

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie  
am Biederstein des Klinikums rechts der Isar  
der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Ring)

**Einsatz zellulärer In-vitro-Allergietests bei Patienten mit Typ-I-  
Allergie auf Betalaktam-Antibiotika**

Isabel León Suárez

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. B. Eberlein

2. Univ.- Prof. Dr. Dr. J. Ring

Die Dissertation wurde am 16.10.2013 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 02.04.2014  
angenommen.

---

<b>I.</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>Verzeichnis der veröffentlichten Daten aus der Arbeit</b>	<b>4</b>
<b>III.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1	Betalaktamantibiotika	8
1.1.1	Unerwünschte Nebenwirkungen	9
1.2	Betalaktamallergie	10
1.2.1	Klassifikation, Symptome und Pathophysiologie	10
1.3	Allergiediagnostik	12
1.3.1	Anamnese	12
1.3.2	Hauttestungen	13
1.3.3	In-vitro-Allergie-Diagnostik	14
1.3.3.1	Serologische Tests	14
1.3.3.2	Zelluläre Tests	14
1.3.4	Provokationstestung	15
1.4	Allergietherapie	15
1.5	Basophilenaktivierungstest (BAT)	17
1.5.1	Basophile Granulozyten	17
1.5.2	Oberflächenmarker	18
1.5.2.1	Marker zur Identifizierung von Basophilen	18
1.5.2.2	Aktivierungsmarker von Basophilen	19
1.6	Leukotrienfreisetzungstest	20
1.7	Zielsetzung der Arbeit	21
<b>2.</b>	<b>Patienten, Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1	Patienten und Kontrollpersonen	22
2.1.1	Patienten	22
2.1.2	Kontrollpersonen	22
2.2	Hauttests	22
2.3	Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper	23
2.4	Verwendete Geräte und Materialien	24
2.4.1	Geräte	24
2.4.2	Materialien	24
2.5	Flow-CAST®	27
2.5.1	Prinzip der Methode	27
2.5.2	Allergene	27
2.5.3	Versuchsablauf	29
2.5.4	Analyse mit Durchflusszytometer	30
2.6	Flow2-CAST®	32
2.6.1	Prinzip der Methode	32
2.6.2	Allergene	32
2.6.3	Versuchsablauf	34
2.6.4	Analyse mit Durchflusszytometer	35

---

2.7 CAST®-2000 ELISA	38
2.7.1 Prinzip der Methode	38
2.7.2 Allergene	39
2.7.3 Versuchsablauf	41
2.7.4 Analyse mit Photometer	43
2.8 Statistische Analyse	45
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>46</b>
3.1 Charakterisierung der Patienten	46
3.2 Charakterisierung der Allergene	47
3.3 Basophilenaktivierung mit dem Flow-CAST®	47
3.3.1 Definition eines positiven Ergebnisses	47
3.3.2 Kriterien für die Auswertung	47
3.3.3 Basophilenaktivierung	48
3.4 Basophilenaktivierung mittels Flow2-CAST®	50
3.4.1 Definition eines positiven Ergebnisses	50
3.4.2 Kriterien für die Auswertung	50
3.4.3 Basophilenaktivierung	50
3.5 Messung der Leukotrienfreisetzung mittels CAST®-2000 ELISA	53
3.5.1 Definition eines positiven Ergebnisses	53
3.5.2 Kriterien für die Auswertung	53
3.5.3 Ergebnisse	54
3.6 Kontrollpersonen	56
3.6.1 Klinische Charakterisierung	56
3.6.2 Basophilenaktivierung mittels Flow-CAST®	56
3.6.3 Basophilenaktivierung mittels Flow2-CAST®	57
3.6.4 Leukotrienfreisetzung mittels CAST®-2000 ELISA	58
3.7 Ergebnisse der statistischen Auswertung	60
3.7.1 Sensitivität	60
3.7.2 Spezifität	60
3.7.3 Effizienz	60
3.8 Vergleich der Ergebnisse der Hauttests mit den In-vitro-Tests	60
3.8.1 Flow-CAST®	60
3.8.2 Flow2-CAST®	61
3.8.3 CAST®-2000 ELISA	61
3.9 Vergleich der Ergebnisse der In-vitro-Tests mit den angeschuldigten Auslösern In-vivo	61
3.9.1 Flow-CAST®	61
3.9.2 Flow2-CAST®	62
3.9.3 CAST®-2000 ELISA	62
<b>4. Diskussion</b>	<b>63</b>
4.1 Bedeutung von Hauttests und Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper	63
4.2 Bedeutung der Leukotrienmessung	63
4.3 Kombination von In-vitro-Testverfahren	65
4.4 Bedeutung der Basophilenaktivierung	66
4.4.1 Interpretation der Ergebnisse der Basophilenaktivierungstests	66
4.4.2 Vergleich und Bedeutung beider Basophilenaktivierungstests:	

Flow-CAST® und Flow2-CAST®	67
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>72</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>74</b>
<b>IV Danksagung</b>	<b>82</b>
<b>V Lebenslauf</b>	<b>83</b>
<b>VI Anhang</b>	<b>84</b>

## II Verzeichnis der veröffentlichten Daten aus der Arbeit

### Posterpräsentationen und Vorträge auf Kongressen:

#### **Poster auf dem XXVIII EAACI Kongress, Warschau, 6.-10. Juni 2009**

Towards a clinical validation of the BÜHLMANN Flow2-CAST® basophil activation test for drug and protein allergy.

Schneider M, Eberlein B, León Suárez I, Hausmann O, Wolanczyk-Medrala A, Medrala W, Romano A, Seneviratne S, Snorton A, Niederberger C, Jermann T.

Allergy 2009; 64: 536

#### **Vortrag auf dem ENDA-EuroBAT Meeting, Rotterdam, 14.-15. Oktober 2009**

A new basophil activation test using CD63 and CCR3 in allergy to antibiotics.

Eberlein B, León Suárez I, Darsow U, Rueff F, Sonnenschein U, Schneider M, Behrendt H, Ring J.

#### **Poster und Vortrag auf dem 4th International Drug Hypersensitivity Meeting, Rom, 22.-25. April 2010**

A new basophil activation test using CD63 and CCR3 in allergy to antibiotics.

León Suárez I, Darsow U, Rueff F, Sonnenschein U, Schneider M, Behrendt H, Ring J, Eberlein B.

Eur Ann Allergy Clin Immunol 2010; 42: 75-76

### **Publikation:**

Eberlein B, León Suárez I, Darsow U, Ruëff F, Behrendt H, Ring J.

A new basophil activation test using CD63 and CCR3 in allergy to antibiotics.

Clin Exp Allergy 2010; 40(3): 411-418

### III. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
>	größer als
<	kleiner als
° C	Grad Celsius
AA	Arzneimittlexanthem
Abb.	Abbildung
AE	Atemnot
AGEP	Acute Generalized Exanthematous Pustulosis
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AÖ	Angioödem
AS	Anaphylaxie
Ax	Amoxicillin
BAT	Basophilenaktivierungstest
BL	Betalaktame
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAST	Cellular-Antigen-Stimulation-Test
CD	Cluster of Differentiation
Cef	Cefuroxim
Cipro	Ciprofloxacin
DA	Dalton
DRESS	Drug Reaction with Eosiniphilia and Systemic Symptoms
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-Linked-Immunsorbent-Assay
FACS	Fluorescence-Activated-Cell-Sorter
FcεRI	Hochaffiner IgE-Rezeptor
FEIA	Fluoreszenzenzymimmunoassay

FITC	Fluoreszein Isothiocyanat
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	Forward Scatter
IC	intrakutan
Ig	Immunglobulin
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
L	Liter
LT	Leukotriene
M	männlich
MDM	Minor Determinat Mixture
Min	Minuten
ml	Mililiter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
nm	Nanometer
NK	Negativkontrolle
Pat.	Patient
PE	Phycoerythrin
Pen G	Benzylpenicillin
Pen V	Phenoxymethylpenicillin
pg	Pikogramm
PK	Positivkontrolle
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PPL	Benzylpenicilloylpoly-L-Lysine
Pr	Prick
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
ROAT	Repeated Open Application Test
ROC	Receiver-Operating-Characteristic
s.	siehe
SI	Stimulationsindex

SJS	Stevens-Johnson-Syndrom
sLT	Sulfidoleukotriene
SSC	Side Scatter
Tab.	Tabelle
TEN	Toxische Epidermale Nekrolyse
URT	Urticaria
W	weiblich



# 1. Einleitung

## 1.1 Betalaktamantibiotika

Die Entdeckung der Antibiotika gehört zu einem der wichtigsten Ereignisse in der Geschichte der Medizin. 1928 basierte die Entdeckung des Penicillins auf einem Zufall: der schottische Bakteriologe Alexander Fleming bemerkte, dass auf eine Kulturplatte mit *Staphylococcus aureus* ein aus Versehen gelangter Schimmelpilz, *Penicillium notatum*, dessen Wachstum hemmte. Die Entdeckung der Cephalosporine im Gegensatz war kein Zufallsbefund. 1948 entdeckte Guiseppa Brotzu dass *Cephalosporium acremonium*, das Wachstum von *Staphylococcus aureus* und anderen Krankheitserregern in vitro hemmte. In den 70er Jahren wurden die ersten Cephalosporine in den Markt eingeführt, ca. 25 Jahre nach ihrer Entdeckung [80].

Die Betalaktamantibiotika stellen die größte Gruppe der antibakteriellen Therapeutika dar. Unter dieser Gruppe werden Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame aufgrund ihres gemeinsamen chemischen Grundgerüsts (Betalaktam-Ring) zusammengefasst [79].

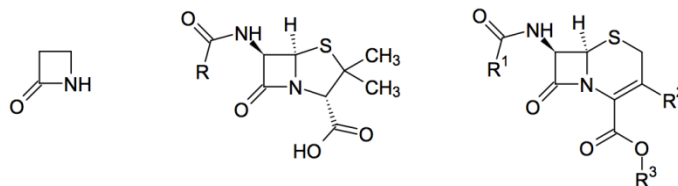


Abb. 1: Strukturformeln (von links nach rechts):  $\beta$ -Laktam Ring, Penicilline, Cephalosporine [12].

Ihre Wirkung ist bakterizid. Betalaktame durchdringen schlecht das Gewebe. Die Verteilung erfolgt ausschließlich im Extrazellulärraum. Aus diesem Grund sind sie nicht zur Therapie von intrazellulär lokalisierten Erregern geeignet.

Die Elimination erfolgt hauptsächlich renal und relativ schnell: Mit Halbwertszeiten von 1-2 Stunden bei fast allen Betalaktame müssen diese deswegen mehrmals täglich verabreicht werden [79].

Die häufigsten verwendeten Betalaktamantibiotika sind [79]:

- Penicillin G (Benzylpenicillin). Es wird intravenös (hohe Plasmakonzentrationen) oder intramuskulär verabreicht. Dieses Antibiotikum wirkt vor allem gegen grampositive Erreger.
- Penicillin V und Propicillin. Diese haben das gleiche Spektrum wie Penicillin G und eignen sich aufgrund ihrer Säurefestigkeit für die orale Anwendung.
- Flucloxacillin. Gehört zu den penicillinasefesten Penicillinen, die bei Staphylokokken Infektionen eingesetzt werden.

- Aminopenicilline (Amoxicillin und Ampicillin). Diese werden gegen gramnegative und grampositive Erreger eingesetzt, sowohl parenteral als auch oral. Betalaktamase-Inhibitoren wie Sulbactam oder Clavulansäure werden hinzugefügt um das Wirkspektrum gegen Staphylokokken und gramnegative Erreger zu erweitern.

- Mezlocillin und Piperacillin von der Gruppe der Acylaminopenicilline. Beide sind gegen gramnegative Erreger wirksamer als die o.g. Aminopenicilline. Zusammen mit dem Betalaktamase-Inhibitor Tazobactam wird das Wirkspektrum von Piperacillin verbessert.

- Cephalosporine. Diese sind stabiler gegenüber Betalaktamase als Penicilline und unwirksam gegen Enterokokken. Diese Gruppe der Betalaktame kann prinzipiell in 2 Untergruppen dividiert werden: Parenterale und orale Cephalosporine.

Zu den parenteralen Cephalosporinen gehören Cefazolin (1. Generation), Cefuroxim und Cefotiam (2. Generation) sowie Cefotaxim, Ceftriaxon, Ceftazidim und Cefepim (3. Generation). Zu den oralen Cephalosporine gehören Cefalexin, Cefadroxil, Loracarbef (1. Generation), Cefaclor, Cefuroxim (2. Generation), Cefixim, Ceftibuten und Cefpodoxim (3. Generation).

Cephalosporine der ersten Generation zeichnen sich durch eine gute Wirksamkeit gegen Staphylokokken, auch gegen Betalaktamase-Bildner aus. Ihre Wirksamkeit gegen gramnegative Erreger ist eingeschränkt. Cephalosporine der zweiten Generation weisen eine bessere Resistenz gegen Betalaktamase auf. Die Ausweitung des Spektrums im gramnegativen Bereich ist bei den neueren Cephalosporinen meist mit einem Verlust der Wirksamkeit gegen grampositive Bakterien verbunden, vor allem *Staphylococcus aureus* [79].

- Carbapeneme wie Imipenem, Meropenem und Ertapenem. Unter allen Betalaktamen weisen diese das breiteste Spektrum auf, sind Betalaktamase stabil und werden nur bei speziellen Indikationen eingesetzt.

- Aztreonam. Diese Substanz ist bisher das einzige therapeutisch gebräuchliche Monobaktam-Antibiotikum. Es wird bei überwiegend gramnegativen, resistenten Bakterien eingesetzt.

### 1.1.1 Unerwünschte Nebenwirkungen

Zu den häufigsten unerwünschten Nebenwirkungen der Betalaktame gehören gastrointestinale Störungen wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall, die insbesondere nach der oralen Einnahme auftreten können. Im Falle einer schweren Antibiotika-assoziierten Diarrhöe sollte an einer pseudomembranöse Kolitis gedacht werden [79].

Weitere adverse Reaktionen nach Einnahme von Betalaktamen können Blutbildveränderungen wie Eosinophilie, Thrombozytopenie und Leukopenie (Neutropenie) sein. Diese pathologischen Zustände normalisieren sich in der Regel nach Absetzen des Medikaments.

Neurotoxische Reaktionen als weitere Nebenwirkungen können nach der Verabreichung von hohen Dosen von Betalaktamen auftreten.

Weitere unerwünschte Nebenwirkungen einer Therapie mit Betalaktamen sind allergische Reaktionen. Diese treten neben gastrointestinale Störungen am häufigsten auf. Allergische Reaktionen treten bei parenteraler Verabreichung eher als bei oraler Einnahme auf [79].

## 1.2 Betalaktamallergie

Schätzungsweise 3-5% der stationären Aufnahmen sind durch Arzneimittelnebenwirkungen bedingt [57] [60], wobei Betalaktamantibiotika (BL) die häufigsten Auslöser von Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Medikamente sind [74]. Bis zu zehn Prozent der Bevölkerung berichten aktuell in der Anamnese über eine Penicillinallergie [77]. Penicilline sind für 20 – 55 % aller allergischen Medikamentennebenwirkungen verantwortlich [62]. Etwa 10% der hospitalisierten Patienten berichten über eine Antibiotikaallergie, insbesondere gegen Penicilline [81]. Die Häufigkeit anaphylaktischer Reaktionen beträgt etwa 1%, die tödlicher Zwischenfälle ca. 1:50000. Aufgrund des hohen Penicillinverbrauchs ist das Problem von größter praktischer Bedeutung [60]. In der Literatur findet sich Benzylpenicillin (BP) als erstes angeschuldigtes Antibiotikum dieser Gruppe; im Laufe der Jahre kamen verschiedene Penicilline und Cephalosporine dazu. Heutzutage ist Amoxicillin (AX) der Vertreter dieser Gruppe, der am häufigsten allergische Reaktionen induziert [4]. Aufgrund der neuen chemischen Verbindungen, die zur Verfügung stehen, wird man mit einer Zunahme der Überempfindlichkeit gegenüber Betalaktame im Laufe der Jahre rechnen müssen [4, 74]. Die früher zwischen Penicillin und Cephalosporinen der ersten Generation angenommene Häufigkeit einer Kreuzreaktivität von 10% scheint allerdings für die neueren Cephalosporine niedriger zu sein [60].

### 1.2.1 Klassifikation, Symptome und Pathophysiologie

1963 schlugen Coombs und Gell eine Klassifikation der Überempfindlichkeitsreaktionen nach den Pathomechanismen in vier Typen vor (Tab. 1) [13] [60]. Zu diesen 4 bekannten Reaktionsmechanismen können 2 weitere Typen identifiziert werden: Typ V und Typ VI. Im lebenden Organismus können verschiedene Typen parallel oder in zeitlicher Abfolge auftreten und können sich gegenseitig beeinflussen [60]. Penicillinallergien können sich in allen bekannten Reaktionstypen manifestieren (erweiterte Klassifikation nach Coombs und Gell). Zur Auslösung einer Allergie muss das Medikament immunogen sein, was für Fremdeiweiße und Peptide naturgemäß zutrifft. Niedermolekulare Pharmaka benötigen als „Haptene“ die Bindung an ein körpereigenes Trägerprotein um immunogen zu sein. Beim Penicillin sind die entscheidenden antigenen Determinanten bekannt: die Penicilloyl-Gruppe als „major determinant“ und Penicillenat und Penicillamin als „minor determinants“ [60].

Typ-I-Reaktionen (Soforttyp) geschehen meist innerhalb einer Stunde nach Einnahme des Medikamentes und werden durch Medikament-spezifische IgE-Antikörper vermittelt [63, 74]. Typ-I-Reaktionen umfassen klinisch charakteristischerweise anaphylaktische Reaktionen mit den typischen Symptomen an den Reaktionsorganen Haut, Atemwege, Herz-Kreislauf-System und Magen-Darm-Trakt. Urtikaria, Angioödem, Asthma, Tachykardie, Hypotonie, Übelkeit und Erbrechen können allein oder in Kombination auftreten [77].

Das pathophysiologische Prinzip ist die Freisetzung vasoaktiver Mediatorsubstanzen durch Überbrückung von zwei IgE-Molekülen auf der Oberfläche von Mastzellen und

basophilen Granulozyten durch das Allergen. Die Reaktion verläuft Komplement-unabhängig [60].

Von 10 000 Patienten, die Penicillin erhalten, liegt das Risiko einer IgE-vermittelten Soforttypallergie bei ca. fünf Fällen [77]. Die Angaben zu Todesraten in der Literatur schwanken zwischen 0,3:10 000 [36] und 1:50.000 [60].

Typ-II-Reaktionen sind seltener und entstehen durch zytotoxische Antikörper, die gegen Oberflächendeterminanten von Zellen gerichtet sind, wenn sich z.B. ein Medikament als Hapten an Leukozyten oder Thrombozyten bindet und dadurch Anlass zur allergischen Agranulozytose oder Thrombozytopenie gibt [60].

Bei den Typ-III-Reaktionen aktivieren Immunkomplexe das Komplementsystem sowie Thrombozyten und neutrophile Granulozyten. Diese Form von Reaktionen manifestieren sich als allergische Agranulozytose oder Thrombozytopenie, hämolytische Anämie oder Blutgruppenunverträglichkeit [60].

Typ-IV (a-d)-Reaktionen, bekannt als verzögerte Überempfindlichkeitsreaktionen, geschehen üblicherweise in einem Intervall von 24 bis 48 Stunden nach Medikamenteneinnahme [74]. Diese werden durch verschiedene T-Zell Subpopulationen vermittelt wie z.B. zytotoxische CD8-Zellen bei den bullösen Arzneimittelreaktionen (IVc) [60]. Das makulopapulöse Arzneimittlexanthem ist die häufigste Reaktion. Andere klinische Bilder sind das fixe toxische Arzneimittlexanthem und das Lyell-Syndrom. Lediglich in 10 % der Fälle einer Unverträglichkeitsreaktion nach Penicillingabe zeigen sich verzögerte Reaktionen in Form von Exanthenen wie dem makulopapulösen Exanthem [62].

Als Typ-V-Reaktionen werden granulomatöse Veränderungen bezeichnet, die sich im Verlauf von 2 bis 5 Wochen nach Injektionen von Fremdstoffen entwickeln [60].

Zu den Typ VI Reaktionen gehören krank machende Immunreaktionen, die durch eine spezifische Antikörperwirkung ausgelöst wurden [60]. Beispiele hierfür sind die Insulinresistenz oder ein Arzneimittel-induzierter Lupus erythematoses [60].

Tab. 1: Klassifikation pathogener Immunreaktionen erweitert nach Coombs und Gell [60]

<b>Typ</b>	<b>Pathogenese</b>	<b>Klinische Symptome</b>
<b>I</b>	IgE	Allergische Urtikaria Angioödem Anaphylaxie Asthma bronchiale Rhinitis Konjunktivitis Allergische Gastroenteritis
<b>II</b>	zytotoxisch	Hämolytische Anämie Agranulozytose

		Thrombozytopenische Purpura
<b>III</b>	Immunkomplexe	Serumkrankheit Immunkomplex Anaphylaxie Vaskulitis Alveolitis Nephritis Arthritis
<b>IV</b>	Zellulär (T-Zellen)	Kontaktexzem Atopisches Ekzem Arzneimittlexanthem SJS TEN AGEP DRESS Fixes toxisches Arzneimittlexanthem
<b>V</b>	Granulomatöse Reaktion	Injektionsgranulome
<b>VI</b>	„stimulierende“ („neutralisierende“) Überempfindlichkeit	Autoimmunthyreoiditis Myasthenia gravis Reverse Anaphylaxie Insulinresistenz Chronische Urtikaria (Unterform mit Auto-AK gegen FcεRI)

### 1.3 Allergiediagnostik

Die Allergiediagnostik, auch die einer Betalaktamallergie, umfasst grundsätzlich vier Schritte: Anamnese, Hauttestung, In-vitro-Allergie-Diagnostik und Provokationstests [60]. Eine wichtige Rolle spielt dabei das zeitliche Intervall zwischen der Reaktion auf Betalaktame und der allergologischen Diagnostik, da im Laufe der Zeit spezifische IgE Antikörper und Hauttests negativ werden können.

#### 1.3.1 Anamnese

Zu den wichtigsten Bestandteilen einer allergologischen Anamnese gehören die Fragen nach den Symptomen, insbesondere nach Beginn, Dauer, zeitlichem Ablauf, Intensität, Häufigkeit und Ansprechen auf Therapie. Eine korrekte Anamnese sollte auch Informationen über Begleiterkrankungen beinhalten. Weitere wichtige Punkte einer allergologischen Anamnese sind die Fragen nach Auslösefaktoren, Begleitumstände und Lebensgewohnheiten wie z.B. Jahreszeit, örtliche Gegebenheiten, Beruf, Urlaub, Medikamente, Nahrungsmittel, Anstrengung, Stress, UV-Licht, Tierkontakt, Tabakrauch u.a. [60].

Da die Reaktionen auf Betalaktame meistens Jahre zurückliegen, zum Teil in der Kindheit, gestaltet sich die Anamnese häufig schwierig. Die Betroffenen können oft keine genauen Angaben bzgl. Symptome und Reaktionen sowie zum zeitlichen Zusammenhang machen.

### 1.3.2 Hauttestungen

Die Hauttests, die in der Allergie-Diagnostik zur Verfügung stehen sind: Reibtest, Pricktest, Scratchtest, Intrakutantest, Epikutantest und ROAT (repeated open application test).

Beim Pricktest, der zur Diagnostik von Typ-I-Reaktionen eingesetzt wird, wird ein Tropfen des Allergenextrakts auf die Haut aufgetragen und anschließend die Haut mit einer Lanzette im schrägen Winkel kurz angestochen und angehoben. Die Ablesung der Quaddel- und Erythem-Reaktion erfolgt nach 15 Min. Die Durchführung eines Intrakutantests erfolgt durch eine streng intrakutane Injektion mit einer Tuberkulinspritze und Kanülengröße 21 von 0,02-0,05 ml der Allergenverdünnung, die durchschnittlich 1/100 der Allergenkonzentration der Pricktestlösung entspricht. Ein wichtiger Aspekt bei den letztgenannten Hauttests ist die korrekte Durchführung mit einer positiven (Histamin) und negativen (Kochsalz bzw. Lösungsmittel) Kontrolle [60]. Die Diagnostik einer Typ-I-Betalaktamallergie umfasst Pricktests und Intrakutantests mit PPL (major determinant), minor determinants (MDM) und weitere Antibiotika inklusive das angeschuldigte Präparat. Es wird immer mit dem Pricktest angefangen. Bei negativem Ausfall wird intrakutan getestet. Die Häufigkeit positiver Hauttestreaktionen bei positiver Anamnese wird mit etwa 30% angegeben [60].

Der Reibtest wird bei stark sensibilisierten Personen zum Nachweis z.B. einer Tierhaar- oder Medikamentenallergie empfohlen. Hierbei wird die Haut des Unterarmes mit dem nativen Allergen kräftig gerieben [60]. Beim Scratchtest, der dem Prinzip des Pricktests sehr ähnlich ist, wird die Haut unter dem aufgetragenen Allergen oberflächlich ca. 5mm lang eingeritzt [60].

Der Epikutantest wird zur Diagnostik von Kontaktallergien eingesetzt. Dabei handelt es sich meist um Typ-IV-Reaktionen im Sinne eines allergischen Kontaktekzems oder eines Arzneimittelexanthems. Dabei wird das verdünnte Allergen in eine meist aus Vaseline bestehende Grundlage mit Hilfe von Aluminiumkammern (Finn chambers) oder in Aluminiumfolie auf der Haut fixiert. Die Reaktion wird nach 24-48 und nach 72 Stunden abgelesen. Neben einer positiven Reaktion in Form von Erythem, Papeln, Bläschen und in der maximalen Ausprägung Erosion sind toxische Reaktionen zu unterscheiden. Diese zeichnen sich durch eine schärfere Begrenzung und einen früheren Höhepunkt der Reaktion aus und sind auch bei Kontrollpersonen positiv [60]. Die Häufigkeit positiver Epikutantestreaktionen bei positiver Anamnese schwankt zwischen 5% bei Penicillin G, 13% bei Ampicillin und 11% bei Amoxicillin [77].

Der ROAT wird bei Verdacht auf eine Kontaktallergie, bzw. zum Nachweis einer Typ-IV-Allergie und meistens nach unklarem Ergebnis durch den Epikutantest verwendet. Die Substanzen, meistens Cremen oder Salben werden über Tage auf ein Areal auf der Innenseite des Armes aufgetragen. Die Reaktion der Teststelle wird nach der Bildung von Erythemen, Papeln und Quaddeln beurteilt [2].

### 1.3.3 In-vitro-Allergie-Diagnostik

#### 1.3.3.1 Serologische Tests

In-vitro-Tests dienen in der Regel dem Nachweis von zirkulierenden IgE-Antikörpern oder verschiedenen Reaktionsprodukten der an der allergischen Reaktion beteiligten Zellen [30]. Bei den In-vitro-Untersuchungen wird zwischen serologischen und zellulären Tests einerseits sowie zwischen allergenspezifischen und nicht allergenspezifischen Methoden unterschieden [60]. Die am häufigsten angewandten In-vitro-Methoden sind die Bestimmung des Gesamt-IgE im Serum und von allergenspezifischem IgE. Bei der letzteren Methode werden Allergene an eine Festphase gebunden, diese dann mit Patientenserum inkubiert und spezifisch gebundenes IgE in einem zweiten Schritt durch ein Detektionssystem messbar gemacht. Das erhaltene Meßsignal ist der Menge gebundener IgE direkt proportional. Die Ergebnisse werden häufig in CAP-Klassen (0-6) und kU/l angegeben [30].

Serum IgE-Antikörper Spiegel nach Reaktionen auf Medikamente neigen dazu im Laufe der Zeit abzufallen [11]. Spezifisches IgE ist im ersten Monat nach der Reaktion nahezu regelmäßig positiv, nach einem Jahr noch in etwa 50%, nach 5 Jahren immer noch in 25% der Fälle. Die Sensitivität der spezifischen IgE-Antikörper liegt jedoch unter der von Hauttestungen und die Nachweisbarkeit spezifischer Antikörper im Serum ist kürzer als im Hauttest. Ein positives Ergebnis in der Bestimmung von spezifischen IgE Antikörpern bedeutet nicht obligat eine Unverträglichkeit, ein negatives Resultat schließt eine Allergie nicht grundsätzlich aus [44]. Die Bestimmung von spezifischen IgE-Antikörpern ist nur für eine limitierte Anzahl von Antibiotika verfügbar, hauptsächlich für Amoxicillin, Ampicillin, Penicillin G und V sowie Cefuroxim.

Ein weiterer In-vitro-Test ist der Immunoblot. Dieser erlaubt den Nachweis von Antikörpern gegen einzelne Epitope elektrophoretisch aufgetrennter Allergengemische und die Charakterisierung einzelner Allergenbestandteile [30]. Weiterhin gehören zu den serologischen, nicht allergenspezifischen Markern Mediatoren allergierelevanter Zellen wie Histamin aus Mastzellen und Basophilen, eosinophil-kationisches Protein aus eosinophilen Granulozyten und Tryptase aus Mastzellen [60].

#### 1.3.3.2 Zelluläre Tests

Weitere allergologische In-vitro-Verfahren sind die zellulären Tests. Die wichtigsten Methoden sind die Bestimmung der In-vitro-Histaminfreisetzung aus peripheren Leukozyten, die Degranulation der basophilen Leukozyten, der Basophilenaktivierungstest (BAT), die Messung der Leukotrienfreisetzung aus peripheren Leukozyten und der Lymphozyten-Transformations-Test [60].

Histaminfreisetzungstests wurden in den letzten Jahren in der Diagnostik von Penicillinallergien eingesetzt. Es zeigte sich eine niedrige Sensitivität. Diese Feststellung zusammen mit anderen Nachteilen verhinderte, dass diese Methode zur Routinediagnostik bei Betalaktamallergien eingesetzt werden konnte. Der Leukotrienfreisetzungstest machte sich in den letzten Jahren in der Diagnostik von IgE-vermittelten Allergien von Nahrungsmitteln, Hymenopteregiften, Aeroallergenen und einigen Medikamenten nützlich. Diese Methode

wurde auch in einigen Studien bei Patienten mit einer Betalaktamallergie untersucht und zeigte eine relativ hohe Spezifität, aber eine niedrige Sensitivität (34,6%-47,7%). [20]

In den letzten Jahren wurden in der Diagnostik von IgE-vermittelten Reaktionen z.B. bei Hymenopterengiften, Latex und inhalativen Allergenen anhand von Basophilenaktivierungstests zuverlässige Ergebnisse ermittelt. Diese Tests zeigten mit Antibiotika, insbesondere mit Betalaktamen, Sensitivitäten mit Werten um 50% und Spezifitäten mit Werten zwischen 91-93% [23]. Die in dieser Arbeit angewandten zellulären Tests zur Diagnostik von Antibiotika Allergien, der Basophilenaktivierungstest und der Leukotrienfreisetzungstest, werden nachstehend unter 1.5 und 1.6 genauer beschrieben.

