

**Technische Universität München  
Klinik und Poliklinik für Dermatologie und  
Allergologie am Biederstein**

**Wertigkeit des Basophilenaktivierungstests bei Patienten mit  
Insektengiftallergie und Doppelsensibilisierung auf Bienen- und Wespengift**

**LILIAN FELICITAS KRISCHAN**

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

**Doktors der Medizin (Dr. med.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende(r): Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Bernadette Eberlein
2. Prof. Dr. Dirk Busch

Die Dissertation wurde am 30.07.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Medizinische Fakultät am 20.03.2019 angenommen.

## **Verzeichnis der veröffentlichten Daten aus der Arbeit:**

### **Vorträge auf Kongressen/Tagungen:**

1. Krischan L, Schneider M, Sonnenschein U, Darsow U, Ring J, Eberlein B  
Double positivity to bee and wasp venom – help by recombinant allergen – based IgE testing or basophil activation tests?  
Vortrag auf dem 4. Euro BAT Meeting, 31.Oktober – 1. November 2010, München.
2. Krischan L, Schneider M, Sonnenschein U, Darsow U, Ring J, Eberlein B  
Wertigkeit des Basophilenaktivierungstests und der Bestimmung rekombinanter Allergene bei Patienten mit Doppelpositivität auf Bienen- und Wespengift.  
Vortrag auf dem 9. Arbeitsgespräch Insektengiftallergie, 20/21. Mai 2011, Landshut  
Allergo J 2011; 20: 192

### **Publikation:**

Eberlein B, Krischan L, Darsow U, Ollert M, Ring J. Double positivity to bee and wasp venom: improved diagnostic procedure by recombinant allergen-based IgE testing and basophil activation test including data about cross-reactive carbohydrate determinants.  
J Allergy Clin Immunol 2012; 130: 155-161

### **Preise:**

Allmirall Förderpreis Dermatologie 2013 für oben genannte Publikation

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Insektengiftallergie</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie .....	1
1.1.2	Allergieauslösende Insekten.....	1
1.1.3	Bienen- und Wespengift.....	3
1.1.4	Pathomechanismus der Insektengiftallergie.....	6
1.1.5	Klinik der Stichreaktion und Anaphylaxie.....	10
1.1.6	Risikofaktoren einer systemischen Reaktion .....	12
<b>1.2</b>	<b>Diagnostik der Insektengiftallergie</b> .....	<b>12</b>
1.2.1	Anamnese .....	13
1.2.2	Hauttest.....	14
1.2.3	In-vitro-Testverfahren .....	15
1.2.3.1	Nachweis von allergenspezifischem IgE gegen Bienen- und Wespengift sowie gegen rekombinante Allergene.....	15
1.2.3.2	Zelluläre Tests .....	17
1.2.3.3	Mediatorbestimmungen.....	18
<b>1.3</b>	<b>Therapie der Insektengiftallergie</b> .....	<b>20</b>
1.3.1	Prophylaxe.....	20
1.3.2	Spezifische Immuntherapie (SIT) .....	21
<b>1.4</b>	<b>Basophilenaktivierungstest (BAT)</b> .....	<b>24</b>
1.4.1	Basophile Granulozyten .....	24
1.4.2	Prinzip des BAT .....	24
1.4.3	BAT bei Insektengiftallergie.....	25
<b>1.5</b>	<b>Problemstellung und Zielsetzung der Studie</b> .....	<b>26</b>
1.5.1	Doppelpositivität/Doppelsensitivität.....	26
1.5.2	Glykoproteine und CCDs .....	27
1.5.3	Zielsetzung der Studie .....	28
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1</b>	<b>Patienten und Kontrollen</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2</b>	<b>Diagnostik</b> .....	<b>30</b>
2.2.1	Anamnese .....	30
2.2.2	Hauttest.....	30
2.2.3	Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper.....	30

2.2.4	ELISA mit rekombinanten Insektengiftallergenen .....	31
<b>2.3</b>	<b>Basophilenaktivierungstest.....</b>	<b>32</b>
2.3.1	Reagenzien, Material und Geräte .....	32
2.3.2	Durchführung des Basophilenaktivierungstests .....	35
2.3.3	Durchflusszytometrie .....	38
2.3.4	Prinzip der Datenanalyse.....	40
2.3.5	Auswertung und Bestimmung der halbmaximalen Konzentration .....	43
2.3.5.1	Beispiel.....	45
<b>2.4</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>48</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>Überblick.....</b>	<b>50</b>
3.1.1	Anamnese .....	56
3.1.2	Hauttest.....	57
3.1.3	sIgE auf Bienen- und Wespengift .....	58
3.1.4	sIgE auf rekombinante Allergene.....	59
3.1.5	Basophilenaktivierungstest mit Bienen- und Wespengift .....	60
3.1.5.1	Auswertung mittels Cut-off von $\geq 15\%$ .....	60
3.1.5.2	BAT und Auswertung mittels halbmaximaler Konzentration.....	62
<b>3.2</b>	<b>Konkordante und diskordante Ergebnisse .....</b>	<b>63</b>
3.2.1	Anamnese und Basophilenaktivierungstest.....	63
3.2.2	Hauttest und Basophilenaktivierungstest .....	64
3.2.3	sIgE auf rekombinante Allergene im Vergleich zum BAT .....	64
<b>3.3</b>	<b>Kohlenhydratseitenketten .....</b>	<b>66</b>
3.3.1	Spezifisches IgE auf CCDs (MUX F3 von Bromelain und Meerrettichperoxidase (HRP)).....	66
3.3.2	Basophilenaktivierungstest mit Bromelain und Meerrettichperoxidase .....	66
3.3.3	Vergleich CAP und BAT .....	67
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>69</b>
<b>4.1</b>	<b>Doppelsensibilisierung .....</b>	<b>70</b>
4.1.1	Problematik für Arzt und Patient .....	71
<b>4.2</b>	<b>Aspekte der Insektengiftallergiediagnostik .....</b>	<b>72</b>
4.2.1	Anamnese .....	73
4.2.2	Intrakutantest.....	74

-Inhaltsverzeichnis-

4.2.3	Spezifisches IgE .....	74
4.2.4	Stichprovokation .....	76
4.2.5	Zelluläre Tests .....	76
4.2.6	sIgE auf rekombinante Allergene.....	77
4.2.7	CCDs (Cross-reactive carbohydrate determinants).....	81
4.2.8	BAT.....	83
<b>4.3</b>	<b>BAT in vorliegender Studie.....</b>	<b>87</b>
4.3.1	BAT mit Bienen- und Wespengift .....	87
4.3.2	Konsequenz aus BAT-Ergebnissen.....	87
4.3.3	BAT mit Bromelain und Meerrettichperoxidase (HRP) .....	89
<b>4.4</b>	<b>Spezifische Immuntherapie bei Patienten mit sIgE auf Bienen- und Wespengift.</b>	<b>92</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>102</b>
<b>1</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>103</b>
<b>2</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>127</b>
<b>3</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>149</b>
<b>4</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>150</b>

-Abkürzungsverzeichnis-

Abkürzung	Bedeutung
ACE	Angiotensin converting enzyme
AK	Antikörper
Api	Allergenkomponente des Bienengifts
B	Biene/Bienengift
BAT	Basophilenaktivierungstest
Br	Bromelain
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-Linked-Immunsorbent-Assay
ca.	circa
CAP	Carrier-Polymer-System
CAST	Cellular-Antigen-Stimulation-Test
CCD	Cross-reactive Carbohydrate Determinant
CD	Cluster of Differentiation
c	Concentration
C50	halbmaximale Stimulation
Da	Dalton
FACS	Fluorescence-Activated-Cell-Sorter
Fcε-RI	Hochaffiner IgE Rezeptor
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FL	Fluoreszenz
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
FSC	Forward Scatter
gp	Glykoprotein
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
i. c.	intrakutan
i. m.	intramuskulär
i. v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G

-Abkürzungsverzeichnis-

IL	Interleukin
JAK	Janus Acid Tyrosinkinase
$\kappa$	Kappa
kg	Kilogramm
kU	Kilounits
l	Liter
min	Minuten
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
ml	Milliliter
MUXF	$\text{Man}\alpha\text{1-6}(\text{Xyl}\beta\text{1-2})\text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-4}(\text{Fuc}\alpha\text{1-3})\text{GlcNAc}$
ND	Not Done (nicht durchgeführt)
neg	negativ
NA	Not Available (nicht verfügbar)
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
Pat.	Patient
PBS	Phosphate Buffered Saline
pos	positiv
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
ROC	Receiver-Operating-Characteristics
r	rekombinant
s.	siehe
S.	Seite
s	spezifisch
SD	Standarddeviation
sIg	spezifisches Immunglobulin
SIT	spezifische Immuntherapie
sog.	sogenannt
SSC	Side Scatter
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Tab.	Tabelle
TH1	T-Helferzelle Typ 1

-Abkürzungsverzeichnis-

TH2	T-Helferzelle Typ 2
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
Ves	Allergenkomponente des Wespengifts
vs.	versus
W	Wespe/Wespengift
x	mal
&	und
%	Prozent
+	positiv
-	negativ
°C	Grad Celsius

# **1 Einleitung**

## **1.1 Insektengiftallergie**

### **1.1.1 Epidemiologie**

Bienen- und Wespenstiche gehören zusammen mit Arznei- und Nahrungsmitteln zu den häufigsten Auslösern einer systemischen Überempfindlichkeitsreaktion mit den Symptomen der Soforttypallergie (Anaphylaxie; 7, 130, 132, 133). Weltweit berichten zwischen 54% und 94% der Erwachsenen, mindestens einmal in ihrem Leben von einem Insekt gestochen worden zu sein (5). Ca. 1,2-4,5% der Bevölkerung in Deutschland leiden an einer Überempfindlichkeit gegen Insektengifte, in Europa und den USA sind ca. 0,8-5% betroffen (13, 49, 58). Die Prävalenz für ausgeprägte lokale Reaktionen wird mit bis zu 19% angegeben, bei bis zu 25% der Bevölkerung lassen sich positive Hauttests und insektengiftspezifische Antikörper der Immunglobulinklasse E (IgE) als Ausdruck einer Sensibilisierung für Hymenopterengift nachweisen (134).

