

Comparaison Rapid. Ens[®] pneumallergènes (Dexall/All.Diag) versus CAP System RAST[®] (Pharmacia) et tests cutanés

M.H. CHABANE ¹, J. BARBARA ¹, P. MATHELIER-FUSADE ¹,
N. MOUNEDJI ¹, N. ABUAF ², F. LEYNADIER ¹

RÉSUMÉ

Le Rapid. Ens[®] pneumallergènes est un test de dépistage des IgE spécifiques, permettant de tester chaque sérum simultanément vis-à-vis de 4 mélanges de pneumallergènes incluant les pollens (g3, g6, w6, w9, t3), les acariens domestiques (d1, d2), les phanères d'animaux (e1, e5) et les moisissures (m1, m2, m3, m6). Il s'agit d'une méthode immunoenzymatique utilisant des billes revêtues d'allergènes (système Acti-Tip[®]). Les résultats de cette méthode ont été comparés à ceux du CAP System RAST[®] FEIA et à des tests cutanés à lecture immédiate chez 108 patients allergiques. Le Rapid. Ens[®] pneumallergènes est bien corrélé au CAP System RAST[®] pour les pollens (91 %), les phanères d'animaux (90,3 %), les acariens (85,1 %) et les moisissures (75 %). La concordance globale entre les 2 méthodes est de 86,3 p. cent. La comparaison des deux méthodes aux résultats des tests cutanés montre une meilleure sensibilité du CAP System RAST[®] (0,85 versus 0,74) pour une spécificité comparable (0,75 versus 0,72). En effet, le Rapid. Ens[®] ne dépiste que les cas correspondant à un résultat supérieur ou égal à la classe 2 en CAP System RAST[®]. Le Rapid. Ens[®] pneumallergènes (système Acti-Tip[®]) apparaît comme une méthode fiable pour le dépistage *in vitro* des IgE spécifiques des pneumallergènes courants, d'un meilleur rapport coût/efficacité * que la plupart des tests de dépistage où les pneumallergènes sont testés en un seul mélange.

(*) Cotation du Rapid. Ens pneumallergènes = B70.

SUMMARY

Comparison between Rapid. Ens[®] pneumallergens (Dexall/All-Diag) and CAP System RAST[®] (Pharmacia) and skin prick tests. - Rapid. Ens[®] pneumallergens is a screening assay for specific IgE against a panel of pneumallergens. Four allergen mixtures are simultaneously assayed for each serum, including pollens (g3, g6, w6, w9, t3), house dust mites (d1, d2), animal danders (e1, e5) and moulds (m1, m2, m3, m6). The test is based on EIA method using allergen coated beads (Acti-Tip[®] system) and ready-to-use reagents predisposed on microtiter plates. Results are obtained in less than 2 hours. The results obtained by CAP system RAST[®] FEIA and skin prick tests were compared 108 allergic patients. A good correlation was found between Rapid. Ens[®] pneumallergens and CAP system RAST[®] for pollens (91 %), animal danders (90.3%) and mites (85.1 %) and to a lesser extent for moulds (75 %), with an overall concordance of 86.3 per cent. Using skin prick tests as reference, the comparison showed a better sensitivity of the CAP system RAST[®] (0.85 versus 0.74), but a similar specificity (0.75 versus 0.72). Rapid. Ens[®] Pneumallergens (Acti-Tip[®] System) seems to be a reliable method for *in vitro* screening of specific IgE to common pneumallergens. It is a useful and low cost effective tool which yields more information than most existing *in vitro* screening tests for specific IgE.

MOTS-CLÉS : Immunoglobulines E – Tests biologiques.

KEY-WORDS : Immunoglobulin E – Biological tests.

1. Centre d'Allergie,

2. Laboratoire d'hématologie et d'immunologie,
Hôpital Rothschild, 33, Bd de Picpus, 75012 PARIS.

Tirés à part : Pr F. Leynadier (adresse ci-dessus).

Reçu le 6 janvier 1997. Accepté le 25 février 1997.

CHABANE M.H., BARBARA J., MATHELIER-FUSADE P., MOUNEDJI N., ABUAF N., LEYNADIER F. – Comparaison Rapid. Ens[®] pneumallergènes (Dexall/All-Diag) versus CAP System RAST[®] (Pharmacia) et tests cutanés. *Rev. fr. Allergol.*, 1997, **37** (4), 442-446.

