

## Sensibilisation ou allergie aux venins d'hyménoptères : comment faire la différence ?

*Sensitisation only or allergy to hymenoptera venoms: How to tell the difference?*

F. Lavaud<sup>\*</sup>, J.-M. Perotin, J.-F. Fontaine  
et le groupe insecte SFA/Anaforcal

*Service des maladies respiratoires et allergiques, CHU de Reims, 45, rue Cognacq-Jay,  
51092 Reims cedex, France*

### Résumé

Le diagnostic d'allergie aux venins d'hyménoptères repose sur une histoire clinique évocatrice et la preuve d'une sensibilisation au venin. Les recommandations et conférences de consensus donnent la priorité aux tests cutanés et plus particulièrement aux tests intradermiques. Des tests cellulaires peuvent être proposés en deuxième intention. À l'heure actuelle aucun test ne permet de prédire plus qu'une simple sensibilisation et la situation est difficile lorsque l'histoire clinique n'est pas claire, que l'insecte n'a pas été identifié et que les tests diagnostiques montrent une polysensibilisation. Il peut s'agir de sensibilisations multiples ou de réactions croisées entre les venins. Après avoir éliminé le rôle des déterminants carbohydrates qui sont le plus souvent en cause dans les sensibilisations croisées, le choix du clinicien peut s'orienter en cas de réactions cliniques sévères vers plusieurs désensibilisations. L'avenir des sensibilisations asymptomatiques demeure en effet inconnu.

© 2010 Publié par Elsevier Masson SAS.

*Mots clés* : Hyménoptères ; Venins ; Anaphylaxie ; Diagnostic ; Sensibilisation croisée ; Double positivité

### Abstract

The diagnosis of hymenoptera venom allergy is based on the clinical history and proof of sensitisation to the venom. Recommendations and consensus conferences have given priority to skin tests and, even more, to intradermal tests. Tests using blood cells can be used as an additional diagnostic step. At present, no test can reveal more than sensitisation to the venom. The situation becomes difficult when the clinical history is not clear, when the insect has not been identified or when the diagnostic tests reveal multiple sensitivities. The question then is between sensitivity to multiple hymenoptera or cross-reactions between the venoms. After having eliminated the role of carbohydrate determinants, which are most often the cause of cross-reactions, the clinician is likely to turn towards immunotherapy with several specific venoms in cases of severe clinical reactions. The prognosis of asymptomatic sensitisations still remains uncertain.

© 2010 Published by Elsevier Masson SAS.

*Keywords*: Hymenoptera venom allergy; Sensitisation; Diagnosis; Cross-reactivity

### 1. Introduction

L'épidémiologie de la sensibilisation aux venins d'hyménoptères reste mal connue dans la population générale et en particulier le risque de réactions anaphylactiques lors de repiquères est inconnu chez les patients sensibilisés. Des

facteurs de risque ont cependant été identifiés (type d'insecte, âge, profession, traitements à visée cardiovasculaire, mastocytose, nombre et répétition des piqûres, sévérité des réactions antérieures), mais de nombreux accidents sévères sont décrits comme première manifestation de l'allergie aux venins d'hyménoptères. L'immunothérapie spécifique (ITS) apporte une protection estimée entre 80 et 100 % chez les patients ayant présenté une réaction systémique [1] et elle est proposée chez les patients jugés à risque de réactions anaphylactiques sévères lors de repiquères. Cela concerne en pratique les patients ayant

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [lavaud.francois@wanadoo.fr](mailto:lavaud.francois@wanadoo.fr) (F. Lavaud).

présenté une histoire clinique de type allergique sévère et chez lesquels on a pu prouver une sensibilisation aux venins d'hyménoptères par tests cutanés ou dosages biologiques.

Le problème devient plus complexe dans certains cas, notamment lorsque l'anamnèse et la reconnaissance de l'insecte sont incertaines et que l'on se trouve en présence d'une polysensibilisation à plusieurs venins. Faut-il alors prendre en compte ces polysensibilisations et proposer une désensibilisation double, voire triple, ou existe-t-il des moyens de discriminer ce qui revient à d'éventuelles réactions croisées sans incidence clinique ? Cette question difficile a été posée au groupe « insecte » émanation de la SFA et de l'Anaforcald dans le cadre du forum de discussion des experts sur les cas difficiles [2]. Leurs conclusions sont un support à ce travail.