Zwischen 1990 und 2006 gab das statistische Bundesamt in Deutschland die Zahl der Toten nach einem Stich einer Biene, Wespe oder Hornisse mit insgesamt 335 an. Allerdings wird von einer hohen Dunkelziffer ausgegangen, da die Anaphylaxie häufig nicht als solche erkannt wird (134). Post-mortem-Studien über plötzliche und unerwartete Todesopfer im Alter zwischen 15- und 65-Jährigen zeigten, dass bei bis zu 32% erhöhte IgE-Werte für mindestens ein Insektengift vorlagen (162).

Die häufigste Todesursache bei Insektengiftallergikern ist ein Atemstillstand als Ausdruck einer anaphylaktischen Reaktion nach einem einzelnen Stich in den Kopf oder Nacken. Aber auch eine große Anzahl von Stichen bei Nicht-Allergikern kann tödlich sein (194).

### **1.1.2 Allergieauslösende Insekten**

In 99% der Fälle stammen die Gifte, welche eine insektenstichinduzierte Anaphylaxie auslösen, aus der Ordnung der Hymenopteren (Hautflügler), deren Subgruppe der Aculeata eine Aufteilung in Apidea, Vespoidea und Scolioidea erlauben.

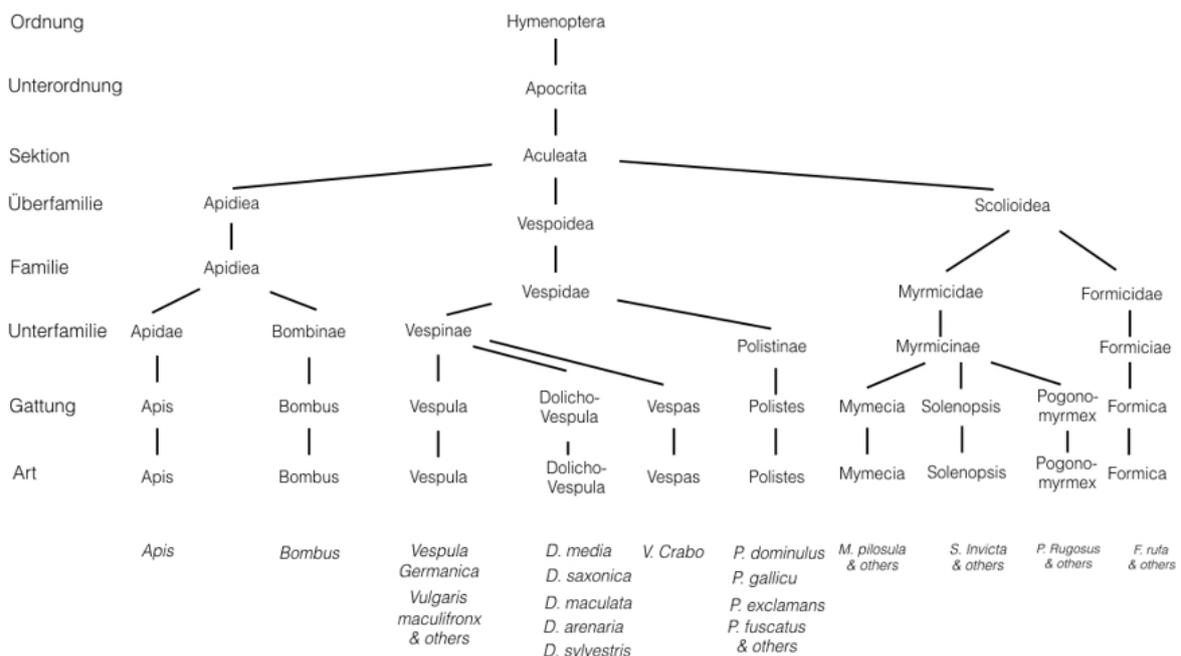
## -Einleitung-

Zu der Familie der Apidae gehören die Honigbiene (*Apis mellifera*, im Folgenden als Biene bezeichnet) und die Hummel (Genus *Bombus*), welche größer und behaarter ist als die Biene und durch eine gelbe oder weiße Bänderung am Abdomen charakterisiert ist.

Die Familie der Vespidae (Faltenwespen) werden in Vespinae (Papierwespen) und Polistinae (Feldwespen) unterteilt und sind neben ihrer schwarz-gelben Streifung beinahe unbehaart. Die Aufteilung der Vespinae erfolgt in *Vespula*, *Dolichovespula* und *Vespa* (Abbildung 1). Die Kurzkopfwespe, *Vespula vulgaris* (im Folgenden als Wespe bezeichnet), gehört zusammen mit der *Vespula germanica* zur Familie der Vespiden (12, 110).

Neben der Honigbiene, zeigen vor allem die *Vespula* spp. (Kurzkopfwespen, *Vespula germanica*, *Vespula vulgaris*, im Folgenden als Wespe bezeichnet) besondere Relevanz in Europa. Diese gelten als aggressiv und werden von Speisen und Müll angelockt, weshalb sie eine besondere Gefahrenquelle für den Menschen darstellen (12, 112, 195). Sie sind kleiner als die Hornissen (*Vespa Crabo*, Gattung *Vespa*), die Unterscheidung zur Gattung *Dolichovespula* (Langkopfwespen) fällt dagegen schwerer und ist aufgrund des kürzeren Augen-Flügel-Abstandes zu treffen (12).

In Australien und den USA sind die Feuerameise (*Solenopsis invicta*) aus der Familie der Scoliidea von größerer Bedeutung und häufig für allergische Stichreaktionen verantwortlich (112, 167, 194).



**Abbildung 1: Taxonomie der Hymenopteren (110)**

### 1.1.3 Bienen- und Wespengift

Durch einen Stich gelangt das Hymenopterengift, eine komplexe Mischung aus toxischen und allergisierenden Substanzen, in den menschlichen Körper (110). Während Bienen bei einem Stich im Durchschnitt zwischen 50 µg und 120 µg in die Haut injizieren und der Stechapparat zurückbleibt, sind dies bei der Wespe, welche ihren Stachel wieder zurückzieht, nur ca. 1,1-3,1 µg (12).

Das Wissen über die Giftzusammensetzung und Allergenstruktur ist wichtige Voraussetzung für eine korrekte Diagnosestellung sowie ein adäquates therapeutisches Vorgehen. In den letzten Jahrzehnten gelangen Isolation und Charakterisierung einzelner Hymenopterengifte, womit eine Basis für neue Diagnostikmethoden, wie beispielsweise die Bestimmung rekombinanter Allergene, geschaffen wurde (12, 78, 112).

Ein Großteil der Hymenopterengifte ist aus biogenen Aminen, Peptiden und Proteinen mit meist enzymatischen Eigenschaften zusammengesetzt (62, 110, 134). Des Weiteren werden die enthaltenen Allergene aufgeteilt in Minor- und Major-Allergene, gemessen an der Häufigkeit des Vorkommens von IgE-Antikörpern gegen die jeweiligen Allergene im Patientenserum. So bezeichnet der Begriff „Major-Allergen“ ein Allergen, welches bei  $\geq 50\%$  der Testpersonen eine Reaktion mit dem entsprechenden spezifischen IgE auslöst (93).

Im Folgenden wird die Zusammensetzung des Giftes der *Apis mellifera* (Biene) und der *Vespula vulgaris* (Wespe) näher erläutert (Tabelle 1 und 2):

Die beiden Hauptbestandteile des Bienengifts sind Melittin (Api m 4) und die Phospholipase A2 (Api m 1), deren Toxizität bei gleichzeitigem Vorhandensein noch ausgeprägter ist (66).

Melittin (Api m 4) stellt 50% des Trockengewichts und ist ein Peptid aus nur 26 Aminosäuren mit hoher Membrantoxizität. Dies führt anfangs zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und später zu Zytolyse von Mastzellen, Erythrozyten, Thrombozyten und Lysosomen. Hämolyse, Ganglienblockade und Histaminfreisetzung sind die Folge, was sich klinisch in Form von Krämpfen, Arrhythmie oder Vagotonie äußert (62, 66, 71, 110, 182). Wurde Melittin (Api m 4) früher neben Allergen C (Dipeptidylpeptidase, Api m 5) und Api m 6 (Proteaseinhibitor) zu den Minor-Allergenen gezählt, ordnen es Autoren neuerer Literatur den Major-Allergenen zu (12, 66, 112, 122, 169).

Ebenfalls zu den Peptiden zählen Apamin, welches nicht zu den Allergenen gezählt wird und über seine neurotoxische Wirkung zu tonisch-klonischen Krämpfen führt, sowie das Mastzelldegranulierende Peptid (MCD-Peptid), welches die Freisetzung von Histamin bewirkt (62, 78).

## -Einleitung-

Weiterhin zu den Major-Allergenen des Bienengifts zählen die Phospholipase A2 (Api m 1), die Hyaluronidase (Api m 2) und die Saure Phosphatase (Api m 3).

Die Phospholipase A2 (Api m 1) stellt mit einem Trockengewicht von 12-15% neben dem Melittin (Api m 4) einen Hauptbestandteil und das wichtigste Enzym des Bienengifts dar (62, 112). Ihre zytolytische Wirkung aufgrund ausgeprägter Oberflächenaktivität führt zu einer Histaminfreisetzung und zu indirekter Hämolyse durch Katalyse von Lysolecithin (62, 71). Weitere Interaktionen mit der Atemkette führen zusätzlich zu einer Inaktivierung des Thrombins (62, 110). Ende der 80er-Jahre ist es der Wissenschaft gelungen, die DNA des Major-Allergens Api m 1 (Phospholipase A2) zu entschlüsseln und sich somit diagnostischen Zwecken zu Nutzen zu machen (31, 90).

Die Hyaluronidase (Api m 2), mit einem Trockengewicht von 1-3% wird, aufgrund ihrer Eigenschaft Mucopolysaccharide des Hautbindegewebes zu hydrolysieren und damit ein Eindringen des Giftes in tiefere Hautschichten zu fördern, auch als „Spreading factor“ bezeichnet (62, 71). Unterstützt wird sie dabei von den biogenen Aminen, wobei hier als wichtigster Vertreter Histamin zu nennen ist (62, 110). Ihre vasodilatatorische und permeabilitätssteigernde Eigenschaft trägt ebenfalls zu einer Giftausbreitung im Gewebe bei. Zusammen mit Peptiden wie Melittin (Api m 4), bewirkt sie eine juckende Schwellung an der Einstichstelle (62, 71).