#### **1.3.4 Provokationstestung**

Bei Provokationstests wird das verdächtige Allergen direkt an das Zielorgan appliziert und die klinische Reaktion registriert. Der Provokationstest ist am aussagekräftigsten, führt allerdings häufiger zu Zwischenfällen [30]. Die wichtigsten Applikationsformen sind: konjunktival, nasal, bronchial, oral und parenteral.

Orale Provokationstests mit Antibiotika können zur Diagnostik einer Betalaktamallergie durchgeführt werden. Dabei wird als Dosis ein Bruchteil der auslösenden Menge vom angeschuldigten Medikament oral eingenommen. Die Dosis wird dann alle 2 Stunden gesteigert. Um psychische Einflüsse auszuschalten wird dabei auch ein Placebo verabreicht. Orale Provokationstests beinhalten allerdings das Risiko von schweren anaphylaktischen Reaktionen. Aus diesem Grund müssen solche Tests mit Einverständnis der Patienten nach ausführlicher Information über Risiken und Indikation und unter stationärer Überwachung erfolgen [60].

#### **1.4 Allergitherapie**

Die Meidung des auslösenden Allergens ist die wirksamste kausale Methode einer Allergiebehandlung. Für die meisten Indikationen für Penicillin gibt es eine Reihe von Ausweichpräparaten mit ähnlicher Wirksamkeit und Verträglichkeit. Im Rahmen einer oralen Provokationstestung werden standardmäßig Ausweichpräparate getestet, die zu einer anderen Familie als der des angeschuldigten Antibiotikums gehören. Bei zwingender Indikation zur Penicillinbehandlung kann eine Hyposensibilisierung mit langsam ansteigenden Dosen unter größtmöglichen Vorsichtsmaßnahmen versucht werden [73] [60].

Ein wichtiger Aspekt sind die therapeutischen Maßnahmen im Falle einer anaphylaktischen Reaktion. Die klassische anaphylaktische Reaktion wird durch IgE-Antikörper auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Leukozyten vermittelt. Tab. 2 stellt die Stadieneinteilung und Symptomatik anaphylaktischer Sofortreaktionen dar.



Tab. 2: Schweregradskala zur Klassifizierung anaphylaktischer Reaktionen nach Ring u. Meßmer [60] [61].

Grad	Haut	Abdomen	Respirationstrakt	Herz-Kreislauf
<b>I</b>	Juckreiz Flush Urtikaria Angioödem	-	-	-
<b>II</b>	Juckreiz Flush Urtikaria Angioödem (nicht obligat)	Nausea Krämpfe	Rhinorrhö Heiserkeit Dyspnoe	Tachykardie (> 20/min) Hypotension (> 20 mmHg systolisch) Arrhythmie)
<b>III</b>	Juckreiz Flush Urtikaria Angioödem (nicht obligat)	Erbrechen Defäkation	Larynxödem Bronchospasmus Zyanose	Schock
<b>IV</b>	Juckreiz Flush Urtikaria Angioödem (nicht obligat)	Erbrechen Defäkation	Atemstillstand	Kreislaufstillstand

Abhängig vom Stadium und Symptomatik werden entsprechende therapeutische Maßnahmen ergriffen, die anschließend in Tab. 3 dargelegt sind.

Tab. 3: Stadienabhängige Therapie der anaphylaktischen Reaktion [2].

Stadium I	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stop Antigen-Zufuhr</li> <li>• venöser Zugang</li> <li>• Antihistaminika i.v.</li> </ul>
Stadium II	zusätzlich <ul style="list-style-type: none"> <li>• Atemwege freihalten, Sauerstoffgabe</li> <li>• Volumensubstitution i.v.</li> <li>• Glukokortikoide i.v.</li> <li>• <math>\beta</math>-Sympathomimetika</li> </ul>
Stadium III	zusätzlich <ul style="list-style-type: none"> <li>• Theophyllin i.v.</li> <li>• Adrenalin i.v.</li> </ul>
Stadium IV	zusätzlich <ul style="list-style-type: none"> <li>• Intubation und kardio-pulmonale Reanimation</li> </ul>

## 1.5 Basophilenaktivierungstest (BAT)

Der Basophilenaktivierungstest (BAT) ist ein zellulärer Test zur Diagnostik von Allergien vom Soforttyp (Typ I). Er stellt über ein In-vitro-Verfahren die in vivo stattfindende Reaktion auf eine Allergenexposition dar. Er ist somit ein wichtiger allergologischer Diagnostikbaustein bei Sofortreaktionen und schließt eine diagnostische Lücke bei unklaren oder schwierigen Fällen, bei denen sich Diskrepanzen zwischen Anamnese und In-vivo/vitro-Diagnostik ergeben haben. Weiterhin stellt er eine Testalternative für Patienten dar, bei denen eine Hauttestung aus unterschiedlichen Gründen nicht möglich ist.

### 1.5.1 Basophile Granulozyten

Die basophilen Granulozyten stellen den geringsten Anteil der zirkulierenden Leukozyten dar, etwa weniger als 1%. Diese sind mit einem Durchmesser von 9-14  $\mu\text{m}$  auch die kleinsten Granulozyten [27]. Sie wurden im Jahr 1879 von Paul Ehrlich erstmals beschrieben und zeichnen sich durch einen segmentierten Zellkern mit zytoplasmatischen Granula aus, welche sich mit basischen Farbstoffen anfärben lassen [28]. Humane Basophile entwickeln sich im Knochenmark aus CD34+ Vorläuferzellen und werden als reife und differenzierte Zellen ins periphere Blut abgegeben. Das wichtigste Zytokin für die Differenzierung und Reifung der Basophilen ist das Interleukin-3 [28].

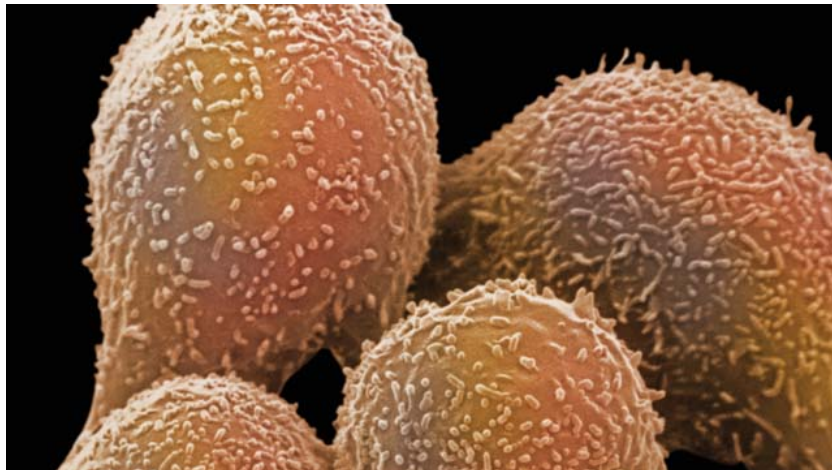


Abb. 2: Basophile Granulozyten (Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme) [56].

Basophile Granulozyten spielen, ebenso wie Neutrophile, Eosinophile, Makrophagen und Mastzellen eine bedeutende Rolle in der angeborenen Immunität gegenüber pathogenen Organismen [27]. An den Stellen wo sich allergische Reaktionen beim Menschen abspielen finden sich vermehrt Basophile. Die Anwesenheit von basophilen Granulozyten im Gewebe korreliert positiv mit der Schwere der Erkrankung und negativ mit der Zahl der Basophilen im peripheren Blut [71].

Auf der Zellmembran basophiler Granulozyten befinden sich, ebenso wie auf Mastzellen, hochaffine IgE-Rezeptoren ( $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ ). Diese bestehen aus je einer  $\alpha$ - und  $\beta$  und zwei  $\gamma$ -Untereinheiten. Für die Signalübertragung ist der  $\gamma$ -Teil des Rezeptors verantwortlich [39].

Das Antigen, der Rezeptor und das allergenspezifische IgE bilden einen Komplex. Diese Überbrückung induziert eine Fusion der zytoplasmatischen Granula mit der Plasmamembran. Dabei kommt es zu einer Produktion von Zytokinen und Mediatoren [37]. Bei der Degranulation von Basophilen wird eine Vielzahl von Mediatoren freigesetzt, u.a. Histamin, Proteasen, Peroxidasen,  $\beta$ -Glucuronidase, Lipidmediatoren, v.a. Leukotrien C<sub>4</sub> und Zytokine wie Interleukin-4, Interleukin-13, Interleukin-8 und MIP-1 $\alpha$  [38].

Durch Quantifizierung der freigesetzten Mediatoren in das extrazelluläre Medium kann die Aktivierung der basophilen Granulozyten erfasst werden. Zudem kann die Aktivierung der Basophilen auch durch Veränderungen der Expression von Oberflächenmolekülen gemessen werden.

### 1.5.2 Oberflächenmarker

Gemeinsam mit anderen Leukozyten, exprimieren humane basophile Granulozyten eine Reihe von Oberflächenmarkern wie z.B. IgE, den hochaffinen IgE Rezeptor Fc $\epsilon$ RI, CD11, CD13, CD18, CD26, CD31, CD203c, CCR3, CRTH2, CD63 und FC $\gamma$ RII (CD32w) unter vielen anderen [64].

#### 1.5.2.1 Marker zur Identifizierung von Basophilen

In der vorliegenden Arbeit wurde beim Flow-CAST® ein Antikörper gegen humanes IgE, markiert mit Fluoreszein-Isothiocyant (anti-IgE-FITC) als Marker zur Identifizierung der Basophilen verwendet. Der Anti-IgE Antikörper war der erste Marker zur Identifizierung von Basophilen. Beim Menschen kommt es beim Vorliegen einer Sensibilisierung zur Bildung von allergenspezifischem IgE. Durch Bindung des allergenspezifischen IgE an den hochaffinen Rezeptor (Fc $\epsilon$ RI) von Mastzellen und basophilen Granulozyten und folgend durch Überbrückung zwischen zwei IgE-Molekülen durch Bindung des Allergens kommt es dann zur Freisetzung verschiedener Mediatoren einer allergischen Reaktion [40]

Im Gegensatz zum Flow-CAST® wurde beim Flow2-CAST® als Marker für die basophilen Zellen der humane Chemokinrezeptor CCR3, mittels Phycoerythrin (anti-CCR3-PE), verwendet. CCR3 ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der hauptsächlich auf Eosinophile, Basophile, ein Teil von Th2 Lymphozyten und Mastzellen exprimiert wird [46, 58]. Basophile Granulozyten präsentieren eine sehr viel höhere Dichte an CCR3 Rezeptor als andere Leukozyten, da sie eine vermehrte Anzahl an Kopien an deren Oberfläche besitzen. CCR3 bindet an mehrere CC-Liganden und rekrutiert Leukozyten, vor allem Th2-Zellen und Eosinophile, zu den Entzündungsstellen. Der Rezeptor spielt eine wesentliche Rolle bei allergischen Reaktionen, inklusive allergischem Asthma und allergischer Rhinitis und bei der atopischen Dermatitis [46]. Er ist der Hauptrezeptor von Eotaxin, ein Chemokin, welches in verschiedenen allergischen Prozessen stark beteiligt ist.

Andere in der Literatur beschriebene Marker für basophile Granulozyten sind z. B. CD203c, CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> oder CD123<sup>+</sup>/anti-HLA-DR<sup>-</sup> [23]. CRTH2 ist ein Prostaglandin D2 Rezeptor. Es wird bei Entzündungsprozessen unter anderem exprimiert. Der Rezeptor spielt eine wichtige Rolle bei der Immunantwort in inflammatorischen Prozessen und bei allergischen Reaktionen. Es wird hauptsächlich von Mastzellen freigesetzt und induziert die Chemotaxis

von Th2-Lymphozyten sowie Eosinophilen und Basophilen. CD123 ist ein Typ I Transmembranmolekül der Zytokinrezeptor Familie, welches die wichtigste Untereinheit des IL-3-Rezeptors darstellt [53]. CD123 wird auf einem Teil der im peripheren Blut vorhandenen dendritischen Zellen sowie partiell auch auf Vorläuferzellen, Monozyten, Eosinophilen und Basophilen exprimiert. In einer bulgarischen Vergleichsstudie von 2006 an 56 Patienten konnte in den Basophilenaktivierungstests nach Stimulation mit Gräserpollen kein signifikanter Unterschied zwischen Markierung mit Anti-IgE-Antikörper oder CD123<sup>+</sup>/anti-HLA-DR<sup>-</sup> gefunden werden [50].

### 1.5.2.2 Aktivierungsmarker von Basophilen

CD63 und CD203c sind die beiden relevantesten Aktivierungsmarker der Basophilen.

In der vorliegenden Studie wurde bei beiden BAT, Flow2-CAST® und Flow-CAST®, mittels flowzytometrischer Messung die Exprimierung des Oberflächenmarkers CD63 an basophilen Granulozyten untersucht. Diese Methodik, die Messung der menschlichen Basophilenaktivierung via CD63, wurde erstmals 1991 von Knol et al. beschrieben [43]. CD63 ist ein Glykoprotein von 53kDA, das in der Lysosomenmembran von basophilen Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen u.a. lokalisiert ist. Es besitzt eine Länge von 238 Aminosäuren, 4 transmembrane, hydrophobe Regionen und 3 Bindungsstellen für N-gebundene Glykosylierungen [49]. Es gehört zur Familie der Tetraspanine, integrale Membranproteine, die funktionell an Zelladhäsionsprozessen und Signaltransduktion beteiligt sind und wird in Basophilen, Makrophagen, Mastzellen und Thrombozyten gebildet [5, 24]. In basophilen Granulozyten ist CD63 vor allem in den intrazytoplasmatischen Granula lokalisiert und wird erst nach Zellaktivierung bei der Degranulation an die Membranoberfläche exprimiert [24].

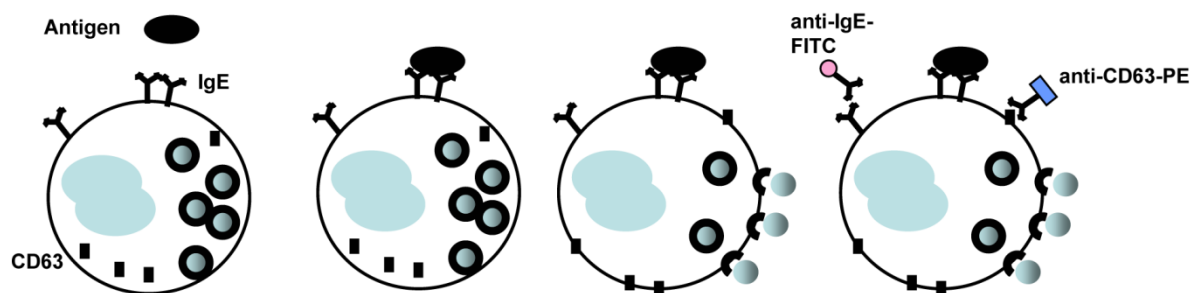


Abb. 3: Basophilenaktivierung. CD63 ist in ruhenden Basophilen an intrazelluläre Granula gebunden. Aktivierte basophile Granulozyten exprimieren CD63 in hoher Dichte auf die Zelloberfläche [24]. Die Identifizierung der Basophilen erfolgt hier mit anti-IgE-FITC, die Messung der Aktivierung mit anti-CD63-PE.

CD203c ist der einzige Marker, der auf ruhenden Basophilen vorhanden ist, und nach Aktivierung auf der Zelloberfläche stark hochreguliert wird. CD203c gehört zur Gruppe der Ektonukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen. Es ist ein Typ II-Transmembranprotein und entspricht dem Ectoenzym E-NPP3 (Ectonukleotidpyrophosphatasephosphodiesterase-3). CD203c kommt fast nur auf Mastzellen, Basophilen und ihren Vorläuferzellen vor. Bei einer Basophilenaktivierung kommt es durch Bindung von IgE-Antikörpern und Quervernetzung des hochaffinen FcεRI-Rezeptors zu einer raschen Hochregulation von CD203c auf der Zelloberfläche. Über seine biologische Funktion ist wenig bekannt. [8, 9]. Als Basophilen-Aktivierungsmarker hat CD203c in der durchflusszytometrischen Diagnostik verschiedener Allergien zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die erste Beschreibung über diese Möglichkeit wurde 2001 von Bühring et al. dokumentiert [8].

Im Vergleich dieser beider Aktivierungsmarker konnte gezeigt werden, dass die Hochregulierung von CD203c wesentlich schneller erfolgt, als die von CD63. Die Expression von CD203c erreicht dabei bereits nach ca. 5 Minuten ein Maximum, während die von CD63 bis ca. 15- 20 Minuten weiter ansteigt [9].

Bei den Basophilenaktivierungstests werden fluoreszierende Antikörper an Proteine wie CD63 gebunden, die auf der Oberfläche aktivierter Basophilen vorhanden sind. Mittels Durchflusszytometrie wird die Fluoreszenz gemessen. Es handelt sich somit um eine effiziente Methode, um mit Hilfe der Expression von Oberflächenmarkern größere Mengen an Proben auf ihre quantitative Beeinflussung durch Allergene zu prüfen [48].

## 1.6 Leukotrienfreisetzungstest

Ein weiterer zellulärer Test zur Diagnostik von Allergien vom Soforttyp (Typ I) ist der Leukotrienfreisetzungstest. Er kann ebenso eine diagnostische Hilfe bei unklaren oder schwierigen Fällen sein. Weiterhin stellt er eine Testalternative für Patienten dar, bei denen eine Hauttestung aus unterschiedlichen Gründen nicht möglich ist.

Die Leukotriene sind eine Familie von biologisch aktiven Molekülen, die von Leukozyten, Mastzellen, Makrophagen und anderen Geweben und Zellen in Reaktion auf immunologische und nicht-immunologische Reize gebildet werden. Sie bewirken eine Reihe von biologischen Effekten, wie Kontraktion der glatten Muskulatur der Bronchien, die Stimulation der vaskulären Permeabilität und Aktivierung von Leukozyten. Sie sind stark wirksame Mediatoren entzündlicher und allergischer Reaktionen. Die Leukotriene wurden im Jahre 1938 entdeckt. Der Begriff "Leukotrien" wurde 1979 nach der Erstbeschreibung seiner Struktur eingeführt [35]. Die Biosynthese der Leukotriene ist von dem Enzym 5'-Lipoxygenase abhängig und erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden Schritten durch die Reaktion von Arachidonsäure mit 5'-Lipoxygenase und 15'-Lipoxygenase. Bei der 5'-Lipoxygenase-Reaktion kommt es zunächst zur Bildung von 5-Hydroperoxy-eicosatetraensäure (5-HPTE), die durch Umlagerung der Doppelbindungen in Leukotrien A4 übergeht. Daraus entsteht durch die Epoxyhydrolase das Leukotrien B4 oder durch Verknüpfung mit dem Tripeptid Glutathion mittels der Glutathion-5-Transferase das

Leukotrien C<sub>4</sub>. Die Abspaltung eines Glutamyl-Restes führt zu Leukotrien D<sub>4</sub>, woraus durch Eliminierung eines Glycyl-Restes das Leukotrien E<sub>4</sub> entsteht [35].

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten CAST®-2000 ELISA handelt es sich um einen 1992 von de Weck eingeführten In-vitro-Test, der auf der Neuproduktion von Mediatoren der allergischen Reaktion basiert [17]. Somit kann die momentane Stimulierbarkeit eines Patienten untersucht werden. Der CAST®-2000 ELISA erlaubt die quantitative Bestimmung von Sulfidoleukotrienen (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>), welche von isolierten Leukozyten nach Allergen-(Antigen-) Kontakt synthetisiert und ausgeschüttet werden. Hierbei werden isolierte Leukozyten aus Patienten-Blutproben gleichzeitig mit Interleukin 3 behandelt und mit Allergenen stimuliert. Im Anschluss an die Stimulation werden die freigesetzten Leukotriene in einem ELISA quantifiziert [7, 10].

### **1.7 Zielsetzung der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Ermittlung der Basophilenaktivierung anhand von zwei Testprotokollen mit CD63 als Aktivierungsmarker, aber mit unterschiedlichen Markern zur Identifizierung von Basophilen, dem etablierten Flow-CAST® (anti-IgE-FITC, anti-CD63-PE) und dem neu entwickelten Flow2-CAST® (anti-CCR3-PE, anti-CD63-FITC), sowie die Messung der Leukotrienfreisetzung anhand des CAST®-2000 ELISA, bei 21 Patienten mit einer Typ-I-Allergie gegen Betalaktamantibiotika und 12 gesunden Kontrollen. Zudem wurden diese drei diagnostischen In-vitro-Methoden miteinander verglichen. Fokussiert wurde dabei auf:

- Die Ermittlung der Sensitivität aller drei Tests bei Patienten mit einer Typ-I-Antibiotikaallergie und einer gesunden Kontrollgruppe.
- Die Ermittlung der Spezifität aller drei Methoden bei Patienten mit einer Typ-I-Antibiotikaallergie und einer gesunden Kontrollgruppe.
- Die Ermittlung der Effizienz aller drei Tests bei Patienten mit einer Typ-I-Antibiotikaallergie und einer gesunden Kontrollgruppe.
- Den Vergleich der Ergebnisse aus Basophilenaktivierungstests und Leukotrienfreisetzungstest zu Anamnese, Hauttests und Bestimmung der spezifischen IgE-Antikörper.
- Die Beurteilung inwieweit die zellulären In-vitro-Tests in der Lage sind, zusätzliche Informationen zu den bei konventionellen klinischen Testverfahren ermittelten Daten zu liefern.

## 2. Patienten, Material und Methoden

### 2.1 Patienten und Kontrollpersonen

#### 2.1.1 Patienten

Insgesamt wurden 21 Patienten getestet, 19 Frauen und zwei Männer, im Alter zwischen 26 und 66 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 44,76 +/- 13,48 Jahre. Alle einbezogenen Patienten wiesen eine positive Anamnese einer Typ-I Antibiotikaallergie gegenüber Betalaktame oder Ciprofloxacin auf. Die Diagnose wurde weiterhin durch einen positiven Hauttest (Prick oder IC-Test) sowie spezifisches IgE gegen Antibiotika ergänzt. Ein oder mehrere dieser Kriterien waren bei jedem Patienten erfüllt, außer bei einem Patienten, der nur eine eindeutige klinische Anamnese aufwies. Die Studienteilnehmer gaben ihr schriftliches Einverständnis für die Studie und versicherten, dass sie sieben Tage vor der Blutentnahme keine antiallergischen Medikamente wie Antihistaminika oder Kortikosteroide eingenommen hatten.

Jedem Patienten und Probanden wurde ausreichend Blut für die drei In-vitro-Tests mittels 9 ml EDTA Röhren entnommen. Das Blut wurde sofort für die Tests verwendet oder bei 2-8°C bis zu 24 Stunden gelagert.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigt.

#### 2.1.2 Kontrollpersonen

Die Gruppe der Kontrollpersonen bestand aus 12 freiwilligen und gesunden Probanden, sieben Frauen und fünf Männer, zwischen 20 und 56 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 32,9 +/- 11 Jahre. Die Probanden wiesen eine negative Anamnese bezüglich einer Antibiotikaallergie und ein negatives RAST Ergebnis für Antibiotika (Penicilloyl G, Penicilloyl V, Ampicillin, Amoxicillin) auf. Hauttests wurden aus ethischen Gründen nicht durchgeführt.

### 2.2 Hauttests

Um eine Eignung der Patienten für die Studie festzustellen, wurden sowohl der Prick- als auch der Intrakutan-Test durchgeführt.

Beim Prick-Test wurden die Antibiotikaallergene Penicillin G, Penicillin V, PPL, MDM, Ciprofloxacin, Cefuroxim, Amoxicillin und Ampicillin wie üblich in Form von Tropfen am erscheinungsfreien Unterarm aufgetragen und mit einer feinen Lanzette im schrägen Winkel kurz angestochen. Nach 15 Minuten wurde die Testlösung abgewischt und die Reaktion abgelesen [60] Als Kontrolllösungen wurden Histamin (positiv) und NaCl 0,9% (negativ) mitgeführt. Bei einem Quaddeldurchmesser größer als 3 mm wurde das Ergebnis als positiv gewertet.

Beim Intrakutan-Test wurden verschiedene Konzentrationen der Allergenverdünnungen mit einer Tuberkulinspritze und Kanülengröße 21 streng intrakutan injiziert. Dabei musste eine

kleine Quaddel entstehen [60]. Die Reaktionen wurden nach 15 min abgelesen. Die Beurteilung beinhaltet die Größe der Quaddel und des Erythems. Bei einer Quaddelgrößendifferenz von 5mm oder mehr als die Negativkontrolle wurde das Ergebnis als positiv betrachtet. Hierbei wurden ebenso als Positivkontrolle Histamin und als Negativkontrolle NaCl 0,9% verwendet.

### 2.3 Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper

Die Bestimmung des spezifischen IgE erfolgte entweder durch den Festphase-Fluoreszenzenzymimmunoassay ImmunoCAP® FEIA System (Pharmacia-Upjohn, Uppsala, Schweden) oder durch Immulite® 2000 Immunoassay System (Siemens AG, Erlangen, Deutschland), ein Flüssigphase-Chemilumineszenz-Assay. Zweck beider Testverfahren ist es, die Bindung von im Serum vorhandener IgE-Antikörpern an das jeweilige Allergen nachzuweisen.

Beim ImmunoCAP® FEIA System ist das interessierende Allergen kovalent an sogenannte Immuno-CAPs (feinporige Celluloseschwämme mit großer Oberfläche und hoher Bindungskapazität für Allergene) gebunden. Wird nun Patientenserum über diese Oberfläche geleitet, bilden im Serum enthaltene spezifische IgE-Antikörper mit den auf dem Immuno-CAP gebundenen Allergenen (c1 Penicilloyl G, c2 Penicilloyl V, c5 Ampicillin, c6 Amoxicillin) einen Komplex. Nachdem die unspezifischen IgE abgewaschen wurden, werden Enzym ( $\beta$ -Galaktosidase)-markierte Antikörper gegen IgE hinzugefügt, die sich wiederum an den Komplex aus Allergen und spezifischem IgE anlagern. Somit wird spezifisches IgE nachgewiesen. Die Werte werden in kU/l (KiloUnits/Liter) ausgedrückt und können nachfolgend in CAP-RAST-Klassen eingeteilt werden:

Tab. 4: Spezifische IgE-Klassen gemäß CAP-FEIA-System

CAP-RAST-KLASSE 0	$\leq 0,35$ kU/l
CAP-RAST-KLASSE 1	0,35 – 0,70 kU/l
CAP-RAST-KLASSE 2	0,7 – 3,5 kU/l
CAP-RAST-KLASSE 3	3,5 – 17,5 kU/l
CAP-RAST-KLASSE 4	17,5 – 50 kU/l
CAP-RAST-KLASSE 5	50 – 100 kU/l
CAP-RAST-KLASSE 6	$\geq 100$ kU/l

Beim Immulite® 2000 Immunoassay System bindet spezifisches IgE aus der Patientenprobe an Allergene, die kovalent an eine lösliche Polymer/Copolymer-Matrix gebunden sind. Diese ist wiederum mit einem Ligand (Biotin) konjugiert. Die Allergene binden an eine anti-Ligand (Streptavidin) beschichtete Festphase, die zur Trennung dient. Durch Waschen wird ungebundenes Material entfernt. Anschließend werden Anti-IgE Sekundärantikörper



zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min bilden diese mit den IgE-Molekülen Komplexe und nach erneutem Waschen wird luminogenes Substrat (Adamantyldioxetanphosphat) zugegeben und das Lumineszenzsignal gemessen. Die entsprechenden Konzentrationen an spezifischem IgE werden in kU/l umgewandelt und die Werte den zugehörigen Testsystem-Klassen zugeteilt:

Tab. 5: Spezifische IgE-Klasseneinteilung beim Immulite® 2000 Immunoassay System

Spez. IgE-Klasse	Konzentration in kU/l
0	0,00 – 0,34
1	0,35 – 0,69
2	0,70 – 3,49
3	3,50 – 17,49
4	17,50 – 52,49
5	52,50 – 99,99
6	>/= 100

## 2.4 Verwendete Geräte und Materialien

### 2.4.1 Geräte

- Vortex-Mischer (Genie 2 , Bender & Hobein, Zürich, Schweiz)
- Schwenkmischer SM1 (Desaga GmbH, Wiesloch, Deutschland)
- Brutschrank mit 37° (Mettler GmbH, Schwabach, Deutschland)
- Kühl- und Gefrierschrank Bosch Cooler (max. -20° C) (Bosch GmbH, Gerlingen, Deutschland)
- Durchflusszytometer (FACScan™, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mit 488 nm Lichtanregung (Argonlaser) und CellQuest™-Software
- Computer (Apple Macintosh mit Cellquest Software Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- MRX Microplate Reader (Dynex Technologies GmbH, Denkendorf, Deutschland)
- Zentrifuge (Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, Deutschland)
- Kühlzentrifuge mit freischwingenden Einsätzen für 12 x 75 mm Röhrchen (Universal 32-R, Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, Deutschland)
- Mikroplatten Washer HydroFlex (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland)

### 2.4.2 Materialien

- Kalium-EDTA Monovetten (9 ml) (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland)
- Verstellbare Pipetten (Eppendorf Reference, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) für 10 bis 100 µl und 200 bis 1000 µl mit Pipettenspitzen (Eppendorf Tips Standard)
- Pipettenspitzen Biosphere (200 µl+1000 µl) (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland)

- Dispenserspitzen Combitips plus, Standard 50 ml (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Meßröhrchen (12 x 75 mm, 5 ml): BD Falcon™ Tubes (BD Biosciences GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Eppendorfgefäße (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Parafilm® M Verschlussfolie 100mm x 75m (Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland)
- Flüssigkeiten für die FACS-Analyse (Flow assisted cell sorting): FACSFlow, FACSRinse, FACSClean, (Becton-Dickinson (BD) Biosciences GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Steriles, pyrogenfreies Reinstwasser (Apotheke Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland)
- Bidestilliertes Wasser (Apotheke Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland)
- Antibiotika Allergene PPL und MDM lyophilisiert (Diater, Madrid, Spanien)
- Antibiotika CAST®-Allergene (Penicillin G, Penicillin V, Amoxicillin, Ampicillin, PPL, MDM, Cefuroxim, Ciprofloxacin) in lyophilisierter Form (Bühlmann, Schönenbuch, Schweiz)
- Flow-CAST® Testkit (Bühlmann, Schönenbuch, Schweiz) enthält:
  - 1 Flasche lyophilisierter Stimulationspuffer; enthält Interleukin-3 und Heparin und wurde mit 50 ml ultrareinem und pyrogenfreiem Wasser rekonstituiert. Danach wurde der Stimulationspuffer aliquotiert und bei -20°C bis zu 6 Monaten aufbewahrt.
  - 1 Flasche lyophilisierte Stimulationskontrolle mit dem monoklonalen Antikörper anti-FcεRI zur Rekonstitution mit 1,5 ml ultrareinem und pyrogenfreiem Wasser. Die rekonstituierte Mischung wurde bei 2-8°C für zwei Monate gelagert oder für längere Lagerung vorher aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.
  - 1 Fläschchen (2,2 ml) gebrauchsfertiges Farbe-Reagenz; es enthält die monoklonalen Antikörper anti-CD63-PE und anti-IgE-FITC und wurde bei 2-8°C gelagert.
  - 1 Flasche (40 ml) konzentriertes (10x) Lyse-Reagenz; es wurde mit 360 ml deionisiertem Wasser verdünnt (1:10) und bei 2-8°C gelagert.
  - 2 Flaschen (je 100 ml) Blockierungspuffer (Stop-Lösung); gebrauchsfertig und bei 2-8°C gelagert.