INTRODUCTION

Depuis qu'il a été montré que le dosage des IgE totales n'avaient qu'une faible valeur prédictive positive pour le diagnostic de l'allergie [5], le dosage des IgE spécifiques est devenu un outil de choix pour l'investigation en routine. Plusieurs tests de dépistage des IgE spécifiques sont apparus sur le marché. Ils ont pour principe la recherche qualitative ou semi-quantitative d'IgE spécifiques contre des mélanges d'allergènes (PhadiaTOP®, AlaTOP®, Vidas Stallertest®...). Ces tests sont à différencier des dosages quantitatifs d'IgE spécifiques contre un allergène unitaire (CAP-RAST®, AlaSTAT®, Vidas stallergy®...).

Le Rapid. Ens® pneumallergènes (REP) est un test biologique pour le dépistage de l'allergie respiratoire basé sur la recherche qualitative d'IgE spécifiques de 4 mélanges de pneumallergènes (tableau I). Le sérum du patient est systématiquement testé contre les 4 mélanges d'allergènes : pollens, acariens domestiques, phanères et moisissures.

Tableau I. – Allergènes entrant dans la composition du Rapid Ens® pneumallergènes et ceux du CAP System RAST® utilisés pour la comparaison

<i>Rapid. Ens® Pneuma.</i>	<i>CAP System RAST®</i>
Pollens : Dactyle pelotonnée (g3), Phléole des prés (g6), Armoise commune (w6), Plantain (w9), Bouleau (t3)	g3 et/ou g6 et/ou w6 et/ou w9 et/ou t3
Acariens : <i>Dermatophagoïdes ptéronyssinus</i> (d1), <i>D. Farinæ</i> (d2)	d1 et/ou d2
Animaux : Epithelia de chat (e1), squames de chien (e5)	e1 et/ou e5
Moisissures : <i>Penicillium notatum</i> (m1), <i>Cladosporium herbarum</i> (m2), <i>Aspergillus fumigatus</i> (m3), <i>Alternaria alternata</i> (m6)	mx1 (m1, m2, m3, m6)

Le but de ce travail est d'évaluer les performances du REP par comparaison au dosage des IgE spécifiques par le CAP system RAST® FEIA (CAP). Pour cela, des sérums testés par CAP vis-à-vis d'allergènes entrant dans la composition du REP ont été sélectionnés et testés par REP. Les résultats de chacun des mélanges du REP ont été comparés à ceux du CAP (tableau I). Ensuite, les résultats des deux méthodes sont comparés aux tests cutanés à lecture immédiate.

PATIENTS

La comparaison du REP versus CAP a été effectuée sur 108 sérums d'allergiques, chez lesquels avait été prescrit lors de leur consultation un dosage d'IgE spécifiques effectué par la technique du CAP system RAST® FEIA (laboratoire d'Immunologie et d'Hématologie de l'Hôpital Rothschild, Dr N. Abuaf). Tous les sérums avaient été conservés à - 20°C pendant moins de 2 ans.

MATÉRIEL

Les réactifs du REP (tampon de dilution, anti-IgE et solution de lavage) sont prédistribués dans une microplaque qui permet de tester 4 sérums de patients. Les microplaques sont recouvertes d'un film, qu'il est possible de retirer par quartier, permettant une utilisation au coup par coup, sans perte. Des billes recouvertes de mélanges d'allergènes (phases solides) sont fixées au bouts de bâtonnets adaptés sur un « portoir » afin de faciliter leur manipulation. Un code de couleurs, bâtonnets/billes permet l'identification rapide des allergènes. Chaque « portoir » comporte deux billes témoins (témoin positif et négatif) et 4 billes recouverte chacune d'un des 4 mélanges d'allergènes (tableau I).

Les densités optiques ont été mesurées sur un lecteur de microplaque MRX Dynatech Laboratories (Guyancourt, France).

Les réactifs pour le CAP ont été fournis par Pharmacia France S.A. (Saint Quentin en Yvelines). Les microplaques ont été lues sur un lecteur de fluorescence Fluoro Count 96 (Pharmacia France S.A., Saint Quentin en Yvelines).

Les allergènes glycérolés, les témoins (positif et négatif) et les pointes pour prick-tests (Stallerpoint®) proviennent de Stallergènes S.A. (Antony, France).

