. Renaudin^e, J.-F. Tuyeras^e, F. de Blay^b, M. Morisset^d, C. Hilger^{a,e}

^a Laboratoire d'immunogénétique et d'allergologie, CRP-Santé, 84, Val Fleuri, 1526 Luxembourg, Luxembourg

^b Unité de pneumologie, d'allergologie et de pathologie respiratoire de l'environnement, nouvel hôpital civil, 1, porte de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, France

^c Faculté de médecine, université de Strasbourg, 67091 Strasbourg, France

^d Service national d'immunologie et d'allergologie, centre hospitalier de Luxembourg, 4, rue Ernest-Barblé, 1210 Luxembourg, Luxembourg

^e Groupe de travail sur les « Allergènes moléculaires » de la Société française d'allergologie, 75724 Paris, France

Reçu le 19 septembre 2013 ; accepté le 19 décembre 2013

Résumé

Objectif de l'étude. – Le but de l'étude est de déterminer la valeur ajoutée de l'étude du profil de sensibilisation moléculaire chez les patients allergiques au poisson.

Patients et méthodes. – Le diagnostic d'une allergie au poisson a été retenu chez 62 patients sur la base d'une histoire clinique évocatrice, de tests cutanés et d'IgE spécifiques positives aux extraits de poisson (cabillaud, saumon, thon). La détermination des IgE spécifiques vis-à-vis de la parvalbumine, de l'énolase, de l'aldolase et de la gélatine de poisson, quantifiées par Elisa, a été réalisée chez tous les patients.

Résultats. – Quarante-cinq patients sont sensibilisés à la parvalbumine. Chez les patients sensibilisés à la parvalbumine de cabillaud (morue), 50 % sont également sensibilisés à l'énolase et à l'aldolase. Chez les patients ayant des tests cutanés positifs au saumon et au thon (75,6 % et 67,6 % respectivement), des sensibilisations isolées à la parvalbumine ont été observées. Une corrélation positive est observée entre les taux moyens des IgE spécifiques envers la parvalbumine et l'énolase de cabillaud, et la sévérité du tableau clinique, ce qui n'est pas le cas pour l'aldolase de cabillaud. Trois groupes de patients ont été analysés selon leur degré de réactivité IgE envers la parvalbumine : un premier groupe ($n = 36$) composé de patients sensibilisés aux 3 poissons avec des symptômes modérés à sévères. Les symptômes sont corrélés à la présence d'IgE au cabillaud (extrait total) et à la parvalbumine de cabillaud. Un second groupe est constitué de patients ($n = 9$) monosensibilisés et ayant une allergie de gravité mineure, principalement au saumon. Les symptômes sont corrélés à des IgE spécifiques envers l'extrait de saumon et envers la parvalbumine de saumon. Le troisième groupe est composé de patients ($n = 17$) sensibilisés à un nombre restreint de poissons et présentant des symptômes modérés à sévères. Chez ces patients dont les IgE étaient négatives envers la parvalbumine, on objective la présence d'IgE à l'aldolase, l'énolase ou à la gélatine de poisson dans 70,6 % des cas. Dans ce dernier groupe, la présence d'IgE spécifiques envers le cabillaud est rarement observée.

Conclusion. – L'utilisation d'un panel d'allergènes moléculaires de poisson variés contribue à l'amélioration du diagnostic de l'allergie au poisson. Certains profils de sensibilisation semblent associés à des tableaux cliniques particuliers.

© 2014 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Aldolase ; Allergène ; Allergie alimentaire ; Allergie au poisson ; Cabillaud ; Enolase ; Gélatine de poisson ; Morue ; Parvalbumine ; Saumon ; Thon

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : annette.kuehn@crp-sante.lu (A. Kuehn).

Abstract

Study objective. – The aim of this study was to investigate the added value of using a panel of fish allergens in component-resolved diagnosis of fish-allergic patients.

Patients and methods. – Sixty-two patients were diagnosed as being allergic to fish by clinical history and with positive skin prick-tests and specific IgE to fish extracts (cod, salmon and tuna). Allergen-specific IgE levels to fish parvalbumin, enolase, aldolase and gelatin were quantified by Elisa.

Results. – Forty-five of the patients were sensitized to parvalbumin. Among the cod parvalbumin-sensitized patients, 50% were also sensitized to both enolase and aldolase. Of the patients with positive skin tests to salmon and to tuna (75.6% and 67.6%, respectively), isolated sensitization to parvalbumin was observed. Mean levels of specific IgE to cod and enolase parvalbumin were positively correlated with the severity of the patients' clinical symptoms; this was not the case for cod aldolase. Patients were clustered into three groups according to their parvalbumin-specific IgE-reactivity. In the first group, the 36 patients who were sensitized to three different fish reported mild to severe symptoms; their symptoms were correlated with the presence of IgE to total cod extract and to cod parvalbumin. The second group of 9 mono-sensitized patients had only minor symptoms of fish allergy, most often to salmon; their symptoms were positively correlated with specific IgE levels of salmon extract and cod parvalbumin-specific IgE. The third group consisted of 17 patients who were sensitized to a small number of fish; they had moderate to severe symptoms. While this group of patients had no detectable parvalbumin-specific IgE, 70.6% of them were found to have IgE specific for fish aldolase, enolase or gelatin; in this group, the presence of IgE specific for cod was rarely observed.

Conclusion. – The use of a panel with a number of allergenic fish proteins may contribute to the improvement of the diagnosis of fish allergy. Specific sensitization profiles appear to be associated with certain profiles of clinical symptoms.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Fish allergy; Diagnosis; Clinical profile; Cod; Salmon; Tuna; Fish allergens; Parvalbumin; Aldolase; Enolase; Gelatin

1. Introduction

Le poisson est un allergène alimentaire important pouvant entraîner des réactions sévères [1]. Les prévalences de l'allergie au poisson rapportées dans la littérature sont variables : l'allergie au poisson paraît plus fréquente chez l'adulte (< 0,4 %) que chez l'enfant (< 0,3 %). La prévalence est également plus importante dans les régions côtières où la consommation de poisson est plus régulière [2–4]. L'allergie au poisson apparaît souvent au cours de l'enfance et persiste à l'âge adulte [5]. Les symptômes cliniques sont variables : réactions bénignes (syndrome oral), réactions modérées (urticaire, vomissements) ou réactions sévères (angioedème, asthme, anaphylaxie) [6–8]. Les symptômes surviennent après l'ingestion de poisson mais aussi après contact cutané ou après inhalation d'émanations ou de vapeurs de poisson générées par la manipulation, la préparation et la cuisson [9].

La majorité des patients rapportent des symptômes après l'ingestion de différentes espèces de poisson, même s'il s'agit d'espèces appartenant à des familles taxonomiquement éloignées [10]. Les études sérologiques ont montré d'importantes réactions croisées (> 80 %), alors que sur le plan clinique les réactions croisées sont moins fréquentes (50 à 70 %) [6,11–13]. L'allergénicité variable des différentes espèces de poisson a été attribuée aux différents modes de préparation et au contenu variable en allergènes spécifiques [14,15]. Le thon est souvent toléré chez les patients allergiques au poisson et est même utilisé comme matrice dans les tests de provocation orale aux aliments [16,17].