Weiterhin lassen sich Katecholamine, Kohlenhydrate sowie Aminosäuren im Bienengift nachweisen (110).

Aufgrund des kontinuierlichen Fortschritts in der Wissenschaft, findet die Auflistung rekombinanter Allergene des Bienengifts heutzutage laufend Ergänzung. So erfolgte in neuerer Zeit die Identifikation der Serinprotease (Api m 7), der Carboxylesterase (Api m 8), der Carboxypeptidase (Api m 9), des Icarcapins (Api m 10), zweier Isoformen von Api m 11 sowie des Vitellogenins (Api m 12; 169). Besonderes Augenmerk richtet sich hierbei auf Icarcapin (Api m 10) sowie Vitellogenin (Api m 12), weitere Minor-Allergene des Bienengifts, welche zukünftig eine bedeutende Rolle in Diagnostik und Therapie spielen könnten (19, 83, 122).

Wie im Bienengift stellen auch Enzyme, Peptide und biogene Amine (Katecholamine, Aminosäuren, Serotonin) die wesentlichen Komponenten des Wespengifts dar (80). Zu den Major-Allergenen werden die Phospholipase A1 (Ves v 1), Hyaluronidase (Ves v 2) und Antigen 5 (Ves v 5) gezählt. Mit einem Trockengewicht von 6-14% bzw. 5-10% stellen die Phospholipase A1 (Ves v 1) und das Antigen 5 (Ves v 5) quantitativ den wichtigsten Bestandteil dar (110, 122).

Die Hyaluronidase (Ves v 2), welche in der Vergangenheit den Minor-Allergenen zugeordnet wurde, zeigt eine beachtliche Sequenzhomologie mit der des Bienengifts (Api m 2) und ähnelt ihr in ihren Eigenschaften. Zusätzlich zur klassischen Hyaluronidase (Ves v 2 bzw. Ves v 2.0101) gelangen Kolarich et al. 2005 die Identifikation einer offensichtlich entscheidenden inaktiven Isoform (Ves v 2.0201; 84).

Das 2010 von Blank et al. isolierte Minor-Allergen Dipeptidylpeptidase des Wespengifts (Ves v 3), weist ebenfalls Sequenzhomologien zur Dipeptidylpeptidase des Bienengifts (Api m 5) auf (17).

Ein weiteres Allergen des Wespengifts stellt das Vitellogenin (Ves v 6) dar. Dem Vitellogenin des Bienengifts Api m 12 entsprechend, weisen beide neben Sequenzhomologien von Aminosäuren Ähnlichkeiten bei Molekulargewicht und IgE-Reaktivität auf. Die besondere Bedeutung dieser beiden rekombinanten Allergene liegt in deren offensichtlicher CCD-Freiheit, weshalb die Vitellogenine zukünftig in der Diagnostik der Insektengiftallergie eine entscheidende und tragende Rolle spielen könnten (19).

Liegt der Histamingehalt im Bienengift bei 1% am Trockengewicht, so liegt er mit 4% im Wespengift deutlich höher (62, 110, 134, 194). Zusammen mit den Peptiden sind die biogenen Amine ebenfalls für die lokale Schwellung an der Einstichstelle verantwortlich. Die systemische Toxizität ist den Kininen, kleinen niedermolekularen Peptiden im Wespengift, zuzuschreiben, welche durch Einwirkung an der glatten Muskulatur zu Blutdruckabfall und Bronchialkonstriktion führen (62). Die Funktion der Phospholipase A1 (Ves v 1) ähnelt der des Bienengifts (Api m 1; 79).

Den Major-Allergenen Api m 1 (Phospholipase A2) des Bienengifts und Ves v 5 (Antigen 5) des Wespengifts kommt in der vorliegenden Studie eine besondere diagnostische Wertigkeit zu, weshalb sie im Kapitel Material und Methoden nochmals ausführliche erläutert werden.

**Tabelle 1: Zusammensetzung des Bienen- und Wespengifts**

	Bienengift	Wespengift
Niedermolekulare Substanzen ≤ 1000 kDA	Histamin Katecholamine Kohlenhydrate Aminosäuren	Histamin Katecholamine Aminosäuren Serotonin
Peptide ≥ 1000 kDA	Melittin (Api m 4) Apamin MCD-Peptid Proteaseinhibitor (Api m 6)	Kinine
Enzyme 10000-20000 kDA	Phospholipase A2 (Api m 1) Hyaluronidase (Api m 2) Saure Phosphatase (Api m 3) Dipeptidylpeptidase (Allergen C, Api m 5) Serinprotease (Api m7) Carboxylesterase (Api m8) Carboxypeptidase (Api m9) Icarapin (Api m10) MRJP 8 (Api m 11.0101) MRJP (Api m 11.0201) Vitellogenin (Api m 12)	Phospholipase A (Ves v 1) Hyaluronidase (Ves v 2) Dipeptidylpeptidase (Ves v3) Antigen 5 (Ves v5) Vitellogenin (Ves v6)

**Tabelle 2: Übersicht einzelner Hymenopteregifte (108, 117, 122, 169, 185)**

Gift	Allergen	Name	Major/Minor	Entschlüsselt	Rekombinant vorhanden	Glykosiliert
<b>Apis mellifera</b>	Api m1	Phospholipase A2	Major	Ja	Ja	Ja
	Api m 2	Hyaluronidase	Major	Ja	Ja	Ja
	Api m 3	Saure Phosphatase	Major	Ja	Ja	Ja
	Api m 4	Melittin	Minor?	in syn-thetischer Form	Ja	Nein
	Api m 5	Dipeptidylpeptidase	Major	Ja	Ja	Ja
	Api m 6		Minor	Ja	Ja	Nein
	Api m 7	CUB Serinprotease	Major?	Teils	Teils	Ja
	Api m 8	Carboxylesterase				Ja
	Api m 9	Carboxypeptidase				Ja
	Api m 10	Icarapin	Major	Ja		Ja
	Api m 11.0101	MRJP 8	Minor			Ja
	Api m 11.0201	MRJP 9	Minor			Ja
Api m 12	Vitellogenin				Ja	
<b>Vespa vulgaris</b>	Ves v 1	Phospholipase A1	Major	Ja	Ja	Nein
	Ves v 2	Hyaluronidase	Major	Ja	Ja	Ja
	Ves v 3	Dipeptidylpeptidase	Minor	Ja	Ja	Ja
	Ves v 5	Antigen 5	Major	Ja	Ja	Nein
	Ves v 6					Ja

### 1.1.4 Pathomechanismus der Insektengiftallergie

Eine Allergie entsteht infolge einer gestörten Immunreaktion auf eigentlich harmlose exogene Substanzen, welche mit pathologischen Symptomen einhergeht (183).

Prinzipiell gilt es zwischen einer Sensibilisierung und einer allergischen Reaktion zu unterscheiden. Diese geht einer solchen bei erstmaligem Antigenkontakt voraus und verläuft klinisch stumm. Erst bei erneutem Kontakt mit dem Fremdstoff treten klinische Symptome auf, die unter Umständen lebensbedrohlich sein können (142).

Immunglobulin E (IgE) sowie Mastzellen und basophile Granulozyten mit dem hochaffinen IgE-Rezeptor Fc $\epsilon$ RI nehmen in der Pathogenese der Allergie eine Schlüsselrolle ein.

Nach Primärexposition des menschlichen Organismus auf einen Fremdstoff erfolgt aufgrund enzymatischer Eigenschaften die Aufnahme durch dendritische Zellen. Mithilfe des im Zytosol vorhandenen Ubiquitins und der damit einhergehenden Zerlegung in Peptidfragmente, werden diese vom „Major histocompatibility complex“ Klasse II (MHC II) an der Zelloberfläche präsentiert und von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen/T-Helferzellen erkannt. Abhängig von der produzierten Zytokinart erfolgt eine Einteilung in TH1- und TH2-Helferzellen. Bei ausreichendem Vorhandensein von IL-4 differenzieren sich die T-Helferzellen in TH2-Zellen und sekretieren IL-4 und IL-13. Durch die als Switch-Faktor bezeichneten Zytokine IL-4 und IL-13 sowie durch Einwirken von CD40 auf die B-Zellen und den CD40-Liganden, kommt es über die Janusfamilien-Tyrosinkinasen JAK1 und JAK3 zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) und somit zur B-Zellaktivierung und dem Immunglobulinklassenwechsel zu IgE.

Zusammen mit seinen Oberflächenrezeptoren, dem hochaffinen Fc $\epsilon$ RI-Rezeptor und dem niedrigaffinen Fc $\epsilon$ RII-Rezeptor, stellt Immunglobulin E (IgE) das Schlüsselement der Allergie vom Soforttyp (Typ I) dar.

Die allergenspezifischen IgE-Antikörper binden mit ihrer Fc-Portion an die  $\alpha$ -Kette, die Bindungsstelle des Fc $\epsilon$ RI-Rezeptors, und bilden einen IgE-Fc $\epsilon$ RI Komplex. Ein erneuter Allergenkontakt (Sekundärexposition) führt zur Bildung eines Allergen-IgE-Fc $\epsilon$ RI-Komplexes durch Quervernetzung zweier benachbarter zytotoper IgE-Ak durch das Allergen. Ein Teil des Fc $\epsilon$ RI, das sogenannte ITAM (immunoreceptor tyrosine activation motif), eine spezifische Tyrosinrest-Sequenz, wird durch diesen Vorgang phosphoryliert und löst eine Signalkaskade aus. Der mittels dieser Membranveränderung in Gang gesetzte Tyrosinkinasen-Signalweg führt letztlich zu einer Calcium-Freisetzung und somit zur Mastzelldegranulation. Die Ausschüttung von Histamin, Prostaglandinen, Leukotrienen, Zytokinen, SRS-A (slow reaction substance of anaphylaxis), Heparin, plättchenaktivierenden Faktors (PAF), proteolytischen Enzymen und anderen Mediatoren aus Mastzellen und Basophilen rufen die für die Allergie typischen klinischen Symptome hervor. So kommt es in Folge der Freisetzung zu einer Kontraktion glatter

## -Einleitung-

Muskelzellen der Atemwege und des Gastrointestinaltraktes und somit zu Atemnot und gastrointestinalen Symptomen. Weiterhin sind eine gesteigerte Gefäßpermeabilität und Vasodilatation zu beobachten, welche Schwellung, Quaddeln, Juckreiz und eine gesteigerte Magensäureproduktion nach sich ziehen. Zusätzlich unterhalten und gefördert werden diese Vorgänge unter anderem durch den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (Zytokinproduktion  $\uparrow$ ) und die Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 (Abbildung 2; 91, 110).