Die Kits wurden im Kühlschrank bei 2-8°C gelagert.

- Flow2-CAST® Kit (Bühlmann, Schönenbuch, Schweiz) enthält:
  - 1 Flasche lyophilisierter Stimulationspuffer; enthält Kalzium, Interleukin-3 und Heparin; wurde mit 50 ml ultrareinem und pyrogenfreiem Wasser rekonstituiert. Danach wurde der Stimulationspuffer aliquotiert und bei -20°C bis zu 6 Monaten aufbewahrt.
  - 1 Fläschchen lyophilisierte Stimulationskontrolle mit dem monoklonalen Antikörper anti-FcεRI zur Rekonstitution mit 1,5 ml Stimulationspuffer; die rekonstituierte Mischung wurde anschliessend aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.
  - 1 Fläschchen lyophilisierte Stimulationskontrolle fMLP (N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin); diese wurde mit 1,5 ml Stimulationspuffer rekonstituiert, für den wiederholten Gebrauch aliquotiert und bei -20°C gelagert.

- 1 Fläschchen (2,2 ml) gebrauchsfertiges Färbe-Reagenz; enthält die monoklonalen Antikörper anti-CD63-FITC und anti-CCR3-PE und wurde bei 2-8°C gelagert.
- 1 Flasche (25 ml) konzentriertes Lyse-Reagenz (10x); es wurde mit 225 ml deionisiertem Wasser verdünnt (1:10) und bei 2-8°C gelagert.
- 1 Flasche (100 ml) gebrauchsfertigen Waschpuffer, der bei 2-8°C gelagert wurde.

Die Kits wurden im Kühlschrank bei 2-8°C gelagert.

- CAST®-2000 Kit (Bühlmann, Schönenbuch, Schweiz) enthält:

#### *Reagenzien für die Zellenisolation und Stimulation*

1 Flasche (20 ml) Dextran-Lösung gebrauchsfertig; wurde bei 2-8°C gelagert.

- 1 Flasche lyophilisierter Stimulationspuffer; enthält Interleukin-3 und wurde mit 50 ml ultrareinem und pyrogenfreiem Wasser rekonstituiert. Danach wurde der Stimulationspuffer aliquotiert und bei -20°C bis zu 6 Monate aufbewahrt.
- 1 Fläschchen lyophilisierte Stimulationskontrolle mit dem anti-IgE Rezeptor Antikörper zur Rekonstitution mit 3,5 ml ultrareinem und pyrogenfreiem Wasser. Die rekonstituierte Mischung wurde bei 2-8°C für zwei Monate gelagert oder für längere Lagerung vorher aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

#### *ELISA Reagenzien*

- 2 Mikrotiter-Platten beschichtet mit Kaninchen anti-Maus IgG; sie wurden mit ausreichend Lagerungspuffer bei 2-8°C gelagert.
- Platten Abdeckfolien (6 Stück).
- 1 Flasche (50 ml) Waschpuffer-Konzentrat (20x); wurde mit 950 ml deionisiertem Wasser gelöst und bei 2-8°C bis 2 Monaten nach Rekonstitution gelagert.
- 1 Flasche (30 ml) gebrauchsfertiger ELISA-Puffer, der bei 2-8°C aufbewahrt wurde.
- 5 x 1 lyophilisierte Flasche Kalibrator; enthält LTD4 in HSA Puffer Matrix und wurde mit 1 ml deionisiertem Wasser gelöst und nach Gebrauch verworfen. Nach der Rekonstitution enthielt der Standard 3.200 pg/ml LTD4.
- 5 x 2 lyophilisierte Flaschen Kontrollen (tief und hoch); enthalten ebenso LTD4 in HSA Puffer Matrix; wurden je mit 1 ml deionisiertem Wasser verdünnt und nach jedem Versuch verworfen. Die Kontrollen enthielten eine Lot abhängige Menge LTD4. Die genaue Konzentration wurde bei jedem Kit speziell angegeben.
- 1 Flasche lyophilisiertes Nullwert-Reagenz (Blank); enthält gepuffertes LTD4; wurde mit 2 ml deionisiertem Wasser gelöst und für den wiederholten Gebrauch aliquotiert und bei -20°C gelagert. Nach der Rekonstitution enthielt das Nullwert-Reagenz 32.000 pg/ml LTD4.
- 2 Flaschen lyophilisierter Enzym-Marker; enthält alkalische Phosphatase konjugiertes LTD4; jede Flasche wurde mit 5,5 ml ELISA-Puffer gelöst und bei 2-8°C bis 2 Monaten nach Rekonstitution aufbewahrt.
- 1 Flasche (11 ml) gebrauchsfertiger Antikörper (gepufferter Maus anti-sLT Antikörper); wurde bei 2-8°C gelagert.
- 1 Flasche (42 ml) gebrauchsfertiges pNPP (p-Nitrophenylphosphat) Substrat; wurde ebenso bei 2-8°C gelagert.
- 1 Flasche (11 ml) gebrauchsfertige, korrosive Stop-Lösung; wurde auch bei 2-8°C aufbewahrt.

## 2.5 Flow-CAST®

### 2.5.1 Prinzip der Methode

Der Flow-CAST® (Bühlmann, Schönenbuch, Schweiz) ermöglicht *in vitro* die quantitative diagnostische Bestimmung von aktivierten Basophilen, welche nach Antigenstimulation CD63 auf der Zelloberfläche exprimieren.

Die Aktivierung der Basophilen durch Allergene wird durch die erhöhte Expression von CD63 (Glykoprotein gp53) an der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Periphere Blutleukozyten werden aus Vollblutproben der Patienten isoliert und mit einem Stimulationspuffer, der Interleukin-3 (IL-3) enthält, gemischt. Spezifisches Allergen wird zugegeben und die Zellen werden so stimuliert, dass die *in vivo* Situation nachgestellt wird. Bei IgE-vermittelten Allergien wird spezifisches IgE auf der Zelloberfläche über das Allergen kreuzvernetzt und es kommt zur Aktivierung einer intrazellulären enzymatischen Kaskade, die wiederum zur Aktivierung der Basophilen führt. Während dieser Aktivierung verschmelzen intrazelluläre Bestandteile, die das transmembrane Protein CD63 enthalten, mit der Zellwand und CD63 wird so auf der extrazellulären Zellwand sichtbar [65].

Als Positivkontrolle wird ein hochspezifischer monoklonaler Antikörper verwendet, der den hochaffinen IgE-bindenden Rezeptor (FcεRI) erkennt und zu einer Aktivierung der Basophilen führt, indem die Kreuzvernetzung nachgestellt wird.

Nach dem Abstoppen der Reaktion wird das Färbereagenz zugegeben. Dieses enthält eine Mischung von monoklonalen Antikörpern gegen CD63, markiert mit Phycoerythrin (anti-CD63-PE), und Antikörper gegen humanes IgE, markiert mit Fluoreszein-Isothiocyanat (anti-IgE-FITC). Die verbliebenen Erythrozyten werden über eine Lyse-Reaktion entfernt und nach dem Beenden der Reaktion werden die Zellen mittels Durchflußzytometrie analysiert.

### 2.5.2 Allergene

Verwendet wurden für jede Kontrolle je 8 Allergene (Penicillin G, Penicillin V, PPL, MDM, Ampicillin, Amoxicillin, Cefuroxim und Ciprofloxacin).

Für die einzelnen Patienten wurden jeweils die angeschuldigten Antibiotikaallergene benutzt.

Bei den Allergenen handelte es sich um Allergene der Firma Bühlmann, die in lyophilisierter Form geliefert und bei 2-8° gelagert wurden. Die Menge der einzelnen Lyophilisate variierte von Allergen zu Allergen und betrug von 12,5 µg bei PPL bis 1 mg bei Penicillin G und V.

Es wurden je zwei verschiedene Konzentrationen getestet. Die Verdünnungsreihe wurde wie folgt angesetzt:

Jedes Allergenröhrchen wurde mit 250 µl Stimulationspuffer vermischt (Konzentration 2; C2). Darauf folgend wurden je 50 µl von C2 mit 200 µl Stimulationspuffer gemischt (Konzentration 3; C3).

Eine Ausnahme stellte die Verdünnung von Ampicillin dar. Hierbei wurden auch 250 µl Stimulationspuffer zum Allergenröhrchen zugegeben (AmpC1) und anschließend 50 µl AmpC1 mit 150 µl Stimulationspuffer gemischt (AmpC2). Danach wurden 50 µl AmpC2 mit 200 µl Stimulationspuffer gemischt (C3). Verwendet wurden die Konzentrationen C2 und C3.

Die Konzentrationen nach der Rekonstitution waren wie folgt:

- Penicillin G:	C2 = 4 mg/ml C3 = 0,8 mg/ml
- Penicillin V:	C2 = 4 mg/ml C3 = 0,8 mg/ml
- PPL:	C2 = 50 µg/ml C3 = 10 µg/ml
- MDM:	C2 = 1 mg/ml C3 = 0,2 mg/ml
- Ampicillin:	C1 = 10 mg/ml C2 = 2,5 mg/ml C3 = 0,5 mg/ml
- Amoxicillin:	C1 = 2,5 mg/ml C2 = 0,5 mg/ml
- Cefuroxim:	C2 = 2,5 mg/ml C3 = 0,5 mg/ml
- Ciprofloxacin:	C2 = 100 µg/ml C3 = 20 µg/ml

Daraus ergaben sich im Flow-CAST® folgende End-Konzentrationen in der Stimulation (1:2):

- Penicillin G:	C2 = 2 mg/ml C3 = 0,4 mg/ml
- Penicillin V:	C2 = 2 mg/ml C3 = 0,4 mg/ml
- PPL:	C2 = 25 µg/ml C3 = 5 µg/ml
- MDM:	C2 = 0,5 mg/ml C3 = 0,1 mg/ml
- Ampicillin:	C2 = 1,25 mg/ml C3 = 0,25 mg/ml
- Amoxicillin:	C1 = 1,25 mg/ml C2 = 0,25 mg/ml
- Cefuroxim:	C2 = 1,25 mg/ml C3 = 0,25 mg/ml
- Ciprofloxacin:	C2 = 50 µg/ml C3 = 10 µg/ml

Die Allergenlösungen wurden nach Gebrauch verworfen und für jeden Versuch frisch hergestellt.

### 2.5.3 Versuchsablauf

1. Jedem Patienten/Probanden wurde ausreichend venöses Blut in EDTA-Röhrchen entnommen. Für die Kontrollen waren jeweils 9,5 ml nötig. Für die Testung bei den Patienten waren, abhängig von den getesteten Antibiotika,

$$\frac{n \text{ Allergene} \times n \text{ Konzentrationen} + 3 \text{ (pos. Kontrolle} + 2 \times \text{neg. Kontrolle)}}{2}$$

2

= x ml Vollblut notwendig.

Die Zellstimulation wurde sofort nach Blutentnahme durchgeführt oder das Blut bei 2-8°C bis zu 24 Stunden aufbewahrt.

2. Die antikoagulierte Blutprobe wurde zuerst im Entnahmeröhrchen vorsichtig gemischt und anschließend im Röhrchen für 5 min bei 200 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren zwei getrennte Phasen von oben nach unten sichtbar:

- a) Leukozyten enthaltende Plasma-Fraktion
- b) Erythrozyten-Fraktion

3. Die Plasma-Fraktion wurde zusammen mit den Leukozyten mit einer Einwegpipette vorsichtig abgesaugt, in ein frisches und pyrogen-freies Röhrchen überführt und anschließend 10 min bei 500 g zentrifugiert. Die Plasma-Fraktion wurde mit einer Pipette vollständig abgenommen und verworfen.

4. Danach wurden 100 µl Stimulationspuffer pro 1 ml eingesetztem Blut zugegeben und die Leukozyten vorsichtig resuspendiert.

5. Für jeden Patienten und Probanden wurden pyrogenfreie Röhrchen vorbereitet und beschriftet: NK für den Basalwert (im Doppelansatz NK1 und NK2), PK für die Stimulationskontrolle, A1-1 für Allergen 1 mit der Verdünnung 1, usw.

6. Zugabe von 50 µl Stimulationspuffer (Basalwert) in das NK Röhrchen.

7. Zugabe von 50 µl Stimulationskontrolle in das PK Röhrchen.

8. Zugabe von je 50 µl Allergenlösung in das entsprechende Röhrchen.

9. Zugabe von 50 µl Zellsuspension in alle Röhrchen.

10. Die gesamten Röhrchen wurden vorsichtig gemischt, abgedeckt und  $40 \pm 5$  min bei 37°C im Brutkasten inkubiert.

11. Anschließend wurden je 50 µl kalte Stop-Lösung und je 20 µl kalte Färbe-Reagenz in jedes Röhrchen zugegeben und leicht gemischt.
12. Inkubation bei 2-8°C für 30 ± 5 min.
13. Je 3,5 ml auf Raumtemperatur vorgewärmtes Lyse-Reagenz wurden in jedes Röhrchen pipettiert. Anschließend wurden die Röhrchen für 5 ± 1 min bei 18-28°C inkubiert.
14. Die Lyse Reaktion wurde mit je 1 ml Stop-Lösung beendet.
15. Danach wurden die Röhrchen für 5 min bei 1000 – 1200 x g zentrifugiert.
16. Die Überstände wurden verworfen und die Zell-Niederschläge mit je 500 µl Stop-Lösung resuspendiert und leicht gemischt.
17. Innerhalb von zwei Stunden erfolgte die Messung im Durchflusszytometer.

#### 2.5.4 Analyse mit Durchflusszytometer

Die Analyse wurde innerhalb von zwei Stunden mit dem Durchflusszytometer (FACScan™: Becton-Dickinson, Immunocytometry System; Heidelberg; Software: CellQuest™) mit einem Argonlaser mit 488nm Wellenlänge (blau-grünes Anregungslicht) durchgeführt. Ziel dabei war es die aktivierten Basophilen auszuwerten.

Hierbei wurde in der Analyse ein Fenster (R1) gesetzt, das die gesamte Lymphozyten-Population einschloss (Abb. 4).

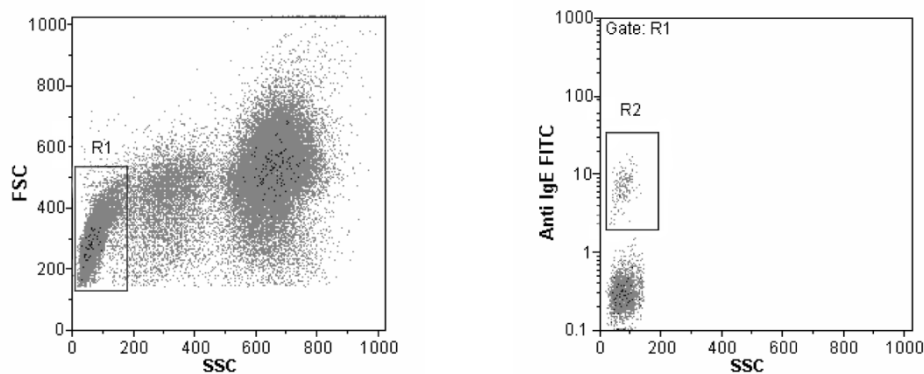


Abb. 4: Identifizierung der Basophilen im Flow-CAST®. R1 umfasst die gesamte Lymphozytenpopulation, R2 die IgE-positiven Basophilen.

Innerhalb der Lymphozyten-Population wurde ein zweites Fenster (R2) auf die hell-fluoreszierenden FITC-markierten (IgE-positiven) Zellen gesetzt (Abb. 4).

Danach wurde der Prozentsatz der hell-fluoreszierenden PE-markierten (CD63-positiven) Zellen im Vergleich zu der Gesamtzahl der hell-fluoreszierenden FITC-markierten (IgE-

positiven) Zellen mit der Software berechnet (siehe Abb. 5). Die Anzahl gemessener basophiler Granulozyten für die Auswertung betrug mindestens 300.

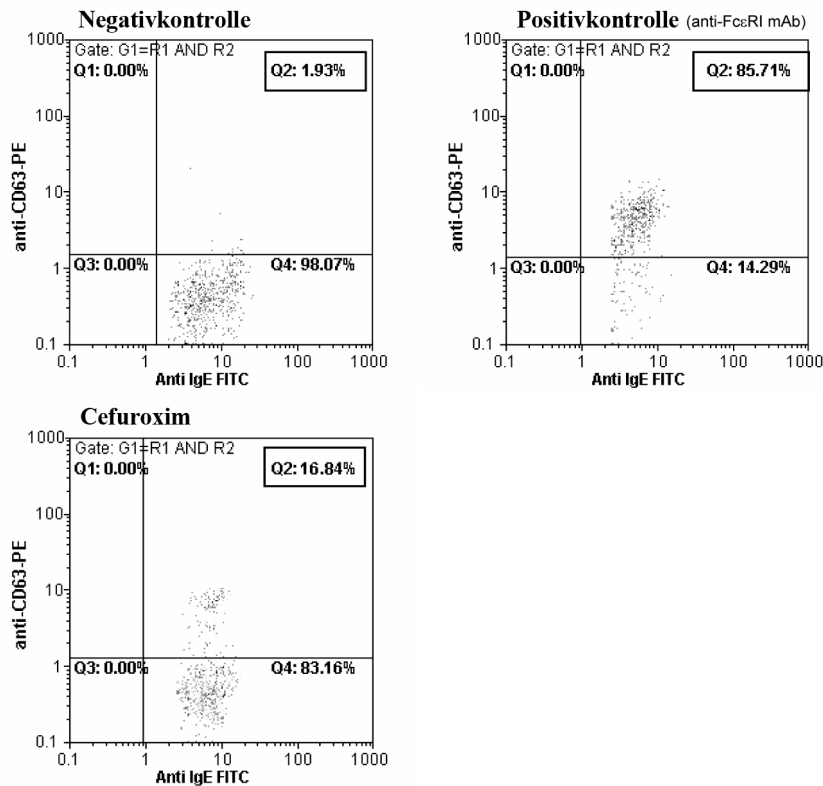


Abb. 5: Bestimmung des Prozentsatzes der hell-fluoreszierenden PE-markierten (CD63-positiven) Zellen im Vergleich zu der Gesamtzahl der hell-fluoreszierenden FITC-markierten (IgE-positiven) Zellen. Q2 repräsentiert die aktivierten Basophilen am Beispiel einer Negativkontrolle, einer Positivkontrolle sowie einer Inkubation mit Cefuroxim.

Da Medikamente einen geringeren Aktivierungs-Prozentsatz ergeben, wurde ein niedrigerer Grenzwert gewählt. Ergebnisse mit  $\geq 5\%$  aktivierten Basophilen, wurden nach Herstellerangaben als positiv gewertet. Zusätzlich wurde ein Stimulationsindex (Allergenstimulation über negative Kontrolle) berücksichtigt. Dieser musste gleich oder größer 2 sein, damit das Ergebnis als positiv betrachtet werden konnte.



## 2.6 Flow2-CAST®

### 2.6.1 Prinzip der Methode

Der Flow2-CAST® ist ein Basophilen Aktivierungstest (BAT) und kann für die In-vitro-Bestimmung von Soforttyp Allergien und Hypersensitivitäten gegen vermutete Allergene verwendet werden.

Der In-vitro-Test wird für den diagnostischen Nachweis der Expression des CD63 Oberflächenmarkers auf Basophilen in Vollblut verwendet, welche nach Allergenstimulation durchflusszytometrisch bestimmt wird.

Die Aktivierung der Basophilen durch Allergene wird durch die erhöhte Expression von CD63 (Glykoprotein gp53) an der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie gemessen. Allergene werden in Stimulationspuffer zu EDTA Vollblut von Patienten gegeben. Damit wird die In-vivo-Reaktion nachgestellt, bei der das an die Zelloberfläche gebundene spezifische IgE kreuzvernetzt wird. Diese Reaktion aktiviert eine intrazelluläre Signalkaskade, welche zur Basophilenaktivierung führt. Während der Aktivierung verschmelzen intrazelluläre Bestandteile, welche das transmembrane Protein CD63 enthalten, mit der Zellwand und CD63 wird somit auf der extrazellulären Oberfläche exponiert.

Als Positivkontrollen werden je ein spezifischer monoklonaler Antikörper verwendet der den hochaffinen IgE bindenden Rezeptor (FcεRI) erkennt sowie N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) als unspezifischen Zellaktivator.

Gleichzeitig zur zellulären Stimulation wird das Färbereagenz dazugegeben. Dieses enthält ein Gemisch aus monoklonalen Antikörpern gegen humanes CD63, konjugiert mit Fluoreszein Isothiocyanat (anti-CD63-FITC), sowie gegen den humanen Chemokinrezeptor CCR3, markiert mit Phycoerythrin (anti-CCR3-PE). CCR3 wird auf Eosinophilen und Basophilen exprimiert. Die enthaltenen Erythrozyten werden durch eine Lyse-Reaktion entfernt. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt werden die Zellen in Waschpuffer resuspendiert und können danach durchflusszytometrisch analysiert werden.

### 2.6.2 Allergene

Für jede Kontrolle wurden je 8 Allergene (Penicillin G, Penicillin V, PPL, MDM, Ampicillin, Amoxicillin, Cefuroxim und Ciprofloxacin) benutzt.

Bei den einzelnen Patienten wurden jeweils die angeschuldigten Antibiotikaallergene verwendet.

Es handelte sich um Allergene der Firma Bühlmann, die in lyophilisierter Form geliefert und bei 2-8° gelagert wurden. Die Menge der einzelnen Lyophilisate variierte von Allergen zu Allergen und betrug von 12,5 µg bei PPL bis 1 mg bei Penicillin G und V.

Es wurden je drei verschiedene Verdünnungsstufen getestet, mit der Ausnahme von Amoxicillin. Hier wurden nur 2 Konzentrationen verwendet. Die Verdünnungsreihe wurde wie folgt hergestellt:

Ein erstes Allergenröhrchen wurde mit 50 µl Stimulationspuffer versetzt (C1). Ein zweites Röhrchen wurde mit 250 µl verdünnt (C2). Darauf folgend wurden je 50 µl von C2 mit 200 µl Stimulationspuffer gemischt (C3).

Eine Ausnahme stellten die Verdünnungen von Ampicillin und Amoxicillin dar. Hierbei wurden 250 µl Stimulationspuffer zu jedem Allergenröhrchen zugegeben (C1). Anschließend wurde im Fall von Ampicillin 50 µl AmpC1 mit 150 µl Stimulationspuffer gemischt (AmpC2). Danach wurden 50 µl AmpC2 mit 200 µl Stimulationspuffer gemischt (C3).

Bei Amoxicillin wurden nur 50 µl C1 mit 200 µl Stimulationspuffer gemischt (C2) und entsprechend verwendet.

Die Konzentrationen nach Rekonstitution waren wie folgt:

- Penicillin G:	C1 = 20 mg/ml C2 = 4 mg/ml C3 = 0,8 mg/ml
- Penicillin V:	C1 = 20 mg/ml C2 = 4 mg/ml C3 = 0,8 mg/ml
- PPL:	C1 = 250 µg/ml C2 = 50 µg/ml C3 = 10 µg/ml
- MDM:	C1 = 5 mg/ml C2 = 1 mg/ml C3 = 0,2 mg/ml
- Ampicillin:	C1 = 10 mg/ml C2 = 2,5 mg/ml C3 = 0,5 mg/ml
- Amoxicillin:	C1 = 2,5 mg/ml C2 = 0,5 mg/ml
- Cefuroxim:	C1 = 12,5 mg/ml C2 = 2,5 mg/ml C3 = 0,5 mg/ml
- Ciprofloxacin:	C1 = 500 µg/ml C2 = 100 µg/ml C3 = 20 µg/ml

Daraus ergaben sich im Flow2-CAST® folgende End-Konzentrationen in der Stimulation (1:4,4):

- Penicillin G:	C1 = 4,55 mg/ml C2 = 0,91 mg/ml C3 = 0,18 mg/ml
- Penicillin V:	C1 = 4,55 mg/ml C2 = 0,91 mg/ml

	C3 = 0,18 mg/ml
- PPL:	C1 = 56,82 µg/ml
	C2 = 11,36 µg/ml
	C3 = 2,27 µg/ml
- MDM:	C1 = 1,14 mg/ml
	C2 = 0,23 mg/ml
	C3 = 0,045 mg/ml
- Ampicillin:	C1 = 2,27 mg/ml
	C2 = 0,57 mg/ml
	C3 = 0,114 mg/ml
- Amoxicillin:	C1 = 0,57 mg/ml
	C2 = 0,11 mg/ml
- Cefuroxim:	C1 = 2,84 mg/ml
	C2 = 0,57 mg/ml
	C3 = 0,114 mg/ml
- Ciprofloxacin:	C1 = 113,64 µg/ml
	C2 = 22,73 µg/ml
	C3 = 4,545 µg/ml

Die Allergenlösungen wurden nach Gebrauch verworfen und für jeden Versuch frisch hergestellt.

### 2.6.3 Versuchsablauf

Für die Patienten waren je 50 µl EDTA-Blut pro Ansatz notwendig. Die Menge des insgesamt benötigten Blutes bei den jeweiligen Patienten ergab sich aus der Anzahl der getesteten Antibiotika. Für die Kontrollen waren jeweils 1,3 ml Vollblut notwendig (50 µl x 26 Ansätze).

Die Zellstimulation wurde sofort nach Blutentnahme durchgeführt. Falls dies nicht möglich war, wurden die Proben bei 2-8°C bis zu 24 Stunden aufbewahrt.

1. Die entnommene Blutprobe wurde durch mehrmaliges Invertieren des Röhrchens gemischt.
2. Anschließend wurden ausreichend pyrogenfreie Röhrchen, welche für die Messung am Durchflusszytometer geeignet sind, vorbereitet und entsprechend beschriftet:

NK: Negativkontrolle, PK1: Stimulationskontrolle mit anti-FcεRI, PK2: Stimulationskontrolle mit fMLP, A1-1: Allergen 1 mit Konzentration 1, A1-2: Allergen 1 mit Konzentration 2, usw.

#### *Stimulation und Färbung*

3. 50 µl des entsprechenden Stimulus wurden zu jedem Röhrchen zugeben. In das NK Röhrchen wurden 50 µl Stimulations-Puffer (Basiswert) pipettiert, in das PK1 Röhrchen 50 µl Stimulations-Kontrolle mit anti-FcεRI, in das PK2 Röhrchen 50 µl Stimulations-Kontrolle fMLP, und je 50 µl der jeweiligen Allergenkonzentration wurden in die entsprechenden Röhrchen gegeben.

4. Danach wurden je 100 µl Stimulations-Puffer in jedes Röhrchen zugegeben.
5. Je 50 µl Vollblut wurden in jedes Röhrchen gegeben. Dabei wurden Blutkontaminationen an Seitenwänden und Rand der Röhrchen vermieden.
6. Anschließend wurde vorsichtig gemischt.
7. 20 µl Färbe-Reagenz wurden zu jedem Röhrchen zugegeben und erneut vorsichtig gemischt.
8. Alle Röhrchen wurden zugedeckt und für 25 Minuten bei 37°C inkubiert.

#### *Lyse*

9. Je 2 ml vorgewärmte (18-28°C) Lyse-Reagenz wurden zu jedem Röhrchen zugegeben und anschließend vorsichtig gemischt.
10. Die Röhrchen wurden dann 5-10 Minuten bei 18-28°C inkubiert.
11. Danach wurden sie für 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert.
12. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und die Ränder wurden mit saugfähigem Papier getrocknet.
13. Abschließend wurde das Zellpellet mit je 300 µl Wasch-Puffer resuspendiert und vorsichtig gemischt.
14. Die Datenerhebung auf dem Durchflusszytometer wurde anschließend innerhalb von 2 Stunden durchgeführt.

#### **2.6.4 Analyse mit Durchflusszytometer**

Die Analyse wurde mit einem Durchflusszytometer, welches eine 488 nm Argonlaser-Diode besitzt (blau-grünes Exzitationslicht) durchgeführt (FACScan™: Becton-Dickinson, Immunocytometry System; Heidelberg). Die Datenanalyse der erhobenen Daten wurde mit der Software für Durchflusszytometer CellQuest durchgeführt.

Das Durchflusszytometer muss mit Forward Scatter (FSC), Side Scatter (SSC) und mit zwei Fluorochrom Kanälen für FITC und PE ausgerüstet sein.

Während der Datenerhebung war sichergestellt, dass auf einem FSC/SSC Histogramm die Leukozytenpopulation in drei separate Populationen aufgetrennt wurde (Abb. 6).