La parvalbumine a été décrite comme premier allergène dans le cabillaud au début des années 1970 et plus tard comme étant l'allergène majeur pour de nombreuses espèces de poisson [18,19]. Les parvalbumines sont des protéines hydrosolubles liant le calcium, d'un poids moléculaire de 12 kDa [20]. Ces

protéines musculaires présentent une stabilité importante. Elles ont de grandes homologies structurales entre elles, ce qui peut expliquer les réactivités cliniques croisées observées chez les patients allergiques aux poissons [10,21]. Les structures conservées de la protéine se situent essentiellement dans les régions se liant au calcium. Elles correspondent aux principaux épitopes B, sensibles à une déplétion en calcium [22]. Malgré l'importance des réactions croisées entre les différentes parvalbumines, des allergies isolées au saumon, liées à une sensibilisation à la parvalbumine, ont été décrites [23].

Quelques cas cliniques publiés font état de réactions croisées non liées aux parvalbumines [24,25]. La gélatine de poisson a été identifiée comme étant responsable d'anaphylaxie alimentaire [26,27]. Récemment, les émolases et aldolases ont été identifiées comme étant de nouveaux allergènes du cabillaud, du saumon et du thon [28]. Ces protéines sont des enzymes métaboliques sensibles au traitement thermique, présentes en grande quantité dans les tissus musculaires du poisson. Dans cette étude sérologique, 63 % des patients allergiques aux poissons étaient sensibilisés à l'émolase et 50 % à l'aldolase, démontrant ainsi que ces deux enzymes sont des allergènes importants du poisson à côté de la parvalbumine et de la gélatine de poisson.

Le diagnostic de l'allergie au poisson repose sur l'histoire clinique, les résultats des tests cutanés vis-à-vis d'extraits de poisson, la détermination des IgE spécifiques et, dans certains cas, des tests de provocation orale. Les taux d'IgE spécifiques sont corrélés aux résultats des tests de provocation orale dans certaines études [29]. Plusieurs extraits de poisson sont disponibles pour le dosage des IgE spécifiques et, depuis quelques années, des protéines recombinantes (parvalbumines de carpe et de cabillaud) sont également disponibles pour le diagnostic in vitro. Cependant, la valeur ajoutée du dosage des IgE spécifiques d'allergènes moléculaires individuels n'a pas été évaluée dans une large cohorte de patients allergiques au

poisson. De plus, on peut se demander si le seul traitement habituellement préconisé chez ces patients, c'est-à-dire l'éviction de toutes les espèces de poissons, est véritablement pertinent.

Le but du travail présenté ici est de pouvoir apporter des réponses à ces questions en utilisant les dosages d'IgE spécifiques vis-à-vis de 4 allergènes moléculaires de poisson (parvalbumine, émolase, aldolase, gélatine de poisson), de situer la valeur diagnostique du profil de sensibilisation sérique moléculaire et de le comparer aux résultats des tests cutanés et des IgE spécifiques utilisant des extraits globaux de poisson.

2. Patients et méthode

2.1. Patients allergiques au poisson

Vingt-huit patients ont été recrutés en France par l'intermédiaire du groupe de travail sur les « Allergènes Moléculaires » de la Société française d'allergologie, et 34 patients ont été recrutés par le Centre national d'immunologie et d'allergologie au Luxembourg. L'ensemble de la population comprenait 37 hommes et 25 femmes. Il s'agissait de 26 enfants (de 3 à 12 ans, moyenne : 7,6) et de 36 adultes (moyenne d'âge : 28,7). Tous ces patients avaient une allergie confirmée au poisson, basée sur une histoire clinique évocatrice, des tests cutanés positifs et/ou un taux d'IgE supérieur à 0,35 kU_A/L vis-à-vis des extraits de cabillaud, de saumon ou de thon.

La majorité des patients rapporte plusieurs épisodes allergiques à l'ingestion (58/62, 94 %), lors de l'inhalation (10/62, 16 %) ou au contact du poisson (7/62, 11 %). Des prick-tests vis-à-vis des allergènes perannuels (acariens, allergènes animaux) ont été réalisés. Les réactions cliniques immédiates

ont été cotées selon l'échelle de sévérité de l'anaphylaxie proposée par Muller [30] (Tableau 1). Le grade 1 correspond à un syndrome oral (I_A) ou de l'urticaire (I_B), le grade 2 à un angioedème, le grade 3 à de l'asthme (III_A) ou un œdème laryngé (III_B), et le grade 4 à la survenue des signes cardiovasculaires (hypotension, collapsus, choc). Des poussées d'eczéma sont les seules réactions retardées rapportées après ingestion (E) dans cette série. Parmi les symptômes non reliés à l'ingestion du poisson, on relève une urticaire (C_U) et un eczéma de contact (C_D) ainsi que de l'asthme (A_i).

2.2. Tests cutanés et détermination des IgE spécifiques

Des prick-tests ont été réalisés avec des extraits commerciaux (ALK-Abelló, Varennes-en-Argonne, France ; Stallergènes, Antony, France) et du poisson cru (cabillaud, saumon et thon). L'intensité des réponses aux tests cutanés a été évaluée par la mesure du diamètre de la papule : 3–5 mm, 6–10 mm et 11–15 mm. Le témoin positif est une solution d'histamine à 10 mg/mL. Les IgE spécifiques du cabillaud, saumon et thon ont été dosées par la technique ImmunoCAP (Thermoscientific, Phadia, Uppsala, Suède). Des taux inférieurs à 0,35 kU_A/L sont considérés comme négatifs. L'étude a eu l'accord du Comité national d'éthique du Luxembourg et un consentement éclairé a été établi avec tous les patients.

2.3. Dosage des IgE vis-à-vis de la parvalbumine, de l'émolase, de l'aldolase et de la gélatine de poisson par la technique Elisa

Les parvalbumines de cabillaud, saumon et thon ont été purifiées selon la technique décrite précédemment [15].

Tableau 1
Graduation des réactions cliniques au poisson.

Grade		Peau	Système gastro-intestinal	Voies respiratoires	Système cardiovasculaire
<i>Réaction immédiate induite par l'ingestion</i>					
I	I _A	<i>Syndrome oral</i>	–	–	–
	I _B	<i>Urticaire, prurit</i>			
II		<i>Angioedème</i>	Vomissements, diarrhées, crampes abdominales	–	–
III	III _{A1}	± Un ou plusieurs des symptômes précédents	± Un ou plusieurs des symptômes précédents	<i>Asthme : patients ayant d'autres allergies respiratoires</i>	Étourdissement, anxiété
	III _{A2}	± Un ou plusieurs des symptômes précédents	± Un ou plusieurs des symptômes précédents	<i>Asthme : patients sans autres allergies respiratoires</i>	± Un ou plusieurs des symptômes précédents
	III _B	± Un ou plusieurs des symptômes précédents	± Un ou plusieurs des symptômes précédents	<i>Œdème laryngé</i>	± Un ou plusieurs des symptômes précédents
IV		± Un ou plusieurs des symptômes précédents	± Un ou plusieurs des symptômes précédents	± Un ou plusieurs des symptômes précédents	<i>Hypotension, choc</i>
<i>Réaction non immédiate induite par l'ingestion</i>					
E		<i>Dermatite atopique, eczéma</i>	–	–	–
<i>Réaction induite par inhalation ou contact et non par ingestion de poisson</i>					
C _D , C _U		<i>Eczéma, urticaire</i>	–	–	–
Ai		–	–	Asthme	–

Les réactions immédiates sont classées selon le degré de sévérité (classification de Mueller modifiée) [30]. Les symptômes écrits en italique sont des indications indispensables pour définir le grade ou type d'allergie.