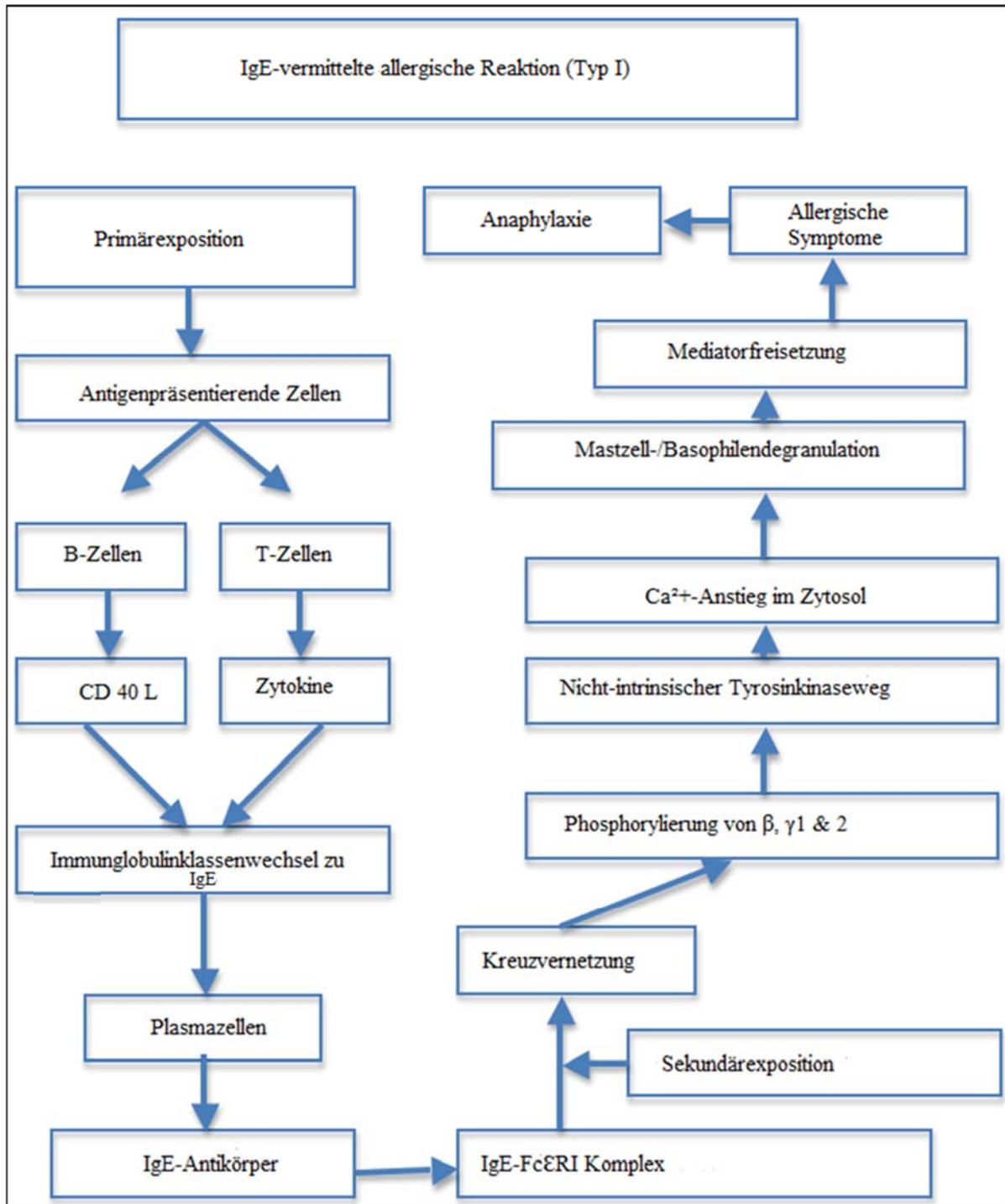


Abbildung 2: IgE-vermittelte allergische Reaktion (Typ I; 91)

### 1.1.5 Klinik der Stichreaktion und Anaphylaxie

Bei hoher Variabilität des klinischen Erscheinungsbildes wird eine lokale von einer systemischen Stichreaktion unterschieden.

Bei der Lokalreaktion kommt es aufgrund der Gifteinwirkung von im Insektengift enthaltenen Toxinen und Entzündungsmediatoren zu einer juckenden oder brennenden Rötung und Schwellung unter Einbezug des Unterhautgewebes an der Einstichstelle. Persistiert diese über mehr als 24 Stunden und beträgt der Durchmesser mehr als 10 cm, spricht man von einer schweren Lokalreaktion. Diese kann bis zu mehreren Wochen andauern und zu starken Funktionseinschränkungen führen. Kommt es nach einem enoralen Stich zu einem Larynxödem, kann diese Reaktionsform der Lokalreaktion sogar lebensbedrohlich sein. Deren zugrunde liegender Pathomechanismus ist bislang ungeklärt, es werden sowohl IgE-vermittelte als auch zellvermittelte Reaktionen beschrieben (12, 110, 134).

Bei der systemischen Reaktion handelt es sich in den meisten Fällen um eine durch Antikörper gegen bestimmte Bestandteile des Insektengifts ausgelöste allergische Reaktion vom Typ I nach Coombs und Gell (Soforttyp). Schon ein einzelner Stich kann zu potentiell lebensbedrohlichen, isoliert oder gemeinsam auftretenden Symptomen führen, die in den meisten Fällen innerhalb weniger Minuten auftreten (133).

Bei einer allergischen Sofortreaktion kommt es aufgrund hämatogener Anströmung oder aber ausgedehntem Haut- bzw. Schleimhautkontakt der Allergene zu einer akuten Degranulation von Mastzellen und basophilen Granulozyten und somit zur Kontraktion glatter Muskelzellen sowie einer erhöhten Vasopermeabilität bei Vasodilatation und Vagusaktivierung. Daraus resultierende Symptome sind Hauterscheinungen wie Flush und Urtikaria, Angioödem, Dyspnoe, Bronchospasmus, Hypoxämie, Vomitus, Hypotonie bis hin zum Bild eines anaphylaktischen Schocks mit potentiell letalem Ende oder bleibenden neurologischen Schäden nach Reanimation (12, 142, 166, 183).

Kein einheitlicher Konsens besteht bezüglich der Definition „Anaphylaxie“. So ist offen, ob für die Bezeichnung als solche eine Organbeteiligung und/oder ein kritischer Blutdruckabfall sowie eine respiratorische Einschränkung obligat sind (130, 140, 152).

Nach dem Schweregrad der klinischen Symptome erfolgt die Klassifikation nach Ring und Messmer in Grad I bis IV (Tabelle 3; 141). Diese erfolgt anhand des schwersten jeweils aufgetretenen Symptoms, wobei nicht alle Symptome obligat auftreten müssen (140).

-Einleitung-

Während sich die Symptomatik einer anaphylaktischen Reaktion Grad I in Form von Flush, Juckreiz, Urtikaria und Angioödem auf die Haut beschränkt, sind bei Grad II bereits gastrointestinale und respiratorische Beschwerden wie Übelkeit und Dyspnoe sowie Auswirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem in Form von Tachykardie und Hypotension zu beobachten. Kennzeichnend für eine anaphylaktische Reaktion Grad III bzw. Grad IV sind neben einer Aggravation der Atemfunktion (Larynxödem, Bronchospasmus, Zyanose) bzw. einem vollständigen Atemstillstand, das Auftreten eines Schocks bzw. eines Kreislaufstillstandes (141). Aber auch unspezifische und nicht objektivierbare Symptome treten im Rahmen einer allergischen Reaktion auf. So berichten Patienten anamnestisch von metallischem Geschmack im Mund, Palmar- und Plantarparästhesien, Hitzewallungen, pectoralem Engegefühl, Palpitationen, Schwindel und Angst (110).

Studien zufolge rangiert das Auftreten einer Anaphylaxie 5-15 min nach einem Insektenstichereignis zwischen 0,3 und 8,9 % (13).

**Tabelle 3: Schweregradskala zur Klassifizierung der Anaphylaxie nach Ring und Messmer (141)**

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

### **1.1.6 Risikofaktoren einer systemischen Reaktion**

Risikofaktoren für die Schwere der Ausbildung einer Insektengiftallergie und somit für den Schweregrad der anaphylaktischen Reaktion stellen erhöhte Serumtryptasewerte, wie zum Beispiel bei Mastozytose oder Knochenmarkserkrankungen, und die Expositionshäufigkeit, beispielsweise in Form beruflicher oder freizeittlicher Aktivitäten (Gärtner, Landwirt, Bäckereiverkäufer, Imker), dar. Weiterhin gelten das Fehlen von Hauterscheinungen und Angioödem, ein hoher Schweregrad einer vorangegangenen Stichreaktion, ein Symptombeginn nach weniger als fünf Minuten nach dem Stichereignis, sowie fortgeschrittenes Lebensalter (>40 Jahre) aufgrund bestehender Vorerkrankungen als Risiko, eine Anaphylaxie zu erleiden (12, 89, 133, 147, 172, 189).

Der Einfluss kardialer Medikation auf die Schwere der Anaphylaxie ist heutzutage umstritten. Galten  $\beta$ -Blocker und ACE-Hemmer lange Zeit als Risikofaktoren, sowohl für die Ausprägung als auch die Therapie mit Epinephrin, konnte dies in neuesten Studien nur teilweise belegt werden. In einer 2009 von Ruëff et al. veröffentlichten Multicenter-Studie mit 962 Patienten zeigten Probanden, welche ACE-Hemmer einnahmen, ein höheres Risiko für eine Anaphylaxie, die Einnahme von  $\beta$ -Blockern hingegen schien keinerlei Einfluss zu haben (147). Stoevesandt et al. konnten 2012 keinen Zusammenhang zwischen kardiovaskulärer Medikation und Schwere der Anaphylaxie beobachten (172). Ungeachtet dieser Ergebnisse, bedarf diese Patientengruppe einer erhöhten Aufmerksamkeit bei der Durchführung der spezifischen Immuntherapie aufgrund schwererer unerwünschter Arzneimittelwirkungen (128).