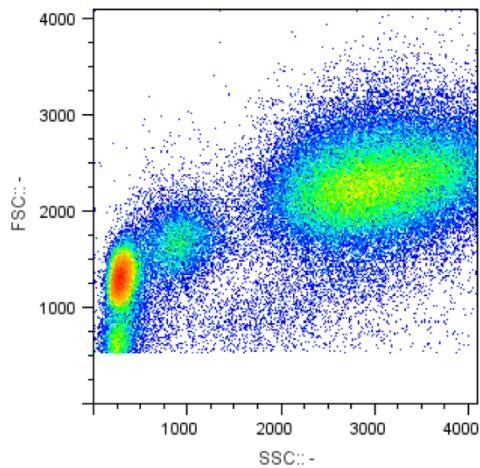


Abb. 6: Drei unterschiedliche Populationen (Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten) im FSC / SSC Diagramm.

Aufgrund der niedrigeren Aktivierung bei Medikamentenallergien sollte die Mindestzahl an gezählten Basophilen bei 300 oder mehr liegen.

Die Analyse bestand aus zwei Schritten:

1. Ein Fenster 1 (R1) wurde so gesetzt, dass die gesamte Basophilen Population  $CCR3^{pos}$  mit tiefem Side Scatter SSC low eingeschlossen wurde (Abb 7). Die Eosinophilen, welche auf der oberen rechten Seite (SSC high) liegen, wurden dabei ausgeschlossen.

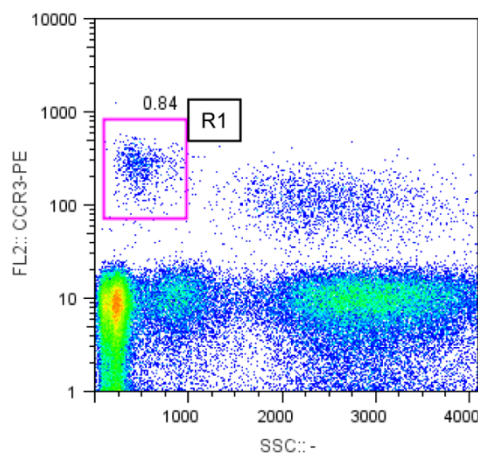


Abb. 7: Selektion von Basophilen. R1 repräsentiert die CCR3 positiven Basophilen.

2. Danach wurde der Prozentsatz der hell-fluoreszierenden (CD63-positiven) Zellen im Vergleich zu der Gesamtzahl aller basophilen Zellen, welche in Fenster R1 eingeschlossen wurden, berechnet. (Abb 8).

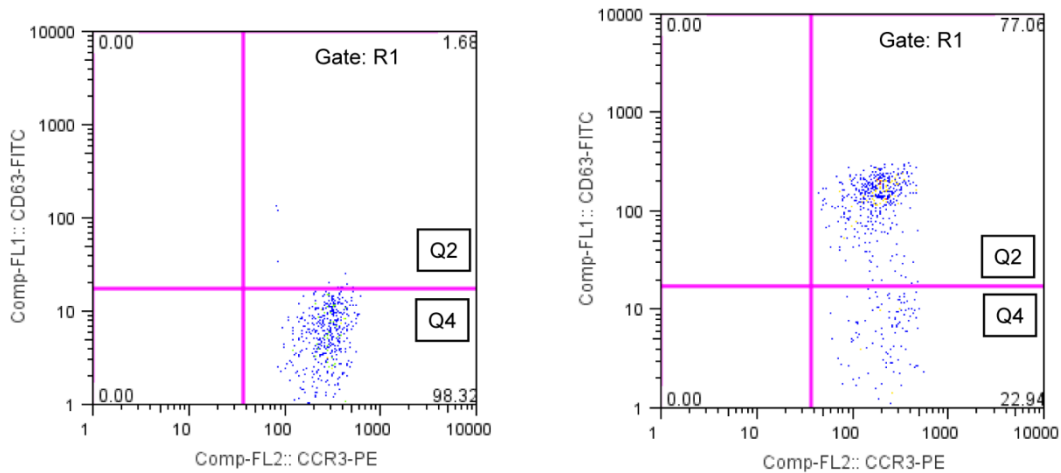


Abb. 8: Bestimmung des Prozentsatzes der hell-fluoreszierenden (CD63-positiven) Zellen (Q2) im Vergleich zu der Gesamtzahl aller Basophilen (Q2 und Q4).

Für den Flow2-CAST® wurden Receiver-Operating-Characteristic (ROC)–Kurven erstellt, um den optimalen Cut-Off-Wert für ein positives Testergebnis zu ermitteln. Die ROC-Analyse ist eine vielfach angewandte Methode zur Untersuchung und Etablierung neuer Testverfahren mit dem Ziel, optimale Cut-Off-Werte festzulegen, um möglichst hohe Sensitivitäten und Spezifitäten zu erlangen. Basierend auf verschiedenen Studien und Evaluationen mit unterschiedlichen Basophilenaktivierungstests sowie anhand von in dieser Studie, von der Firma Bühlmann erstellten ROC-Kurven wurde beim Flow2-CAST® für Antibiotika ein Wert von  $\geq 5\%$  und ein Stimulationsindex von  $\geq 2$  als Kriterium für ein positives Ergebnis empfohlen.

In der Abbildung 9 wird als Beispiel, die ROC-Kurve mit der ersten Cefuroxim Konzentration (Cef 1) gezeigt. Die ROC-Kurve wurde anhand der Daten von 10 Patienten und 12 Kontrollen, die in der vorliegenden Studie mit Cefuroxim getestet wurden, erstellt.

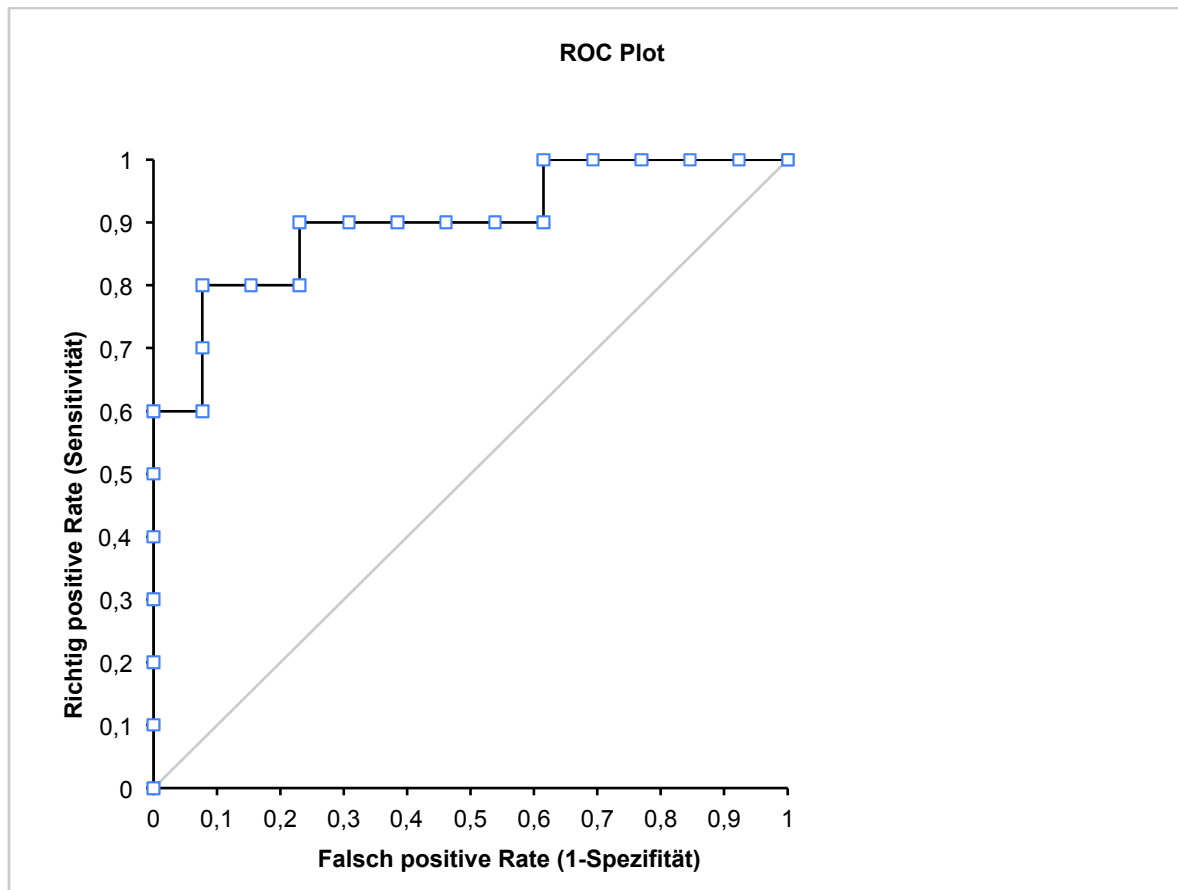


Abb. 9: ROC Analyse beim Flow2-CAST® mit der ersten Cefuroxim Konzentration. Ein Grenzwert von 5% Basophilenaktivierung für ein positives Testergebnis („Cut-Off“) ergab eine Sensitivität von 70% und eine Spezifität von 92%.

## 2.7 CAST®-2000 ELISA

### 2.7.1 Prinzip der Methode

Der CAST®-2000 ELISA (Bühlmann, Schönenbuch, Schweiz) erlaubt die quantitative Bestimmung von Sulfidoleukotrienen (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>), welche von isolierten Leukozyten nach Allergen-(Antigen-) Kontakt synthetisiert und ausgeschüttet werden.

Hierbei werden sedimentierte Leukozyten aus Patienten Blutproben gleichzeitig mit Interleukin 3 behandelt und mit Allergenen stimuliert. Im Anschluß an die Stimulation werden die freigesetzten Leukotriene in einem ELISA quantifiziert.

Es können drei Testabschnitte unterschieden werden:

*Isolation der Leukozyten:* Durch Zugabe von Dextran zu den Patientenproben wird die Viskosität des Blutes erhöht, wodurch sich die Erythrozyten bei der anschließenden 90-minütigen Sedimentation absetzen, während Leukozyten und Thrombozyten in der Plasma-Fraktion verbleiben. Diese Plasma-Fraktion wird vorsichtig in frische Teströhrchen überführt, wo die Leukozyten nach einer kurzen Zentrifugation isoliert werden. Nach der Zentrifugation

finden sich die Leukozyten im Niederschlag. Der Überstand enthält mehr als 90% der Thrombozyten und wird verworfen. Die isolierten Leukozyten werden anschließend in IL-3-haltigem Stimulationspuffer resuspendiert.

*Stimulation der Leukozyten:* Durch Zugabe des entsprechenden Allergens bzw. Antigens werden die Zellen stimuliert und so zur De-novo Synthese von Leukotrienen angeregt, die in den Zellüberstand abgegeben werden. Daneben wird für jede Probe eine basale Stimulation sowie zur Beurteilung der Vitalität der Zellen eine Stimulationskontrolle mit einem Anti-IgE-Rezeptor (FcεRI) Antikörper durchgeführt. Nach der 40-minütigen Stimulation bei 37°C wird aus den Stimulationsüberständen im nachfolgenden Enzymimmunoassay die Menge der synthetisierten und freigesetzten Leukotriene bestimmt.

*Leukotrienbestimmung:* Der ELISA-Test wird in beschichteten Mikrotiter-Platten durchgeführt. 16 Mikroküvetten pro Ansatz werden für die Standards und Kontrollen gebraucht. Je 2 Mikroküvetten pro Patient werden für die basale Stimulation und die Stimulationskontrolle benötigt. Standards, Stimulations-Überstände der Patientenproben und Kontrollen werden zusammen mit enzymmarkiertem (alkalische Phosphatase) Leukotrien D4 und spezifischen anti-sLT Antikörpern in der Mikrotiter-Platte inkubiert. Ungebundene Reaktionspartner werden in einem anschließenden Waschschrift entfernt.

Zugegebenes Substrat, p-Nitrophenylphosphat (pNPP), wird anschließend vom gebundenen Enzym zu einem farbigen Endprodukt umgesetzt. Die Reaktion wird nach 30 Minuten durch Zugabe der Stop-Lösung beendet und die Absorption in einem Mikrotiter-Platten-Photometer bei 405 nm gemessen.

### **2.7.2 Allergene**

Insgesamt wurden für jede Kontrolle acht Allergene benutzt (Penicillin G, Penicillin V, PPL, MDM, Ampicillin, Amoxicillin, Cefuroxim und Ciprofloxacin).

Das Blut der einzelnen Patienten wurde jeweils auf die angeschuldigten Antibiotikaallergene getestet.

Bei den Allergenen handelte es sich um Allergene der Firma Bühlmann, die in lyophilisierter Form geliefert und bei 2-8° gelagert wurden. Die Menge der einzelnen Lyophilisate variierte von Allergen zu Allergen und betrug von 12,5 µg bei PPL bis 2,5 mg bei Ampicillin. Bei letzterem wurden 2 unterschiedlichen Mengen pro Lyophilisat geliefert: eine für den CAST®-2000 ELISA mit 2,5 mg und eine für den Flow-CAST® und den Flow2-CAST® mit 625 µg. Für die restlichen Allergene wurde nur eine Menge für alle 3 Tests benötigt.

Es wurden je zwei verschiedene Konzentrationen getestet. Die Verdünnungsreihe wurde wie folgt durchgeführt:

Jedes Allergenröhrchen wurde mit 250 µl Stimulationspuffer versetzt (C2). Darauf folgend wurden je 50 µl von C2 mit 200 µl Stimulationspuffer gemischt (C3).

Bei Amoxicillin wurden die Bezeichnungen C1 und C2 anstatt C2 und C3 verwendet.



Eine Ausnahme stellte die Verdünnung von Ampicillin dar. Hierbei wurden auch 250 µl Stimulationspuffer zum Allergenröhrchen zugegeben (AmpC1) und anschließend 50 µl AmpC1 mit 150 µl Stimulationspuffer gemischt (AmpC2).

Die Konzentrationen nach Rekonstitution waren wie folgt:

- Penicillin G:	C2 = 4 mg/ml C3 = 0,8 mg/ml
- Penicillin V:	C2 = 4 mg/ml C3 = 0,8 mg/ml
- PPL:	C2 = 50 µg/ml C3 = 10 µg/ml
- MDM:	C2 = 1 mg/ml C3 = 0,2 mg/ml
- Ampicillin:	C1 = 10 mg/ml C2 = 2,5 mg/ml
- Amoxicillin:	C1 = 2,5 mg/ml C2 = 0,5 mg/ml
- Cefuroxim:	C2 = 2,5 mg/ml C3 = 0,5 mg/ml
- Ciprofloxacin:	C2 = 100 µg/ml C3 = 20 µg/ml

Daraus ergaben sich im CAST®-2000 folgende End-Konzentrationen (1:5):

- Penicillin G:	C2 = 0,8 mg/ml C3 = 0,16 mg/ml
- Penicillin V:	C2 = 0,8 mg/ml C3 = 0,16 mg/ml
- PPL:	C2 = 10 µg/ml C3 = 2 µg/ml
- MDM:	C2 = 0,2 mg/ml C3 = 0,04 mg/ml
- Ampicillin:	C1 = 2 mg/ml C2 = 0,4 mg/ml
- Amoxicillin:	C1 = 0,5 mg/ml C2 = 0,1 mg/ml
- Cefuroxim:	C2 = 0,5 mg/ml C3 = 0,1 mg/ml
- Ciprofloxacin:	C2 = 20 µg/ml C3 = 4 µg/ml

Die Allergenlösungen wurden nach Gebrauch verworfen und für jeden Versuch frisch hergestellt.

### 2.7.3 Versuchsablauf

Pro Reaktionsröhrchen wurden 300 µl Vollblut benötigt. Das entsprach eine Menge von 5,4 ml Vollblut bei den Kontrollen (1 NK, 1 PK und 8 Allergene mit jeweils 2 Konzentrationen). Bei den Patienten war die benötigte Menge Blut abhängig von den zu testenden Antibiotika.

#### *Zellstimulation*

1. Pro 1 ml eingesetzte Blutprobe wurden 0,25 ml Dextran-Lösung verwendet. Bei einem Beispiel von 4 ml Blutprobe wurde in ein Polypropylen-Röhrchen 1 ml Dextran-Lösung dazugegeben, leicht gemischt und bei 18-28°C 90 Minuten inkubiert.
2. Die obere Phase wurde in ein zweites Röhrchen übertragen und 15 Minuten bei 130 x g und 18-28° zentrifugiert.
3. Der Überstand wurde verworfen und mit 1 ml Stimulationspuffer pro 1 ml eingesetztem Blut resuspendiert.
4. Für jeden Patienten und Probanden wurden ausreichende Röhrchen verwendet und beschriftet: NK (Patient-Basalwert), PK (Patient-Kontrolle), A11 (Allergen 1, Konzentration 1), usw.
5. Zugabe von 75 µl Stimulationspuffer in das NK-Röhrchen.
6. Zugabe von 75 µl Stimulations-Kontrolle in das PK-Röhrchen.
7. Zugabe von je 75 µl Allergen in das entsprechende Röhrchen.
8. Je 300 µl Zellsuspension wurden dazugegeben.
9. Die Röhrchen wurden gemischt (Vortex), bedeckt und 40 min bei 37° inkubiert.
10. Anschließend wurden alle Röhrchen gemischt und 5 min bei 1000xg und 2-8° zentrifugiert. Den Zellüberstand aus jedem Röhrchen wurde sofort für den ELISA verwendet oder bei  $\leq 20^{\circ}\text{C}$  gelagert und innerhalb von 6 Monaten verbraucht.

#### *ELISA-Anleitung*

Für jeden neuen Testansatz wurde jeweils ein "Master"-Kalibrator rekonstituiert und eine neue Testkurve bestimmt. Rekonstituierte sowie verdünnte Kalibratoren und Kontrollen sind nicht haltbar und wurden unmittelbar verbraucht. Um eine vollständige Eichkurve zu erhalten, wurde die Verdünnungsreihe wie folgt vorbereitet:

- Drei Röhrchen wurden von S2 bis S4 beschriftet und 300 µl ELISA-Puffer wurden in die jeweiligen Röhrchen (von S2 bis S4) pipettiert.
- 100 µl rekonstituierter Kalibrator (S1, 3200 pg/ml) wurden ins Röhrchen S2 pipettiert und gemischt.
- 100 µl wurden von S2 nach S3 transferiert und gemischt. Danach wurden 100 µl von S3 nach S4 transferiert und gemischt.

Die entsprechenden Konzentrationen waren:

S1: 3200 pg/ml

S2: 800 pg/ml

S3: 200 pg/ml

S4: 50 pg/ml

S0: Nullkalibrator (nur ELISA-Puffer)

1. Eine ausreichende Anzahl Streifen zum Ansatz von Nullwert-Reagenz, Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben wurden verwendet.
2. Mikroküvetten wurden entleert und jeweils einmal mit mindestens 300  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen. Die Küvetten wurden durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig getrocknet.
3. 100  $\mu$ l Nullwert-Reagenz wurden im Doppelansatz in die Mikroküvetten A1 und A2 pipettiert.
4. Zugabe von 100  $\mu$ l ELISA-Puffer (Nullstandard, S0), im Doppelansatz in die Mikroküvetten B1 und B2.
5. Zugabe von 100  $\mu$ l Kalibrator S4 (50 pg/ml), im Doppelansatz in die Mikroküvetten C1 und C2.
6. Zugabe von 100  $\mu$ l Kalibrator S3 (200 pg/ml), im Doppelansatz in die Mikroküvetten D1 und D2.
7. Zugabe von 100  $\mu$ l Kalibrator S2 (800 pg/ml), im Doppelansatz in die Mikroküvetten E1 und E2.
8. Zugabe von 100  $\mu$ l Kalibrator S1 (3200 pg/ml), im Doppelansatz in die Mikroküvetten F1 und F2.
9. Je 100  $\mu$ l Kontrolle Tief wurden im Doppelansatz in die Mikroküvetten G1 und G2 zugegeben und je 100  $\mu$ l Kontrolle Hoch in die Mikroküvetten H1 und H2.
10. Zugabe von 100  $\mu$ l der jeweiligen Zellüberstände, im Doppelansatz, in die weiteren Mikroküvetten.
11. 50  $\mu$ l Enzym-Marker wurden zu allen Mikroküvetten zugegeben.
12. Zugabe von 50  $\mu$ l Antikörper-Lösung zu allen Küvetten.
13. Anschließend wurde die Mikrotiter-Platte mit einer Abdeckfolie bedeckt und zwei Stunden auf einem Platten-Schüttler bei 800-1000 rpm und 18-28°C inkubiert.
14. Danach wurden die Küvetten entleert und je dreimal mit mindestens 300  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen. Die Platte wurde sorgfältig getrocknet.
15. Zugabe von auf 18-28°C vorgewärmtes 200  $\mu$ l pNPP Substrat zu allen Mikroküvetten.

16. Darauf folgend wurde die Platte mit einer Abdeckfolie zugedeckt, vor direktem Licht geschützt und 30 min auf einem Platten-Schüttler bei 800-1000 rpm und 18-28°C inkubiert.
17. Zugabe von 50 µl Stopp-Lösung in alle Mikroküvetten um die Reaktion zu beenden und kurze Mischung auf dem Platten-Schüttler.
18. Anschließend wurde innerhalb von 30 min bei 405 nm die Absorption mit einem Mikrotiter-Platten-Photometer gemessen.

#### **2.7.4 Analyse mit Photometer**

Die Messung der optischen Dichte erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm. Zunächst wurde die Standardkurve berechnet. Hierbei wurde die Absorption für jeden Kalibrator, die Maximale Bindung (MB=S<sub>0</sub>; technisch maximale Absorption des ELISA Tests) und der Nullwert (Blank = NSB) gemessen, der Mittelwert aus den Doppelmessungen berechnet und der Blank-Mittelwert davon subtrahiert (= korrigierter Absorption Mittelwert). Dann wurde die Bindung der jeweiligen Kalibratorenpaare als Prozentsatz der maximalen Bindung berechnet, wobei die Blank-korrigierte Maximale Bindungs-Absorption als 100% gesetzt wurde.

Danach wurde der Bindungs-Prozentsatz (Vertikalachse) gegen die sLT-Konzentration in pg/ml (Horizontalachse) auf halblogarithmischem Papier aufgetragen und die entsprechende geglättete Funktion berechnet.

Anschließend wurde die Absorption jeder Probenmikroküvette gemessen, der Mittelwert aus den Doppelmessungen berechnet, der Blank-Mittelwert davon subtrahiert und die korrigierten Absorptions-Mittelwerte registriert.

Dann wurde die Bindung der jeweiligen Proben als Prozentsatz der maximalen Bindung berechnet.

Anhand dieses Bindungswertes und der oben erwähnten Kurve wurde die entsprechende sLT-Konzentration abgelesen (Abb. 10).

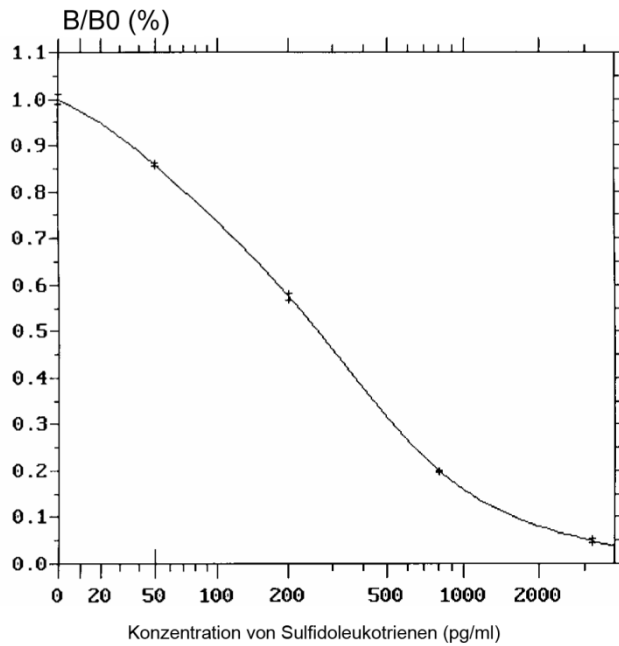


Abb. 10: Beispiel einer typischen Eichkurve beim CAST®-2000 ELISA

Aufgrund der geringeren Erhöhung der sLT Freisetzung durch Medikamentenallergene wurde durch die Herstellerfirma ein individueller technischer Grenzwert (CUT-OFF) für jedes einzelne Allergen ermittelt:

- Penicillin G: 50 pg/ml sLT
- Penicillin V: 40 pg/ml sLT
- PPL: 50 pg/ml sLT
- MDM: 40 pg/ml sLT
- Ampicillin: 70 pg/ml sLT
- Amoxicillin: 100 pg/ml sLT
- Cefuroxim: 40 pg/ml sLT
- Ciprofloxacin: 90 pg/ml sLT

Alle Angaben beziehen sich auf Nettokonzentrationen nach vorheriger Subtraktion des Basalwertes (negative Kontrolle). Werte höher als diese Konzentrationen wurden als positiv gewertet.

## 2.8 Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden anhand von Sensitivität, Spezifität und Effizienz dargestellt.

Die Sensitivität wurde definiert als

$$\frac{\text{Anzahl der richtig positiven}}{(\text{Anzahl der richtig positiven} + \text{Anzahl der falsch negativen})}$$

Als Spezifität wurde

$$\frac{\text{die Anzahl der richtig negativen}}{(\text{Anzahl der richtig negativen} + \text{Anzahl der falsch positiven})}$$

definiert.

Die Effizienz ist als

$$\frac{(\text{Sensitivität} + \text{Spezifität})}{2}$$

definiert worden.

Die Ergebnisse wurden anhand einer Vierfeldertafel statistisch verglichen. Ein p Wert von  $\leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der Patienten

Alle 21 untersuchten Patienten wiesen eine positive Anamnese bezüglich einer Typ-I-Antibiotika Allergie auf. 20 von den 21 einbezogenen Patienten zeigten positive Reaktionen im Hauttest. Bei 2 Patienten wurde ein positives Resultat in der Bestimmung der IgE-Antikörper nachgewiesen. Die Patientendaten mit der entsprechenden Diagnostik und mit der dazugehörigen Anamnese sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 6: Klinische Charakterisierung der Patienten.

Patient Nr./Geschlecht		Alter in Jahren	Anamnese, klinische Reaktion, Zeitpunkt der Reaktion (Jahr)	Positiver Hauttest	Spezifische IgE-Klasse
1	W	43	URT, AÖ auf PEN, 2000	BPN, CEF (IC)	2 PEN V
2	W	46	URT, AÖ, AA auf AX und PEN, 1997 und 2005	AMP, AX, CEF, CIPRO (Pr); PPL, MDM (IC)	2 AMP 3 AX
3	W	45	AÖ, AA, AS, andere auf CIPRO und PEN, 2005 und 2006	CIPRO (Pr); BPN, CEF (IC)	0
4	W	30	AS auf CEF, 2004	CEF (Pr); PPL, MDM (IC)	0
5	W	60	AS auf CEF, 2007	CEF, CIPRO (Pr)	0
6	W	46	URT, AS, AA auf CEF, 2006	CEF (Pr)	0
7	W	31	AÖ auf PEN, 1999	PPL, MDM (IC)	0
8	W	31	Andere auf PEN, 1995	PPL, MDM (IC)	0
9	W	50	URT, AS auf AX und PEN, 1991	AX (Pr); MDM (IC)	0
10	W	65	URT auf AX, 2007	CIPRO (Pr); PPL, MDM (IC)	0
11	W	31	AS auf AX und CEF, 2008	CEF, AX (Pr); CEF (IC)	0
12	M	64	URT, AE auf PEN, 1980-1999	PPL (Pr); CIPRO, PPL (IC)	0
13	W	57	URT auf AX und PEN, 2007	BPN, AX, CEF (Pr)	0
14	W	31	URT, AA auf AX,	n.a.	0

			CEF und PEN, Januar 2007		
15	W	26	URT, AÖ auf AX, 2007	PPL, MDM (IC)	0
16	W	66	URT, AA auf PEN, vor einigen Jahren	PPL (IC)	0
17	W	42	URT, AA, andere auf PEN, 1991	PPL, MDM, CIPRO (Pr); PPL, MDM (IC)	0
18	M	57	URT, AA auf PEN, n.b.	PPL, CEF (IC)	0
19	W	28	URT auf PEN, CEF und Mofloxacin, 2007	CEF (Pr); PPL, MDM (IC)	0
20	W	35	URT auf PEN und CEF, November 2006	BPN, CEF (IC)	0
21	W	56	URT auf AX, vor Jahren	MDM (IC)	0

W = weiblich, M = männlich, URT = Urtikaria, AÖ = Angioödem, AS = Anaphylaxie, AA = Exanthem, AE = Atemnot, Pr = Prick, IC = Intrakutan, n.b. = nicht bekannt.

### 3.2 Charakterisierung der Allergene

Insgesamt wurden in den Versuchsreihen 8 Allergene verwendet. Die Konzentrationen dieser Allergene wurden bezüglich deren Stimulationshemmung und unspezifischen Stimulation charakterisiert. Aufgrund dieser Evaluation wurden die höchstmöglichen Konzentrationen für die Zellstimulation verwendet. Die exakten Konzentrationen sind oben im Kapitel Material und Methoden dargestellt.

### 3.3 Basophilenaktivierung mit dem Flow-CAST®

#### 3.3.1 Definition eines positiven Ergebnisses

Die Ergebnisse der Messungen beim Flow-CAST® wurden nach Herstellerangaben als positiv gewertet, wenn der Prozentsatz der aktivierten Basophilen nach Inkubation mit dem jeweiligen Allergen gleich oder größer als 5% war. Zudem wurde ein sogenannter Stimulations-Index (SI) berücksichtigt: der Prozentsatz der aktivierten Basophilen sollte mindestens doppelt so hoch wie der Wert spontan stimulierter Basophile sein (SI:  $\geq 2$ ).

#### 3.3.2 Kriterien für die Auswertung

In den Messungen zeigten einige getestete Personen in der Negativkontrolle mehr als 5% spontan aktivierte Basophile. Ergebnisse mit Basalwerten von mehr als 15% aktivierten Basophilen wurden nicht ausgewertet. Beim Flow-CAST® waren es insgesamt 3 Patienten (Pat. Nr. 3, 15 und 18).