## 2. Rappels épidémiologiques

L'allergie aux venins d'hyménoptères comprend des réactions locales étendues, où l'ITS n'est pas indiquée, et des réactions systémiques classées en quatre grades selon Mueller [3] ou Ring et Messmer [4].

La prévalence des réactions systémiques est estimée entre 0,3 et 7,5 % dans la population générale [5]. Elle est plus élevée chez les apiculteurs, de l'ordre de 14 à 43 % [6–7] et basse chez les enfants, 0,15 à 0,3 % [5,8].

La mortalité par piqûre d'hyménoptères demeure rare, 0,03 à 0,48 décès/an/100 000 habitants [5,9], dont plus de 50 % ont des comorbidités cardiovasculaires [10]. On estime également que 40 à 85 % des patients décédés n'avaient pas présenté de réactions anaphylactiques lors des piqûres antérieures, mais étaient donc sensibilisés [9]. L'étude déjà ancienne de Golden et al. [11] sur 269 sujets ayant effectué des tests cutanés et des dosages d'IgE spécifiques de façon systématique pour les venins montre une sensibilisation asymptomatique dans 15 % des cas. Le nombre de piqûres joue également un rôle, la sensibilisation passant à 31 % après deux piqûres. En fait, il est probable qu'une grande proportion des sujets piqués se sensibilise à cette occasion (de 25 à 40 %), mais que cette sensibilisation est transitoire et disparaît au bout de trois ans dans 40 % des cas. Chez les patients demeurant sensibilisés après ce délai, la plupart présenteront lors d'une nouvelle piqûre une réaction locale étendue. Cependant, le risque de réaction systémique chez les patients demeurant sensibilisés et asymptomatiques jusque là demeure parfaitement inconnu et des arguments prospectifs observationnels font encore défaut.

En pratique le problème va donc être le suivant : lors d'un bilan réalisé dans le cadre de l'exploration de symptômes sévères après piqûre d'insecte, on met en évidence une sensibilisation IgE dépendante à plusieurs venins. Faut-il alors mettre en route plusieurs ITS ? La mise en place d'une désensibilisation probabiliste double, voire triple en majeure le coût, multiplie les risques d'effet secondaire et peut aussi générer une sensibilisation à de nouveaux allergènes [12]. Dans l'étude multicentrique européenne de l'EAACI [13], 20 % des 840 patients traités présentaient des effets secondaires lors de l'ITS, la majorité étant légers, l'adrénaline était utilisée chez six patients (0,07 %). Par ailleurs, ces positivités multiples

peuvent être le fait de réactions croisées à des composants communs des venins, allergènes, mais aussi des composants carbohydrates ou *cross-reactive carbohydrates determinants* (CCD) et dans ce cas une ITS à un seul venin pourrait suffire.

## 3. De la sensibilisation à l'allergie : moyens diagnostiques

Le diagnostic d'allergie aux venins d'hyménoptères repose sur un faisceau d'arguments. L'histoire clinique fait état d'une réaction anormale, supérieure à la simple réaction locale d'envenimation et allant de la réaction locale étendue au choc anaphylactique. De nombreux éléments doivent être pris en compte : nombre et date des piqûres, symptômes, délai d'apparition, traitement reçu en urgence, lieu anatomique de la piqûre, persistance ou non de l'aiguillon, environnement et activités lors de la piqûre, facteurs de risque pour une réaction sévère ou pour des repiqûres, profession, bonne tolérance des repiqûres ou des piqûres d'autres hyménoptères, autres allergies.