Auch die hinlängliche Meinung, Bienengiftallergien nähmen einen fulminanteren Verlauf als Wespengiftallergien (109, 145), widerlegten Ruëff et al. in ihrer Studie. So waren bei einer Allergie auf Wespengift häufiger Komplikationen in Form schwerer lebensbedrohlicher Reaktionen zu beobachten (147).

## **1.2 Diagnostik der Insektengiftallergie**

Die Allergietestung erfordert ein mehrstufiges diagnostisches Vorgehen. Neben der Anamnese steht der Nachweis einer Sensibilisierung (Nachweis allergenspezifischen IgEs und/oder positives Ergebnis im Hauttest) im Vordergrund. Heutzutage existieren mit modernen und aufwendigen

Testverfahren, den sogenannten In-vitro-Untersuchungen, weitere diagnostische Möglichkeiten, die zum Nachweis einer Sensibilisierung hilfreich sein können (118, 159).

Im Gegensatz zu anderen Allergien stellt die Provokationstestung in Form einer Stichprovokation unter kontrollierten Bedingungen im Rahmen der Routinediagnostik bei Verdacht auf Insektengiftallergie kein Mittel der Wahl mehr dar. Empfohlen Blaauw et al. Mitte der 80er- bis in die 90er-Jahre noch diese Methode als Maßgabe für eine spezifische Immuntherapie, gilt die Durchführung zu diagnostischen Zwecken nicht nur aus ethischen Gründen heutzutage als obsolet und bleibt der Therapiekontrolle vorbehalten (15, 16, 73, 107, 145).

### **1.2.1 Anamnese**

Die Anamnese gilt in der Medizin in vielen Bereichen als Goldstandard, so auch bei der Insektengiftallergie.

Speziell für die Allergiediagnostik standardisierte Bögen erleichtern die Befunderhebung und ermöglichen ein, bezogen auf das Krankheitsbild, gezieltes Nachfragen. Im anamnestischen Fokus bei Insektengiftallergikern steht neben Alter, Geschlecht, Freizeitverhalten und Beruf, die Identifizierung des die Reaktion auslösenden Insekts. Hierbei ist eine möglichst genaue Identifikation der stechenden Hymenoptere wünschenswert. Die äußerlichen Merkmale mögen einer Unterscheidung dienen, allerdings fällt vielen betroffenen Patienten eine korrekte Angabe über das Insekt schwer (6). Gezieltes Nachfragen nach beispielsweise Flucht- und Aggressionsverhalten, aber auch nach der Lokalität des Geschehens (in Müllnähe, beim Barfußlaufen etc.), erweist sich für die Identifikation als hilfreich. Als weiterhin diagnostisch richtungweisend ist die Angabe über den Verbleib des Stachels an der Einstichstelle. Während Bienen den Stachel bei einem Stich verlieren und dieser in der Haut des Opfers verbleibt, bleibt der Stechapparat der Wespen intakt und mehrere Stichereignisse hintereinander sind möglich (110, 194).

Als weiterer Risikofaktor für eine schwere Anaphylaxie und folglich anamnestisch zu erheben gilt neben ACE-Hemmern und der folglich obligaten Medikamentenanamnese eine Erhöhung der Serumtryptase als Folge von beispielsweise Mastozytose, chronischer Urtikaria oder malignen Neoplasien (147).

## 1.2.2 Hauttest

Bei Verdacht auf das Vorliegen einer Insektengiftallergie ist des Weiteren die Durchführung eines Hauttests indiziert. Das Testprinzip hierbei beruht auf dem Transport des Allergens zu den in der Dermis liegenden Mastzellen. Der Pricktest gilt unter den Hauttests als Methode der ersten Wahl. Das Insektengiftextrakt wird in Konzentrationen von 1 bis 300 µg/ml auf die Hautoberfläche aufgetragen, mithilfe einer Lanzette wird daraufhin die Epidermis angeritzt. Nach 20 min erfolgt eine Ablesung des Ergebnisses (11).

Bei unauffälligem Pricktest trotz klinischer Symptomatik wird die sensitivere intrakutane Testung angeschlossen. Hierbei werden Insektengiftextrakte auf der volaren Seite des Unterarms (wahlweise am Rücken) in Konzentrationen von 0,1 bis 1 µg streng intrakutan gespritzt. Als Positivkontrolle erfolgt die subkutane Injektion von Histamin, Kochsalz dient als Negativkontrolle (142).

Zeigt sich nach 15 bis 20 min an der Applikationsstelle das Auftreten einer Sofortreaktion im Sinne von Erythem, Quaddel und Erythemhof (Lewis-Trias) größer als 3 (Quaddel ohne Erythem) bzw. 5 (Erythem ohne Quaddel) mm im Durchmesser, ist der Test als positiv zu werten und zu beenden (Endpunkttitration). Diese lokalen Veränderungen sprechen für eine Degranulation kutaner Mastzellen und folglich Vasodilatation (→Erythem), Erhöhung der Kapillarpermeabilität (→Quaddel) und Gefäßerweiterung durch Axonreflex (→Erythemhof). Eine Ablesung nach weiteren 6 und 24 Stunden wird weiterhin zur Erfassung verzögerter Reaktionen (late cutaneous reaction) empfohlen (10, 129, 142).

Die aktuellen Leitlinien (01.03.2011) der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI) empfehlen die zweimalige Durchführung eines Hauttests, erstmals in der ersten Woche und ein zweites Mal circa vier bis sechs Wochen nach Stichereignis (56, 133). Auch wenn eine systemische Reaktion im Rahmen einer Hauttestung eine Seltenheit darstellt, ist die Durchführung unter Notfallbereitschaft obligat (12).

Da es sich bei der Hauttestung um eine In-vivo-Methode handelt, gilt es, bei gegebenen Kontraindikationen, wie beispielsweise bei akuten sowie chronischen Ekzemen, Schwangerschaft, im Säuglings- und Kleinkindalter oder bei Sekundärinfekten der Haut, die Durchführung dieser Testung abzuwägen bzw. zu unterlassen (10).

### **1.2.3 In-vitro-Testverfahren**

In-vitro-Untersuchungen auf spezifische IgE-Antikörper stellen in der Diagnostik der Insektengiftallergie ein wertvolles diagnostisches Hilfsmittel dar. Ergänzend zur Anamnese und den Ergebnissen der Hauttestung werden sie routinemäßig zur Klärung der Frage nach einer notwendigen Therapie in Form einer spezifischen Immuntherapie eingesetzt (144, 159).

Aber auch andere Verfahren wie die Bestimmung von Mediatoren allergierelevanter Zellen (Tryptase), Immunoblot oder zelluläre Tests wie der Basophilenaktivierungstest können eine sinnvolle Ergänzung im Rahmen der Diagnostik darstellen.

Der Vorteil dieser Testverfahren besteht im nicht invasiven Vorgehen. So kann die In-vitro-Diagnostik weitgehend an der gesamten Patientenklientel unabhängig von Alter oder Hautbeschaffenheit gefahrlos durchgeführt werden. Die Komplikationen der Hauttestung, wie beispielsweise eine problematische Durchführung bei atopischen Hautveränderungen oder Gefahren einer Anaphylaxie, können bei Anwendung von In-vitro-Testverfahren elegant umgangen werden (103, 124).

#### **1.2.3.1 Nachweis von allergenspezifischem IgE gegen Bienen- und Wespengift sowie gegen rekombinante Allergene**

Weil einer Erhöhung des Gesamt-IgEs unterschiedliche Ursachen wie beispielsweise atopische Erkrankungen, eine Parasitose oder eine Immunerkrankung zugrunde liegen können, ist die Bedeutung bei der Diagnostik der Insektengiftallergie eingeschränkt (110, 156). Hier ist die Messung allergenspezifischen IgEs gegenüber der Bestimmung des Gesamt-IgEs von größerer Relevanz. Während sich Anfang der 70er-Jahre als großer Fortschritt in der Allergietestung die Messung sIgEs mittels des sogenannten Radio-Allergo-Sorbent-Tests (RAST) etablierte, stehen heutzutage neuere Verfahren wie beispielsweise der Immuno-CAP zur Verfügung. Diese vollautomatisierten Verfahren verwenden anstelle von Radioisotopen Enzyme oder Fluoreszin als Marker für die im Serum vorhandenen anti-IgE-Antikörper und zeigen eine höhere Sensitivität (70, 95).

Beim FEIA (Fluorescence-enzyme immunoassay) wird eine Fluoreszenz gemessen, welche durch Abspaltung eines in den Substraten enthaltenen Fluorochroms bei der enzymatischen Reaktion entsteht (151).

Ebenso wie die Hauttestung empfiehlt sich leitliniengerecht die zweimalige Bestimmung des spezifischen IgEs für Bienen- und Wespengift ebenfalls in der ersten Woche und nach vier bis sechs Wochen nach Insektenstich. Studien zeigten, dass spezifisches IgE im Serum bereits binnen der ersten zwei Wochen nach Stichereignis nachweisbar ist. So lässt sich eine frühzeitige Entscheidung über das weitere Prozedere und Therapieoptionen fällen (133, 139).

Allerdings weisen bis zu 59% der Insektengiftallergiker spezifisches IgE sowohl für Bienen- als auch für Wespengift auf, was nach heutiger wissenschaftlicher Erkenntnis im Wesentlichen auf dem Auftreten von Kreuzreaktionen einzelner Giftproteine oder CCDs beruht (113).

Die Problematik der In-vitro- und In-vivo-Allergiediagnostik, wie beispielsweise bei der sIgE-Bestimmung, liegt in der Verwendung von Gesamtgiftextrakten (108, 114). Diese allerdings bestehen aus einer Mischung allergener und nicht allergener Komponenten wie pharmakologisch aktiven Aminen und Peptiden (28, 96, 158). Bereits in den 70er-Jahren begannen Wissenschaftler mit der Identifikation der Phospholipase, der Hyaluronidase und des Antigen 5 des Wespengifts sowie der Phospholipase, der Hyaluronidase, der sauren Phosphatase und des Melittins des Bienengifts, die Gesamtgiftextrakte in ihre einzelnen Komponenten zu unterteilen (197). Aufgrund der hohen Kosten und des großen Aufwandes reziproker In-vitro-Inhibition konnte sich damals eine weitere Abklärung sIgE-doppelpositiver Patienten mittels dieses Verfahrens nicht in der Praxis durchsetzen (137). Aus dieser Tatsache und der eingeschränkten Aussagekraft der Hauttestung sowie der oftmals unklaren Anamnese resultierte die Empfehlung, eine spezifische Immuntherapie mit beiden Giften durchzuführen (44, 197).