MÉTHODES

Les tests cutanés (TC) à lecture immédiate par la méthode du prick-test à l'aide d'une batterie de pneumallergènes avaient été effectués dans le cadre du bilan allergologique lors d'une consultation au Centre d'Allergie de l'Hôpital Rothschild. Les tests cutanés avaient été pratiqués en même temps que le dosage des IgE spécifiques chez 79 patients, et entre 1 et 3 ans auparavant chez 31 patients. Un témoin positif (phosphate de codéine 9 %) et négatif (diluant glycéro-salin), permettent l'interprétation des TC. La mesure du diamètre moyen de la papule et de l'érythème effectuée 15 minutes après permet de considérer qu'un test est positif lorsque le diamètre moyen

de la papule est supérieur ou égal à 75 p. cent du témoin positif.

Le REP consiste à déposer 100 µl/puits de chaque sérum dans une rangée de 6 puits contenant le tampon de dilution prédistribué, où seront immergés les 6 billes maintenues par un « portoir » pendant 30 mn. Le portoir est déplacé dans la seconde rangée contenant le conjugué anti-IgE-peroxydase pour une nouvelle incubation de 30 mn. Le portoir est ensuite déplacé dans les 3^e et 4^e rangées de puits pour un lavage de deux fois 3 mn, puis les billes sont immergées dans des puits contenant la solution chromogène pendant 30 mn. Toutes les incubations se font à température ambiante. Un témoin positif (bille recouverte d'anticorps anti-IgE) et négatif (bille sans allergène, témoin d'une éventuelle fixation non spécifique des IgE) sont inclus dans chaque test. La lecture du test se fait visuellement par comparaison au témoin négatif. Tous les tests ont été lus par 3 personnes sans connaissance préalable des résultats du CAP. Une lecture au spectrophotomètre à 405 nm (lecteur de microplaque) a été pratiquée afin d'évaluer sa concordance avec la lecture visuelle.

Le dosage des IgE spécifiques par la méthode du CAP system RAST® FEIA a été réalisé en suivant les instructions du fabricant. Brièvement, les IgE sériques spécifiques réagissent avec l'allergène couplé par covalence à une mousse synthétique (ImmunoCAP®). Après élimination par lavage des IgE n'ayant pas réagi, les immunoCAP® sont incubés avec des anticorps anti-IgE humaine marqués à la β -galactosidase. Les anti-IgE marqués non liés sont ensuite éliminés par lavage et le complexe est incubé avec le réactif de développement. La fluorescence, mesurée après addition de la solution d'arrêt, est proportionnelle à la concentration en IgE spécifiques de l'échantillon. Les résultats sont lus sur une gamme étalon effectuée dans les mêmes conditions.

L'analyse statistique a utilisé le calcul de l'écart réduit du nombre de cas discordants, pour la comparaison de la significativité des résultats du REP versus TC et du CAP versus TC. Le test est considéré significatif ($p < 0,05$) pour $\varepsilon > 1,96$.

RÉSULTATS

Lecture et interprétation des résultats de Rapid. Ens®

La lecture visuelle par comparaison au témoin négatif, recommandée par le fabricant, dépend de la sensibilité individuelle aux différentes nuances de bleu. Aussi, les lectures effectuées en insu, par trois personnes, comparées à la mesure

de la densité optique (DO) à 405 nm, montrent que l'œil ne détecte le bleu qu'à partir de 85 mDO. Une discordance a été notée pour 3 résultats faiblement positifs sur 130 sérums testés (certains sérums ont été testés 2 fois). Sachant que 4 mélanges d'allergènes ont été testés pour chaque sérum, l'erreur de lecture est de 3/1 320 lectures soit 0,22 p. cent (environ 2 p. 1 000). La mesure de la DO de ces 3 tests a montré des valeurs comprises entre 85 et 90, ce qui permet de les considérer comme positifs comparés aux témoins négatifs, alors qu'ils avaient été rendus négatifs à la lecture visuelle.

Comparaison Rapid. Ens® versus CAP System RAST®

Les sérums donnant des réactions de classe 1 (0,35 à 0,70 KU/l) en CAP sont rarement positifs (2/19) avec le REP (tableau II). La limite de détection du test ne permet de détecter que les sérums donnant des réactions de classe ≥ 2 ($\geq 0,70$ KU/l), comme le précise la notice du fabricant.