Si l'insecte a été clairement identifié par le patient, ce qui est habituel pour les apiculteurs, ou s'il a été apporté pour identification, le lien de cause à effet est facile entre un insecte bien défini et une clinique évocatrice. Dans ce cas le bilan est simple et vise à démontrer une sensibilisation pour le venin de l'insecte en cause par tests cutanés ou tests in vitro, usuellement le dosage d'IgE spécifiques :

- les tests cutanés doivent être effectués au moins deux semaines après la réaction clinique pour éviter de faux négatifs liés à une période réfractaire [5,14] et idéalement un à deux mois après. S'ils ont été effectués précocement et sont négatifs ils doivent être répétés un à deux mois plus tard. S'ils ont été pratiqués par prick-tests, des dilutions progressives de 0,01 µg/ml à 100 µg/ml sont recommandées, ou par voie intradermique (IDR) de 0,001 à 1 µg/ml. Au-delà, de faux positifs existent chez les patients non sensibilisés, du fait d'un pouvoir histaminique du venin. Globalement la sensibilité du prick-test demeure inférieure à celle de l'IDR et un test négatif en prick doit être confirmé par une IDR [5,15]. La reproductibilité des tests et surtout des pricks a été également discutée [16]. Cette mise en défaut est estimée de l'ordre de 4 % [17] à un cas sur trois [18] dans un bilan initial. Cependant la sensibilité de l'IDR est évaluée à au moins 90 % à une concentration de 1 µg/ml [5,19] ;
- les dosages d'IgE spécifiques antivenins sont effectués par différentes méthodes dont la sensibilité demeure un peu plus faible que celle des IDR surtout si la mesure est faite à plus d'un an de la piqûre [14]. Dans les premiers jours qui suivent une piqûre, les IgE sont basses et augmentent progressivement au bout de deux à quatre semaines pour décliner progressivement selon de très larges variations individuelles [5]. Si le dosage demeure négatif devant une clinique évocatrice, il doit être répété quelques semaines plus tard [20] et une variation rapide dans le taux d'IgE spécifiques est un argument décisionnel supplémentaire pour impliquer la responsabilité du venin suspecté [5,21] ;

- les IgG spécifiques sont les témoins d'une exposition au venin [22] et une augmentation de leur taux après piqûre n'est pas corrélée à l'existence d'une réaction allergique [5,14]. Elles décroissent plus rapidement après piqûre que les IgE spécifiques [23] ;
- le dosage de la tryptase de base qui a sa place dans les réactions sévères dans la recherche d'une mastocytose [24] n'est pas un test de sensibilisation ;
- le test de provocation n'est pas effectué en France car jugé dangereux [5] et non éthique. Bien sur si une repiqûre spontanée a eu lieu depuis le bilan initial, ses effets cliniques seront pris en compte pour innocenter ou impliquer la sensibilisation à l'insecte. La valeur prédictive d'un test de provocation bien toléré en laboratoire avec un insecte vivant a été estimée de 85 à 95 % pour une repiqûre naturelle [25]. Cependant, des tests de provocation pratiqués de manière itérative jusqu'à un an après une piqûre bien tolérée ont provoqué au deuxième test une réaction systémique chez 6,5 % d'une population pédiatrique [26] et 21 % des adultes [27]. Ainsi un test de provocation négatif ne constitue pas une sécurité absolue et globalement il n'est pas recommandé pour le diagnostic de routine d'allergie au venin ni du reste pour le suivi d'une désensibilisation [28] ;
- dans les cas plus difficiles, lorsqu'il existe une discordance entre histoire clinique et bilan habituel par tests cutanés et/ou dosage d'IgE spécifiques, des tests cellulaires tels les tests de libération d'histamine ou d'activation des basophiles (TAB) ont été proposés [5,17,29]. Le TAB en cytométrie de flux utilisant comme marqueur l'expression du CD 63 est utilisé depuis quelques années [30] avec une sensibilité de 85 à 100 % et une spécificité de 83 à 100 %. Une pré-incubation par IL3 pourrait en améliorer la sensibilité [31]. Les résultats seraient supérieurs aux tests de libération d'histamine [32] mais l'affinité des IgE joue un rôle et des IgE de faible affinité peuvent ne pas être détectées [33]. D'autres tests cellulaires ont été évalués, notamment les tests de libération des leucotriènes C4. Leurs sensibilité et spécificité en sont inférieures [34]. Globalement les tests cellulaires ne sont pas de pratique courante car mal standardisés et peu accessibles car effectués dans des laboratoires très spécialisés [17,35].

Au total, l'histoire clinique est compatible et on a prouvé par des tests cutanés et/ou des dosages d'IgE spécifiques une sensibilisation à un venin d'insecte qui a été bien identifié. Dans ce cas, l'allergie est clairement démontrée et les propositions thérapeutiques d'ITS peuvent être discutées.