La gélatine de poisson a été préparée à partir d'un extrait commercial (Rousselot, Courbevoie, France) [27]. Le dosage des IgE spécifiques a été effectué par la technique Elisa comme décrit précédemment [28]. Brièvement, les parvalbumines purifiées, les énoleses et aldolases, et la gélatine de poisson ont été fixées sur le support à une concentration de 5 µg/mL. Les sérums des patients ont été dilués dans un tampon contenant 3 % d'albumine sérique bovine (BSA). Les IgE spécifiques ont été dosées en utilisant une courbe standard établie avec un sérum de patient allergique au chat dont le contenu en IgE spécifiques vis-à-vis de la sérum albumine de chat était connu. La limite de positivité a été fixée à 0,35 kU_A/L. Les sérums de 25 sujets non atopiques ont servi de contrôle négatif.

2.4. Analyse statistique

Le Graphpad Prism (version 5.01) a été utilisé pour l'analyse statistique. Les résultats des données ont été comparés en utilisant le test Anova et le test de Fisher. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative sur le plan statistique.

3. Résultats

3.1. Données cliniques

Après ingestion de poisson, 20 patients ont rapporté un syndrome oral, 22 une urticaire, 27 un angioedème, 6 de l'asthme, un a présenté une réaction hypotensive associée à l'asthme et 12 patients une poussée d'eczéma. Cinq signalaient des réactions au contact du poisson (sans ingestion) dont une urticaire et des poussées d'eczéma chez 2 sujets, respectivement. Dix patients ont présenté de l'asthme après inhalation de vapeurs lorsqu'ils cuisinaient du poisson et dans 8 cas il s'agissait d'un asthme professionnel. Quarante-quatre patients (71 %) ont présenté les symptômes d'allergie après consommation de plusieurs variétés de poissons, mais 18 (29 %) ont affirmé qu'ils toléraient certaines espèces de poissons et certains patients (7 ; 11 %) ne réagissaient qu'avec une seule espèce.

3.2. Résultat des tests diagnostiques usuels

Tous les patients ont réagi à au moins un des poissons en tests cutanés. Le dosage des IgE vis-à-vis du cabillaud est positif chez 49 patients (79 % ; 0,4–188,0 kU_A/L, médiane 2,5 kU_A/L), vis-à-vis du saumon chez 49 patients (79 % ; 0,4–147,0 kU_A/L, médiane 2,0 kU_A/L), vis-à-vis du thon chez 45 patients (73 % ; 0,4–77,0 kU_A/L, médiane 0,9 kU_A/L).

3.3. Résultat des dosages d'IgE spécifiques vis-à-vis des allergènes de poisson

Au total, 72,6 % des patients sont sensibilisés à la parvalbumine (0,4–145,0 kU_A/L, médiane 5,3 kU_A/L), 58,1 % sont sensibilisés aux parvalbumines des trois poissons et 14,5 % à la parvalbumine de saumon exclusivement. Trente-cinq patients sur 62 ont des IgE spécifiques vis-à-vis des énoleses de cabillaud

(0,5–95,0 kU_A/L, médiane 5,0 kU_A/L), 15 patients sur 62 sont positifs pour l'énolese de saumon (0,4–19,0 kU_A/L, médiane 1,5 kU_A/L), et 12 patients sur 62 pour l'énolese de thon (0,6–20,0 kU_A/L, médiane 2,0 kU_A/L). Vingt-trois patients sur 62 ont des IgE vis-à-vis de l'aldolase de cabillaud (1,0–22,0 kU_A/L, médiane 3,0 kU_A/L), 10 patients sur 62 vis-à-vis de l'aldolase de saumon (0,4–13,0 kU_A/L, médiane 4,5 kU_A/L) et 8 patients sur 62 vis-à-vis de l'aldolase de thon (0,5–8,0 kU_A/L, médiane 2,8 kU_A/L). Douze patients ont des IgE spécifiques vis-à-vis de la gélatine de poisson (0,54–20,0 kU_A/L, médiane 3,0 kU_A/L).

L'IgE-réactivité des patients vis-à-vis de la parvalbumine, de l'énolese et de l'aldolase a été comparée entre les différents poissons (cabillaud, saumon et thon) (Fig. 1). Les recouvrements les plus marqués sont observés pour les allergènes de cabillaud : 50 % des patients ont des IgE pour les trois allergènes du cabillaud, alors que 30,6 % des patients ont des IgE pour la parvalbumine et l'énolese (Fig. 1A) ; 16,7 % ont exclusivement des IgE pour la parvalbumine sans réactivité vis-à-vis de l'énolese et de l'aldolase. Les recouvrements sont moins fréquents (Fig. 1B) pour le saumon ; 13,3 % des patients ont des IgE vis-à-vis de la parvalbumine et l'énolese, et seulement 11 % des patients ont des IgE vis-à-vis des trois allergènes du saumon. Il est important de souligner que 75,6 % ont des IgE exclusivement pour la parvalbumine de saumon. Les recouvrements pour les allergènes du thon sont similaires à ceux des allergènes de saumon : alors que 10,8 % des patients sont sensibilisés vis-à-vis de la parvalbumine et de l'énolese de thon, 67,6 % sont uniquement sensibilisés à la parvalbumine de thon (Fig. 1C).

Cette analyse basée sur les allergènes a montré que la prévalence des anticorps IgE spécifiques dirigés contre l'énolese est très importante chez les patients sensibilisés au cabillaud suggérant une importance équivalente des 2 allergènes chez ces patients.

3.4. Corrélation entre les taux d'IgE et la gravité des signes cliniques

Les IgE spécifiques vis-à-vis de la parvalbumine, de l'énolese et de l'aldolase de cabillaud ont été corrélées avec la gravité des signes cliniques. La valeur moyenne du taux d'IgE spécifiques vis-à-vis de la parvalbumine est corrélée positivement au degré de sévérité des symptômes induits par l'ingestion de poisson (Fig. 2A). Les taux les plus élevés sont observés chez les patients présentant de l'asthme après inhalation de vapeur de poisson. Des IgE spécifiques de l'énolese et de l'aldolase de cabillaud ont été mises en évidence chez les patients ayant des symptômes sévères. Le taux des IgE spécifiques de l'énolese est corrélé positivement avec la sévérité des symptômes survenant après l'ingestion de poisson (Fig. 2B). Cette corrélation n'est pas observée pour l'aldolase (Fig. 2C).