Tableau II. – Résultats du Rapid Ens® pneumallergènes avec 19 sérums donnant des résultats de classe 1 avec le CAP System RAST®

	Rapid. Ens® Pneumallergènes	
	Positif	Négatif
Pollens	1	4
Acarie	0	7
Animaux	1	2
Moisissures	0	4

Les résultats du CAP ont donc été classés en 2 groupes : classe 0 ou 1 et classe 2 à 5 pour l'analyse comparative avec le REP. Les résultats des 2 méthodes ont été considérés concordants lorsque pour un résultat positif avec un mélange du REP, au moins un des allergènes du mélange est positif en CAP. De même sont-ils considérés concordants lorsque pour un résultat négatif avec un mélange du REP, tous les allergènes du mélange sont négatifs en CAP. La sensibilité, la spécificité et l'efficacité (concordance) du REP comparées au CAP ont été calculées pour chaque groupe d'allergène testé (tableau III).

Estimés par rapport au CAP (tableau III), tous groupes confondus, le REP montre une sensibilité de 83,6 p. cent, une spécificité de 92,6 p. cent et une efficacité (concordance) de 86,5 p. cent.

Tableau III. – Performances du Rapid Ens® pneumallergènes comparé au CAP System RAST® (comparaison par groupes d'allergènes)

	Pollens	Acariens	Animaux	Moisissures	Globale
Sensibilité	90,4 *	79,7	88,4	64,7	83,6
Spécificité	93,3	96,4	94,7	84,2	92,6
Efficacité **	91,0	85,1	90,3	75,0	86,5
Effectif	67	87	62	36	252

* Résultats exprimés en pourcentages.

** Concordance.

Comparaison Rapid. Ens® et CAP System RAST® versus tests cutanés

Quatre patients avec des TC ininterprétables en raison d'un dermatographe, n'ont pas été inclus dans cette comparaison. Les deux méthodes comparées aux tests cutanés, ne diffèrent pas significativement pour les pollens (REP/TC : $\epsilon = 1,79$, NS et CAP/TC : $\epsilon = 0,71$, NS) et les phanères (REP/TC : $\epsilon = 0,71$, NS et CAP/TC : $\epsilon = 0,71$, NS) (tableau IV). En revanche, il y a une différence significative entre les résultats du REP comparés à ceux des TC aux acariens ($\epsilon = 3,47$, $p < 0,01$) et aux moisissures ($\epsilon = 2,04$, $p < 0,05$), mais pas entre les résultats du CAP et ceux des TC aux acariens ($\epsilon = 1,5$, NS) ni aux moisissures ($\epsilon = 1,18$, NS). La sensibilité du CAP est supérieure à celle du REP (0,86 versus 0,70) pour la détection des IgE spécifiques des acariens domestiques (d1 et d2) et des moisissures (0,70 versus 0,55). Cependant, le faible effectif des TC négatifs (12 à 18) n'autorise pas la comparaison de la spécificité des deux tests.

La comparaison globale des résultats (tous groupes confondus) obtenus avec le REP et le CAP, à ceux des TC (tableau V) fait apparaître une meilleure sensibilité du CAP (respectivement 0,85 versus 0,74, $p < 0,01$) et efficacité (respectivement 0,81 et 0,74), pour une spécificité équivalente des deux tests (0,75 versus 0,72).

Comparaison Rapid. Ens® versus (tests cutanés + CAP System RAST®)

Cette comparaison ne tient compte que des cas concordants pour les tests cutanés et le dosage des IgE spécifiques par CAP (tableau VI).

Tableau V. – Sensibilité, spécificité et efficacité (concordance) du Rapid Ens® pneumallergènes et du CAP System RAST® comparés aux tests cutanés (considérés comme référence)

Allergènes	N	Sensibilité		Spécificité		Efficacité	
		REP	CAP	REP	CAP	REP	CAP
Pollens	61	85,7 *	91,8 *	83,3 *	83,3 *	85,2 *	90,2 *
Acariens	75	70,2 **	85,9 **	83,3	77,8	73,0	84,0
Animaux	55	75,7	81,1	61,1	50,0	70,9	70,9
Moisissures	29	55,0 †	70,0 †	75,0	83,3	59,4	75,0

* Résultats exprimés en pourcentages.