#### 4. Polysensibilisations et doubles positivités : une situation difficile

Lorsque l'insecte n'a pas été clairement identifié ou que l'histoire clinique n'est pas contributive, par exemple du fait de l'ancienneté de la piqûre ou par accidents décrits avec plusieurs insectes, on est amené à effectuer une recherche élargie dans les sensibilisations aux venins.

Les extraits disponibles pour tests cutanés sont le venin d'abeille, le venin de guêpe *vespula*, le venin de guêpe *polistes*.

D'autres venins sont disponibles en dosage d'IgE spécifiques, mais compte tenu des réactions croisées habituelles entre abeille et bourdon [36] et guêpe *vespula* et frelon *vespa* [37], la recherche de sensibilisation se limite en général à ces trois espèces. Les *dolicho vespula* croisent également avec *vespula* et ne sont pas présents dans les campagnes françaises. Le bilan va donc s'orienter vers abeille et guêpe *vespula* pour l'ensemble du territoire français en y ajoutant *polistes* pour les régions sud.

Dans ce cas si l'indication à une ITS est posée et que le patient est réactif à un seul des trois venins testé systématiquement l'ITS va se limiter à ce venin. S'il existe une polysensibilisation à deux ou trois venins, on peut alors programmer des désensibilisations doubles ou triples ou essayer de déterminer la pertinence de ces sensibilisations.

La fréquence des polysensibilisations est estimée par dosage d'IgE spécifiques CAP-Pharmacia, de 30 % entre abeille et guêpe *vespula* [38]. Dans ces doubles sensibilisations 18 % sont des réactions croisées authentiques et ne justifient qu'une seule ITS qui peut être orientée par des techniques d'inhibition. De même, les doubles sensibilisations entre *vespula* et *polistes* sont liées à des réactions croisées dans 69 % des cas (31 patients sur 45) dans l'étude de Caruso [12] et liées en partie à la présence de CCD présents dans les deux venins.

Les moyens de discrimination entre double allergie et sensibilisation croisée sont encore insuffisants et confidentiels et méritent d'être évalués et standardisés. L'écart du seuil réactionnel des tests cutanés pour les venins n'a que peu de valeur compte tenu d'une anamnèse peu claire et n'exclut pas une sensibilisation plus ancienne qui pourrait entraîner une réaction clinique en cas de repiqûre. De même, l'écart dans le dosage des IgE spécifiques n'est pas fiable et des accidents anaphylactiques sévères s'observent avec des taux bas d'IgE spécifiques [39].

Les réactions croisées observées entre les venins peuvent être dues à des analogies de séquence partielle entre des allergènes peptidiques présents dans les venins, ce qui a notamment été démontré pour la hyaluronidase [40] allergène majeur de l'abeille (*Api m2*), même si cet allergène n'est pas un allergène majeur du venin [41], reconnu par uniquement 10 à 15 % des patients allergiques à cet insecte. Les CCD sont plus fréquemment en cause dans les réactions croisées, mais c'est le fait essentiellement des tests *in vitro*, leur pertinence clinique étant loin d'être démontrée et ils ne sont pas ou peu responsables de réactions croisées au niveau des tests cutanés [42,43]. L'épitope carbohydre est un N-glycane- $\alpha$ -1-3 fucosylé présent sur de nombreux allergènes, pollens, aliments, latex et en particulier sur la broméline de l'ananas et la peroxydase du raifort. On a proposé pour la mise en évidence du rôle des CCD dans les réactions croisées, des dosages d'IgE spécifiques pour la broméline ou la peroxydase du raifort, allergènes de faible incidence clinique. Un RAST positif à un de ces allergènes est en faveur d'une réactivité vis-à-vis des CCD et indirectement d'une réaction croisée par ce biais entre les venins.