Im weiteren Verlauf gewann der in den 90er-Jahren eingeführte Basophilenaktivierungstest und die Antikörperbestimmung gegen Bromelain (MUX F3 aus Bromelin) sowie gegen die Meerrettichperoxidase (HRP) als Stellvertreter der CCDs an Bedeutung. Da man glaubt, mittels BAT zwischen klinisch relevanten und irrelevanten Allergenen unterscheiden zu können, ist er der Bestimmung sIgEs im Serum überlegen und erfährt im Besonderen bei Patienten mit positivem IgE für Bienen- und Wespengift mit fraglicher klinischer Relevanz seine Berechtigung (198). Als Hauptbestandteile dieser Studie werden sowohl der BAT als auch die Antikörperbestimmung gegen CCDs im laufenden Text erläutert.

Die in jüngster Zeit etablierte Methode, sIgE gegen einzelne Allergenbestandteile anstatt gegen das Gesamtextrakt zu bestimmen, stellt einen wichtigen diagnostischen Fortschritt dar. Diese Methode ermöglicht es, aufgrund fehlender kreuzreagierender Antikörper eine Verfälschung des Ergebnisses durch diese zu vermeiden und weiterhin für das jeweilige Insekt sIgE gegenüber spezifischen Allergenen zu bestimmen (115). Anfang der 90er-Jahre ist es der Wissenschaft

gelungen, die Hymenoptergifte von Biene und Wespe zu reinigen und weitere Allergenkomponenten einzeln zu isolieren (31, 90). Im Vordergrund dieser sogenannten Komponenten-aufgelösten Diagnostik (component-resolved diagnosis, CRD) stehen hierbei vor allem r Api m 1, die Phospholipase A2 und somit ein Major-Allergen des Bienengifts, und r Ves v 5 (Antigen 5) sowie r Ves v 1 (Phospholipase A1) des Wespengifts, ebenfalls Major-Allergene (112). Mithilfe des ImmunoCAP-Verfahrens (Phadia, Uppsala, Schweden) wird das Vorhandensein sIgEs dieser aktuell (2015) einzig kommerziell verfügbaren rekombinanten Allergene ermittelt (117, 122). Spezifische IgEs weiterer Allergenbestandteile sind Gegenstand aktueller Forschung, mittels ELISA-Technik ist weiterhin die experimentelle Bestimmung von rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3, rApi m 5, rApi m 6, rApi m 10, rVes v 1, rVes v 2, rVes v 3 und rVes v 5 bereits möglich (38, 105, 106, 108, 164).

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis einer Insektengiftallergie stellt das Immunoblot-Verfahren dar. So empfiehlt die Europäische Akademie für Allergologie und Klinische Immunologie (EACCI) 2006 die Durchführung von Insektengiftimmunoblots bei negativen oder nicht eindeutigen Ergebnissen der etablierten Methoden wie Hauttest oder CAP-Assay (12).

Hierbei wird nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Allergenextrakte nach Molekulargewicht in einzelne Proteinfractionen und Fixierung auf Nitrozellulose die spezifische Reaktivität eines Serums gegen einzelne Proteine (eines Allergenextraktes) als positive Bande sichtbar gemacht (Western-Blot-Technik; 118, 142).

In der Praxis allerdings gilt dieses Verfahren in der Regel als zu aufwendig und bleibt für gewöhnlich der klinischen Forschung für die Identifizierung und Charakterisierung von Einzelallergenen vorbehalten (144).

### **1.2.3.2 Zelluläre Tests**

#### **Histaminfreisetzungstest**

Dieses Testverfahren beruht auf der Messung der Histamin-Ausschüttung peripherer Leukozyten allergischer Patienten. Inkubation von heparinisiertem Vollblut oder isolierten Zellen mit verschiedenen Allergenverdünnungen führt zur Histaminfreisetzung aus den basophilen Granulozyten. Histamin wird anschließend im Überstand fluorometrisch oder mittels Immunoassays gemessen und dabei zu einer 100%-Kontrolle und einem Leerwert in Beziehung gesetzt. Nach einer Positivkontrolle (Stimulation mit Anti-IgE) erfolgt die Auswertung mithilfe

festgesetzter Normgrenzen für die In-vitro-Histaminfreisetzung in %. Diese Histaminfreisetzung findet abhängig von der eingesetzten Insektengiftkonzentration statt (110, 170).

Aufgrund des relativ hohen technischen Aufwandes ist der Histaminfreisetzungstest für die Routinediagnostik wenig geeignet und findet nur bei Patienten mit unklaren Ergebnissen im Hauttest und/oder des spezifischen IgEs sinnvolle Anwendung (170).

#### Cellular-Allergen-Stimulation-Test (CAST)

Beim sogenannten CAST oder Leukotrienfreisetzungstest erfolgt zunächst ein „Priming“ peripherer Blutleukozyten mit Interleukin-3 (IL-3). Nach der anschließenden Inkubation mit Insektengift in verschiedenen Konzentrationen erfolgt die Messung der aus Leukozyten, vor allem der Basophilen, freigesetzten Sulfidoleukotriene mittels ELISA. Die Auswertung erfolgt anhand einer Positiv- und Negativkontrolle (29).

#### Basophilenaktivierungstest

Grundlage dieses Ende der 90er-Jahre eingeführten Tests ist der Nachweis einer Änderung von Zelloberflächenmarkern auf basophilen Granulozyten, exprimiert infolge einer allergeninduzierten Zellstimulation. Mithilfe eines Aktivierungsmarkers, wie beispielsweise CD63, kann allergenspezifisch die In-vitro-Aktivität basophiler Granulozyten gemessen werden. Ein entscheidender Vorteil dieser Methode stellt die schnelle Testung einer Vielzahl potentieller Allergene mit nur einer geringen Blutmenge dar (41, 144).

Da dieser Test einen wesentlichen Bestandteil der hier durchgeführten Studie darstellt, wird später im laufenden Text näher darauf eingegangen (s. Kapitel 1.4)

### **1.2.3.3 Mediatorbestimmungen**

Bei diesen Testverfahren steht vor allem die Bestimmung der basalen Serumtryptase, ein Marker der Mastzelldegranulation, im Vordergrund. Verschiedene Studien zeigten, dass ein erhöhter Serumspiegel dieses von den Mastzellen produzierten Enzyms mit dem Schweregrad der anaphylaktischen Reaktion eines Sticheignisses korreliert, dieser Zusammenhang mit steigendem Lebensalter sogar weiter an Bedeutung gewinnt und als zusätzlicher Risikofaktor für die Entwicklung einer allergischen Reaktion angesehen werden muss (89, 111).

## -Einleitung-

Ca. 10 % der Patienten mit Insektengiftallergie weisen eine Erhöhung der basalen Serumtryptase auf (147).

Weiterhin sind erhöhte Tryptasewerte bei Mastozytose aber auch bei chronischer Urtikaria, urämischem Juckreiz oder Knochenmarkserkrankungen zu finden. Solch eine Erhöhung der basalen Serumtryptase gilt als Risikofaktor einer ausgeprägten anaphylaktischen Reaktion infolge eines Insektenstichs (147). Auch die Wahrscheinlichkeit eines Therapieversagens im Rahmen einer spezifischen Immuntherapie ist bei diesen Patienten erhöht (173).

## 1.3 Therapie der Insektengiftallergie

### 1.3.1 Prophylaxe

Vor jeglichem Therapieansatz steht die Prophylaxe und somit der Versuch, eine potenzielle allergische Reaktion zu vermeiden. Wichtig hierfür sind für betroffene Patienten grundlegende Kenntnisse der Lebensweise der Hymenopteren und ihres Verhaltens. So gelten für den Allergiker eine ganze Reihe von Verhaltensmaßnahmen, beispielsweise der Verzicht auf blumige Geruchsessenzen und Kleidung sowie auf Barfußlaufen. Weiterhin sollten Abfalleimer, der Verzehr von Speisen im Freien, Gärtnern und andere Aktivitäten im Freien vermieden werden (21, 52).

Selbstverständlich ist eine Prophylaxe nicht immer ausreichend. Jeder Insektengiftallergiker sollte deshalb zu den Flugzeiten von Bienen und Wespen (Biene: März bis August, Wespe: August bis September) ein Notfallset bei sich tragen. In diesem enthalten sind neben einem oralen Antihistaminikum ein orales Glukokortikoid und bei anamnestisch aufgetretener schwerer Reaktion Adrenalin zur intramuskulären Selbstinjektion (Tabelle 4). Die amerikanische Gesellschaft für Allergie, Asthma und Immunologie empfiehlt bei vorangegangener Anaphylaxie ausdrücklich die Erstellung eines Notfallplans, individuell abgestimmt auf den einzelnen Patienten, welcher im Notfallset mitzuführen ist (97, 140).

**Tabelle 4: Wirkungsweise der Medikation bei anaphylaktischer Reaktion (140, 183)**

Medikament	Wirkung	UAW
<b>Adrenalin (i. m., ggf. i. v.)</b>  <b>Medikament der Wahl</b>	Vasokonstriktion, Herzfrequenz ↑, Erweiterung der Bronchien, Hemmung der Histaminfreisetzung	Tremor, Blässe, Palpitationen, Blässe
<b>H1-Antihistaminikum (oral, i. v.)</b>	Pruritus ↓, Urtikaria ↓, Flush ↓, Rhinorrhoe ↓	Sedation
<b>Glukokortikoide (oral, i. v.)</b>	Verhinderung biphasischer oder protrahierter Anaphylaxie-Symptome	
<b>β2-Agonist (inhalativ)</b>	Bronchodilatation	Tremor, Tachykardie

### 1.3.2 Spezifische Immuntherapie (SIT)

Die erstmals 1911 von Leonard Noon beschriebene Form einer „prophylaktischen Impfung gegen Heuschnupfen“ und später die erfolgreiche Behandlung eines Imkers mit Asthmasymptomatik mit Bienenganzkörperextrakt durch Benson und Semenov, legten den Grundbaustein der heutigen spezifischen Immuntherapie (9). Als einzige kausale Therapie der Insektengiftallergie ist sie mit einem Impfschutz mit 80% bei Bienengift und 95% bei Wespengift als sehr effizient anzusehen und gilt bis heute als Goldstandard bei der Behandlung von Hymenoptereingiftallergien (119, 123, 148, 196). Die spezifische Immuntherapie kann den Allergiker vor potenziell lebensbedrohlichen allergischen Symptomen schützen und führt zu einer Verbesserung der Lebensqualität (14).