3.5. Profils de sensibilisation IgE des patients allergiques au poisson

Les patients allergiques au poisson ont été répartis en trois groupes selon leur profil de réactivité IgE (Fig. 1, Tableau 2).

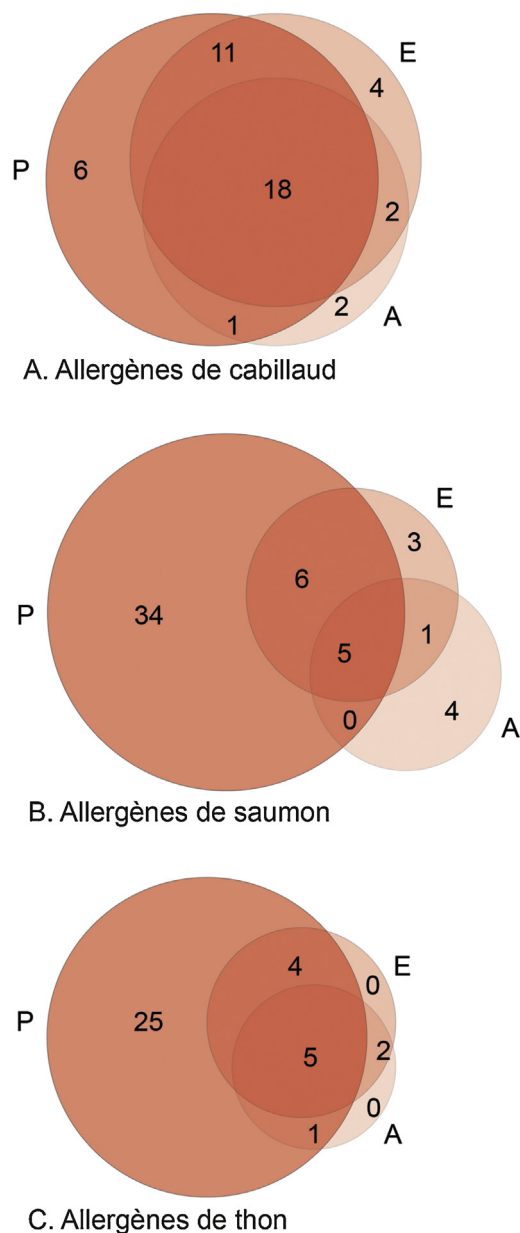


Fig. 1. Les réactivités IgE vis-à-vis de la parvalbumine, de l'énolase et de l'aldolase sont corrélées pour le cabillaud (A), le saumon (B) et le thon (C). Les recouvrements les plus importants pour les 3 allergènes sont observés pour les protéines de morue (18 patients ; 50,0 %). Une réactivité IgE isolée est surtout observée pour le saumon (34 patients ; 75,6 %) et le thon (25 patients ; 67,6 %). P, parvalbumine ; E, énolase ; A, aldolase.

Ces groupes diffèrent par leur réaction à la parvalbumine, ce qui a déjà été montré dans une publication antérieure [28]. En bref, le premier groupe rassemble les patients ayant des IgE positives pour les trois parvalbumines (cabillaud, saumon, thon). Les patients du groupe 2 ont des IgE vis-à-vis d'une seule parvalbumine et de manière prédominante vis-à-vis de la parvalbumine de saumon. Les patients du groupe 3 ont des IgE vis-à-vis d'allergènes autres que la parvalbumine. Dans cette étude-ci, nous avons analysé la symptomatologie clinique dans chaque groupe et nous avons étudié l'efficacité du diagnostic moléculaire selon les groupes établis.

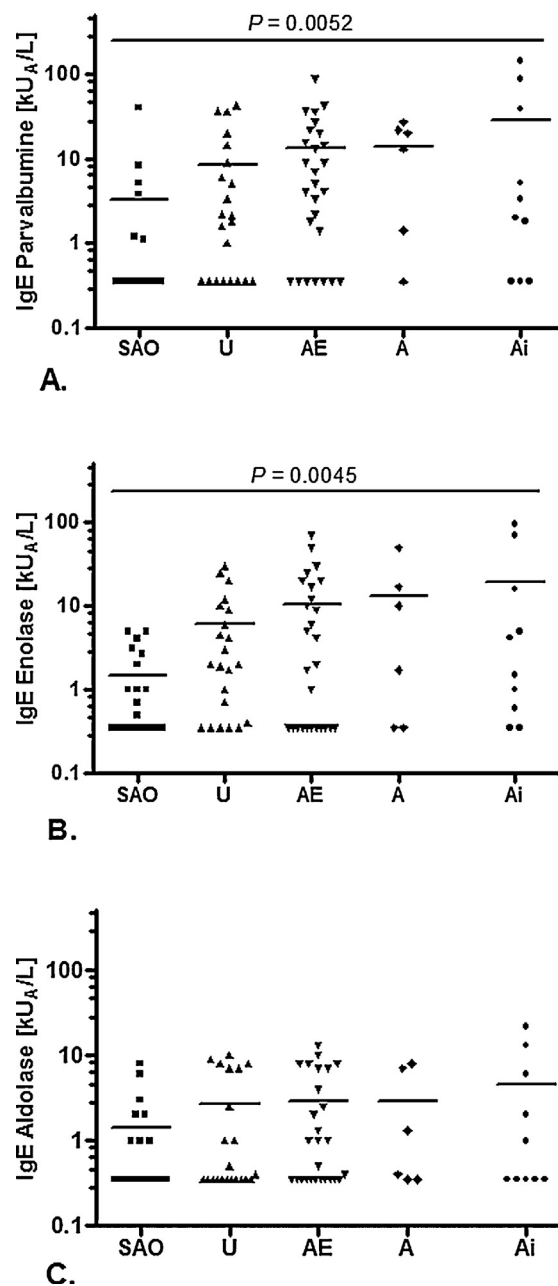


Fig. 2. Corrélation entre les IgE spécifiques vis-à-vis de la parvalbumine (A) et de l'énolase de cabillaud (B) et la sévérité des symptômes chez 62 patients allergiques au poisson ($p = 0,0052$ and $p = 0,0045$, respectivement). Le taux moyen d'IgE spécifiques augmente avec la sévérité de la réaction immédiate induite par l'ingestion de poissons (SAO, syndrome oral ; U, urticaire ; AE, angioedème, A, asthme). Il n'y a pas de corrélation significative entre les taux d'IgE spécifiques anti-aldolase (C) et les symptômes cliniques ($p = 0,0691$). Les taux d'IgE spécifiques les plus élevés sont observés pour les symptômes d'asthme non-induits par l'ingestion de poisson (Ai). p , Anova (test de corrélation linéaire).

Groupe I : ce groupe comprend 36 patients (58,1 %) se répartissant comme suit : 29 patients (80,6 %) ayant aussi des IgE vis-à-vis des énolases, 21 (58,3 %) vis-à-vis des aldolases et 8 (22,2 %) vis-à-vis de la gélatine de poisson. Dans ce groupe, tous les patients ont des tests cutanés positifs aux trois poissons (cabillaud, saumon, thon) et tous ont rapporté des réactions cliniques vis-à-vis de plusieurs espèces de poisson avec des

Tableau 2

Résultats des dosages d'IgE vis-à-vis des extraits de poisson et des allergènes moléculaires de poisson chez 62 patients.