D'autres techniques plus sophistiquées ont été évaluées. Ce sont les techniques d'inhibition, soit inhibition de RAST,

inhibition d'immunoblots, inhibition de TAB par d'autres venins ou par des protéines riches en CCD [44,45]. Un reproche fait à ces techniques est leur coût [35]. Elles ne sont pas nomenclaturées et ne sont pas pratiquées de façon usuelle et sont même confidentielles, réservées à quelques centres. De plus, elles sont difficiles à interpréter notamment pour des taux faibles d'IgE et le seuil de spécificité reste imprécis ; il n'est en effet pas certain qu'une inhibition de 70 à 80 % exclut totalement une sensibilisation à un épitope partagé [35]. Une amélioration des techniques d'inhibition en utilisant une capture des IgE anti-CCD préalable à l'inhibition permet d'obtenir des résultats ne dépendant pas de leur présence [46]. Une inhibition significative est alors en faveur d'épitopes communs à pertinence clinique et oriente vers une véritable allergie croisée, au sens clinique du terme.

Une approche récente pour discriminer ces doubles positivités est le dosage des IgE spécifiques pour des allergènes recombinants spécifiques de l'abeille (Api m1, phospholipase A2) et de la guêpe vespula (Vesv5, allergène 5) [35]. Ces allergènes recombinants sont des allergènes majeurs, non glycosylés et ne font pas intervenir le rôle de CCD. La réactivité allergénique est comparable en tests cutanés et tests in vitro avec l'allergène naturel Api m1 [47]. Dans l'étude de Müller, la présence d'IgE spécifiques pour les deux allergènes Api m1 et Ves v5 prouve une double sensibilisation et orienterait vers une double désensibilisation. En revanche, un dosage négatif innocenterait l'insecte. Cependant il n'est pas exclu que d'autres allergènes jouent un rôle, mais la probabilité reste faible car dans cette étude, 97 % des sérums de patients allergiques à l'abeille reconnaissent Api m1 et 96 % des sérums de patients allergiques à la guêpe vespula reconnaissent Ves v5.

## 5. Enquête d'opinion auprès des experts du groupe « insecte »

À la question « que faire en cas de double positivité ? » dans le cadre du bilan de réactions systémiques sévères après piqûre d'hyménoptères, les experts du groupe « insecte » sont restés dans l'ensemble prudents dans l'interprétation des tests d'inhibition et sur la mise en route d'une désensibilisation. Tous donnent la priorité à la clinique dans la probabilité d'identification de l'insecte responsable (profession, circonstances de la piqûre, sévérité de la réaction). La priorité est également donnée aux tests cutanés. Ainsi, lorsque le test est positif à un seul insecte mais que les dosages d'IgE sont positifs pour plusieurs, seul le test cutané est pris en compte pour la mise en route d'une désensibilisation associée alors à une trousse d'urgence. La recherche de réactivités vis-à-vis des CCD est habituellement réalisée (RAST pour broméline par exemple). En revanche, des techniques d'inhibition sont exceptionnellement demandées (une à deux fois par an pour certains), voire jamais car jugées peu fiables ou trop compliquées ou peu accessibles (éloignement du laboratoire).

Les avis sont partagés sur la mise en route d'une double désensibilisation. Exceptionnellement pour certains, habituellement pour d'autres surtout si les symptômes ont été sévères et le patient très exposé.

## 6. Conclusion

Globalement les experts sont prudents et en cas de double positivité si les IgE antibroméline sont négatifs, la majorité des experts s'orientent vers une double désensibilisation compte tenu qu'aucun marqueur prédictif indiquant plus qu'une simple sensibilisation n'a encore pu être validé. Les tests cutanés et les tests in vitro ne peuvent en aucun cas prédire la gravité des symptômes en cas de nouvelle piqûre, et si 25 à 84 % des patients à test cutané positif ne présenteront aucun symptôme, on sait qu'au contraire jusqu'à 22 % des patients à tests cutanés négatifs développeront une réaction systémique [5].

Quant à l'avenir des patients sensibilisés asymptomatiques, il demeure incertain et justifie des études prospectives.

## Conflit d'intérêt

Les auteurs n'ont pas transmis de conflit d'intérêt.

## Participation

Experts s'étant exprimé sur ce sujet en 2009. Joëlle Birnbaum, Jean-Louis Bourrain, Yvonne Delaval, Charles Dzviga, Christian Gallen, Bruno Girodet, Laurence Guilloux, Nicolas Hutt, François Lavaud, Henry Malandain, Catherine Neukirch, Éric Puillandre, Jean-Marc Rame, Isabelle Sullerot, François Wessel.