** $\epsilon = 3,47$, $p < 0,01$. † $\epsilon = 2,04$, $p < 0,05$.**Tableau VI. – Performances du Rapid Ens® pneumallergènes dans les cas ayant des tests cutanés et des CAP System RAST® concordant**

	Pollens	Acariens	Animaux	Moisissures	Globale
Sensibilité	93,3 *	81,6	93,3	64,3	86
Spécificité	90,9	100	90,0	100	96
Efficacité	92,9	85,7	92,5	79,2	89
Effectif	56	63	40	24	183

* Résultats exprimés en pourcentages.

Lorsqu'on considère uniquement les cas ayant des TC et un dosage d'IgE spécifiques par CAP concordants, la méthode REP, atteint une sensibilité de 0,86, une spécificité de 0,96 et une efficacité (concordance) de 0,89.

DISCUSSION

La recherche qualitative ou quantitative des IgE spécifiques apporte la preuve biologique de la sensibilisation du patient à un allergène, utile au diagnostic d'allergie [10]. Néanmoins, la législation en vigueur astreint les médecins généralistes et spécialistes à respecter certaines règles de prescription de ces examens biologiques [9]. Lorsque les TC ne peuvent pas être pratiqués, les tests biologiques de dépistage prennent alors tout leur intérêt. Toutefois, les IgE spécifiques comme les TC

Tableau IV. – Comparaison qualitative des résultats du Rapid Ens® pneumallergènes et du CAP System RAST® avec ceux des tests cutanés (considérés comme référence)

Séries appariées	Pollens		Acariens		Animaux		Moisissures	
	REP/TC	CAP/TC	REP/TC	CAP/TC	REP/TC	CAP/TC	REP/TC	CAP/TC
Effectif	61	61	75	75	55	55	29	29
Nombre de -/+	7	4	17	8	9	7	9	5
Nombre de +/-	2	2	3	4	7	9	3	2
Significativité	NS	NS	$p < 0,01$	NS	NS	NS	$p < 0,05$	NS

sont les témoins d'une sensibilisation et non d'une allergie car le sujet peut être totalement asymptomatique ou présenter des manifestations cliniques sans rapport avec l'allergène auquel il est sensibilisé [3, 5].

Aujourd'hui, plusieurs techniques sont proposées pour le dépistage des IgE spécifiques, mais elles ne dépistent pas toutes les mêmes allergènes ; aussi, le biologiste qui les pratique doit-il préciser le nom du test utilisé.

La comparaison du REP avec le dosage des IgE spécifiques (unitaires) par CAP des allergènes entrant dans la composition des mélanges du REP, montre une bonne concordance pour les pollens (91,0 %), les phanères d'animaux (90,3 %) et les acariens (85,1 %). Elle est plus faible pour les moisissures (75,0 %), mais certains sérums dosés par le CAP avaient été conservés à - 20°C jusqu'à 2 ans (allergie rare), avant d'être retestés par le REP, ce qui n'était pas le cas des autres sérums. La sensibilité du REP par rapport aux résultats du CAP varie de 64,7 p. cent à 90,2 p. cent et la spécificité de 84,2 p. cent à 96,4 p. cent. Globalement, le REP reste bien concordant avec le dosage des IgE spécifiques par CAP (215 tests/249 dosages soit 86,3 %).

La comparaison avec les TC montre une meilleure sensibilité du CAP par rapport au REP (85,0 % versus 73,8 %) – avec une différence significative pour les acariens – et une plus grande efficacité (81,4 % versus 74,1 %). En revanche, le REP possède une bonne spécificité : 75 p. cent contre 72 p. cent pour le CAP. Comme cela a déjà été rapporté, des résultats de classe 2 en CAP peuvent se voir chez des sujets asymptomatiques [12]. Des résultats proches ont été obtenus par d'autres méthodes de dépistage des IgE spécifiques à l'aide d'un panel de pneumallergènes (Ala Top, Quidel Allergen Screen...) comparées aux TC, avec une sensibilité de 78 p. cent à 85 p. cent et une spécificité de 83 p. cent à 94 p. cent [6, 8].