Zudem zeigten vereinzelte Patienten eine Stimulation von weniger als 10% basophile Granulozyten auf die positive Kontrolle mit anti FcεRI (Non-responder). Die Anzahl betrug beim Flow-CAST® 2 (Pat. Nr. 9 und 16).

Alle diese Ergebnisse wurden in der Auswertung nicht mitberücksichtigt.

### 3.3.3 Basophilenaktivierung

Insgesamt blieben 16 auswertbare Patienten nach Ausschluss der Non-responder und der Patienten, die eine basale Aktivierung von mehr als 15% aufwiesen. Die erhaltenen Einzel-Ergebnisse der Basophilenaktivierung beim Flow-CAST® sind in Abb. 11 und 12 sowie im Anhang in Tab. 2 dargestellt. Jeweils angezeigt ist die Aktivierung der basophilen Granulozyten in Prozent.

Insgesamt konnte bei 8 von den 16 analysierbaren Patienten ein positives Ergebnis nachgewiesen werden. Diese sind in einer entsprechenden Tabelle im Anhang mit grauer Farbe unterlegt. Bei den Patienten Nr. 2 und Nr. 4 ergaben sich auf Stimulation mit PPL in der Konzentration c3 positive Resultate (5,7% und 15,6% Basophilenaktivierung, SI = 2,1 und 6,2). Patient Nr. 5 wies auf beide Konzentrationen von Cefuroxim positive Ergebnisse auf (15% und 16,8%, SI = 4,2 und 4,7). Die Patienten Nr. 6, 11 und 14 reagierten auf Stimulation mit Cefuroxim c3 ebenso positiv (10,6%, SI = 2,7, 11,8%, SI = 2,2 und 15,4%, SI = 3,7). Nr. 10 wies auf PPL c2 (5,2%, SI = 3,1) und MDM c3 (20,6%, SI = 12,1) eine positive Basophilenaktivierung auf. Ein positives Ergebnis konnte auch beim Patienten Nr. 12 nach Stimulation mit MDM c3 (10,2%, SI = 2,6) gemessen werden.

In den Abbildungen 11 und 12 sind die erhaltenen Ergebnisse beim Flow-CAST® aller auswertbaren Patienten Diagramm mit den einzelnen Werten dargestellt.

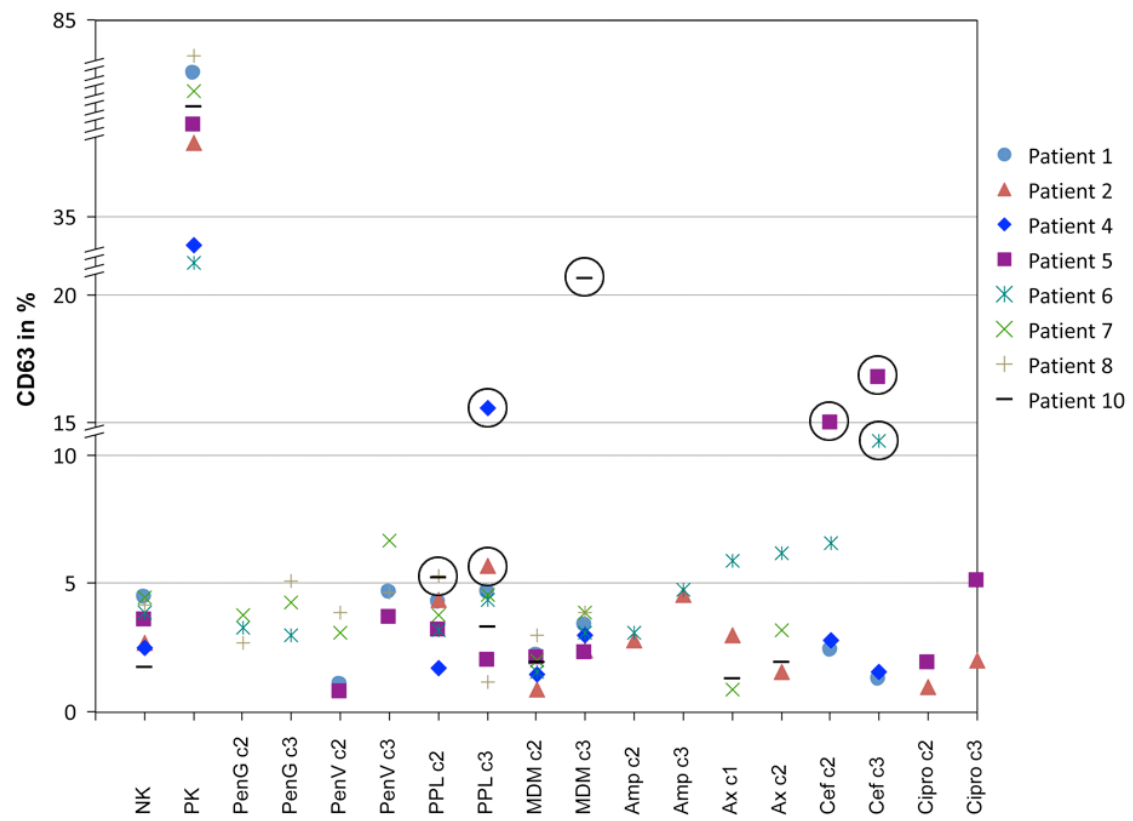


Abb. 11: Basophilenaktivierung mittels Flow-CAST®: Ergebnisse der Patienten 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 und 10. Die positiven Ergebnisse sind schwarz umkreist.

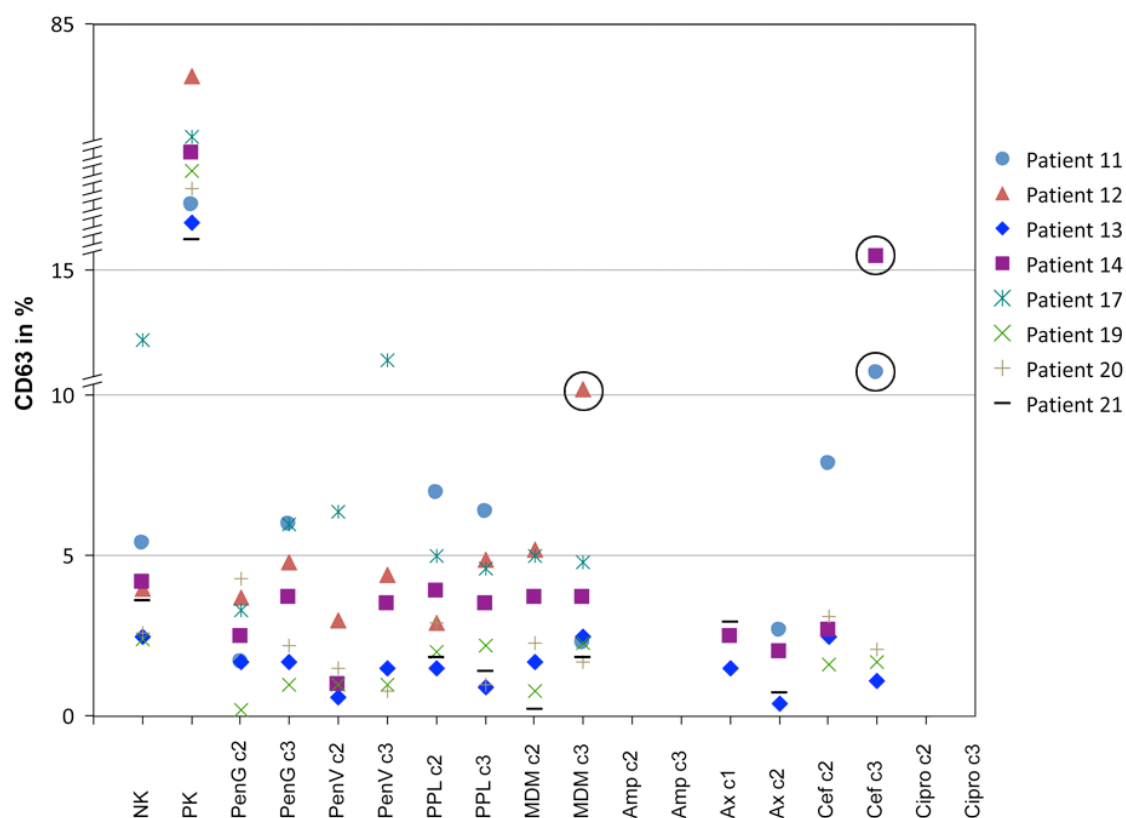


Abb. 12: Basophilenaktivierung mittels Flow-CAST®: Ergebnisse der Patienten 11, 12, 13, 14, 17, 19, 20 und 21. Die positiven Ergebnisse sind schwarz umkreist.

### 3.4 Basophilenaktivierung mittels Flow2-CAST®

#### 3.4.1 Definition eines positiven Ergebnisses

Beim Flow2-CAST® wurde ebenso ein Ergebnis als positiv betrachtet, wenn die Anzahl der aktivierten basophilen Granulozyten gleich oder größer als 5% war. Der Stimulationsindex  $\geq 2$  gegenüber der Negativkontrolle wurde in der Auswertung der Ergebnisse dieser Versuchsreihe ebenfalls einkalkuliert.

#### 3.4.2 Kriterien für die Auswertung

Beim Flow2-CAST® zeigte kein Patient eine basophile Aktivierung in der Negativkontrolle von mehr als 15%. Zwei der getesteten Patienten wiesen keine Stimulation auf antiFεRI in der Positivkontrolle auf (Pat. Nr. 9 und 16). In der Positivkontrolle mit fMLP reagierten diese Patienten mit mehr als 10% Aktivierung der Basophilen. Diese Patienten wurden aufgrund ihres Status als Non-responder von der Auswertung ausgeschlossen.

#### 3.4.3 Basophilenaktivierung

Es verblieben daraufhin 19 Patienten für die Auswertung des Flow2-CAST® nach Ausschluss der Non-responder. Die einzelnen Resultate der Basophilenaktivierung beim Flow2-CAST®

sind in Abbildung 13 und 14 sowie im Anhang in einer entsprechenden Tabelle dargelegt. Angezeigt ist die Aktivierung der basophilen Granulozyten in Prozent.

In der Versuchsreihe des Flow2-CAST® ließ sich bei 10 von den 19 Patienten in der Auswertung ein positives Ergebnis nachweisen. Patient Nr.1 zeigte in der höchsten Konzentration von Cefuroxim (c1) ein positives Ergebnis (5%, SI = 2,4). Die Patienten Nr. 5 und Nr. 11 wiesen auf alle drei Konzentrationen von Cefuroxim positive Resultate auf (Nr. 5: 17,6%, SI = 9,8, 20,7%, SI = 11,5, 21,2%, SI = 11,8 sowie Nr. 11: 100%, SI = 40, 65%, SI = 18,6, 17,8%, SI = 7,1). Beim Patienten Nr. 7 konnte ein deutlich positives Ergebnis bei PenG c3 beobachtet werden (83,9%, SI = 40). Patient Nr. 14 zeigte 2 positive Resultate: bei PenG c1 (5,1%, SI = 2,2) und Cefuroxim in der Verdünnung c2 (5,9%, SI = 2,6). Beim 15. Untersuchten konnte bei PenV in der höchsten Konzentration eine Positivität festgestellt werden (85,9%, SI = 8,7). Patient Nr. 17 wies auf PenG c1 und c2 sowie auf PenV1 ein positives Ergebnis auf (15%, SI = 8,3, 5,6%, SI = 3,1, 6,1%, SI = 3,4). Beim Patienten Nr. 18 ließen sich mehrere positive Resultate nachweisen und zwar nach Stimulation mit PenG c1 (10,9%, SI = 6,1), PenV c1 (8,3%, SI = 4,6), PPL c2 (5,3%, SI = 2,9), MDM c1 (17,1%, SI = 9,5), MDM c2 (5,5, SI = 3,1) und zwei Cefuroxim-Konzentrationen (8%, SI = 4,4 und 9,2%, SI = 5,1). Ebenso mehrere positive Ergebnisse zeigte Patient Nr. 19: auf PenG c1 (29,8%, SI = 11,9), PenG c2 (7,5%, SI = 3), auf alle drei Konzentrationen von PenV (25,4%, SI = 10,2, 6%, SI = 2,4 und 5,5%, SI = 2,2) und Cefuroxim (49,6%, SI = 19,8, 35,6%, SI = 14,2 und 9,7%, SI = 3,9) sowie auf MDM c1 (16,1%, SI = 6,4). Zuletzt konnten beim 20. Untersuchten positive Resultate nach Stimulation mit PenG c1 (12,8%, SI = 5,8), PenV c1 (11,1%, SI = 5), MDM c1 (6,6%, SI = 3) und Cefuroxim in den Konzentrationen c1 (55,8%, SI = 25,4) und c2 (8,8%, SI = 4) festgestellt werden.

Die Abbildungen 13 und 14 zeigen die erhaltenen Werte der Patienten beim Flow2-CAST® in graphischer Form.

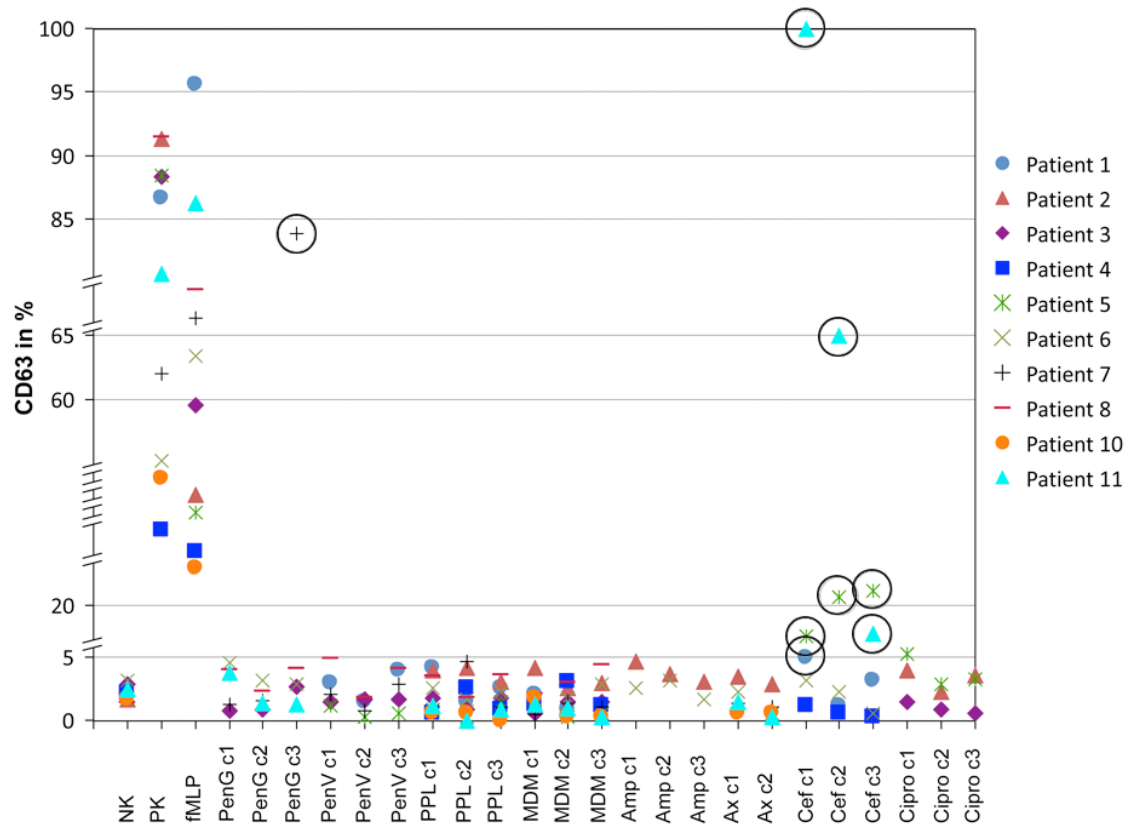


Abb. 13: Ergebnisse der Patienten 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 und 11 beim Flow2-CAST®. Die positiven Resultate sind schwarz umkreist.

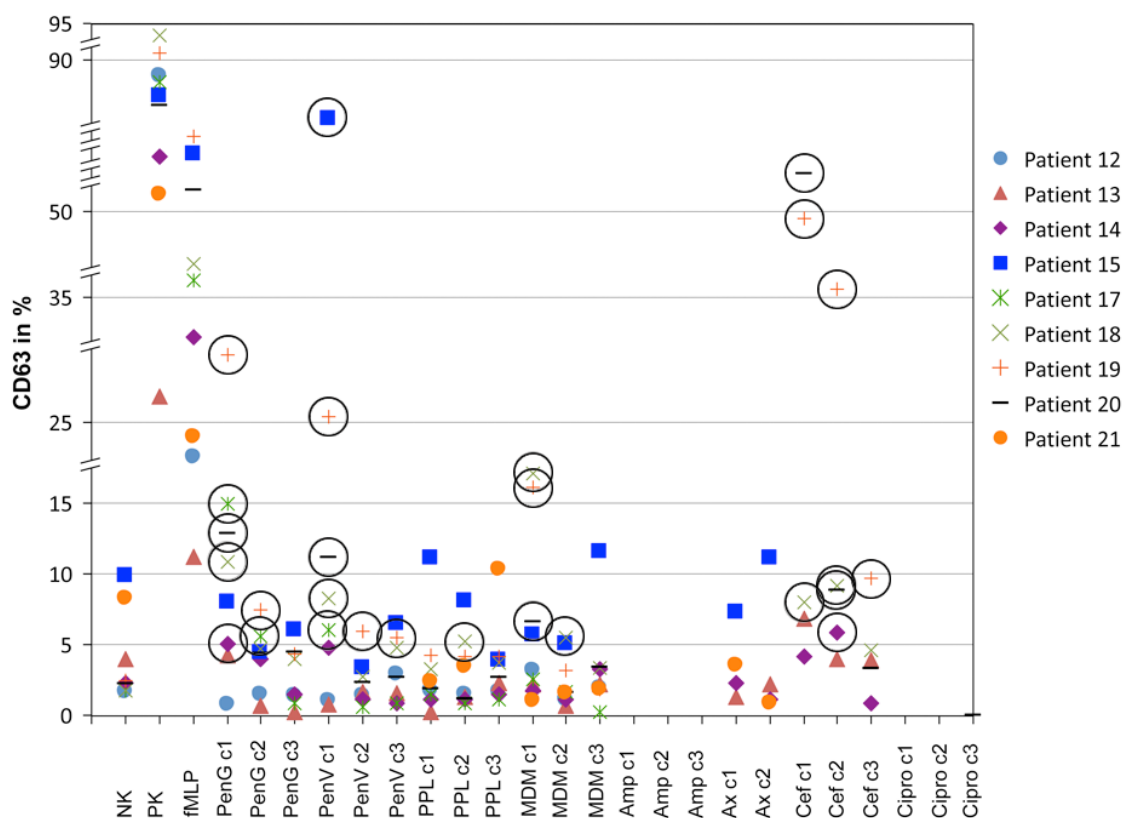


Abb. 14: Alle Ergebnisse der Patienten 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 21 und 21 beim Flow2-CAST®. Die positiven Ergebnisse sind mit schwarzen Kreisen dargestellt.

### 3.5 Messung der Leukotrienfreisetzung mittels CAST®-2000 ELISA

#### 3.5.1 Definition eines positiven Ergebnisses

Beim CAST®-2000 ELISA wurden die Ergebnisse anhand der Freisetzung von Sulfidoleukotrienen nach Allergen-Kontakt in pg/ml gemessen. Die endgültigen Konzentrationen wurden als Nettokonzentrationen nach vorheriger Subtraktion des Basalwertes (negative Kontrolle) berechnet. Von der Herstellerfirma wurde ein individueller technischer Grenzwert (CUT-OFF) für jedes einzelne Allergen ermittelt und festgelegt (siehe 2.6.4). Werte höher als diese Konzentrationen wurden als positiv gewertet.

#### 3.5.2 Kriterien für die Auswertung

Die Werte der Negativkontrollen sollten unter 200 pg/ml liegen. Insgesamt zeigten beim CAST®-2000 ELISA 2 Patienten Werte in der Negativkontrolle (basale Stimulation) von mehr als 200 pg/ml Sulfidoleukotriene. Diese Individuen wurden von der Auswertung ausgeschlossen (Pat. Nr. 3 und 15).

Als weiteres Kriterium sollte die positive Kontrolle der getesteten Patienten höher als 200 pg/ml sein. Beim CAST®-2000 ELISA war dies bei einem Patienten nicht der Fall. Dieser wurde ebenfalls von der Auswertung ausgeschlossen (Pat. Nr. 20).

### 3.5.3 Ergebnisse

Die Einzel-Ergebnisse der CAST®-2000 ELISA Versuchsreihe der 18 analysierbaren Patienten sind im Anhang sowie in den Abbildungen 15 und 16 dargestellt. Angezeigt wird die Leukotrienkonzentration in pg/ml.

Beim CAST®-2000 ELISA konnte nur bei 3 Patienten ein positives Ergebnis nachgewiesen werden. Patient Nr. 2 zeigte bei Ampicillin in der Konzentration c2 eine Positivität (72,7 pg/ml). Beim Patienten Nr. 5 wurden bei beiden Verdünnungen von Cefuroxim positive Resultate gemessen (434,4 pg/ml und 399 pg/ml). Beim 18. Untersuchten zeigte sich bei der höchsten Cefuroxim-Konzentration (c2) ein positives Ergebnis (41,6 pg/ml). Die Abbildungen 15 und 16 zeigen eine graphische Darstellung der einzelnen Messwerte in der Versuchsreihe.

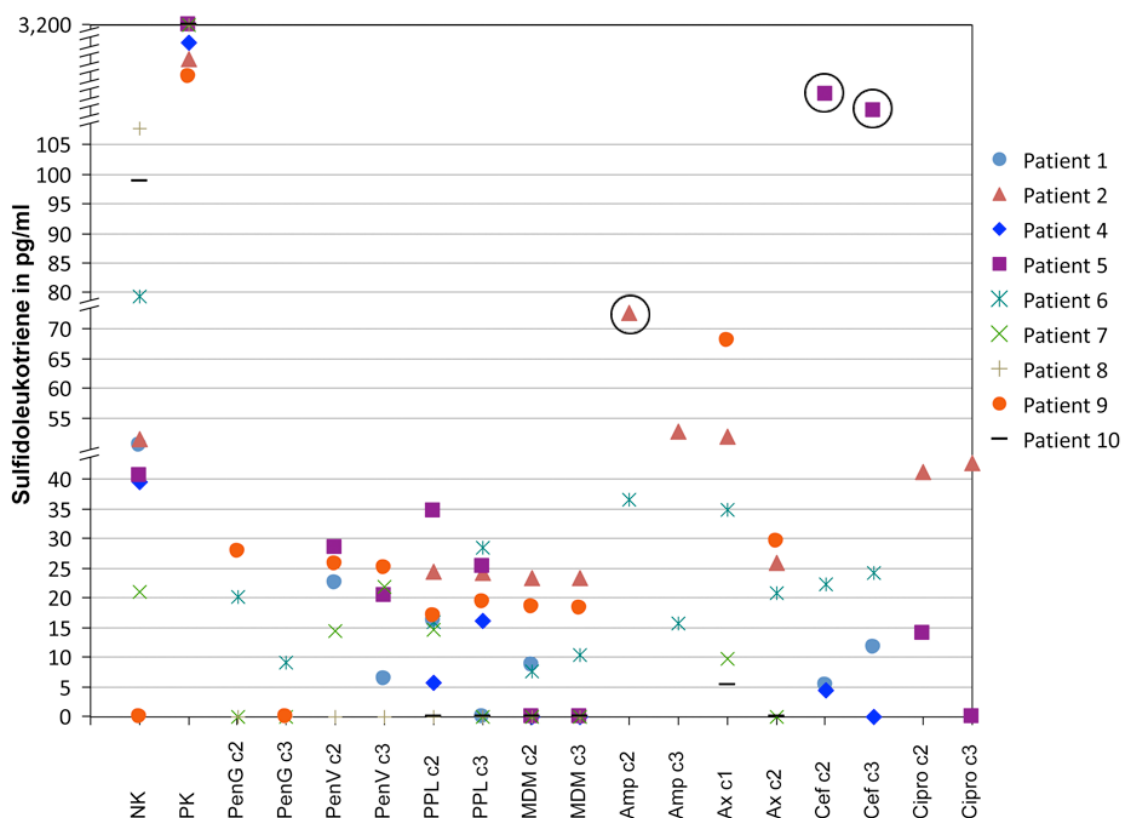


Abb. 15: Messwerte der Patienten 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 und 10 beim CAST®-2000 ELISA. Die positiven Resultate sind schwarz umkreist.

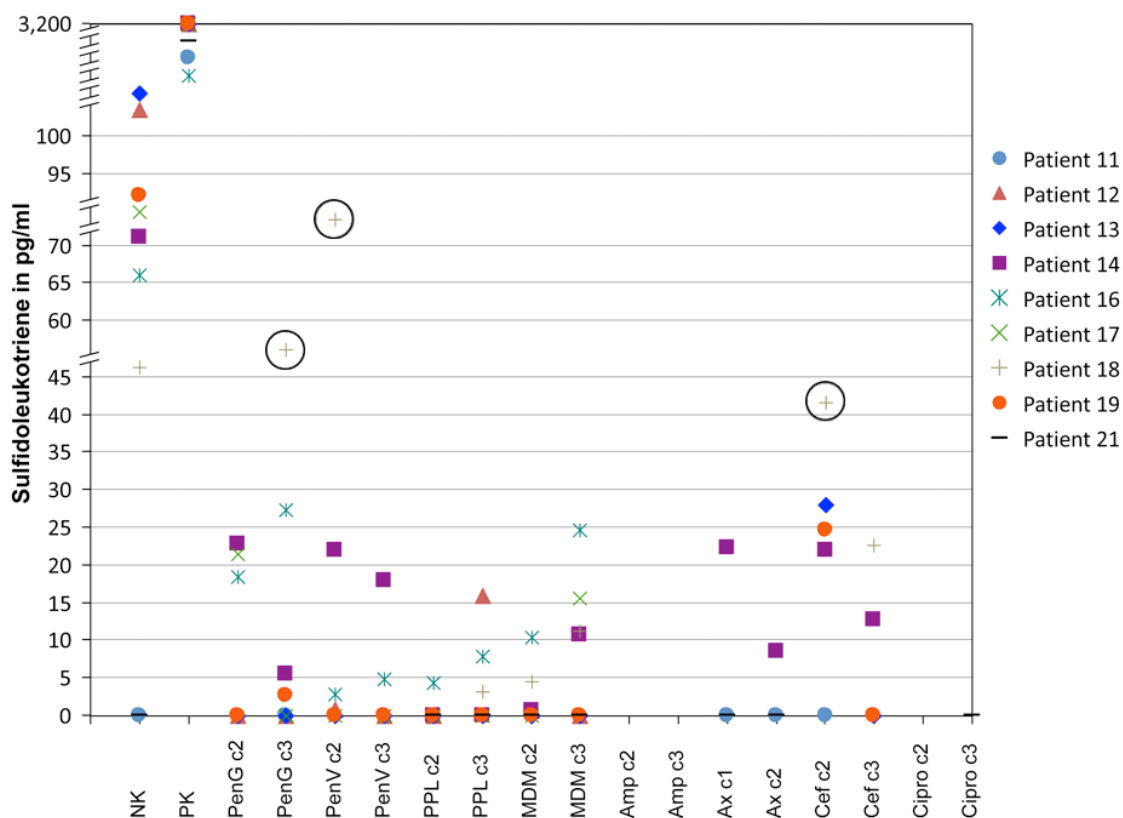


Abb. 16: Messwerte der Patienten 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19 und 21 beim CAST®-2000 ELISA. Die positiven Ergebnisse sind schwarz umkreist.

In der nachfolgenden Tabelle ist eine Zusammenfassung der einzelnen positiven Ergebnisse der in dieser Arbeit untersuchten Testverfahren dargestellt. Präsentiert werden jeweils alle positiven Ergebnisse der Patienten in den jeweiligen Antibiotika Konzentrationen.

Tab. 7: Anzahl der positiven Testergebnisse der Patienten. Dargestellt wird jeweils die Anzahl der positiven Reaktionen in Abhängigkeit vom Testverfahren bei den jeweiligen Antibiotika. N.g. = nicht getestet.

	Flow-CAST®	Flow2-CAST®	CAST®-2000 ELISA
Pen G c1	n.g.	5	n.g.
Pen G c2	0	2	0
Pen G c3	0	1	1
Pen V c1	n.g.	5	n.g.
Pen V c2	0	1	1
Pen V c3	0	1	0
PPL c1	n.g.	0	n.g.
PPL c2	1	1	0
PPL c3	2	0	0
MDM c1	n.g.	3	n.g.
MDM c2	0	1	0
MDM c3	2	0	0



Amp c1	n.g.	0	n.g.
Amp c2	0	0	1
Amp c3	0	0	0
Ax c1	0	0	0
Ax c2	0	0	0
Cef c1	n.g.	6	n.g.
Cef c2	1	6	2
Cef c3	4	3	1
Cipro c1	n.g.	0	n.g.
Cipro c2	0	0	0
Cipro c3	0	0	0

### 3.6 Kontrollpersonen

#### 3.6.1 Klinische Charakterisierung

12 gesunde Probanden ohne Hinweise auf eine Antibiotikaallergie in der Vorgeschichte wurden als Kontrollen untersucht.

#### 3.6.2 Basophilenaktivierung mittels Flow-CAST®

Hier wurde ebenso ein Ergebnis als positiv gewertet wenn das Resultat mehr als 5% Basophilenaktivierung ergab und der Stimulationsindex  $\geq 2$  war.

Eine Kontrollperson wies beim Flow-CAST® eine spontane Basophilenaktivierung in der Negativkontrolle von mehr als 15% basophile Granulozyten auf. Diese Person wurde von der Auswertung ausgeschlossen. Die Einzel-Ergebnisse der 11 verbliebenen Kontrollen sind jeweils in prozentualer Aktivierung der Basophilen im Anhang dargestellt.

10 der 11 ausgewerteten Kontrollen zeigten negative Resultate beim Flow-CAST®. Die Kontrollperson Nr.3 wies nach Stimulation mit Amoxicillin in der Konzentration c2 ein positives Ergebnis (8,4%, SI = 3) auf. Tabelle 8 zeigt die Mittelwerte der Messungen in den jeweiligen Konzentrationen bei den Kontrollpersonen beim Flow®-CAST.