## Remerciements

Pour l'aide à la bibliographie à Séverine Choffart.

## Références

- [1] Przybilla B, Ring J Hymenoptera venom allergy. In: Ring J, Przybilla B, editors. *New Trends in allergy* – Berlin : Springer 1991; 335–49.
- [2] Rame JM. Cas difficiles d'allergie aux insectes piqueurs : expérience du groupe de travail. *Rev Fr Allergol* 2008;48:201–3.
- [3] Mueller HL. Diagnosis and treatment of insect sensitivity. *J Asthma Res* 1966;3:331–3.
- [4] Ring J, Messmer K. Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. *Lancet* 1977;1(8009):466–9.
- [5] Bilo BM, Rueff F, Mosbech H, et al. Diagnosis of hymenoptera venom allergy. *Allergy* 2005;60:1339–49.
- [6] Annala IT, Karjalainen ES, Annala PA, et al. Bee and wasp sting reactions in current beekeepers. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996;77:423–7.
- [7] Bousquet J, Menardo JL, Aznar R, et al. Clinical and immunological survey in beekeepers in relation to this sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 1984;73:332–40.
- [8] Novembre E, Cianferoni A, Bernardini RA, et al. Epidemiology of insect venom sensitization in children and its correlation to clinical and atopic features. *Clin Exp Allergy* 1998;28:834–8.
- [9] Mosbech H. Death caused by wasp and bee stings in Denmark 1960–1980. *Allergy* 1983;38:195–200.
- [10] Sasvari T, Müller U. Fatalities from insect stings in Switzerland 1978 to 1987. *Schweiz Med Wochenschr* 1994;124:1887–94.
- [11] Golden DBK, Marsh DG, Kagey-Sobotka A, et al. Epidemiology of insect venom sensitivity. *JAMA* 1989;262:240–4.
- [12] Caruso B, Bonadonna P, Severino MG, et al. Evaluation of the IgE cross-reactions among vespoid venoms. A possible approach for the choice of immunotherapy. *Allergy* 2007;62:561–4.