Groupe	Patients	ImmunoCAP extrait			IgE-Elisa									
		Poisson			Parvalbumine			Enolase			Aldolase			Gélatine
		C	S	T	C	S	T	C	S	T	C	S	T	
I	36													
		36	36	34	36	36	36	29	11	10	19	5	6	8
		Moyenne 23,9	21,7	11,3	18,9	21,4	10,7	15,5	5,5	4	7	7,4	3,4	5,7
II	9													
		Gamme 1,3–188	0,5–147	0,5–77	1–145	0,5–114	0,4–131	1–95	0,7–19	0,6–20	1–26	4–13	0,5–8	0,6–20
III	17													
		4	6	4	0	9	1	2	0	0	3	0	0	2
		Moyenne 1,3	1,6	0,6	Neg	0,7	0,8	1,3	Neg	Neg	1,3	Neg	Neg	1,7
III	17													
		Gamme 0,9–2	0,4–2,5	0,4–0,9	–	0,4–1	–	0,5–2	–	–	1–2	–	–	0,4–3
III	17													
		9	4	6	0	0	0	4	2	2	1	5	2	2
		Moyenne 0,9	0,9	1,1	Neg	Neg	Neg	1,8	1	4	2	2,2	1,7	1,4
III	17													
		Gamme 0,4–3	0,4–2	0,4–3	–	–	–	0,6–5	0,4–1,7	2–6	2	0,4–8	0,5–3	1,1–1,8

Groupe I, patients ayant des IgE spécifiques vis-à-vis des 3 parvalbumines et de la plupart des autres allergènes de poissons. Groupe II, patients ayant des IgE vis-à-vis d'une seule parvalbumine, essentiellement vis-à-vis de la parvalbumine de saumon. Groupe III, patients négatifs pour les parvalbumines mais ayant des IgE vis-à-vis d'autres allergènes. Le nombre de patients ayant des IgE positives ($> 0,35 \text{ kUA/L}$) est indiqué. Valeurs IgE en kUA/L . C, cabillaud ; Neg, négatif ; S, saumon ; T, thon.

réactions anaphylactiques de grade 1 à 3 (Fig. 3A). Des poussées de dermatite atopique ont été observées chez 11 patients (dont 3 enfants avec seulement de la dermatite atopique) et une allergie de contact dans 5 cas. Des réactions à l'inhalation d'émanations de poisson furent observées dans 7 cas dont 4 fois chez des patients ayant également des réactions à l'ingestion de poisson.

Groupe II : ce groupe est constitué de neuf patients (14,5 %). Seule une minorité est positive à d'autres allergènes que la parvalbumine (Tableau 2). Tous les patients avaient au moins un prick-tests positif pour un extrait de poisson (Tableau 3). D'un point de vue clinique, 5 patients ont signalé réagir exclusivement à une espèce de poisson tandis que 4 patients réagiraient à l'ingestion de plusieurs espèces, la plupart ayant présenté une anaphylaxie modérée (grade 1 et 2) (Fig. 3B). Un seul patient a rapporté une urticaire de contact et des manifestations respiratoires non induites par l'ingestion.

Groupe III : 17 patients (27,4 %) constituent ce groupe. Huit patients (47,1 %) ont des IgE spécifiques vis-à-vis de l'énolase, 7 vis-à-vis de l'aldolase (41,2 %). La gélatine de poisson est positive chez deux patients (11,8 %). Tous les patients ont un test cutané positif au poisson, toutefois certains (11 sujets) ont un prick-test négatif pour au moins une des trois espèces testées (Tableau 3). Treize patients (76 %) tolèrent l'ingestion de certaines espèces. Les enfants ont présenté des symptômes mineurs et les patients adultes des réactions anaphylactiques de grade 1 à 4 (Fig. 3C). Un patient a rapporté de l'urticaire de contact et deux patients ont observé des réactions respiratoires après inhalation de poisson.

3.6. Efficacité du diagnostic par tests cutanés et dosage d'IgE spécifiques dans les trois groupes de patients

Dans le groupe I, le diagnostic d'allergie au poisson est obtenu dans tous les cas avec les extraits de cabillaud (ImmunoCAP Phadia, tests cutanés) et avec la parvalbumine de cabillaud (Fig. 4).

Dans le groupe II, le diagnostic est obtenu seulement dans 44 % des cas en utilisant l'extrait de cabillaud (ImmunoCAP Phadia). On observe un échec du diagnostic avec l'utilisation de la parvalbumine de cabillaud en Elisa. Chez les patients ayant une réactivité sélective au saumon, la présence d'IgE spécifiques vis-à-vis de la parvalbumine de saumon a confirmé le diagnostic clinique, alors que le prick-test à l'extrait de saumon était positif pour 7 patients sur 9.

Dans le groupe III, le rendement du diagnostic est faible en utilisant l'extrait de cabillaud et la parvalbumine de cabillaud (53 %). L'utilisation de l'énolase, de l'aldolase et de la gélatine de poisson a permis de confirmer la sensibilisation dans 12 cas sur 17 (71 %). Chez 5 patients, aucune sensibilisation n'a été objectivée avec l'ensemble des extraits de poisson testés. L'analyse du sérum de ces patients en immunoblot a montré toutefois une fixation des IgE sur des bandes additionnelles, suggérant la présence d'autres allergènes de poisson non identifiés à ce jour (résultat non présenté).

En combinant les résultats basés sur la quantification des IgE spécifiques avec l'extrait de cabillaud (ImmunoCAP) avec ceux des nouveaux allergènes (Elisa), le diagnostic clinique a été confirmé pour 94 % des patients analysés dans cette étude.

3.7. Efficacité du diagnostic IgE dans des patients ayant des profils de sensibilisation clinique différents

Nous avons analysé la corrélation entre la présence d'IgE spécifiques et la sensibilisation clinique dans des patients polysensibilisés à plusieurs poissons ($n = 44$; 71 %), des patients monosensibilisés à un seul poisson ($n = 5$; 8 %) et des patients sensibilisés à certains poissons bien spécifiques ($n = 13$; 21 %). Un diagnostic était compté comme correct si la réactivité IgE mesurée in vitro correspondait à la réactivité clinique observée, par exemple, un patient polysensibilisé avait des IgE spécifiques contre les trois extraits de poisson en ImmunoCAP.