Tab. 8: Mittelwerte der Basophilenaktivierung in Prozent bei den Kontrollpersonen beim Flow®-CAST.

	Mittelwerte der Basophilenaktivierung bei Kontrollpersonen beim Flow®-CAST
Negativkontrolle	3,3%
Positivkontrolle	45%
Pen G c2	2,2%
Pen G c3	3%
Pen V c2	2,1%
Pen V c3	3,2%
PPL c2	3,5%
PPL c3	3,7%
MDM c2	2,4%
MDM c3	3,3%

Amp c2	2,1%
Amp c3	2,9%
Ax c1	3,9%
Ax c2	2,4%
Cef c2	2,2%
Cef c3	2,5%
Cipro c2	1,7%
Cipro c3	2,7%

### 3.6.3 Basophilenaktivierung mittels Flow2-CAST®

Die Kriterien für ein positives Ergebnis waren ebenfalls eine Basophilenaktivierung von mehr als 5% und ein Stimulationsindex von  $\geq 2$ .

Alle Individuen erfüllten die Bedingungen für die Auswertung. Die einzelnen Ergebnisse der 12 Kontrollpersonen beim Flow2-CAST® sind im Anhang dargelegt.

Beim Flow2-CAST® zeigten 9 der 12 Kontrollen negative Ergebnisse. Die Kontrollpersonen Nr.7 und 10 wiesen nach Stimulation mit Cefuroxim ein positives Ergebnis auf und zwar die erste auf c2 (5,2%, SI = 2,3) und die zweite auf c3 (5,6%, SI = 2,3). Die 12. Kontrollperson wies nach Stimulation mit PenG c1 und PenV c1 positive Werte auf. (6,6%, SI = 2,6 und 7,3%, SI = 2,9).

Anschließend sind in Tabelle die Mittelwerte der Messungen in den jeweiligen Konzentrationen bei den Kontrollpersonen beim Flow2-CAST® dargestellt.

Tab. 9: Mittelwerte der Basophilenaktivierung in Prozent bei den Kontrollpersonen beim Flow2-CAST®

	Mittelwerte der Basophilenaktivierung bei Kontrollpersonen beim Flow2-CAST®
Negativkontrolle	1,8%
Positivkontrolle	60%
fMLP	53,7%
Pen G c1	2,3%
Pen G c2	1,1%
Pen G c3	1,3%
Pen V c1	1,8%
Pen V c2	1,3%
Pen V c3	1,2%
PPL c1	1,6%
PPL c2	1,8%
PPL c3	1,6%
MDM c1	1,6%
MDM c2	1,5%
MDM c3	1,3%
Amp c1	1,3%
Amp c2	1,5%
Amp c3	1,5%

Ax c1	1,9%
Ax c2	1,8%
Cef c1	1,9%
Cef c2	2,5%
Cef c3	2,3%
Cipro c1	2,1%
Cipro c2	2,1%
Cipro c3	2,1%

### 3.6.4 Leukotrienfreisetzung mittels CAST®-2000 ELISA

Beim CAST®-2000 ELISA sollte das Ergebnis der positiven Kontrolle der getesteten Individuen höher als 200 pg/ml sein. Ein individueller technischer Grenzwert (CUT-OFF) wurde von der Firma Bühlmann für jedes einzelne Allergen ermittelt und festgelegt. Werte höher als diese Konzentrationen wurden als positiv gewertet. Von den 12 untersuchten Kontrollpersonen zeigte eine davon Werte außerhalb des Erwartungsbereiches. Diese Person wurde von der Auswertung ausgeschlossen.

Die Ergebnisse der 11 auswertbaren Kontrollen sind im Anhang dargestellt. Angezeigt wird die Leukotrienkonzentration in pg/ml.

Beim CAST®-2000 ELISA zeigten 8 von 11 auswertbaren Kontrollpersonen negative Resultate. Bei der Kontrolle Nr. 1 waren bis auf zwei Werte (Ciprofloxacin c3 und Amoxicillin c3) alle anderen Werte positiv (PG c2 = 50,3 pg/ml, PG c3 = 61,3 pg/ml, PV c2 = 50 pg/ml, PV c3 = 59,3 pg/ml, PPL c2 = 73,2 pg/ml, PPL c3 = 70,6 pg/ml, MDM c2 = 42,1 pg/ml, MDM c3 = 24,2 pg/ml, Amp c2 = 79,2 pg/ml, Amp c3 = 52,3 pg/ml, Ax c2 = 48 pg/ml, Cef c2 = 49,2 pg/ml, Cef c3 = 58,6 pg/ml, Cipro c2 = 76,7 pg/ml). Die 3. Kontrollperson wies auf Cefuroxim positive Resultate auf (44 pg/ml und 48,2 pg/ml). Die Kontrolle Nr. 4 zeigte bei den Konzentrationen Cefuroxim c2 (49,2 pg/ml) und c3 (58,6 pg/ml) sowie MDM c2 (42,1 pg/ml) und Ampicillin c2 (79,2 pg/ml) positive Ergebnisse.

In der Tabelle 10 sind anschließend die Mittelwerte der Messungen der Kontrollpersonen beim CAST®-2000 ELISA dargestellt.

Tab. 10: Leukotrienfreisetzung beim CAST®-2000 ELISA bei den Kontrollen als Mittelwerte. Angezeigt wird die Leukotrienkonzentration in pg/ml.

	<b>Mittelwerte der Leukotrienfreisetzung bei Kontrollpersonen beim CAST®-2000 ELISA</b>
Negativkontrolle	61,1
Positivkontrolle	2926
Pen G c2	9,1
Pen G c3	11,1
Pen V c2	15,9
Pen V c3	14,8
PPL c2	14,7
PPL c3	13,8

MDM c2	20,2
MDM c3	14,5
Amp c2	51,8
Amp c3	27,8
Ax c1	36
Ax c2	22
Cef c2	25,9
Cef c3	24,9
Cipro c2	39,2
Cipro c3	27,6

Nachstehend sind zusammenfassend in einer Tabelle die positiven Ergebnisse der in dieser Arbeit untersuchten Testverfahren dargestellt. Präsentiert werden jeweils die positiven Ergebnisse der Kontrollen in den jeweiligen Antibiotika Konzentrationen.

Tabelle 11: Anzahl der positiven Testergebnisse der Kontrollen. Dargestellt wird jeweils die Anzahl der positiven Reaktionen in Abhängigkeit vom Testverfahren bei den jeweiligen Antibiotika. N.g. = nicht getestet.

	Flow-CAST®	Flow2-CAST®	CAST®-2000 ELISA
Pen G c1	n.g.	1	n.g.
Pen G c2	0	0	1
Pen G c3	0	0	1
Pen V c1	n.g.	1	n.g.
Pen V c2	0	0	1
Pen V c3	0	0	1
PPL c1	n.g.	0	n.g.
PPL c2	0	0	1
PPL c3	0	0	1
MDM c1	n.g.	0	n.g.
MDM c2	0	0	2
MDM c3	0	0	1
Amp c1	n.g.	0	n.g.
Amp c2	0	0	2
Amp c3	0	0	1
Ax c1	1	0	0
Ax c2	0	0	1
Cef c1	n.g.	0	n.g.
Cef c2	0	1	3
Cef c3	0	1	3
Cipro c1	n.g.	0	n.g.
Cipro c2	0	0	1
Cipro c3	0	0	0

## **3.7 Ergebnisse der statistischen Auswertung**

### **3.7.1 Sensitivität**

Beim Flow-CAST® konnte in unserer Studie eine Sensitivität von 50% nachgewiesen werden, 8 von 16 Patienten zeigten positive Ergebnisse.

Beim Flow2-CAST® betrug die Sensitivität 53%. Hierbei wurde ein positives Ergebnis bei 10 von den 19 analysierbaren Patienten demonstriert.

Die Sensitivität beim CAST®-2000 ELISA wurde bei 3 positiven Ergebnissen von 18 auswertbaren Patienten mit 17% errechnet.

Zwischen beiden Basophilenaktivierungstests zeigte sich kein statistischer signifikanter Unterschied bzgl. der Sensitivität; im Vergleich zu dem Leukotrienfreisetzungstest konnte eine signifikante Differenz ermittelt werden.

### **3.7.2 Spezifität**

Beim Flow-CAST® ergab sich eine Spezifität von 91% bei 10 negativen Ergebnissen von 11 Kontrollpersonen.

Die Spezifität betrug beim Flow2-CAST® 75%. Hierbei zeigten 9 von 12 Kontrollpersonen negative Resultate.

Beim CAST®-2000 ELISA wurde eine Spezifität von 73% berechnet, nachdem 8 von 11 analysierbaren Kontrollpersonen ein negatives Ergebnis aufwiesen.

Die Spezifität war beim Flow-CAST® signifikant höher als bei den anderen Testmethoden.

### **3.7.3 Effizienz**

Die Effizienz betrug beim Flow-CAST® 71%. Dieser Wert war signifikant höher als beim Flow2-CAST® und beim CAST®-2000 ELISA mit Werten von jeweils 64% und 45%.

## **3.8 Vergleich der Ergebnisse der Hauttests mit den In-vitro-Tests**

Zudem erfolgte in der vorliegenden Arbeit der Vergleich der Ergebnisse der Hauttests mit den durchgeführten Basophilenaktivierungs- und Leukotrienfreisetzungstests.

### **3.8.1 Flow-CAST®**

Beim Flow-CAST® wurde eine Übereinstimmung zwischen den positiven Ergebnissen des Basophilenaktivierungstests (insgesamt 8 positive Ergebnisse) und der Hauttestung (insgesamt 15 positive Ergebnisse bei den 16 auswertbaren Patienten) in sechs Fällen festgestellt. Drei Patienten, die beim Flow-CAST® positive Ergebnisse auf PPL aufwiesen, zeigten ebenso im Intrakutan-Test eine positive Reaktion auf PPL. Zwei Patienten, die im Flow-CAST® auf Cefuroxim positiv reagierten, hatten zugleich im Prick-Test ein positives

Resultat auf Cefuroxim. Ein Patient wies sowohl im Prick- als auch im Intrakutan-Test ein positives Ergebnis auf, was sich auch beim Flow-CAST® als positives Ergebnis widerspiegelte.

In einem Fall zeigte sich eine Diskrepanz zwischen Hauttestung und Basophilenaktivierungstest: Patient Nr.12 wies beim Flow-CAST® ein positives Ergebnis auf MDM auf, im Prick- und Intrakutan-Test war jedoch PPL positiv. Bei einem Patienten mit einem positiven Ergebnis auf Cefuroxim beim Flow-CAST® war die Hauttestung nicht auswertbar.

### 3.8.2 Flow2-CAST®

Beim Flow2-CAST® fand sich eine Kongruenz zwischen Hauttests (insgesamt 18 positive Ergebnisse) und Basophilenaktivierungstest bei sechs von den zehn In-vitro positiv getesteten Patienten. Bei allen sechs Patienten war bei beiden Untersuchungen Cefuroxim positiv. Bei je einem dieser sechs Patienten war jeweils einmal PPL, MDM und Penicillin bei beiden Testformen positiv. Drei der Patienten reagierten in der Hauttestung positiv auf PPL und MDM, beim Flow2-CAST® jedoch auf PenV oder PenG.

Einer der Patienten wies positive Ergebnisse beim Flow2-CAST® bei PenG und Cefuroxim auf, die Hauttestung war allerdings nicht auswertbar.

### 3.8.3 CAST®-2000 ELISA

Beim CAST®-2000 ELISA fand sich eine Kongruenz zwischen Hauttests (insgesamt 17 positive Ergebnisse) und In-vitro Test bei allen 3 In-vitro positiv getesteten Patienten und zwar einmal bei Ampicillin und zweimal auf Cefuroxim. Bei einem dieser Patienten war jedoch zusätzlich beim CAST®-2000 ELISA PenG und PenV positiv; beim Intrakutan-Test zeigte sich ein positives Ergebnis auf PPL.

## 3.9 Vergleich der Ergebnisse der In-vitro-Tests mit den angeschuldigten Auslösern in vivo

### 3.9.1 Flow-CAST®

Die positiven Ergebnisse beim Flow-CAST® wurden mit den angeschuldigten Antibiotika in vivo verglichen. Es zeigte sich eine Übereinstimmung in 7 von 8 Fällen. Diese sind detailliert in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Vergleich der Ergebnisse im Flow-CAST® mit den angeschuldigten Auslösern in vivo. Eine Übereinstimmung ist grau hinterlegt.

Pat. Nr.	Positive Antibiotika im Flow-CAST®	Angeschuldigte Antibiotika
2	PPL	AX und PEN
4	PPL	CEF
5	CEF	CEF
6	CEF	CEF

10	PPL und MDM	AX
11	CEF	AX und CEF
12	MDM	PEN
14	CEF	AX, CEF und PEN

### 3.9.2 Flow2-CAST®

Beim Vergleich der positiv erhaltenen Ergebnisse im Flow2-CAST® mit den angeschuldigten Antibiotika in der Anamnese fand sich eine Übereinstimmung in 8 von 10 Fällen. Die Patienten 5, 7, 11, 14, 17, 18, 19 und 20 zeigten positive Ergebnisse im Flow2-CAST® bei den gleichen Antibiotika, die anamnestisch angeschuldigt waren. Lediglich bei Pat. Nr.1 und Pat. Nr. 15 zeigte sich keine Kongruenz. Die Tabelle 10 zeigt eine Übersicht des Vergleichs.

Tab. 10: Vergleich der Ergebnisse im Flow2-CAST® mit den angeschuldigten Auslösern in vivo. Eine Übereinstimmung ist grau hinterlegt.

Pat. Nr.	Positive Antibiotika im Flow2-CAST®	Angeschuldigte Antibiotika
1	CEF	PEN
5	CEF	CEF
7	PEN G	PEN
11	CEF	AX und CEF
14	PEN G und CEF	AX, CEF und PEN
15	PEN V	AX
17	PEN G und V	PEN
18	PEN G, PEN V, PPL, MDM und CEF	PEN
19	PEN G, PEN V, CEF und MDM	PEN, CEF und Moxifloxacin
20	PEN G, PEN V und CEF	PEN und CEF

### 3.9.3 CAST®-2000 ELISA

Der Vergleich der positiven Ergebnisse vom CAST®-2000 ELISA mit den angeschuldigten Medikamenten in vivo zeigte eine Kongruenz bei einem Patienten: Pat. Nr. 5 reagierte anaphylaktisch auf Cefuroxim und im Test zeigten sich positive Ergebnisse bei beiden Konzentrationen von Cefuroxim. Die beiden anderen positiven Resultate beim CAST®-2000 ELISA zeigten keine Übereinstimmung: Pat. Nr. 2 reagierte auf Amoxicillin und Penicillin in der Anamnese, im In-Vitro-Test zeigte sich ein positives Ergebnis auf Ampicillin in der Konzentration c2 und Pat. Nr. 18 reagierte auf Penicillin anamnestisch und im CAST®-2000 ELISA zeigte sich ein positives Ergebnis auf Cefuroxim bei der 2. Konzentration.

Bei drei Patienten zeigte sich eine Kongruenz der positiven Ergebnisse der beiden BAT und der angeschuldigten Antibiotika in der Anamnese, nämlich bei Pat. 5, 11 und 14. Bei Pat. Nr. 5 zeigte sich zusätzlich auch ein positives Ergebnis im Leukotrien-Freisetzungstest, so dass bei diesem Patienten das angeschuldigte Antibiotikum Cefuroxim in allen 3 untersuchten Tests positiv war.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die In-vitro-Basophilenaktivierung bei 21 Patienten mit einer Typ-I Antibiotikaallergie anhand eines neu entwickelten Tests, dem Flow2-CAST®, und eines etablierten Tests, dem Flow-CAST® untersucht. Zudem wurde die Leukotrienfreisetzung mittels CAST®-2000 ELISA als weitere diagnostische In-vitro-Methode bei dem gleichen Patientenkollektiv gemessen. Darüber hinaus wurden 12 gesunde Probanden als Kontrollgruppe analysiert.

Beim Flow-CAST® zeigten 8 von 16 auswertbaren Patienten positive Ergebnisse, mit einer resultierenden Sensitivität von 50%. Beim Flow2-CAST® betrug die Sensitivität 53%. Hierbei wurde ein positives Ergebnis bei 10 von den 19 analysierbaren Patienten gezeigt. Die Sensitivität beim CAST®-2000 ELISA wurde bei 3 positiven Ergebnissen von 18 auswertbaren Patienten mit 17% errechnet.

Beim Flow-CAST® ergab sich eine Spezifität von 91% bei 10 negativen Ergebnissen von 11 Kontrollpersonen. Die Spezifität betrug beim Flow2-CAST® 75%. Hierbei zeigten 9 von 12 Kontrollpersonen negative Resultate. Beim CAST®-2000 ELISA wurde eine Spezifität von 73% berechnet nachdem 8 von 11 analysierbaren Kontrollpersonen ein negatives Ergebnis aufwiesen.

### 4.1. Bedeutung von Hauttests und Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper

Die untersuchten Tests dieser Arbeit wurden an Patienten mit einer positiven Anamnese einer Soforttyp-Allergie gegen Antibiotika und positiven Hauttests durchgeführt. Es ist bekannt, dass mehr als die Hälfte der Patienten mit positiver Anamnese bzgl. einer Penicillin Soforttyp Allergie und negativem Hauttest sowie fehlendem Nachweis spezifischer IgE-Antikörper eine Reaktion nach kontrollierter Gabe des angeschuldigten Medikamentes entwickeln können. In einer spanischen Studie wurden 330 Patienten mit positiver Vorgeschichte bezüglich einer Penicillinallergie vom Typ I mit negativem Hauttest und fehlendem spezifischem IgE untersucht. Diese Studie zeigte, dass trotz negativen Haut- und Serum-IgE-Tests eine sofortige Reaktion auf Penicillin auftreten kann. Insgesamt zeigten 89 (27%) Patienten im Hauttest und CAP-FEIA negative Ergebnisse und wurden aus diesem Grund unter kontrollierten Bedingungen mit dem Medikament oral provoziert. Von diesen 89 Patienten entwickelten 49 (55%) eine sofortige Reaktion und wurden daher als allergisch eingestuft [75].

### 4.2 Bedeutung der Leukotrienmessung

Beim CAST®-2000 ELISA erfolgt die quantitative Bestimmung von Sulfidoleukotrienen (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>), welche von isolierten Leukozyten nach Allergen-(Antigen-) Kontakt synthetisiert und ausgeschüttet werden. Dieses Verfahren wurde erstmals etwa vor ca. 19 Jahren von de Weck A.L. et al. vorgeschlagen und war im Jahr 1993, unter den Namen CAST® (Bühlmann Laboratories, Allschwil, Schweiz), im Handel erhältlich [15-17, 31]. Die



Mehrheit der Studien in der Literatur wurde mit diesem Test durchgeführt. Einige andere Autoren verwendeten unterschiedliche im Handel erhältliche anti-Sulfidoleukotriene (SLT) Antikörper wie (z. B. Anti-LTC<sub>4</sub>, Cayman Laboratories), die in der Regel eine eingeschränktere Spezifität aufwiesen [19].

2009 wurde von de Weck et al. anhand einer multizentrischen Studie mit insgesamt 10 Zentren in Europa die Leukotrienfreisetzung an insgesamt 181 Patienten mit einer positiven Anamnese einer Soforttyp-Reaktion auf Betalaktame bewertet. Insgesamt betrug die Sensitivität bei Patienten mit einem positiven Hauttest 41,7%; bei Patienten mit negativem Ergebnis beim Hauttest zeigte sich eine Sensitivität von 27,9%. Die Spezifität variierte zwischen 79-89% [20].

Frühere durchgeführte Studien zeigten ähnliche Ergebnisse. 2005 publizierte die Arbeitsgruppe von García-Avilés [34] eine Arbeit, in der 67 Patienten mit einer positiven Vorgeschichte bezüglich Typ-I-Reaktion nach Einnahme von Betalaktamen und 30 Kontrollen untersucht wurden. 47 der Patienten hatten anaphylaktische Reaktionen und 20 davon Urtikaria innerhalb einer Stunde nach Einnahme des Medikaments. Es konnte eine Sensitivität von 47,7% und eine Spezifität von 83,3% unter Berücksichtigung der 5 untersuchten Betalaktame festgestellt werden. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden getesteten Antibiotika Konzentrationen gefunden.

In einer Studie vom Jahr 2001 konnten anhand von 30 Patienten mit einer positiven Anamnese bezüglich Beta-Laktam Soforttyp Allergie und 33 Kontrollperson eine Sensitivität und Spezifität beim CAST® von 43% und 79% mit einer resultierender Effizienz von 62% festgestellt werden [45].

Weiterhin wurde im Jahr 2004 eine Arbeit publiziert, in der 23 Patienten mit einer IgE-vermittelten Allergie auf Betalaktam Antibiotika, negativen Hauttests und tlw. positiven spezifischen IgE-Antikörpern anhand eines Leukotrienfreisetzungstests und weiterer Testmethoden untersucht wurden. Hierbei wurden eine Sensitivität von 22,7% und eine Spezifität von 83,3% für den CAST® ermittelt [32].

Die vorliegenden Resultate bezüglich der Sensitivität und Spezifität des Leukotrienfreisetzungstests liegen unter den durchschnittlichen Ergebnissen, die in den beschriebenen Studien erhoben worden sind. Beim CAST®-2000 ELISA betrug die Sensitivität in der vorliegenden Studie 17% und die Spezifität 73%.

Die geringe Sensitivität des CAST® in unserer Studie könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Überempfindlichkeit gegenüber Betalaktame nach und nach mit der Zeit verloren geht und die Reaktivität geringer wird je länger der tatsächliche Zeitpunkt der Reaktion zurückliegt [29]. In der vorliegenden Studie lag der Zeitpunkt der Reaktion bei 9 von den 21 Patienten länger als 5 Jahre zurück. 5 von diesen 9 Patienten reagierten mindestens 10 Jahre vor Durchführung der Studie. Bei den restlichen 12 Patienten lag der Zeitpunkt der Reaktion in den 5 Jahren vor Durchführung der Tests zurück. Weitere Gründe für die geringe Sensitivität könnten sein, dass die reaktive Verbindung nicht das Medikament selbst sondern

eines seiner Metaboliten ist, oder dass der Mechanismus der Reaktion unabhängig von den untersuchten Mediatoren ist [19].

### 4.3 Kombination von In-vitro-Testverfahren

In der Literatur wird weiterhin berichtet, dass die Kombination von Leukotrienfreisetzungstests und anderen Untersuchungsmethoden wie Basophilenaktivierungstest [20], Bestimmung von spezifischen IgE-Antikörpern oder Histaminfreisetzung die Sensitivität erhöhen können.

In einer Studie vom Jahr 2001 [45] konnten anhand von 30 Patienten mit einer positiven Anamnese bezüglich Betalaktam Soforttyp Allergie und 33 Kontrollperson eine Sensitivität und Spezifität beim CAST® von 43% und 79% mit einer resultierenden Effizienz von 62% festgestellt werden. Im Vergleich betrug beim Histaminfreisetzungstest die Sensitivität 53%, die Spezifität 55% und die Effizienz 54%. Beide Methoden zusammen ergaben eine Sensitivität von 48% und eine Spezifität von 67% sowie eine Effizienz von 58%. Bezüglich der Sensitivität zeigte sich eine leichte Besserung wenn beide Methoden zusammen betrachtet wurden.

Die Bedeutung beider In-vitro-Methoden, BAT und Leukotrienfreisetzungstest, bei negativen Hauttests auf Betalaktame und negativen IgE-Antikörpern, wurde ebenso in einer spanischen Studie von 2008 gezeigt. In der Arbeit wurde über 2 Patienten mit Urtikaria, Pruritus und Angioödem nach der Einnahme von Amoxicillin und Clavulansäure berichtet. Die übliche Allergiediagnostik anhand Hauttests, inkl. PPL und MDM, und der Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper zeigte bei beiden Patienten negative Ergebnisse. Sowohl der Basophilenaktivierungstest (BAT) als auch der Leukotrienfreisetzungstest (CAST) zeigten signifikant positive Reaktionen auf Amoxicillin und Clavulansäure (74,5% und 14,2% Basophilenaktivierung und 1732 und 949 pg/ml Leukotrienfreisetzung) sowie auf Clavulansäure (66,3% und 11,7% Basophilenaktivierung und >4333 und 1380 pg/ml Leukotrienfreisetzung) und negative Ergebnisse auf Amoxicillin und andere Betalaktam-Antibiotika. Beide Patienten tolerierten die therapeutische Gabe von Amoxicillin [47].

Beim Vergleich der positiven Ergebnisse beim CAST®-2000 ELISA in unserer Studie mit den erhaltenen Ergebnissen der Basophilenaktivierungstests, zeigte sich eine Kongruenz bei Pat. Nr. 5. Alle Konzentrationen von Cefuroxim waren in alle drei Tests positiv. Bei Pat. Nr. 18 zeigte sich eine Übereinstimmung beim CAST®-2000 ELISA und beim Flow2-CAST® bei PenG und PenV. Bei Pat. Nr. 2 fand sich keine Kongruenz.

## 4.4 Bedeutung der Basophilenaktivierung

Basophilenaktivierungstests sind seit Anfang der 90er Jahre kontinuierlich weiterentwickelte zelluläre In-vitro Verfahren, die auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie basieren. Der Vorteil dieser Methode und somit ein wichtiges Charakteristikum ist, dass die verschiedensten Parameter einer Zelle genau definiert werden können [33, 43]. Die ersten durchflusszytometrische Untersuchungen wurden unter anderen in anfänglichen Studien von Nakagawa et al. [54], Gane et al. [33] und Knol et al. [43] publiziert. Die ersten Anwendungen in der Allergiediagnostik sind auf die Arbeitsgruppe um Sainte-Laudy zurückzuführen [64, 65]. Das Prinzip der Methode besteht in der Erfassung der Antigen-Antikörper-Reaktion, durch fluoreszenzmarkierte Antikörper. Meistens wurde, wie auch in der vorliegenden Arbeit, CD63 als Oberflächenmarker benutzt, um die allergenspezifische Aktivierung der Basophilen quantitativ zu erfassen [33, 43, 52, 65]. Zahlreiche Berichte in der Literatur haben in den letzten Jahren gezeigt, dass die Quantifizierung der Basophilenaktivierung mittels Durchflusszytometrie (Basophilenaktivierungstest, BAT) sich als nützliches Werkzeug für die Diagnostik von IgE vermittelten Soforttyp-Reaktionen bewährt hat [11].

### 4.4.1 Interpretation der Ergebnisse der BAT

In der vorliegenden Studie wurden beim Flow-CAST® eine Sensitivität von 50% und eine Spezifität von 91% ermittelt. Beim Flow2-CAST® ergaben sich eine Sensitivität von 53% und eine Spezifität von 75%.

Diese Ergebnisse mit beiden verwendeten Basophilenaktivierungstests sind zufriedenstellend, selbst wenn eine Sensitivität von 50% und 53% als zu niedrig angesehen werden könnte.

Die erhaltenen Resultate liegen damit im Bereich anderer früher durchgeführte Studien mit dem Flow-CAST® bei Patienten mit einer Soforttypallergie auf Betalaktame [20, 32, 67, 68].

Im Jahr 2001 publizierten Sanz et al. [67] eine Studie an 58 Patienten mit einer klinischen Allergie auf Betalaktame und positivem Hauttest auf mindestens eins dieser Allergene: MDM, PPL, Penicillin, Amoxicillin, Ampicillin und Cephalosporine und 30 Kontrollen ohne Allergie auf Betalaktame. Unter Messung der Expression von CD63 an Basophilen als Aktivierungsmarker zeigten sich eine Sensitivität von 50% und eine Spezifität von 93,3%. Weitere in den letzten Jahren publizierte Arbeiten mit dem Flow-CAST® zeigten ähnliche Werte bezüglich der Sensitivität (39,1%, 48,3%) [20, 32]. Im Jahr 2004 wurde in einer Studie mit 23 Patienten mit einer IgE-vermittelten Allergie auf Betalaktam Antibiotika, negativen Hauttests und tlw. positiven spezifischen IgE-Antikörpern beim Basophilenaktivierungstest eine Sensitivität von 39,1% und eine Spezifität von 93,3% ermittelt [32]. In einer multizentrischen Studie in 10 europäischen Zentren, die 2009 publiziert wurde, konnte beim Basophilenaktivierungstest Flow-CAST® eine Sensitivität von 48,3% erreicht werden bei Berücksichtigung der 5 getesteten Betalaktam-Allergene (AX, AMP, BPN, PPL und MDM) in einem Gesamtkollektiv von 181 Patienten [20].

Eine weitere Studie des Jahres 2004 mit 70 Patienten, in der ebenso CD63 als Aktivierungsmarker angewendet wurde, wies ähnliche Ergebnisse auf (Sensitivität 48,6% und

Spezifität 91,3%). Allerdings wurde in diesem Fall ein anderer Test, nämlich der Basotest® anstatt des Flow-CAST®, angewendet [76]. Der Basotest® wird mit heparinisiertem Vollblut durchgeführt. Hierbei werden die Blutproben aliquotiert und anschließend werden diese mit einem Stimulationspuffer, der IL-3 enthält inkubiert [26]. Im Gegensatz dazu wird beim Flow-CAST® eine Leukozytensuspension aus EDTA Blut angewendet. Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Tests ist, dass anti-IgE, der Antikörper zur Erfassung aller Basophilen, beim Basotest® mit PE gekoppelt ist und im Flow-CAST® hingegen mit FITC markiert ist [26]. Eine weitere Arbeit, bei der den Basotest® verwendet wurde, zeigte im Vergleich schlechtere Ergebnisse bezüglich der Sensitivität (35%). Hierbei wurde bei 20 Patienten mit positiver Anamnese einer Soforttypallergie auf Betalaktame und positivem Prick- und Intrakutantest eine Sensitivität von 35% ermittelt [26].

Sowohl in der vorliegenden Arbeit beim Flow-CAST® als auch in den oben erwähnten Studien wurden in den Basophilenaktivierungstests Anti-FcεRI-Antikörper oder Anti-IgE-Antikörper als Marker zur Identifizierung der Basophilen verwendet. Andere in der Literatur beschriebene Marker für basophile Granulozyten sind z. B. CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> oder CD123<sup>-</sup>/anti-HLA-DR<sup>-</sup> [23]. Studien mit Patienten, die eine Antibiotika-Allergie aufwiesen, liegen zu letztgenannten Markern nicht vor.