- [13] Mosbech H, Müller U. Side-effects of insect venom immunotherapy: results from an EAACI multicenter study European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* 2000;55:1005–10.
- [14] Müller UR. Insect sting allergy. Stuttgart: Gustav Fischer, 1990.
- [15] Bjorkander J, Belin L. Diagnostic skin testing in hymenoptera sensitivity. In: Oehling A, editor. *Advances in allergology and applied immunology*. New York: Pergamon Press, 1980: 733.
- [16] Goldberg A. Variability of venom skin tests. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7:342–5.
- [17] Korosec P, Erzen R, Silar M, et al. Basophil responsiveness in patients with insect sting allergies and negative venom-specific immunoglobulin E and skin prick-test results. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1730–7.
- [18] Golden DB, Kagey-Sobotka A, Norman PS, et al. Insect sting allergy with negative venom skin test responses. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107: 897–901.
- [19] Georgitis JW, Reisman RE. Venom skin tests in insect-allergic and insect-non allergic populations. *J Allergy Clin Immunol* 1985;76:803–7.
- [20] Goldberg A, Confino-Cohen R. Timing of venom skin tests and IgE determinations after insect sting anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:182–4.
- [21] Rueff F, Werfel S, Przybilla B. Change of the serum concentration of hymenoptera venom specific IgE antibodies after a systemic sting reaction. A possible diagnostic tool? *Allergy* 2003; 58 (suppl.74): 99 (abstract).
- [22] Annala I, Hurme M, Miettinen A, et al. Lymphocyte subpopulations, cytokine release and specific immunoglobulin G in reactive and non reactive beekeepers. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1988;8:109–14.
- [23] Mosbech H, Christensen J, Diksen A, et al. Insect allergy predictive value of diagnostic tests: A three year follow-up study. *Clin Allergy* 1986; 16:433–40.
- [24] Haeberli G, Bronnimann M, Hunziker T, et al. Elevated basal serum tryptase and hymenoptera venom allergy: Relation to severity of sting reactions and to safety and efficacy of venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2003;33:1216–20.
- [25] Van Halteren HK, Van Der Linden PWG, Burgers SA, et al. Hymenoptera sting challenge of 348 patients: Relation to subsequent field stings. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:1058–63.
- [26] Hauk P, Friedl K, Kaufmehl K, et al. Subsequent insect stings in children with hypersensitivity to hymenoptera. *J Pediatr* 1995;126:185–90.
- [27] Franken HH, Dubois AE, Minkena HJ, et al. Lack of reproducibility of a single negative sting challenge response in the assessment of anaphylactic role in patients with suspected yellow jacket hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93:431–6.
- [28] Ruëff F, Przybilla B, Müller U, et al. The sting challenge test in hymenoptera venom allergy. *Allergy* 1996;51:216–25.
- [29] Eberlein-König B, Schmidt-Leidescher C, Rakoski J, et al. In vitro basophil activation using CD 63 expression in patients with bee and wasp venom allergy. *J Investig Allergol Immunol* 2006;16:5–10.
- [30] Eberlein-König B, Rakoski J, Behrendt H, et al. Use of CD 63 as marker of in vitro basophil activation in identifying the culprit in insect venom allergy. *J Investig Allergol Immunol* 2004;14:10–6.
- [31] Sturm GJ, Böhm E, Trummer M, et al. The CD 63 basophil activation test in hymenoptera venom allergy: A prospective study. *Allergy* 2004; 59:1110–7.
- [32] Lambert C, Guilloux L, Dzviga C, et al. Flow cytometry versus histamine release analysis of in vitro basophil degranulation in allergy to hymenoptera venom. *Cytometry B Clin Cytom* 2003;52B:13–9.
- [33] Christensen LH, Holm J, Skovsgard J, et al. The significance of clonality and affinity of individual specific IgE antibodies for the activation of human basophils. *J Investig Allergol Immunol* 2006;117:S310.
- [34] Sainte-Laudy J, Sabbah A, Drouet M, et al. Diagnosis of venom allergy by flow cytometry correlation with clinical history, skin test, specific IgE, histamine and leucotriene C4 release. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1166–71.
- [35] Mueller UR, Johansen N, Petersen AB. Hymenoptera venom allergy: Analysis of double positivity to honeybee and vespula venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m1 and Ves v5. *Allergy* 2009;64:543–8.
- [36] De Groot H. Allergy to bumblebees. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006;6:294–7.
- [37] Fernandez J. Distribution of vespid species in Europe. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4:319–24.
- [38] Egner W, Ward C, Brown L, et al. The frequency and clinical significance of specific IgE to both wasp (*Vespula*) and honey-bee (*Apis*) venoms in the same patient. *Clin Exp Allergy* 1998;28:26–34.
- [39] Mosbech H. Insect allergy A comparative study including case histories and immunological parameters. *Allergy* 1984;39:543–9.
- [40] Lu G, Kochoumian L, King TP. Sequence identity and antigenic cross-reactivity of white faced hornet venom allergen, also a hyaluronidase, with other proteins. *J Biol Chem* 1995;270:4457–65.
- [41] Jin C, Focke M, Leonard P et al. Reassessing the role of hyaluronidase in yellow venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:184–90.
- [42] Van Ree R. Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129:189–97.
- [43] Hemmer W, Focke M, Kolarich D, et al. Identification by immunoblot of venom glyco proteins displaying immunoglobulin E-binding N-glycans as cross-reactive allergens in honeybee and yellow jacket venom. *Clin Exp Allergy* 2004;31:460–9.
- [44] Straumann F, Bucher C, Wuthrich B. Double sensitization to honeybee and wasp venom: Immunotherapy with one or with both venoms. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;123:268–74.
- [45] Jappe U, Raulf-Helmsoth M, Hoffmann M, et al. In vitro hymenoptera venom allergy diagnosis: Improved by screening for cross reactive carbohydrate determinants and reciprocal inhibition. *Allergy* 2006; 61:1120–9.
- [46] Giroux F, Cano Y, Malandain H. Variation of a simple method to overcome the interference of cross-reactive carbohydrate determinants (CCD) in specific IgE assays. XXVIII congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Varsovie (Pologne) 2009.
- [47] Müller U, Dudler T, Schneider T, et al. Type 1 skin reactivity to native and recombinant phospholipase A2 from honeybee venom is similar. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:395–402.