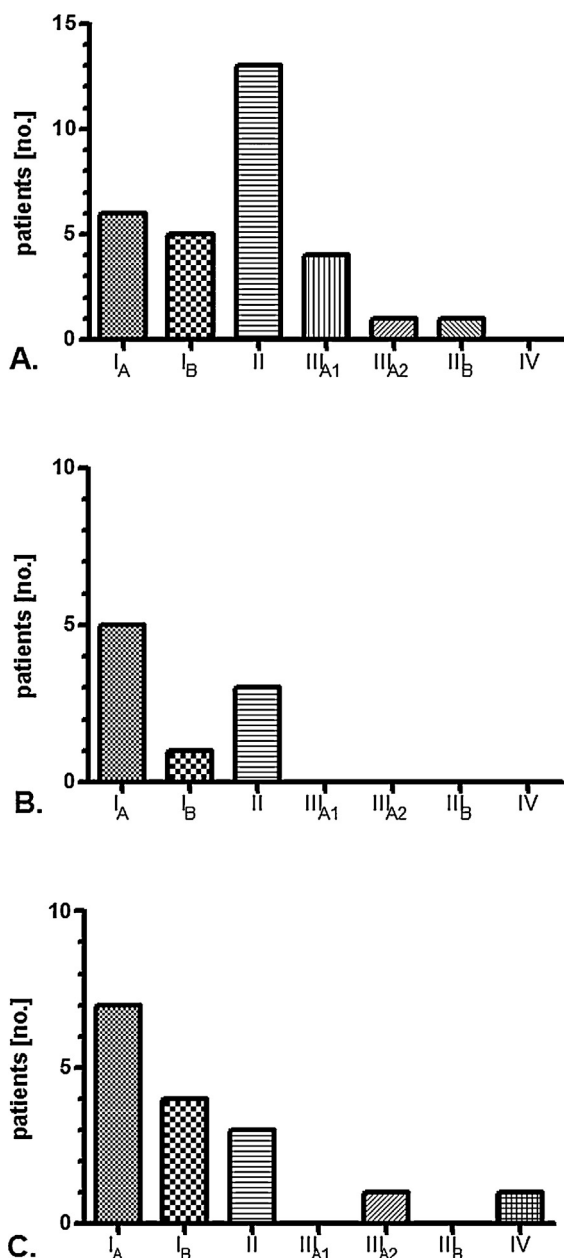


Fig. 3. Les symptômes induits par l'ingestion de poisson chez les patients des groupes I à III sont variables. Les réactions cliniques sont classées selon leur degré de sévérité. A. Groupe I (patients positifs à la parvalbumine), patients présentant des réactions de gravité variable. Groupe II (patients positifs à une seule parvalbumine), patients avec symptomatologie mineure. C. Groupe III (patients négatifs pour la parvalbumine), patients présentant des réactions faibles, mais aussi des réactions sévères.

Dans le groupe des patients polysensibilisés, 39 sujets (89 %) étaient correctement évalués en utilisant pour le diagnostic les extraits poisson ImmunoCAP, 36 (82 %) en utilisant l'Elisa spécifique parvalbumine.

Dans le groupe des patients monosensibilisés, seulement 2 sujets (89 %) étaient diagnostiqués correctement par extrait, mais tous (100 %) l'étaient par Elisa spécifique parvalbumine.

Dans le groupe des patients oligosensibilisés, le diagnostic par extraits n'était pas satisfaisant. Seulement 2 personnes

(15 %) étaient correctement évaluées, 5 patients présentaient un résultat négatif. Tous ces patients n'avaient pas d'IgE spécifiques contre la parvalbumine. Quatre sur cinq avaient des IgE spécifiques aux nouveaux allergènes.

4. Discussion

Le diagnostic d'allergie au poisson repose sur une histoire clinique évocatrice, la mise en évidence d'IgE spécifiques vis-à-vis des extraits de poisson et le résultat des tests cutanés. Dans une étude antérieure, les IgE spécifiques vis-à-vis d'extraits de poisson (pour lesquels les espèces de poissons utilisées n'étaient pas signalées) étaient fortement corrélées aux symptômes cliniques [29]. Une valeur prédictive positive de 100 % a été définie pour l'extrait de poisson pour des taux d'IgE supérieurs ou égaux à 20 kU_A/L et une valeur prédictive négative de 93 % pour des taux d'IgE inférieurs ou égaux à 0,35 kU_A/L. Le test diagnostique basé sur les IgE spécifiques vis-à-vis d'extraits de poisson est sensible mais ne permet pas de faire un diagnostic moléculaire pour des allergènes différents de la parvalbumine. Ces techniques ne sont pas assez performantes pour identifier les espèces de poissons pouvant éventuellement être tolérées par les patients. La majorité des patients sont sensibilisés à la parvalbumine qui est impliquée dans les réactivités croisées existant entre les différentes espèces de poissons. Il a été évoqué que le dosage des parvalbumines pourrait se substituer au dosage d'IgE utilisant des extraits de poisson non standardisés [10,22,23,28].

Le cabillaud, le saumon et le thon sont les poissons les plus fréquemment consommés dans la plupart des pays européens [31]. Le cabillaud et le saumon peuvent entraîner des réactions allergiques sévères alors que le thon est plutôt reconnu comme une espèce hypoallergénique, ce qui semble lié à un contenu beaucoup plus faible en parvalbumine par rapport aux autres espèces de poisson [11,12,15]. Récemment, nous avons identifié de nouveaux allergènes importants dans le cabillaud, le saumon et le thon [28]. Les émolases de poisson ont été nommées par le WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee Gad m 2.0101, Sal s 2.0101 et Thu a 2.0101, et les aldolases de poisson ont été nommées Gad m 3.0101, Sal s 3.0101 et Thu a 3.0101. Les basophiles de rat provenant d'une souche leucémique transfectée avec la chaîne alpha du FcεRI d'origine humaine, libèrent des médiateurs en présence de ces allergènes de 50 et 40 kDa, lorsque ces cellules ont été auparavant passivement sensibilisées par un sérum de patient. Dans notre étude, des IgE vis-à-vis des émolases ont été détectées dans 63 % des cas (0,5–95,0 kU_A/L), de l'aldolase dans 50 % (0,4–26,0 kU_A/L) et de la gélatine de poisson dans 19 % (0,4–20,0 kU_A/L). Les émolases et les aldolases ont, bien que de manière modérée, des IgE-réactivités croisées inter-espèces. De par leurs profils de sensibilisation, nous avons pu classer les patients en trois groupes. Dans le groupe I, les patients avaient des IgE vis-à-vis des parvalbumines des trois espèces de poissons et dans la majorité des cas également vis-à-vis de l'aldolase et de l'émolase. Les patients du groupe II reconnaissaient de façon spécifique une parvalbumine d'une seule espèce de poisson et majoritairement celle du saumon.

Tableau 3

Résultats des tests cutanés effectués avec des extraits de poisson frais chez les patients du groupe II (n° 37–45) et chez les patients du groupe III (n° 46–62) et symptomatologie clinique spécifique aux poissons. Les patients n° 39 et 62 étaient positifs vis-à-vis d'autres espèces de poissons.