In der Literatur werden neben der höheren Anzahl an Therapieversagern weiterhin häufiger schwere Nebenwirkungen bei Bienengifthyposensibilisierungen beschrieben. Die Gründe hierfür sind bis dato ungeklärt (109, 148).

Seit Mitte der 70er-Jahre hat sich die Hyposensibilisierung unter Verwendung von hoch gereinigten Giften anstatt Ganzkörperextrakten durchgesetzt, nachdem sich zeigte, dass die für die Allergie relevanten Allergene im Hymenoptereingift vorhanden sind und sich von denen im Ganzkörperextrakt unterscheiden (98, 110).

Bei Patienten mit vorangegangener systemischer IgE-vermittelter Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp schließt sich nach eingehender Überprüfung mittels der oben genannten diagnostischen Maßnahmen in der Regel eine Hyposensibilisierungstherapie an. Auch das Reexpositionrisiko und eventuelle Kontraindikationen, wobei hier relative von absoluten zu unterscheiden sind (Tabelle 5), gilt es bei der Frage nach einer spezifischen Immuntherapie zu berücksichtigen (101, 110, 128). Tabelle 5 zeigt eine 2015 vom EACCI-Komitee veröffentlichte Übersicht zur Einstufung absoluter und relativer Kontraindikationen.

Zählten in früherer Zeit  $\beta$ -Blocker zu den absoluten Kontraindikationen bei der Durchführung einer spezifischen Immuntherapie, wird in den aktuellen Leitlinien eine Umstellung auf andere Antihypertensiva zwar empfohlen, gilt aber nicht mehr als obligat (72, 133). Ein Auftreten von Nebenwirkungen der Hyposensibilisierung mit Insektengift ist bei dieser Patientenklientel zwar nicht häufiger, dennoch meist ausgeprägter und erfordert eine kontinuierliche Überwachung in der Steigerungsphase (133).

Letztendlich ist eine Entscheidung über die Durchführung einer spezifischen Immuntherapie bei Vorhandensein von Kontraindikationen individuell unter Berücksichtigung des Nutzen-Risiko-Profiles für den Patienten abzustimmen.

Auch während der spezifischen Immuntherapie mit Insektengift sind gewisse Vorsichtsmaßnahmen zu beachten. So sollte der Abstand zwischen einer Aktivimpfung und einer Immuntherapie eine Woche betragen, am Injektionstag auf körperliche Anstrengung verzichtet und der Patient nach Erhalt einer Giftdosis 30 Minuten überwacht werden (136).

**Tabelle 5: Kontraindikationen spezifischer Immuntherapie (128)**

Absolute Kontraindikationen	Relative Kontraindikationen
Unkontrolliertes Asthma	Therapiekontrolliertes Asthma
Therapieresistente Autoimmundefunktionsstörungen	Abklingende Autoimmundefunktionsstörungen
Schwangerschaft (bei Beginn einer SIT)	Maligne Neoplasien
Kinder < 2 Jahre	Kinder 2-5 Jahre
AIDS	HIV (Stadium A, B; CD4+ > 200/µl)
	ACE-Hemmer
	Psychische Erkrankungen
	Chronische Infektionen
	Immunerkrankungen
	Einnahme von Immunsuppressiva

Die spezifische Immuntherapie entwickelt immunologische Toleranzmechanismen, indem sie auf eine Vielzahl humoraler und zellulärer Faktoren des menschlichen Immunsystems einwirkt und zu einer Änderung der Reaktionsform, nicht aber zu Reaktionslosigkeit führt (27, 33). So kommt es während der spezifischen Immuntherapie zu einer Reihe von Änderungen im Pathomechanismus der Insektengiftallergie. Hierbei ist ein Anstieg der Produktion von Interleukin-10 und Interferon- $\gamma$  sowie ein Abfall von Interleukin-4 zu verzeichnen (8). Ozdemir et al. beschrieben spezielle T-Zell-Populationen, welche eine allergische Antwort auf das Insektengift unterbinden (120). Auch die Änderung bestimmter Oberflächenmarker dendritischer Zellen und die Induktion blockierender IgG4-Antikörper sind wahrscheinlich an der Wirkweise der spezifischen Immuntherapie beteiligt (30, 193).

Sie erfolgt durch eine repetitive, hochdosierte subkutane Applikation von Bienen- bzw. Wespengift nach unterschiedlichen Schemata (118, 129). Hierbei hat sich mittlerweile vor allem das Rush- und Ultrarush-Verfahren durchgesetzt. Im Rahmen eines stationären Aufenthaltes wird innerhalb von 2 bis 5 Tagen mittels mehrmals täglich streng subkutan durchgeführter Injektionen mit wässrigen standardisierten Allergenextrakten die angestrebte Erhaltungsdosis von 100 µg erreicht. Diese wird im Anschluss mit zunehmendem Intervall bis 4 Wochen über 3 bis 5 Jahre ambulant weiter injiziert (Erhaltungsphase).

Zur Prophylaxe ausgeprägter Lokalreaktionen an der Injektionsstelle sowie Auftreten systemischer Reaktionen ist die prophylaktische Gabe von Antihistaminika zu erwägen (110).

Der Erfolg der spezifischen Immuntherapie ist dosisabhängig, deshalb kann unter gewissen Umständen wie beispielsweise Therapieversagen eine Steigerung der Erhaltungsdosis auf 200 µg erforderlich sein (196). Zur Beurteilung des Therapieerfolges einer spezifischen Immuntherapie steht routinemäßig derzeit allein die Stichprovokation mit einem lebenden Insekt zur Verfügung. Diese erfolgt, das Einverständnis des Patienten vorausgesetzt, ca. 6-18 Monate nach Erreichen der Erhaltungsdosis in Notfallbereitschaft und darf ausschließlich nur bei Patienten in stabilem Gesundheitszustand durchgeführt werden (129, 142, 145).

Todesfälle sind in diesem Zusammenhang in der Literatur nicht beschrieben, der Bericht von einem 14-jährigen Jungen über die mehrtägige intensivmedizinische Behandlung bei Lungenödem und künstlicher Beatmung nach Stichprovokation betont hingegen die Wichtigkeit entsprechender Prophylaxemaßnahmen (145).

Anhand der klinischen Reaktion bei Stichprovokation lassen sich weiterhin Patienten identifizieren, die zum Schutz vor einer systemischen Insektengiftreaktion eine über die Erhaltungsdosis von 100 µg/4 Wochen hinausgehende Giftmenge benötigen (145).

Die Bestimmung rekombinanter Allergene im ImmunoCAP könnte in der Zukunft eine wichtige Rolle beim Monitoring der spezifischen Immuntherapie spielen. Shin et al. berichteten 2012 in einer Studie von einem signifikanten Abfall von rVes v 5 nach Hyposensibilisierung mit Wespengift (165).

Ob der Basophilenaktivierungstest ein geeignetes Monitoring bei spezifischer Immuntherapie erlaubt und unterstützend bei der Frage nach der Möglichkeit zur Beendigung jener verwendet werden kann, ist ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung und galt lange als umstritten (42, 45). Allerdings zeigen neuere Studien, ebenso wie Ebo et al. 2007, im BAT nach sechs Monaten eine signifikante Abnahme der Sensitivität der Basophilen, nicht aber ihrer Reaktivität (42, 46, 198). Diese Ergebnisse sind richtungsweisend dafür, dass der BAT zur Überprüfung des Erfolgs einer spezifischen Immuntherapie geeignet sein kann. Da diese Tatsache einen weiteren Meilenstein in der Diagnostik und Therapie der Insektengiftallergie bedeutete, wird die Thematik im Diskussionsteil ausführlicher behandelt (s. Kapitel 4.4 Spezifische Immuntherapie bei Patienten mit sIgE auf Bienen- und Wespengift).

## **1.4 Basophilenaktivierungstest (BAT)**

### **1.4.1 Basophile Granulozyten**

Mit weniger als 1% stellen die basophilen Granulozyten einen relativ geringen Anteil der Leukozyten dar und zirkulieren in ausgereifter Form frei in der Blutbahn. Abstammend von CD34<sup>+</sup>/IL-3R $\alpha$ /IL-5<sup>+</sup> eosinophilen/basophilen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, gilt das Zytokin IL-3 als wesentlicher Wachstumsfaktor im Zuge der Basophilenentwicklung und -reifung. Aufgrund des hochaffinen IgE-Rezeptors Fc $\epsilon$ RI an der Basophilenoberfläche, verantwortlich für die Allergenbindung und die darauffolgende Zytokinausschüttung wie IL-4 und IL-13, spielen die Basophilen eine Schlüsselrolle im Rahmen der IgE-vermittelten allergischen Reaktion und gelten als multifunktionelle Effektorzellen.

Eine im Blut vorliegende Basophilie, d. h. eine Erhöhung der basophilen Granulozyten, spricht für das Vorliegen einer reaktiven Veränderung im Zusammenhang mit einer allergischen Reaktion (20, 32, 48, 188).

### **1.4.2 Prinzip des BAT**

Bereits 1991 machten Knol et al. mit der Detektion des Oberflächenantigens CD63 mittels des monoklonalen Antikörpers 435 (Anti-CD63) einen wichtigen Fortschritt bei der Messung basophiler Aktivität (81).

Diese Entdeckung und der Nachweis weiterer Oberflächenproteine werden in der Allergiediagnostik beim in den 90er-Jahren entwickelten Basophilenaktivierungstest genutzt (188).