#### **4.4.2 Vergleich und Bedeutung beider BAT: Flow-CAST® und Flow2-CAST®**

Im Vergleich zum Flow-CAST® wurde beim Flow2-CAST® ein anderer Marker für die basophilen Zellen verwendet: der humane Chemokinrezeptor CCR3.

Die Trennung der Zellsubpopulationen in der Durchflusszytometrie wird durch die Verwendung von CCR3 zur Markierung der Basophilen verbessert im Vergleich zur Identifizierung der Basophilen mittels anti-FcεRI-Antikörper, weil die Expression von Fc an der Oberfläche der Basophilen von Patient zu Patient bekannter Weise stark variieren kann. Basophile Granulozyten exprimieren ca. 20.000 Kopien von CCR3 auf einer einzigen Zelloberfläche, eine erheblich höhere Anzahl als bei anderen Leukozyten. CCR3 ist der wichtigste Rezeptor für Eotaxin und MCP-4 in der Chemotaxis von Basophilen.

In einer Arbeit von 2002 von Monneret et al. [51] bei Patienten mit einer Allergie auf Muskelrelaxantien konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD63 positiven Basophilen in der Stimulationskontrolle mit fMLP nach Markierung der Basophilen mit CCR3 (31,2%± 4,9) höher war als nach Markierung mit Anti-IgE (14,5%± 3,4).

Beim Flow2-CAST® konnten in der vorliegenden Studie mit Patienten mit einer Soforttyp Antibiotikaallergie eine Sensitivität von 53% und eine Spezifität von 75% ermittelt werden. Im Vergleich zum anderen getesteten Basophilenaktivierungstest, dem Flow-CAST®, ist das Resultat bezüglich der Sensitivität leicht besser. Bei genauerer Betrachtung der einzelnen getesteten Antibiotika konnten, insbesondere bei Penicillin G und Penicillin V, mehr positive Ergebnisse beim Flow2-CAST® als beim Flow-CAST® gefunden werden.

Wichtig zu erwähnen ist, dass bei beiden Methoden positive Ergebnisse teilweise nur bei einer Allergenkonzentration und teilweise bei 2 oder 3 Konzentrationen des gleichen Allergens aufgetreten sind.

Die höchste Prozentzahl der Basophilenaktivierung nach Inkubation mit den verschiedenen Allergenen beim Flow-CAST® betrug in der vorliegenden Arbeit nicht mehr als 20,6%. Andere Studien in der Literatur, in denen der Flow-CAST® bei Patienten mit Betalaktam-Allergien untersucht wurde, zeigten ebenso ähnliche positive Werte für die einzelnen Allergenen im Bereich zwischen 15,2% und 22,6% [67] und 12,5% und 28,6% [76].

Äußerst interessant und hilfreich war die Tatsache, dass sich in unserer Studie bei den positiven Ergebnissen des Flow2-CAST® deutlich höhere Werte der Basophilenaktivierung als beim etablierten Flow-CAST® zeigten (z. B. Pat. Nr. 7 mit 83,9% bei Penicillin G, Pat. Nr. 11 mit 100% bei Cefuroxim und Pat. Nr. 15 mit 85,9% bei Penicillin V). Ebenso zeigte sich beim Flow2-CAST®, dass bei der Messung mit Cefuroxim bei mehreren Konzentrationen ein positives Ergebnis resultierte, im Gegensatz zum Flow-CAST®. Anhand der Beispiele von den Patienten Nr. 5, 11, 19 und 20 kann diese Beobachtung deutlich veranschaulicht werden (s. Abb. 11 und 12). Diese Befunde weisen darauf hin, dass der neu entwickelte Test diese Antigene besser erkennen kann als der Flow-CAST®.

Andererseits konnte im Vergleich beider Methoden beobachtet werden, dass der Flow-CAST® in einigen Fällen (Pat. Nr. 2, 4, 6, 10, 12 und 14 bei Cefuroxim c3) positive Ergebnisse aufwies, während der Flow2-CAST® bei derselben Allergenkonzentration desselben Patienten negativ ausfiel. Die Ursache hierfür bleibt vorerst unklar.

In Anbetracht des Mittelwertes der Basophilenaktivierung beim Flow2-CAST® mit 22,84% bleibt die mittlere Aktivierungsquote der Basophilen nach Stimulation mit Betalaktam-Antibiotika bei dieser neuen Methode eher im niedrigen Niveau. Im Vergleich finden sich in der Literatur höhere Werte der Basophilenaktivierung nach Stimulation mit anderen Allergenen wie z.B. Pollen [50, 69] oder Hymenopterenngifte [21, 72]. Die Ursache für die niedrigeren Werte ist vermutlich ein unterschiedlicher molekularer Mechanismus der Reaktion. Basierend auf Studien über IgE-vermittelte Histaminfreisetzung gibt es eine Reihe von Variablen, die die individuelle Basophilenaktivierung beeinflussen, wie die Dichte der IgE-Rezeptoren an der Zelloberfläche, die Proportion von membran-gebundenem allergenspezifischem IgE zum Gesamt IgE, die intrinsische zelluläre Sensitivität der Basophilen, die zelluläre Reaktivität, die strukturelle Eigenschaften des Allergens, die Art der durch Allergene und IgE gebildeten Komplexe, die Dauer des Kontakts zwischen Allergen und membran-gebundenem IgE und das Vorhandensein von IgG in Konkurrenz um die Allergenbindung zu IgE [18, 41]. Diese Kriterien sind im Grunde genommen für Proteinallergene gültig, nicht aber für kleine Moleküle, Haptene oder Medikamente. Normalerweise braucht ein Allergen mindestens 2 Epitope zur Überbrückung von 2 IgE-Moleküle, monovalente Haptene aber nicht. Ausnahmen wie z.B. die Auslösung von Soforttypreaktionen und von IgE-vermittelter Basophilenaktivierung durch scheinbar univalente Haptene und Medikamente können offenbar auftreten. Die genauen molekularen Mechanismen solcher Reaktionen sind noch nicht vollständig geklärt [18].

Wie schon zuvor erwähnt, wurde sowohl beim Flow-CAST® als auch beim Flow2-CAST® der Oberflächenmarker CD63 zur Markierung der Basophilen verwendet. In der Literatur der letzten Jahre finden sich einige Publikationen mit einem weiteren Oberflächenmarker, CD203c, der ebenso zur Bestimmung des Aktivierungsgrades basophiler Granulozyten herangezogen und damit zur Allergiediagnostik verwendet werden kann. Bei Anwendung von CD203c als Marker der Zellaktivierung in der Diagnostik der Latex- und Pollenallergie zeigte sich eine gute Korrelation zu den Ergebnissen mit CD63 und teilweise sogar eine höhere Sensitivität: 75% vs. 50% [6] bei der Latexallergie sowie 92% und 91% bei der Insektengiftallergie [3, 59].

Bei Verwendung von CD203c als Basophilenmarker bei 27 Patienten mit einer Allergie gegen Betalaktame zeigte sich in einer 2008 publizierten Studie eine Basophilenaktivierung von 60% nach Stimulation mit Amoxicillin und von 67% nach Inkubation mit Ampicillin. Im Vergleich dazu wurde in der gleichen Studie die CD63 Expression mit 22% nach Amoxicillin Stimulierung bzw. 33% bei Ampicillin ermittelt [1]. Allerdings wurde in dieser Studie kein Stimulationspuffer mit IL-3, wie sonst üblich für das Protokoll mit CD63, verwendet [1]. Diese Tatsache scheint wichtig zu sein, wie man anhand anderer Studien sieht, die diese beide Oberflächenmarker bei Katzenhaarallergie oder Hymenoptereingiftallergie verglichen haben [22, 55]. IL-3 gehört zur Gruppe der Zytokine, die eine bedeutende Rolle bei Entzündungsprozessen und Überempfindlichkeitsreaktionen spielen und die Proliferation, Differenzierung und Interaktionen vieler Zellen beeinflussen [70]. Es gibt keinen Konsensus, ob die Präinkubation mit IL-3 notwendig ist. Gesichert ist, dass eine Inkubation mit IL-3 den Degranulationsprozess der Basophilen fördert und die Histamin-Freisetzung erhöht [66, 78]. Allerdings ist der genaue Mechanismus der IL-3-Preinkubation bei Basophilen nicht vollständig geklärt. In der Literatur finden sich einige Berichte über eine erhöhte CD63-Expression nach Allergenexposition bei IL-3-Preinkubation, die eine erhöhte Testsensitivität bewirkt, wobei nachgewiesen werden konnte, dass eine kurze, max. 10 Minuten lange Stimulierung mit IL-3 die Expression von CD63 an sich nicht hochreguliert, sondern es vielmehr zu einem Priming der Zellen kommt, aus der eine erhöhte Mediatorfreisetzung oder CD63-Expression nach geeigneter Stimulierung resultiert [14, 25]. Für einige Allergene scheint das Priming mit IL-3 wichtig zu sein, um eine allergenspezifische Stimulation von einer unspezifischen Aktivierung oder gar Zytotoxizität abgrenzen zu können, da deutlich niedrigere Allergenkonzentrationen nötig sind im Vergleich zu Tests ohne vorherige IL-3 Inkubation. Dies ist besonders für Allergene relevant, die nur eine geringe spezifische Basophilenaktivierung hervorrufen, wie beispielsweise zahlreiche Medikamente [25].

Obwohl die Unterschiede im Hinblick auf die Sensitivität nicht statistisch signifikant waren, zeigten sich beim Vergleich der beiden untersuchten Basophilenaktivierungstests in unserer Studie leicht bessere Ergebnisse beim neuen Flow2-CAST®. Ein wichtiger Vorteil ist die kürzere Dauer der Ausführung des Tests bis zum Erhalt der Messergebnisse: Etwa eine Stunde im Vergleich zu ca. 2 Stunden beim Flow-CAST®. Ein weiteres Plus beim Flow2-CAST® ist, dass die Gabe vom Färbereagens direkt am Anfang der Testung erfolgt. In Tabelle 11 sind anschließend die wesentlichen Unterschiede beider BAT schematisch zusammengefasst.

Tab. 11: Wichtigste Unterschiede zwischen beiden untersuchten BAT.

	<b>Flow-CAST®</b>	<b>Flow2-CAST®</b>
Zeit bis zum Ergebnis	Ca. 2 Std.	Ca. 1 Std.
Probenmaterial	Leukozytenzentrifugat aus EDTA Blut, 10 ml EDTA Blut reichen für 20 Analysen	EDTA Vollblut; 1 ml EDTA Blut reicht für ca. 18 Analysen
Positivkontrolle	Anti-FcεRI Ak	Anti-FcεRI Ak und fMLP
Marker zur Identifizierung der Basophilen	Anti-IgE-FITC	Anti-CCR3-PE
Zellstimulation	Nach Zentrifugation der Leukozytensuspension, Inkubation bei 37°C und danach Zugabe von Färbereagenz	Direkte Mischung von Vollblut, Stimulationspuffer, Allergene und Färbereagenz
Testdauer	ca. 2 h	ca. 1 h
Arbeitsschritte	12	8

Der Einsatz beim Flow2-CAST® von Vollblut-Proben (50 µl pro Allergen) im Gegensatz zu der Verwendung von zentrifugierten Leukozyten aus Vollblut (4,5ml bis max. 9,5ml) beim Flow-CAST® hat den Vorteil, dass dadurch die Handhabung des Tests einfacher ist: Es fallen weniger Arbeitsschritte an, 8 beim Flow2-CAST® im Vergleich zu 12 beim Flow-CAST®. Darüber hinaus wird die basale Basophilenaktivierung auf ein Mindestmaß reduziert, da der Zellisolierungsprozess neben einem generellen Zellverlust zu einer Aktivierung von Basophilen führen kann. Das Vorhandensein von allen Blutbestandteilen bei dieser Methode könnte zudem die physiologischen oder pathologischen In-vivo-Bedingungen besser wiedergeben. Dabei können allerdings Beeinträchtigungen durch andere Serumbestandteile, die eine unspezifische Aktivierung bewirken können, nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Desweiteren wurden beim Flow2-CAST® zwei Positiv-Kontrollen verwendet: fMLP und anti-FcεRI-Antikörper. Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), ist ein natürlich vorkommendes bakterielles Peptid. Als sekretionsanregendes Agens funktioniert es über einen an spezifisches G-Protein gekoppelten Rezeptor (FPR1) auf der Zelloberfläche von Basophilen und bewirkt eine Aktivierung der Phospholipase C und von Wegen der MAP (mitogen activated protein)-Kinase [22, 23]. Zwischen dem IgE-vermittelten Aktivierungsweg und der durch fMLP ausgelösten Basophilenaktivierung gibt es wesentliche Unterschiede. Dabei sind sowohl bei der IgE-vermittelten als auch bei der fMLP-induzierten Reaktion deutliche interindividuelle Unterschiede bzgl. der Basophilenaktivierung zu vermerken [42]. FMLP weist eine vermutlich geringere sekretionsfördernde Potenz auf. Diese Tatsache konnte in unserer Arbeit anhand der durchschnittlichen Werte von 53,7% bei den Kontrollen und 45,8% Basophilenaktivierung bei den Patienten bestätigt werden. Da eine Stimulation mit fMLP keine IgE-vermittelte Aktivierung basophiler Granulozyten widerspiegelt, kann es hauptsächlich zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit von Zellen eingesetzt werden und fehlerhafte Testdurchführungen aufzeigen sowie zur Abklärung einer Pseudoallergie beitragen [25]. Falsch negative Ergebnisse können aufgrund technischer Ursachen auftreten, wie unsachgemäße Handhabung und Lagerung, sowie ungeeignete Stimulierung der Zellen

mit schlecht identifizierten Allergenen, die zytotoxische oder hemmende Komponenten enthalten [25].

Durch Verwendung von Anti-Fcε-Antikörper als Stimulationskontrolle werden Non-Responder identifiziert [23, 25]. Es ist allgemein bekannt, dass etwa 5-10% der getesteten Individuen negative Testergebnisse bezüglich der Basophilenaktivierung aufweisen. Es handelt sich um Personen, die auf eine Kreuzvernetzung der IgE-Rezeptoren nicht mit Histamin-Freisetzung aus den Basophilen reagieren [18, 41]. Für dieses Kollektiv von Non-Respondern können Basophilenaktivierungstests nicht als diagnostisches Mittel verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit waren 2 Patienten beim Flow2-CAST® Non-Responder und ebenso beim Flow-CAST®. Es handelte sich um die gleichen Patienten.

In unserer Studie zeigten einige Patienten und Kontrollen in den BAT Basalwerte von mehr als 15% Basophilenaktivierung in der Negativkontrolle. In der Regel bleibt die Basophilenaktivierung der Negativ-Kontrolle in ca. 80% der Fälle unter 5% [66]. Basalwerte können jedoch schwanken, da einige Allergene eine unspezifische Aktivierung hervorrufen. Vor allem bei der Untersuchung von Allergenen, die nur eine geringe Stimulierung bewirken, ist ein geringer Basalwert wünschenswert. Hohe Basalwerte können Ausdruck einer In-vivo-Allergenexposition sein. Weitere Gründe für einen hohen Wert der Negativ-Kontrolle liegen in der Kontamination der Proben durch Endotoxin, Pyrogene oder Allergene während der Inkubation [23, 25]

Bei den Basophilenaktivierungstests können falsch negative Ergebnisse aufgrund einer zu lang hinausgezögerte Diagnostik zurückzuführen sein, weshalb ein solcher Test idealerweise sechs Wochen bis 12 Monate nach dem akuten Ereignis erfolgen sollte. Das Testergebnis kann zudem durch Einnahme von Medikamenten, vor allem Glukokortikosteroide, Antihistaminika, Immunmodulatoren, Immunsuppressiva und anti-IgE-Ak verfälscht werden. Darüber hinaus können falsch negative Ergebnisse durch technische Ursachen, wie falsche Lagerung der Blutproben oder ungeeignete Stimulierung der Zellen durch ungenau definierte Allergene, die hemmende und zytotoxische Komponenten aufweisen können, zustande kommen. Außerdem ist nicht immer die individuell optimale Konzentration im Testansatz für das einzelne Allergen ermittelbar. Bei Auftreten von negativen Testergebnissen trotz positiver Anamnese einer Soforttyp Allergie sollten die oben genannten Faktoren stets sorgfältig überprüft werden und gegebenenfalls ein erneuter Testversuch durchgeführt werden [23, 25, 66].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Flow2-CAST® eine Reihe von Vorteilen wie eine kürzere Testdauer, die Optimierung der Zellseparation mittels CCR3, die Verwendung von zwei Stimulations-Kontrollen und die Benutzung von Vollblut, im Vergleich zu anderen im Handel erhältlichen Basophilenaktivierungstests bietet. In Zukunft sind weitere Studien mit anderen Allergenen notwendig, um die Vorteile, die diese neue Methode im Vergleich zu den bereits im Handel erhältlichen und etablierten Tests bietet, breiter aufzeigen zu können.



## 5. Zusammenfassung

Betalaktamantibiotika sind die häufigsten Auslöser von Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Medikamente. Die Diagnostik einer Medikamentenallergie umfasst Anamnese, Hauttests, In-vitro-Tests und orale Provokationstests. Allergische Reaktionen gegenüber Medikamenten stellen aber häufig ein diagnostisches Problem dar. Die Anamnese gestaltet sich häufig schwierig, da die Reaktionen auf Betalaktame meistens Jahre zurückliegen, zum Teil in der Kindheit. Zudem fallen die Serum IgE-Antikörper Spiegel im Laufe der Zeit ab. Spezifisches IgE ist 5 Jahren nach dem allergischen Ereignis nur noch in etwa 25% der Fälle positiv. Darüber hinaus liegt die Sensitivität der spezifischen IgE-Antikörper unter der von Hauttestungen und die Nachweisbarkeit spezifischer Antikörper im Serum ist kürzer als im Hauttest. In den letzten Jahren wurden neue zelluläre In-vitro-Tests, sogenannte Basophilenaktivierungstests, für die Diagnostik von IgE-vermittelten Reaktionen entwickelt. Hierbei wird die allergenspezifische Aktivierung basophiler Granulozyten mittels bestimmter Oberflächenantigene durchflusszytometrisch gemessen. CD63 und CD203c sind die beiden wichtigsten Aktivierungsmarker der Basophilen, die bisher verwendet wurden.

In dieser Studie wurde die In-vitro-Basophilenaktivierung bei 21 Patienten mit einer Typ-I Betalaktam-Antibiotikaallergie anhand eines neu entwickelten Tests, dem Flow2-CAST® (Bühlmann, Schweiz), und eines etablierten Tests, dem Flow-CAST® (Bühlmann, Schweiz) untersucht. Zudem wurde die Leukotrienfreisetzung mittels CAST®-2000 ELISA (Bühlmann, Schweiz) als weitere In-vitro Methode bei dem gleichen Patientenkollektiv gemessen. Bei allen untersuchten Individuen wurde eine umfassende Diagnostik durchgeführt, inklusive einer sorgfältigen Anamnese, Hauttests und Ermittlung von spezifischen IgE-Antikörpern. Einschlusskriterien der Studie waren ein positiver Hauttest (Prick- oder IC-Test) und/oder der Nachweis von spezifischem IgE gegen Antibiotika. Ausnahme war ein Patient, der nur eine eindeutige klinische Anamnese aufwies. Zudem wurden 12 gesunde Probanden ohne Hinweis auf eine Antibiotikaallergie in der Vorgeschichte als Kontrollgruppe untersucht.

Dabei wurden beim Flow-CAST® (Bühlmann, Schweiz) periphere Blutleukozyten aus EDTA Vollblutproben der Untersuchten isoliert und mit einem Stimulationspuffer, der Interleukin-3 (IL-3) enthält, gemischt. 8 Allergene (Antibiotika) wurden zugegeben und die Zellen damit stimuliert. Als Positivkontrolle wurde ein hochspezifischer monoklonaler Antikörper verwendet, der den hochaffinen IgE-bindenden Rezeptor (FcεRI) erkennt und zu einer Aktivierung der Basophilen führt. Nach dem Abstoppen der Reaktion wurde das Färbereagenz zugegeben. Dieses enthält eine Mischung von monoklonalen Antikörpern gegen CD63, markiert mit Phycoerythrin (anti-CD63-PE), und Antikörper gegen humanes IgE, markiert mit Fluoreszein-Isothiocyanat (anti-IgE-FITC). Die verbliebenen Erythrozyten wurden über eine Lyse-Reaktion entfernt und nach dem Beenden der Reaktion wurden die Zellen mittels Durchflußzytometrie analysiert.

Beim Flow2-CAST® (Bühlmann, Schweiz) wurden die Antibiotika-Allergene direkt in den Stimulationspuffer zu EDTA Vollblut von Patienten gegeben. Als Positivkontrollen wurden hier je ein spezifischer monoklonaler Antikörper verwendet, der den hochaffinen IgE

bindenden Rezeptor (FcεRI) erkennt, sowie N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) als unspezifischer Zellaktivator. Gleichzeitig zur zellulären Stimulation wurde das Färbereagenz dazugegeben: ein Gemisch aus monoklonalen Antikörpern gegen humanes CD63, konjugiert mit Fluoreszein Isothiocyanat (anti-CD63-FITC), sowie gegen den humanen Chemokinrezeptor CCR3, markiert mit Phycoerythrin (anti-CCR3-PE). Die enthaltenen Erythrozyten wurden ebenso durch eine Lyse-Reaktion entfernt. Die Datenerhebung auf dem Durchflusszytometer wurde anschließend innerhalb von 2 Stunden durchgeführt.

Beim CAST®-2000 ELISA (Bühlmann, Schweiz) wurden isolierte Leukozyten aus Patienten-Blutproben gleichzeitig mit Interleukin 3 behandelt und mit den Allergenen (Antibiotika) stimuliert. Im Anschluss an die Stimulation wurden die freigesetzten Leukotriene in einem ELISA quantifiziert.

In unserer Studie konnte beim Flow-CAST® eine Sensitivität von 50% nachgewiesen werden. Beim Flow2-CAST® betrug die Sensitivität 53% und beim CAST®-2000 ELISA 17%. Ebenso wurde in unserer Arbeit die Spezifität der Tests ermittelt. Beim Flow-CAST® zeigte sich eine Spezifität von 91%, beim Flow2-CAST® von 75% und beim CAST®-2000 ELISA wurde eine Spezifität von 73% berechnet.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate bezüglich Sensitivität und Spezifität der BAT lagen im Bereich der Ergebnisse anderer Studien mittels BAT bei Patienten mit einer Soforttypallergie auf Betalaktame. Die Sensitivität dieser Studien variierte zwischen 39,1% und 50%. Die Spezifität lag zwischen 89% und 97%. Die vorhandenen Resultate bezüglich der Sensitivität und Spezifität des Leukotrienfreisetzungstests lagen unter den durchschnittlichen Ergebnissen, die in früheren Studien erhoben worden sind. Diese Werte variierten zwischen 22,7% und 47,7% für die Sensitivität und zwischen 79% bis 89% für die Spezifität.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen den Wert von zwei unterschiedlichen Basophilenaktivierungstests als In-vitro-Methode in der Diagnostik von Typ-I-Antibiotika Allergie mit einer etwas höheren Sensitivität für den Flow2-CAST®. Obwohl die Unterschiede im Hinblick auf die Sensitivität nicht statistisch signifikant waren, zeigten sich beim Vergleich der beiden untersuchten Basophilenaktivierungstests in unserer Studie leicht bessere Ergebnisse beim neuen Flow2-CAST®. Der neu entwickelte Basophilenaktivierungstest wies zudem wichtige Vorteile wie eine kürzere Testdauer, die Optimierung der Zellseparation mittels CCR3, die Verwendung von zwei Stimulations-Kontrollen und die Benutzung von Vollblut auf.

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenso gezeigt werden, dass die BAT gegenüber dem Leukotrienfreisetzungstest in der Diagnostik von Antibiotika-Allergien Vorteile aufwiesen: geringerer Zeitaufwand bis zum Erhalt der Resultate, weniger Arbeitsschritte und bessere Ergebnisse im Hinblick auf die Sensitivität.

Damit ist insbesondere der Flow2-CAST® eine geeignete Methode, um die Diagnostik nach Erhebung der Anamnese, der Durchführung von Hauttests und der Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper zu erweitern, ersetzt aber nicht die oralen Provokationstests.

## IV Literaturverzeichnis

1. Abuaf, N., Rostane, H., Rajoely, B., Gaouar, H., Autegarden, J.E., Leynadier, F., Girot, R.  
Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in the diagnosis of amoxicillin allergy.  
Clin. Exp. Allergy 38 (2008) 921-928
2. Altmeyer, P.  
"Therapielexikon Dermatologie und Allergologie", Springer Verlag, Wien – New York, 2005, 2. Auflage
3. Binder, M., Fierlbeck, G., King, T.P., Valent, P., Bühring, H.J.  
Individual hymenoptera venom compounds induce upregulation of the basophil activation marker ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (CD203c) in sensitized patients.  
Int. Arch. Allergy Immunol. 129 (2002) 160–168
4. Blanca, M.  
Allergic reactions to penicillins. A changing world?  
Allergy 50 (1995) 777-782
5. Bochner, B.S.  
Systemic activation of basophils and eosinophils: markers and consequences.  
J. Allergy Clin. Immunol. 106 (2000) 292-302
6. Boumiza, R., Monneret, G., Forissier, M.F., Savoye, J., Gutowski, M.C., Powell, W.S., Bienvenu, J.  
Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63.  
Clin. Exp. Allergy 33 (2003) 259-265
7. Bühlmann Laboratories, Schönenbuch, Schweiz.  
Arbeitsanleitungen CAST®-2000 ELISA, Flow-CAST® und Flow2-CAST®, Versionen 2007
8. Bühring, H.J., Seiffert M., Giesert C., Marxer A., Kanz L., Valent P., Sano K.  
The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 3.  
Blood 97 (2001) 3303-3305
9. Bühring, H.J., Streble, A., Valent, P.  
The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis.  
Int. Arch. Allergy Immunol. 133 (2004) 317-329
10. Cahen, Y.D., Maly, F.E., Wüthrich, B.  
Cellular antigen stimulation test (CAST)-applicability in the diagnosis of insect toxin allergies.  
Schweiz. Med. Wochenschr. 127 (1997) 5-11

11. Chirumbolo, S.  
Basophil activation test in allergy: time for an update?  
*Int. Arch. Allergy Immunol.* 158 (2012) 99-114
12. Claus, S., Stille, W.  
*Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis*, 10. Auflage.  
Schattauer, Stuttgart 2001
13. Coombs, R.R.A., Gell, P.G.H.  
The classification of allergic reactions underlying disease.  
In: "Clinical aspects of immunology", Gell, P.G.H., Coombs, R.R.A., (Eds.)  
Davis, Philadelphia (1963)
14. Cozon, G., Ferrandiz, J., Peyramond, D., Brunet, J.  
Detection of activated basophils using flow cytometry for diagnosis in atopic patients.  
*Allergol. Immunopatholo. (Madr)* 27 (1999) 182-187
15. De Weck, A.L., Furukawa, K., Dahinden, C., Maly, F.E.  
A new cellular assay for the diagnosis of allergy (sLT-ELISA).  
*Progress in Allergy and Clinical Immunology* (T. Miyamoto Ed.) 14th ICACI Kyoto  
(1992) 197-202
16. De Weck, A.L., Stadler, B.M., Urwyler, A., Wehner, H.U., Bühlmann, R.P.  
Cellular allergen stimulation test (CAST) - a new dimension in allergy diagnostics.  
*Allergy Clin Immunol News* 5 (1993) 9-14
17. De Weck, A.L.  
Perspectives in allergy diagnosis.  
*Int. Arch. Allergy Immunol.* 99 (1992) 252-256
18. De Weck, A.L., Sanz, M. L., Gamboa, P. M., Aberer, W., Bienvenu, J., Blanca, M.,  
Demoly, P., Ebo, D. G., Mayorga, L., Monneret, G., Sainte Laudy, J.  
Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than  
pitfalls. II. Technical issues.  
*J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 18 (2008) 143-55
19. De Weck, A.L., Sanz, M.L.  
Cellular Allergen Stimulation Test (CAST) 2003, a review.  
*J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 14 (2004) 253-273
20. De Weck, A.L., Sanz, M.L., Gamboa, P.M., Aberer, W., Sturm, G., Bilo, M.B.,  
Montroni, M., Blanca, M., Torres, M.J., Mayorga, L., Campi, P., Manfredi, M.,  
Drouet, M., Sainte-Laudy, J., Romano, A., Merk, H., Weber, J.M., Jermann, T.M. and  
members of ENDA (European Network for Drug Allergy)  
Diagnosis of immediate-type  $\beta$ -lactam allergy in vitro by flow-cytometric basophil  
activation test and sulfidoleukotriene production: A multicenter study.  
*J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 19 (2009) 91-109
21. Eberlein-König, B., Schmidt-Leidescher, C., Rakoski, J., Behrendt, H., Ring J.  
In vitro basophil activation test using CD63 expression in patients with bee and wasp  
venom allergy.  
*J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 16 (2006) 5-10

22. Eberlein-König, B., Varga, R., Mempel, M., Darsow, U., Behrendt, H., Ring, J.  
Comparison of basophil activation tests using CD63 or CD203c expression in patients with insect venom allergy.  
*Allergy* 61 (2006) 1084-5
23. Ebo, D.G., Bridts, C.H., Hagendorens, M.M., Aerts, N.E., De Clerck, L.S., Stevens, W.J.  
Basophil activation test by flow cytometry: Present and future applications in allergology.  
*Cytometry Part B* 74B (2008) 201-210
24. Ebo, D.G., Hagendorens, M.M., Bridts, C.H., Schuerwegh, A.J., De Clerck, L.S., Stevens, W.J.  
In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow?  
*Clin. Exp. Allergy* 34 (2004) 332-339
25. Ebo, D.G., Sainte-Laudy, J., Bridts, C.H., Mertens, C.H., Hagendorens, M.M., Schuerwegh, A.J., De Clerck, L.S., Stevens, W.J.  
Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives.  
*Allergy* 61 (2006) 1028-1039
26. Erdmann, S.M., Ventocilla, S., Moll-Slodowy, S., Sauer, I., Merk, H.F.  
Basophilenaktivierungstests in der Diagnostik von Arzenimittelreaktionen.  
*Hautarzt* 56 (2005) 38-43
27. Falcone, F.H., Haas, H., Gibbs, B.F.  
The human basophil: A new appreciation of its role in immune responses.  
*Blood* 96 (2000) 4028-4035
28. Falcone, F.H., Zillikens, D., Gibbs, B.F.  
The 21st century renaissance of the basophil? Current insights into its role in allergic responses and innate immunity.  
*Exp. Dermatol.* 15 (2006) 855-64
29. Fernandez, T.D., Torres, M. J., Blanca-Lopez, N., Rodriguez-Bada, J. L., Gomez, E., Canto, G., Mayorga, C., Blanca, M.  
Negativization rates of IgE radioimmunoassay and basophil activation test in immediate reactions to penicillins.  
*Allergy* 64 (2009) 242-8
30. Fritsch, P.  
*Dermatologie Venerologie*, Springer Verlag, Wien – New York, 2004, 2. Auflage
31. Furukawa K., Tengler, R., de Weck, A.L., Maly, F.E.  
Simplified sulfidoleukotriene ELISA using LTD4-conjugated phosphatase for the study of allergen-induced leukotriene generation by isolated mononuclear cells and diluted whole blood.  
*J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 4 (1994) 110-115
32. Gamboa, P.M., Garcia-Aviles, M. C., Urrutia, I., Antepara, I., Esparza, R., Sanz, M.L.  
Basophil activation and sulfidoleukotriene production in patients with immediate allergy to betalactam antibiotics and negative skin tests.  
*J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 14 (2004) 278-83

33. Gane, P., Pecquet, C., Lambin, P., Abuaf, N., Leynadier, F.  
Flow cytometry evaluation of human basophils.  
*Cytometry* 14 (1993) 344-348
34. Garcia-Aviles, C., Sanz, M. L., Gamboa, P. M., Urrutia, I., Antepará, I., Jauregui, I., De Weck, A. L.  
Antigen specific quantification of sulfidoleukotrienes in patients allergic to Betalactam antibiotics.  
*J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 15 (2005) 37-45
35. Hammarstrom, S.  
Leukotrienes.  
*Annu. Rev. Biochem.* 52 (1983) 355-77
36. International rheumatic fever study group  
Allergic reactions to long-term benzathine penicillin prophylaxis for rheumatic fever.  
*Lancet* 337 (1991) 1308-10
37. Jouvin, M.H., Adamczewski, M., Numerof, R., Letourneur, O., Valle, A., Kinet, J. P.  
Differential control of the tyrosine kinases Lyn and Syk by the two signaling chains of the high affinity immunoglobulin E receptor.  
*J. Biol. Chem.* 269 (1994) 5918-25
38. Kawakami, T., Galli, S.J.  
Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE.  
*Nat. Rev. Immunol.* 2 (2002) 773-86
39. Kinet, J.P.  
The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology.  
*Annu. Rev. Immunol.* 17 (1999) 931-72
40. Kinet, J.P.  
The high-affinity receptor for IgE.  
*Curr. Opin. Immunol.* 2 (1989) 499-505
41. Kleine-Tebbe, J., Erdmann, S., Knol, E. F., MacGlashan, D. W. Jr., Poulsen, L. K., Gibbs, B. F.  
Diagnostic tests based on human basophils: potentials, pitfalls and perspectives.  
*Int. Arch. Allergy Immunol.* 141 (2006) 79-90
42. Knol, E.F., Koenderman, L., Mul, F., Verhoeven, A., Ross, D.  
Differential activation of human basophils by anti-IgE and formyl-methionyl-leucylphenylalanine. Indications for protein kinase C-dependent and -independent activation pathways.  
*Eur. J. Immunol.* 21 (1991) 881-885
43. Knol, E.F., Mul, F., Jansen, H., Calafat, J., Roos, D.  
Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435.  
*J. Allergy Clin. Immunol.* 88 (1991) 328-338
44. Kraft, D., Wide, L.  
Clinical patterns and results of radioallergosorbent test (RAST) and skin tests in penicillin allergy.