N°	Test cutané [mm]			Symptomatologie clinique	n°	Test cutané [mm]			Symptomatologie clinique
	C	S	T			C	S	T	
37	6–10	6–10	6–10	S	46	6–10	–	–	C, S
38	–	6–10	–	S	47	3–5	6–10	nr	C, S
39 ^a	–	–	–	Poisson	48	(+)	(+)	(+)	S ^b
40 ^a	–	6–10	6–10	Poisson	49 ^a	6–10	–	–	C ^b
41	–	6–10	3–5	S	50	nr	11–15	11–15	C ^b
42	6–10	6–10	–	Poisson	51	–	–	6–10	Poisson
43 ^a	–	6–10	–	S	52	6–10	nr	6–10	C, S
44	–	(+)	–	S	53	3–5	–	nr	C ^b
45	11–15	11–15	11–15	Poisson	54	–	–	3–5	Poisson
					55	11–15	–	3–5	C, T
					56	–	6–10	3–5	Poisson
					57 ^a	nr	3–5	6–10	S ^b
					58	–	11–15	3–5	S ^b
					59	3–5	6–10	–	C, T
					60 ^a	6–10	6–10	3–5	Poisson
					61 ^a	(+)	–	–	Poisson
					62	–	nr	–	S ^b

C, cabillaud ; nr, non réalisé ; S, saumon ; T, thon. –, négatif ; (+) test positif douteux ; poisson, espèce non spécifiée par le patient.

^a Test cutané commercial utilisé.

^b Évidence clinique incertaine car ces patients ont arrêté la consommation de poisson.

Les patients du groupe III n'avaient pas d'IgE vis-à-vis de la parvalbumine, mais des IgE vis-à-vis de l'énolase, l'aldolase ou de la gélatine de poisson.

La présence d'IgE spécifiques vis-à-vis de la parvalbumine du cabillaud était fortement associée à la présence d'IgE spécifiques vis-à-vis de l'énolase du cabillaud et à un degré moindre vis-à-vis d'IgE spécifiques de l'aldolase du cabillaud (Fig. 1A). La sensibilisation dominante aux allergènes du cabillaud pourrait s'expliquer par l'importance de la consommation du cabillaud dans la population étudiée. Le cabillaud est consommé principalement après un mode de cuisson douce (court-bouillon, vapeur...) alors que les protéines de saumon et de thon sont soumises à des modes

de préparation plus drastiques (fumage ou conserve). Nous pouvons faire l'hypothèse que les épitopes de l'énolase de cabillaud pourraient résister à des modes de cuisson douces, expliquant que les patients sont souvent cosensibilisés à la parvalbumine et à l'énolase de cabillaud. Par contre, les épitopes des énolases de saumon et de thon pourraient être modifiés par la préparation de ces poissons, ce qui entraînerait une moindre fréquence de co-sensibilisations que dans le cas des allergies vis-à-vis du cabillaud.

Nous avons mis en évidence une corrélation positive entre les taux d'IgE vis-à-vis de la parvalbumine et de l'énolase, et la sévérité des symptômes (Fig. 2). Cette corrélation n'a pas été retrouvée pour les IgE vis-à-vis des aldolases du cabillaud. On peut émettre l'hypothèse que les épitopes des IgE spécifiques anti-parvalbumine et anti-énolase sont plus résistants au traitement subi par le poisson lors de sa préparation, ce qui semble différent pour l'aldolase. Cependant, la stabilité des allergènes vis-à-vis des différents processus de préparation ainsi que le rôle des matrices alimentaires nécessitent d'être évalués dans une étude ultérieure.

Nos résultats concernant la comparaison de la sévérité des symptômes cliniques avec les différents profils de sensibilisation moléculaire montrent que les symptômes sévères s'observent tant dans le groupe I que dans le groupe III (Fig. 3). Ceci semble indiquer que la sévérité clinique n'est pas nécessairement liée à une sensibilisation à la parvalbumine. D'après notre étude, il s'avère également que les patients du groupe I réagissent à de multiples espèces de poissons alors que les patients du groupe III tolèrent certaines espèces de poissons. Ces résultats sont particulièrement intéressants dans le cadre de conseils de régime d'éviction. Cependant, la réactivité ou la tolérance vis-à-vis d'espèces particulières de poissons doit être confirmée par des tests de provocation orale.

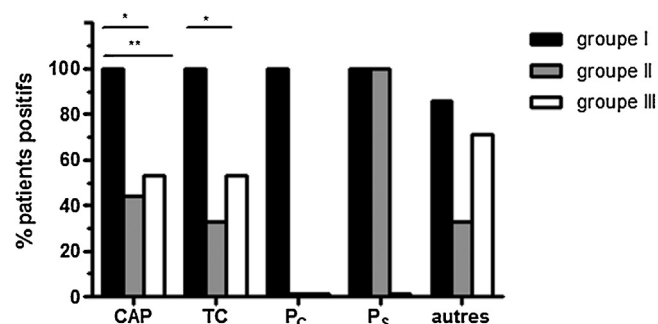


Fig. 4. Les performances du diagnostic de l'allergie au poisson sont très variables pour les 3 groupes selon les méthodes de diagnostic utilisées. Les résultats obtenus par l'ImmunoCAP et les tests cutanés (TC) utilisant des extraits de poisson (cabillaud, saumon, thon) sont comparés aux résultats obtenus par dosage Elisa vis-à-vis des parvalbumines (P ; C, cabillaud [morue] ; S, saumon) et des autres allergènes (énolase, aldolase, gélatine de poisson). Les pourcentages représentent des valeurs relatives par rapport à chaque groupe, $n = 36$, 9 et 17 pour les 3 groupes I–III respectivement ; *, $p = 0,036$; **, $p = 0,005$ (Fisher's exact test).

Les patients du groupe II présentant majoritairement des symptômes modérés de grade 1 et 2, et étant principalement sensibilisés au saumon, ont des taux d'IgE spécifiques vis-à-vis de l'extrait de saumon et de la parvalbumine de saumon relativement bas (0,35 à 2,5 kU_A/L et 0,4 à 1,0 kU_A/L, respectivement). Des cas cliniques de monosensibilisation au saumon ont été rapportés [23,32]. Dans cette étude, nous avons mis en évidence une forte corrélation entre la présence exclusive d'IgE spécifiques vis-à-vis du saumon et une allergie clinique exclusive au saumon. En ce qui concerne l'efficacité des méthodes de diagnostic (dosage d'IgE spécifiques, tests cutanés et diagnostic moléculaire utilisant les parvalbumines et les autres allergènes ; Fig. 4), il apparaît que l'efficacité chez les patients du groupe I est indépendante des méthodes utilisées. Comme les patients dans le groupe I sont positifs à la parvalbumine de cabillaud, on pourrait supposer que la présence d'IgE spécifiques à la parvalbumine pourrait être un marqueur de réactivité croisée clinique. Par contre, chez les patients du groupe II, la meilleure efficacité est obtenue avec la recherche d'IgE anti-parvalbumine de saumon. Ces patients avaient tous des symptômes légers et on pourrait supposer que la présence d'IgE spécifiques au saumon seulement pourrait prédire un syndrome oral léger d'allergie au poisson. Dans le groupe III, un meilleur résultat est obtenu par la recherche d'IgE vis-à-vis de l'énolase, de l'aldolase et de la gélatine de poisson alors que les tests cutanés sont moins fréquemment positifs. Les patients négatifs pour la parvalbumine étaient le plus souvent sensibilisés à certains poisons et l'absence de réactivité IgE contre la parvalbumine pourrait indiquer une réactivité clinique à certains poissons spécifiques. Ainsi, il apparaît que l'utilisation d'allergènes moléculaires du cabillaud, du saumon et du thon permet d'affiner le profil de sensibilisation des patients allergiques au poisson, le diagnostic à l'échelle moléculaire montrant clairement sa supériorité pour les groupes II et III.