Les différences de performances du REP par rapport au CAP sont dues en grande partie à la mauvaise corrélation du premier avec les TC aux moisissures (sensibilité 52,9 % et efficacité 59,4 %), allergènes pouvant donner des tests cutanés faussement positifs [11]. De même, sa faible sensibilité pour les acariens pourrait être liée à une différence qualitative ou quantitative des allergènes d'acariens fixés aux billes.

La méthode du REP présente plusieurs avantages, alliant une rapidité d'exécution (résultats en moins de 2 heures) à une meilleure orientation de la recherche des IgE spécifiques en cas de positivité par l'utilisation de mélanges d'allergènes définis, testés séparément. Des contrôles, positif et négatif, pratiqués sur chaque échantillon, garantissent la bonne exécution du test. Parmi les autres tests du commerce, l'Immunodot Top Screen effectue cette recherche par groupe d'allergènes et inclut des contrôles positif et négatif pour chaque sérum. Mais les pneumallergènes sont regroupés en 3 familles où les acariens (d1, d2) sont mélangés aux poils d'animaux (e1, e2), et les résultats ne sont disponibles qu'en 24 heures (1). Enfin, l'utilisation de REP au coup par coup, comme c'est le cas pour certains tests (Stallertest, Immunodot Top Screen...) (1,2) n'oblige pas à regrouper les sérums pour travailler en série.

Le REP s'avère être un bon outil de dépistage des IgE spécifiques de pneumallergènes courants, plus informatif que la majorité des tests disponibles pour un coût équivalent (cotation B70).

Remerciements : Madame Severine Fehrenbach et Monsieur Bernard Fourtignon (techniciens au laboratoire d'Hématologie et d'immunologie, Service du Professeur J.C. Homberg, Hôpital Rothschild) pour leur assistance technique à la réalisation de ce travail ainsi qu'au Docteur Catherine Pecquet.

RÉFÉRENCES

1. de Weck A.L., Derer M., Morrison-Smith G. – Immunodot Top Screen: un nouveau procédé pour le dépistage des allergies. *Rev. fr. Laboratoires*, 1996, 281, 47-51.
2. Didierlaurent A., Picelli N., Berrouet C., Picart V., Andre C. – A new method for specific IgE measurement: Vidas Stallertest and Vidas Stallergy. XVI EAACI, June 24-25, 1996, Madrid, Spain.
3. Dolen W.K. – Allergy diagnosis revisited. *Ann. Allergy*, 1995, 74, 2-3.
4. Guerin B. – Intérêt clinique en allergologie des tests sériques. *Bio Sciences*, 1987, 6, 201-205.
5. Guerin B., Didierlaurent A., Derer M., Stadler B. – Seuil de positivité – interprétation des résultats du RAST. *Rev. fr. Allergol.*, 1995, 25, 189-195.
6. Hamburger R.N., Berger W.E., Quiwa N.B., Terrazas V., Casillas R., Miller S.P. – Skin testing compared with in vitro testing for screening allergic patients. *Ann. Allergy*, 1991, 67, 133-137.
7. Kelso J.M., Yunginger J.W. – *Allergen Immunotherapy*: 7 - Laboratory tests for IgE mediated diseases. pp. 145-160. New York, Lockey R.F. & Bukantz S.C. Ed. M.Dekker, Inc. 1991.
8. Mc Cullough J. – Evaluation of the AlaTOP® Allergy Screen. 52nd Annual Meeting of the AAAAI, March 15-20, 1996, New Orleans, LA, USA.
9. Arrêté du 19 octobre 1994 modifiant l'arrêté du 3 avril 1985 fixant la nomenclature des actes de biologie médicale. *J.O.* du 27.10.94.
10. Van Arsdel Jr. P.P., Larson E.B. – Diagnostic tests for patients with suspected allergy disease. Utility and limitations. *Ann. Int. Med.*, 1989, 110, 304-312.
11. Yman B.L. – Standardization of IgE antibody assays. *J. Int. Federation Clin. Chem.* 1991, 3, 198-203.
12. Pastorello E.A., Incorvaia C., Ortolani C., Bonini S., Canonica G.W., Zanussi C., Romagnani S., Tursi A. & Zanussi C. – Studies on the relationship between the level of specific IgE antibodies and the clinical expression of allergy: I - Definition of the levels distinguishing patients with symptomatic from patients with asymptomatic allergy to common aeroallergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995, 96, 580-587.