- Br. J. Dermatol. 94 (1976) 593-601
45. Lebel, B., Messaad, D., Kvedariene, V., Rongier, M., Bousquet, J., Demoly, P. Cysteinyl-leukotriene release test (CAST) in the diagnosis of immediate drug reactions.  
Allergy 56 (2001) 688-92
  46. Li, Y., Huang, D., Xia, X., Wang, Z., Luo, L., Wen, R. CCR3 and choroidal neovascularization.  
PLoS One 6 (2011) e17106
  47. Longo, N., Gamboa, P. M., Gastaminza, G., Audicana, M. T., Antepara, I., Jauregui, I., Sanz, M. L. Diagnosis of clavulanic acid allergy using basophil activation and leukotriene release by basophils.  
J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 18 (2008) 473-5
  48. McGowan, E.C., Saini, S. Update on the performance and application of basophil activation tests.  
Curr. Allergy Asthma Rep. 13 (2013) 101-9
  49. Metzelaar, M.J., Wijngaard, P.L.J., Peters, P.J., Sixma, J.J., Nieuwenhuis, H.K., Clevers, H.C. CD63 antigen: a novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells.  
J. Biol. Chem. 266 (1991) 3239-3245
  50. Michova, A., Abugalia, M., Ivanova, T., Nikolov, G., Taskov, H., Petrunov, B. Comparison of two-flow cytometry methods for basophil degranulation in patients sensitized to grass pollen.  
Allergy 61 (2006) 1078-83
  51. Monneret, G., Benoit, Y., Debard, A. L., Gutowski, M. C., Topenot, I., Bienvenu, J. Monitoring of basophil activation using CD63 and CCR3 in allergy to muscle relaxant drugs.  
Clin. Immunol. 102 (2002) 192-9
  52. Monneret, G., Gutowski, M.C., Bienvenu, J. Detection of allergen-induced basophil activation by expression of CD63 antigen using a tricolour flow cytometric method.  
Clin. Exp. Immunol. 115 (1999) 393-396
  53. Moretti, S., Lanza, F., Dabusti, M., Tieghi, A., Campioni, D., Dominici, M, Castoldi, G.A. CD123 (Interleukin 3 receptor  $\alpha$  chain).  
J. Biol. Regul. Homeost. Agents 15 (2001) 98-100
  54. Nakagawa, T., Stadler, B.M., De Weck, A.L. Flow-cytometric analysis of human basophil degranulation. Quantification of human basophils and their degranulation by flow-cytometry.  
Allergy 36 (1981) 39-47
  55. Ocmant, A., Peignoiois, Y., Mulier, S., Hanssens, L., Michils, A., Schandené, L.

- Flow cytometry for basophil activation markers: The measurement of CD203c upregulation is as reliable as CD63 expression in the diagnosis of cat allergy. *J. Immunol. Methods* 320 (2007) 40-48
56. Ohnmacht, C., Schwartz, C., Panzer, M., Schiedewitz, I., Naumann, R., Voehringer, D.  
Basophils orchestrate chronic allergic dermatitis and protective immunity against helminths.  
*Immunity* 33 (2010) 364-74
57. Parker, C.W.  
Drug allergy (first of three parts).  
*N. Engl. J. Med.* 292 (1975) 511-4
58. Pease, J.E., Williams T.J.  
Chemokines and their receptors in allergic disease.  
*J. Allergy Clin. Immunol.* 118 (2006) 305-18; quiz 319-20
59. Platz, I.J., Binder, M., Marxer, A., Lischka, G., Valent, P., Bühring, H.J.  
Hymenoptera-venom-induced upregulation of the basophil activation marker ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 3 in sensitized individuals.  
*Int. Arch. Allergy Immunol.* 126 (2001) 335-342
60. Ring, J.  
In: „Angewandte Allergologie“, Urban & Vogel, München, 2004, 3. Auflage.
61. Ring, J., Messmer, K.  
Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes.  
*Lancet* 1 (1977) 466-469
62. Romano, A., Blanca, M., Torres, M. J., Bircher, A., Aberer, W., Brockow, K., Pichler, W. J., Demoly, P.  
Diagnosis of nonimmediate reactions to beta-lactam antibiotics.  
*Allergy* 59 (2004) 1153-60
63. Romano, A, Torres, M. J., Castells, M., Sanz, M. L., Blanca, M.  
Diagnosis and management of drug hypersensitivity reactions.  
*J. Allergy Clin. Immunol.* 127 (2011) 67-73
64. Sainte-Laudy, J., Sabbah, A., Vallon, C., Guerin, J.C.  
Analysis of anti-IgE and allergen induced human basophil activation by flow cytometry. Comparison with histamine release.  
*Inflamm. Res.* 47 (1998) 401-408
65. Sainte-Laudy, J., Vallon, C., Guérin, J.C.  
Analyse de l'expression membranaire du marqueur CD63 par activation du basophile humain.  
*Allergol. Immunol. (Paris)* 26 (1994) 211-214
66. Sanz M.L., Gamboa, P.M., De Weck, A.L.  
In vitro Tests: Basophil Activation Tests  
In: "Drug Hypersensitivity", Pichler, W.J. (Ed.)  
Karger, Basel, 2007, 391-402



67. Sanz, M.L., Gamboa, P.M., Antépara, I., Usua, C., Vila, R., Garcia-Avilés, C. Chazot, M., De Weck, A.L.  
Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to betalactam antibiotics.  
*Clin. Exp. Allergy* 32 (2002) 277-286
68. Sanz, M.L., Maselli, J. P., Gamboa, P. M., Oehling, A., Dieguez, I., de Weck, A. L.  
Flow cytometric basophil activation test: a review.  
*J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 12 (2002) 143-54
69. Saporta, M., Kamei, S., Persi, L., Bousquet, J., Arnoux, B.  
Basophil activation during pollen season in patients monosensitized to grass pollens.  
*Allergy* 56 (2001) 442-5
70. Serafin, W.E., Austen, K.F.  
Mediators of immediate hypersensitivity reactions.  
*N. Engl. J. Med.* 317 (1987) 30-34
71. Shute, J.  
Basophil migration and chemotaxis.  
*Clin. Exp. Allergy* 22 (1992) 321-3
72. Sturm, G.J., Böhm, E., Trummer, M., Weiglhofer, I., Heinemann, A., Aberer, W.  
The CD63 basophil activation test in Hymenoptera venom Allergy: a prospective study.  
*Allergy* 59 (2004) 1110-1117
73. Sullivan, T.J.  
Antigen-specific desensitization of patients allergic to penicillin.  
*J. Allergy Clin. Immunol.* 69 (1982) 500-8
74. Torres, M.J., Blanca M.  
The complex clinical picture of beta-lactam hypersensitivity: penicillins, cephalosporins, monobactams, carbapenems, and clavams.  
*Med. Clin. North Am.* 94 (2010) 805-20
75. Torres, M.J., Mayorga, C., Leyva, L., Guzman, A. E., Cornejo-Garcia, J. A., Juarez, C., Blanca, M.  
Controlled administration of penicillin to patients with a positive history but negative skin and specific serum IgE tests.  
*Clin. Exp. Allergy* 32 (2002) 270-6
76. Torres, M.J., Padial, A., Mayorga, C., Fernandez, T., Sanchez-Sabate, E., Cornejo-Garcia, J. A., Antunez, C., Blanca, M.  
The diagnostic interpretation of basophil activation test in immediate allergic reactions to betalactams.  
*Clin. Exp. Allergy* 34 (2004) 1768-75
77. Trecka, J.S., Susanne, G., Pfeuffer, P., Raith, P., Bröcker, E.B., Trautmann, A.  
Penicillintherapie trotz Penicillinallergie? Plädoyer für eine allergologische Diagnostik bei Verdacht auf Penicillinallergie.  
*Dtsch. Arztebl.* 101 (2004) A-2888 B-2444 C-2331

78. Valent, P., Bettelheim, P.  
The human basophil.  
Crit. Rev. Oncol. Hematol. 10 (1990) 327-52
79. Wehling, M.  
„Klinische Pharmakologie“  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005
80. Wiley, I.S.G. (1999-2013)  
Die Geschichte des Penicillins  
([http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/biotoxine/antibiotika.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/drug\\_design/penicil.vscml.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/biotoxine/antibiotika.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/drug_design/penicil.vscml.html))  
Stand: 09.03.2013
81. Yates, A.B.  
Management of patients with a history of allergy to beta-lactam antibiotics.  
Am. J. Med. 121 (2008) 572-6

## V Danksagung

Der erste Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. J. Ring, ärztlicher Direktor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München, für die Möglichkeit an seiner Einrichtung promovieren zu können.

Ein besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. Bernadette Eberlein für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und positive Zusammenarbeit sowie für die ständige Motivation und die schnelle und detaillierte Begutachtung meiner Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Darsow sei gedankt für seine Unterstützung und für die problemlose Durchführung großer Teile der Studie in seiner Abteilung.

Bei Herrn M. Schneider und Fr. Dr. U. Sonnenschein (Firma Bühlmann) bedanke ich mich für die stets schnelle und kompetente Lösung aufgetretener Fragen und Probleme.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Belloni, Frau Dr. Grosber, Frau Dr. McIntyre und Frau Dr. Franz für die exzellente und immer freundliche Mitbetreuung der Studienpatienten in den jeweiligen Abteilungen.

Frau Ursula Schatz, Frau Beate Heuser und Frau Christa Hettrich danke ich für ihren großen Einsatz und stete Hilfestellungen im Labor.

Besonders bedanken möchte ich mich ganz liebevoll bei meinem Ehemann Ingo für seine Ratschläge, stetige Unterstützung, große Geduld und bedingungslose Hilfe.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden danke ich für ihre konsequente Förderung und liebevolle Unterstützung über die Jahre.

Nicht zuletzt möchte ich mich aber vor allem auch bei den Patienten und freiwilligen Probanden ganz herzlich bedanken.

## VI Lebenslauf

Name: León Suárez  
Vorname: Isabel  
Geburtsdatum/-ort: 14. August 1982 in Las Palmas de Gran Canaria, Spanien  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: spanisch

### Schulausbildung

09/88-06/92: Grundschule Salvador Manrique de Lara, Las Palmas de Gran Canaria  
09/92-06/00: Gymnasium Deutsche Schule Las Palmas  
05/00: Abitur (Note 1,3)  
06/00: Ablegung der spanischen Hochschulreifeprüfung ( P.A.U.)

### Hochschulausbildung

10/00-11/06: Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München  
08/02: Physikum  
08/03: Erstes Staatsexamen  
09/05: Zweites Staatsexamen  
12/06: Drittes Staatsexamen (Gesamtnote 2,9)

### Beruflicher Werdegang

10/07-08/09: Assistenzärztin in der Artemed Venenfachklinik in München  
Seit 09/2009: Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein, Technische Universität München

Tab. 12: Ergebnisse der Patienten beim Flow CAST®. (Die Werte geben die CD63 Aktivierung in Prozent an).

Pat.	Neg. Kontr.	Pos. Kontr.	PG e2	PG e3	PV e2	PV e3	PPL e2	PPL e3	MDM e2	MDM e3	Amp e2	Amp e3	Ax e1	Ax e2	Cef e2	Cef e3	Cipro e2	Cipro e3
1	4,5	79,2			1,1	4,7	4,3	4,7	2,2	3,4					2,4	1,3		
2	2,7	37,9					4,4	5,7	0,9	2,4	2,8	4,6	3	1,6			1	2
4	2,5	33,9					1,7	15,6	1,5	3					2,8	1,6		
5	3,6	45,3			0,8	3,7	3,2	2	2,1	2,3					15	16,8	1,9	5,1
6	3,9	24,2	3,3	3			3,2	4,4	1,6	3,1	3,1	4,8	5,9	6,2	6,6	10,6		
7	4,5	60,9	3,8	4,3	3,1	6,7	3,8	4,6	2	3,9			0,9	3,2				
8	4,2	83,6	2,7	5,1	3,9	4,7	5,3	1,2	3	3,9								
10	1,7	46,8					5,2	3,3	1,9	20,6			1,3	1,9				
11	5,4	42,4	1,7	6			7	6,4	3,7	2,3			2,5	2,7	7,9	11,8		
12	4	83,4	3,7	4,8	3	4,4	2,9	4,9	5,2	10,2								
13	2,5	30,4	1,7	1,7	0,6	1,5	1,5	0,9	1,7	2,5			1,5	0,4	2,5	1,1		
14	4,2	71,7	2,5	3,7	1	3,5	3,9	3,5	3,7	3,7			2,5	2	2,7	15,4		
17	12,8	81,5	3,3	6	6,4	12,2	5	4,6	5	4,8								
19	2,4	70,3	0,2	1	1	1	2	2,2	0,8	2,3					1,6	1,7		
20	2,6	52,1	4,3	2,2	1,5	0,8	2,9	1	2,3	1,7					3,1	2,1		
21	3,6	26,6					1,8	1,4	0,2	1,8			2,9	0,7				

## VII Anhang

Tab. 13: Ergebnisse der Patienten beim Flow2-CAST®. (Die Werte geben die CD63 Aktivierung in Prozent an).

Pat.	Neg. Kontr.	Pos. Kontr.	MLP Pos. Kontr.	PG e1	PG e2	PG e3	PV e1	PV e2	PV e3	PPL e1	PPL e2	PPL e3	MDM e1	MDM e2	MDM e3	Amp e1	Amp e2	Amp e3	Ax e1	Ax e2	Cef e1	Cef e2	Cef e3	Cipro e1	Cipro e2	Cipro e3
1	2,1	86,7	95,6				3	1,5	4	4,2	1,5	2,6	2,1	0,9	1,2						5	1,2	3,2			
2	1,7	91,4	44,9							4	4,2	3,1	4,2	2,6	3	4,7	3,7	3,1	3,5	2,9				4	2,3	3,6
3	2,9	88,4	59,6	0,8	0,9	2,7	1,5	1,7	1,7	1,8	0,9	1,8	0,6	1,5	1,5									1,5	0,9	0,6
4	2,2	34	32,3							0,6	2,6	0,9	1,3	3,1	1,2							1,2	0,6	0,3		
5	1,8	88,5	39,4				1,2	0,3	0,6	0,9	0,3	1,5	1,5	0,3	0,6						17,6	20,7	21,2	5,3	2,9	3,3
6	3,2	55,2	63,4	4,6	3,2	2,9				2,6	1,7	2,3	1,7	1,8	2,9	2,6	3,2	1,7	2,3	0,6	3,2	2,3	0,6			
7	2,1	62	75,2	1,3	1,6	83,9	2,1	0,8	2,9	1,1	4,7	1,1	0,5	1,4	1,1				1,4	1,1						
8	1,4	91,5	77,4	4	2,3	4,1	4,9	1,8	4,1	3,5	1,8	3,6	2,1	3	4,4											
10	1,7	48,9	22,9							0,6	0,6	0	1,8	0,3	0,3				0,6	0,6						
11	2,5	80,8	86,3	3,8	1,4	1,3				1,2	0	0,9	1,3	1	0,3				1,5	0,3	100	65	17,8			
12	1,7	89	22,6	0,8	1,5	1,4	1,1	1,4	2,9	1,8	1,5	1,7	3,2	1,2	2											
13	4	26,8	11,2	4,3	0,7	0,3	0,8	1,7	1,6	0,3	1,3	2,3	2,2	0,7	2,2				1,3	2,2	6,9	4	3,9			
14	2,3	69,3	32,2	5,1	4	1,5	4,8	1,2	0,9	1,2	1,2	1,5	1,8	1,2	3,3				2,3	1,2	4,2	5,9	0,9			
15	9,9	87,5	69,5	8	4,5	6,1	85,9	3,4	6,5	11,1	8,1	3,9	5,7	5,1	11,6				7,3	11,1						
17	1,8	85,5	36,2	15	5,6	0,9	6,1	0,6	0,9	1,5	0,9	1,2	2,6	1,7	0,3											
18	1,8	94,2	46,4	10,9	4,7	4	8,3	2,8	4,8	3,3	5,3	3,7	17,1	5,5	3,4						8	9,2	4,6			
19	2,5	90,6	72,1	29,8	7,5	4,4	25,4	6	5,5	4,3	4,2	4,2	16,1	3,2	1,9						49,6	35,6	9,7			
20	2,2	86,8	51,5	12,8	4,8	4,5	11,1	2,3	2,7	1,9	1,2	2,7	6,6	1,6	3,4						55,8	8,8	3,3			
21	8,3	51,3	24							2,4	3,5	10,3	1,1	1,6	1,9				3,6	0,9						

Tab. 14: Ergebnisse der Patienten beim CAST 2000®-ELISA. (Die Werte geben die Leukotrienkonzentration in pg/ml an).

Pat	Neg. Kontr.	Pos. Kontr.	PG e2	PG e3	PV e2	PV e3	PPL e2	PPL e3	MDM e2	MDM e3	Amp e2	Amp e3	Ax e1	Ax e2	Cet e2	Cet e3	Cipro e2	Cipro e3
1	50,4	>3200			22,5	6,5	16,1	<0	8,8	<0					5,4	11,7		
2	51,5	1315,6					24,6	24,3	23,4	23,5	72,7	52,8	51,9	26,1			41,3	42,9
4	39,6	2377,7					5,8	16,3	<0	<0					4,4	<0		
5	40,7	>3200			28,5	20,5	34,8	25,4	<0	<0					434,4	399	14,1	<0
6	79,5	>3200	20,3	9,1			16	28,5	7,6	10,4	36,6	15,8	35	20,8	22,4	24,4		
7	21,2	>3200	<0	<0	14,4	21,9	14,7	<0	<0	<0			9,8	<0				
8	107,8	>3200	<0	<0	<0	<0	<0	<0	<0	<0								
9	<0	983,9	28	<0	25,7	25,1	17	19,3	18,5	18,3			68,1	29,7				
10	98,8	>3200					<0	<0	<0	<0			5,3	<0				
11	<0	1222,1	<0	<0			<0	<0	<0	<0			<0	<0				
12	103,5	>3200	<0	<0	0,9	<0	<0	15,9	0,7	<0								
13	159,4	>3200	<0	<0	<0	<0	<0	<0	<0	<0					28	<0		
14	71,1	>3200	22,8	5,5	21,9	18	<0	<0	0,6	10,7			22,3	8,5	22	12,7		
16	66	276,1	18,4	27,4	2,8	4,8	4,3	7,9	10,4	24,7								
17	77,3	>3200	21,5	<0	<0	<0	<0	<0	<0	15,6								
18	46,3	>3200	<0	56,1	76,3	<0	<0	3,2	4,5	11,2					41,6	22,6		
19	92,2	>3200	<0	2,7	<0	<0	<0	<0	<0	<0					24,7	<0		
21	<0	1343,1					<0	<0	<0	<0			<0	<0				

Tab. 15: Ergebnisse der Kontrollen beim Flow CAST®. (Die Werte geben die CD63 Aktivierung in Prozent an).

Kontr.	Neg. Kontr.%	Pos. Kontr.%	PG e2	PG e3	PV e2	PV e3	PPL e2	PPL e3	MDM e2	MDM e3	Amp e2	Amp e3	Ax e1	Ax e2	Cef e2	Cef e3	Cipro e2	Cipro e3
1	1,8	67,9	0	0	1,2	1	3,1	4,7	0,5	3,7	4,7	3,2	3,6	1,9	1,9	3,7	1,5	2,9
2	1,6	26,6	1,3	0,6	1,1	2,2	1,6	1	1,1	1,1	1	1,8	1,9	1,3	0,6	0,8	0,6	0,5
3	2,8	56,9	1,6	2,1	1,8	2,2	1,5	1,3	0,7	2,4	0,4	2,3	8,4	0,5	2	2,9	2,9	2,8
4	5,6	27	7	7,6	4,3	4,6	9,2	10,3	6,3	5,5	4	7,7	6,4	8,2	5,2	5,6	3,1	7,5
5	2,9	90,9	1,2	3,7	1,2	4,8	3,6	5,8	5,1	2,6	0,7	1,8	6	1,2	2,8	1	0,7	2
6	3,4	56,2	1,8	2,9	2,5	2,7	3,3	4,9	2,7	3,9	2	3	1	3	0,9	1,9	1,3	3,3
7	2,1	51	3	1,8	3,8	2,4	1,7	2	1,9	4	1,3	2,1	3,8	1,6	3	2,5	2,1	2,8
8	4,4	33,9	1,8	2,8	2,3	3,2	3,9	2,9	2,6	4,6	2,5	3,3	4,9	3,9	0,9	3	1,2	2,6
10	5,2	13,3	5	5,5	1,3	1,5	5	3,5	1,3	3,9	4,2	3,5	2,8	1	3,5	2,3	0,6	1,7
11	2	34	0,6	1,7	1	1	3,1	2,5	0,2	2,4	1,5	1,7	2	0,8	1,7	2,3	1,9	0,6
12	4,7	36,8	1,2	3,7	2,7	9,4	2,2	1,7	3,6	1,8	0,7	1,5	2,1	3,1	1,4	1,4	2,6	3



Tab. 16: Ergebnisse der Kontrollen beim Flow2 CAST®. (Die Werte geben die CD63 Aktivierung in Prozent an).

Kontr.	Neg. Kontr.%	Pos. Kontr.%	MLP Pos. Kontr.%	PG e1	PG e2	PG e3	PV e1	PV e2	PV e3	PPL e1	PPL e2	PPL e3	MDM e1	MDM e2	MDM e3	Amp e1	Amp e2	Amp e3	Ax e1	Ax e2	Cef e1	Cef e2	Cef e3	Cipro e1	Cipro e2	Cipro e3
1	1,8	51,9	47,2	2,1	1,8	2,3	0,3	1	1,2	1,4	2	2,9	0,8	4,5	0,9	1,2	1,4	2	1,7	2,9	1,4	2,9	3,8	2,6	4,9	3,5
2	2,8	26,1	50,6	0,7	0	1,2	0,8	0,9	0,9	0,3	0,9	1,2	0,9	0,3	0,9	0	0,9	0,6	2,1	0,9	0,6	1,5	2,3	1,8	0,9	1,5
3	1,9	64,1	36,5	1,6	0	1,8	0,6	0,4	0	0,4	0,7	0	1,1	0,7	1,1	0,7	0,7	1,4	1,5	0,7	0,4	1,1	1,8	1,8	0,8	0,7
4	1,8	68,4	75,6	1,3	2,8	2,7	2,5	1,8	2,1	3,3	3,1	1,2	2,2	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,4	3	1,8	3,3	2,3	2,2	1,8	4,2
5	0,7	88,3	52	0,7	0,7	1	0,2	0,3	0,6	1	1,6	0,7	1,3	0	1,3	1	0,6	1,9	1,3	1	0,3	1,3	0,6	0,7	1	0,3
6	1,7	68,5	72,4	2,4	0,8	0	2,2	0,8	2	2,5	2,5	3,7	3	2,3	1,4	1,7	1,7	1,7	2,8	2,3	4,1	3,1	3,4	2,3	2,3	2,8
7	2,3	51,7	67,1	2,6	0,9	0,9	2,3	2	3,5	2,3	3,1	2,8	1,5	2,6	1,7	2,3	0,9	1,4	1,5	0,6	2,5	5,2	2	2,3	3,7	2,6
8	0,3	89,8	52,9	1,5	0,6	0,3	1,5	0,9	0,3	0,6	0,3	1,2	0,6	0,3	0,9	0,9	0,6	0,3	0,6	0,6	1,1	0,6	0,9	0,9	0	0,3
9	0,9	93,8	20,3	3	0,6	0,9	2,4	1,2	0,9	2,7	2,3	0,9	1,5	1,5	0,9	1,8	2,4	3,5	3	1,7	3,5	2,6	2,9	0,9	2,3	1,2
10	2,4	10,9	54	4,8	1,5	1,5	1,2	2,4	1,9	2,4	1,5	2,2	0,9	1,5	1,2	2,2	3,3	1,9	2,5	4,8	3,1	3,3	5,6	4	0,6	2,5
11	2	25	22,6	0,6	0,6	1,4	0,4	2,8	0,6	1,2	1,2	1,5	3,1	1,7	1,7	0,3	1,7	0,3	1,4	2,3	1,1	3,7	1,7	0,9	3,4	2,6
12	2,5	81,4	93,6	6,6	3,2	1,5	7,3	1	0,9	1	2,1	0,9	2,8	1	1,6	1,6	1,3	1	2,1	1,3	3,1	1,2	0,6	5,3	3,4	3

Tab. 17: Ergebnisse der Kontrollen beim CAST-2000 ELISA®. (Die Werte geben die Leukotrienfreisetzung in pg/ml an).

Kontr.	Neg. Kontr.	Pos. Kontr.	PG e2	PG e3	PV e2	PV e3	PPL e2	PPL e3	MDM e2	MDM e3	Amp e2	Amp e3	Ax e1	Ax e2	Cef e2	Cef e3	Cipro e2	Cipro e3
1	15,2	2004,4	50,3	61,3	50	59,3	73,2	70,6	42,1	24,2	79,2	52,3	56,7	48	49,2	58,6	76,7	58,6
3	103,6	>3200	14	16	20	20,2	31,4	28,9	34,6	34,8	89,5	51,4	49,4	35	44	48,2	75,7	64,4
4	61,6	>3200	10,4	9,6	22,8	17,1	14,3	8,9	42,1	24,2	79,2	52,3	56,7	48	49,2	58,6	76,7	58,6
5	62,6	>3200	<0	<0	<0	<0	<0	<0	1,4	<0	30,2	6,8	12,4	<0	<0	<0	11	<0
6	53,7	>3200	13,2	4	21,5	10,6	1,6	<0	16,2	19,9	52,6	<0	49,1	16,9	13,5	<0	52,2	37
7	89,5	>3200	8,6	15,4	28	35,5	17	21,9	19	26,5	67,3	44,8	54,4	47,9	34,6	26,7	65,4	47,4
8	78,4	>3200	2,4	<0	8,2	9,8	9,2	18,8	28,5	7,7	48,9	29,5	40,8	24,3	34,8	39,8	48,8	17,5
9	67,8	>3200	<0	1,2	<0	<0	<0	<0	<0	17,1	55,4	29,5	18,4	2,6	22,7	<0	3,3	<0
10	37,4	1381	<0	6,6	0,9	2,1	7,2	<0	<0	<0	49	30,2	31,8	10,6	19,5	12,4	<0	<0
11	70,5	>3200	1,1	2,7	12,7	1,1	0,8	<0	18,6	<0	<0	<0	14,6	<0	5,4	26,3	12,3	16,3
12	31,6	>3200	<0	5,6	10,4	6,8	6,8	2,1	19,9	5,4	17,9	8,9	11,6	8,8	12,4	3,3	9	3,5