En effet, le diagnostic in vitro est confirmé dans 94 % des cas par la combinaison d'un dosage d'IgE au cabillaud en ImmunoCAP et d'une analyse utilisant le panel moléculaire parvalbumine-énolase-aldolase-gélatine. De surcroît, des profils de sensibilisation particuliers semblent corrélés à la sévérité des symptômes.

5. Conclusions

L'usage complémentaire des parvalbumines de poisson, des émolases, des aldolases et de la gélatine permet de différencier des profils de sensibilisation particuliers. Ces profils IgE sont en corrélation avec des tableaux cliniques distincts qui ne peuvent pas être différenciés par des extraits de poisson utilisés en tests cutanés ou pour des analyses in vitro. L'analyse du profil moléculaire contribuerait également à mieux cibler les évictions vis-à-vis des poissons.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Remerciements

Nous remercions T. Scheuermann, K. Swiontek et T. Graf de leur support technique.

Ce travail a été financé par le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Luxembourg.

Références

- [1] Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:470–5.
- [2] Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, et al. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:638–46.
- [3] Rancé F, Grandmottet X, Grandjean H. Prevalence and main characteristics of schoolchildren diagnosed with food allergies in France. *Clin Exp Allergy* 2005;35(2):167–72.
- [4] Wild LG, Lehrer SB. Fish and shellfish allergy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005;5:74–9.
- [5] Priftis KN, Mermiri D, Papadopoulou A, Papadopoulos M, Fretzayas A, Lagona E. Asthma symptoms and bronchial reactivity in school children sensitized to food allergens in infancy. *J Asthma* 2008;45:590–5.
- [6] Helbling A, Haydet R, McCants ML, Musmand JJ, El-Dahr J, Lehrer SB. Fish allergy: is cross-reactivity among fish species relevant? Double-blind placebo-controlled food challenge studies of fish-allergic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;83:517–23.
- [7] Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Dose-response in double-blind, placebo-controlled oral food challenges in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:582–6.
- [8] Bock SA, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Fatalities due to anaphylactic reactions to food. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:191–3.
- [9] Jeebhay MF, Robins TG, Seixas N, Baatjes R, George DA, Rusford E, et al. Environmental exposure characterization of fish processing workers. *Ann Occup Hyg* 2005;49:423–37.
- [10] Van Do T, Elsayed S, Florvaag E, Hordvik I, Endresen C. Allergy to fish parvalbumins: studies on the cross-reactivity of allergens from 9 commonly consumed fish. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:1314–20.
- [11] Pascual C, Esteban MM, Crespo JF. Fish allergy: evaluation of the importance of cross-reactivity. *J Pediatr* 1992;121:29–34.
- [12] Bernhisel-Broadbent J, Scanlon SM, Sampson H. Fish hypersensitivity: I. In vitro and oral challenge results in fish-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:730–7.
- [13] De Martino M, Novembre E, Galli L, de Marco A, Botarelli P, Marano E, et al. Allergy to different fish species in cod-allergic children: in vivo and in vitro studies. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:909–14.
- [14] Sletten G, Van Do T, Lindvik H, Egaas E, Florvaag E. Effects of industrial processing on the immunogenicity of commonly ingested fish species. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;152:223–36.
- [15] Kuehn A, Scheuermann T, Hilger C, Hentges F. Important variations in parvalbumin content in common fish species: a factor possibly contributing to variable allergenicity. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;153:359–66.
- [16] Bernhisel-Broadbent J, Strause D, Sampson HA. Fish hypersensitivity. II: clinical relevance of altered fish allergenicity caused by various preparation methods. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:622–9.
- [17] Pascual CY, Reche M, Fiandor A, Valbuena T, Cuevas T, Martin-Esteban MM. Fish allergy in childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 2008;19:573–9.
- [18] Elsayed SM, Aas K. Characterization of a major allergen (cod) chemical composition and immunological properties. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1970;38:536–48.
- [19] Hentges F. Allergènes de poissons et crustacés. *Rev Fr Allergol* 2009;49:156–9.
- [20] Elsayed S, Apold J, Holen E, Vik H, Florvaag E, Dybendal T. The structural requirements of epitopes with IgE binding capacity demonstrated by three major allergens from fish, egg and tree pollen. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1991;204:17–31.

- [21] Hansen TK, Bindslev-Jensen C, Skov PS, Poulsen LK. Codfish allergy in adults: IgE cross-reactivity among fish species. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997;78:187–94.
- [22] Bugajska-Schretter A, Elfman L, Fuchs T, Kapiotis S, Rumpold H, Valenta R, et al. Parvalbumin, a cross-reactive fish allergen, contains IgE-binding epitopes sensitive to periodate treatment and Ca²⁺ depletion. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:67–74.
- [23] Kuehn A, Hutt-Kempf E, Hilger C, Hentges F. Clinical monosensitivity to salmonid fish linked to specific IgE-epitopes on salmon and trout beta-parvalbumins. *Allergy* 2011;66:299–301.
- [24] Kondo Y, Komatsubara R, Nakajima Y, Yasuda T, Kakami M, Tsuge I, et al. Parvalbumin is not responsible for crossreactivity between tuna and marlin: a case report. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:1382–3.
- [25] Ebo DG, Kuehn A, Bridts CH, Hilger C, Hentges F, Stevens WJ. Monosensitivity to pangasius and tilapia caused by allergens other than parvalbumin. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010;20:84–8.
- [26] André F, Nancey S, Cavagna S, André C. La gélatine de poisson skw présente-t-elle une allergénicité potentielle ? *Rev Fr d'Allergol* 2001;41:131.
- [27] Kuehn A, Hilger C, Hentges F. Anaphylaxis provoked by ingestion of marshmallows containing fish gelatin. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:708–9.
- [28] Kuehn A, Hilger C, Lehnert-Weber C, Codreanu-Morel F, Morisset M, Metz-Favre C, et al. Identification of enolases and aldolases as important fish allergens in cod, salmon and tuna: component-resolved diagnosis using parvalbumin and the new allergens. *Clin Exp Allergy* 2013. <http://dx.doi.org/10.1111/cea.12117>.
- [29] Sampson HA. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:891–6.
- [30] Mueller HL. Diagnosis and treatment of insect sensitivity. *J Asthma Res* 1966;3:331–3.
- [31] Welch AA, Lund E, Amiano P, Dorronsoro M, Brustad M, Kumle M, et al. Variability of fish consumption within the 10 European countries participating in the European Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutr* 2002;5:1273–85.
- [32] Perez-Gordo M, Lin J, Bardina L, Pastor-Vargas C, Cases B, Vivanco F, et al. Epitope mapping of Atlantic salmon major allergen by peptide microarray immunoassay. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;157:31–40.