Eine Allergenexposition führt durch Bindung des sIgE an membranständige hochaffine IgE-Rezeptoren (Fc $\epsilon$ RI) der basophilen Granulozyten zu vermehrter Freisetzung von Mediatoren (Histamin, Leukotrien C4) sowie zur Expression spezifischer Proteine an der Basophilenoberfläche, wie beispielsweise CD63 und CD203c (20, 187, 188). Sie dienen teilweise (CD203c) zur Identifikation dieser Zellart und stellen weiterhin ein Maß für deren Aktivität dar (Aktivitätsmarker). Nach Markierung mittels fluoreszierender Antikörper des mit Allergenen versetzten Patientenblutes, können sie mithilfe fluoreszenzanalytischer Durchflussanalysen im Basophilenaktivierungstest erfasst werden (41, 125).

CD63, auch LIMP-1 (lysosome integral membrane protein1) oder LAMP-3 (lysosomal associated membraneglycoprotein 3), ist ein Glykoprotein der Lysosomenmembran, wird von allen Zellen mit Ausnahme der Erythrozyten exprimiert und ruht in intrazytoplasmatischen Granula. Zu einer gesteigerten Expression von CD63 auf der Zellmembranoberfläche kommt es nach Verschmelzen der Granula mit der Zellmembran aufgrund von Basophilenaktivierung durch ein Antigen (20). Mithilfe der Flowzytometrie erfolgt in einer Teilvariante eine Auszählung gleichzeitig anti-IgE- und CD63-positiver Zellen. Diverse Inkubationsvorgänge sorgen dafür, dass andere Zellen mit niedriger Bindungskapazität für IgE ausgewaschen werden und somit nur Basophile flowzytometrisch erfasst werden (150).

Das Oberflächenantigen CD203c, auch als ENPP3 (Ectonukleotid-Pyrophosphatase) bezeichnet, wird im Gegensatz zu CD63 ausschließlich von reifen Basophilen sowie Mastzellen und deren Vorläuferzellen exprimiert (55). Auch bekannt unter „neural cell surface differentiation antigen ENPP3“, ist CD203c ein Aktivitätsmarker mit etwas höherer Sensitivität (97% vs. 89%), aber geringerer Spezifität als CD63 (89% vs. 100%) (36). Ähnlich zu CD63 erfolgt eine vermehrte Expression von CD203c an der Zelloberfläche nach Allergenkomplexbildung (41).

Neben den üblichen Vorteilen eines In-vitro-Tests ermöglicht der Basophilenaktivierungstest eine Testung mehrerer verdächtiger Allergene gleichzeitig anhand einer kleinen, bis zu 24 Stunden alten Blutprobe (41).

### **1.4.3 BAT bei Insektengiftallergie**

Das Prinzip der flowzytometrischen Messung macht man sich auch in der Diagnostik der Hymenoptereingiftallergie zu Nutze. Im Jahre 1998 wandten Sainte-Laudy et al. den BAT erstmals in der Diagnostik bei Patienten mit Insektengiftallergie an. In der 2000 veröffentlichten Studie zum Vergleich mit damals etablierten Methoden wie Anamnese, Hauttest, sIgE sowie LRT, erbrachte der CD63-BAT eine Sensitivität und Spezifität von 100% (149).

Unter Verwendung der Aktivitätsmarker CD63 und CD203c wird der BAT heutzutage im Besonderen bei Patienten mit unklaren Ergebnissen in der Routinediagnostik, beispielsweise doppelpositivem sIgE für Bienen- und Wespengift, komplementär angewandt (35, 36, 40, 55).

Neueste Studien legen dem BAT weiterhin ein Nutzen beim Monitoring der spezifischen Immuntherapie nahe. So zeigten unter anderem Erzen et al. eine Abnahme basophilen Ansprechens nach Beendigung der Hyposensibilisierung (46, 198).

## **1.5 Problemstellung und Zielsetzung der Studie**

Die Auswahl des relevanten Insektengifts für die spezifische Immuntherapie bei Patienten mit Doppelsensibilisierung für Bienen- und Wespengift, aber anamnestisch anaphylaktischer Reaktion auf nur ein Insekt oder mehrere unbekannte Insekten, stellt ein häufiges Problem dar.

### **1.5.1 Doppelpositivität/Doppelsensitivität**

Bis zu 59% der getesteten Patienten weisen eine Sensibilisierung sowohl für Bienen- als auch für Wespengift in der Routinediagnostik (Hauttest und spezifisches IgE) auf (44, 113, 137). Dieser Doppelsensitivität können diverse Ursachen zugrunde liegen, die entweder einzeln oder in Kombination auftreten (64). Einerseits kann eine tatsächliche Doppelpositivität vorliegen, der Patient weist also spezifische Antikörper und eine entsprechende klinische Symptomatik sowohl für Bienen- als auch für Wespengift auf. In diesen eher seltenen Fällen ist eine spezifische Immuntherapie mit beiden Giften zu erwägen (44, 137).

In der Literatur mit bis zu 80% beziffert und somit weitaus häufigere Ursache einer Doppelpositivität, sind dagegen Kreuzreaktionen, welche entweder aufgrund partieller Sequenzhomologien der Hyaluronidase im Bienen- und Wespengift oder aber im Vorhandensein kreuzreagierender Kohlenhydratseitenketten, den so genannten CCDs (cross-reacting carbohydrate determinants) begründet liegen (108, 122). Darauf wird im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

Eine besonders starke Kreuzreaktivität zeigen vor allem die Vespigengifte gleicher und nah verwandter Arten, welche sich in Zusammensetzung und Struktur einzelner Allergene stark ähneln (77).

Um unnötige Kosten, Aufwand und Zeit zu sparen, aber auch aus Rücksichtnahme auf den Patienten, ist, bei gleichzeitigem Vorliegen von sIgE für Bienen- und Wespengift oder Reaktionen auf beide Gifte im Hauttest, vor einer spezifischen Immuntherapie mit beiden Giften die genaue Ursache hierfür zu eruieren bzw. die Indikation zu dieser Therapie nach klinischer Symptomatik abzuwägen (173).

## 1.5.2 Glykoproteine und CCDs

Einer der Gründe für das Vorhandensein sIgEs für beide Gifte ist das Vorkommen nichtpeptidischer Kohlenhydratkettenepitope auf Allergenen (glykosylierte Proteine), welche außer in den Insektengiften (Bienen- und Wespengift) unter anderem auch in Gemüse, Pflanzen, Gräsern und Latex zu finden sind (1, 2, 4, 69, 99). Diese Epitope werden als CCDs, cross-reacting carbohydrate determinants, das heißt kreuzreagierende Kohlenhydratketten, bezeichnet, da sie dazu neigen, mit ubiquitär vorkommenden Glykanketten einiger anderer Allergene zu interagieren. Während Kohlenhydratketten von Säugern untereinander nicht immunogen sind, da eine Toleranzentwicklung des Immunsystems vorliegt, unterscheiden sich die nicht im Säugetier auftretenden Glykane von den Säugerglykanen, weshalb es zu einer Immunantwort mit Antikörperbildung, anti-CCDs, kommen kann (2, 65).

Allergene sind Glykoproteine und bestehen aus einem Protein und einer oder mehreren kovalent an das Peptid gebundenen Kohlenhydratgruppen (Zuckergruppen), die dadurch Charakteristika wie eine erhöhte Wasserbindungskapazität und Hitzebeständigkeit (erhöhte Stabilität der Proteine) aufweisen (99).

Das Anhängen von Zuckern, die sogenannte Glykosylierung, erfolgt posttranslational und kann auf verschiedene Arten geschehen. Bei der N-Glykosylierung, der weitaus häufigsten Form, knüpft der Zucker an den Stickstoff der freien Säureamidgruppe des Asparagins an, während bei der O-Glykosylierung die Zuckerbindung an die Hydroxygruppe von Serin, Threonin, Hydroxyprolin oder Hydroxylysin erfolgt (99, 192).

Von Bedeutung im Zusammenhang mit der Hymenopterengiftallergie sind die N-glykosidischen Proteine, zu denen auch das Bromelain und die Meerrettichperoxidase zählen, welche später nochmals genauer beleuchtet werden (51).

Bei den N-Glykanen spielen die  $\alpha(1,3)$ -Fucose und die  $\beta(1,2)$ -Xylose eine Schlüsselrolle hinsichtlich der Antikörpererkennung, allerdings ist auch das Vorhandensein von nur jeweils einer dieser Komponenten möglich. So enthält beispielsweise die im Bienengift vorkommende Phospholipase 2 (PLA2) nur eine an das proximale N-Acetyl-Glucosamin gebundene  $\alpha(1,3)$ -Fucose. Die Tatsache, dass diese Verbindung bei Menschen nicht existiert, macht sie zu einer hochimmunogenen Struktur und führt zu Antikörperbildung gegen CCDs, sogenannte anti-CCD-AK (192).

Aufgrund von Mikroheterogenität und dem gleichzeitigen Vorhandensein glykosylierter und nicht glykosylierter Isoformen besteht unter den Glykanen eine große Bandbreite, welche eine

Kreuzreaktivität limitieren könnte. Diese Kreuzreaktivität aber beruht im Wesentlichen auf dem Vorhandensein von „Basiszuckern“ IgE-reaktiver Glykanketten, im Besonderen der N-Glykane. So beginnt die N-Glykansynthese aller Eukaryoten mit dem Anhang der gleichen 7-Zuckerkette, welche als Basis dient und dann erweitert oder beendet wird (99).

Zu den Glykoproteinen gehören unter anderem auch einige bekannte Allergene, deren Epitope zum Teil aus Kohlenhydratketten bestehen. So konnten für die Bienengiftallergene Api m 1 (Phospholipase A2), Api m 2 (Hyaluronidase), Api m 3 (Saure Phosphatase), Api m 5 (Dipeptidylpeptidase), Api m 7 (Protease), Api m 8 (Carboxylesterase), Api m 9 (Carboxypeptidase), Api m 10 (Icarapin), Api m 11.0101 (MRJP 8), Api m 11.0201 (MRJP 9) und Api m 12 (Vitellogenin) sowie für die Wespengiftallergene Ves v 2 (Hyaluronidase), Ves v 3 (Dipeptidylpeptidase) und Ves v 6 (Vitellogenin) ein Vorhandensein von CCDs nachgewiesen werden (112, 169). Von diesen Glykoepitopen wiederum neigen einige zu Kreuzreaktionen mit in anderen Allergenen enthaltenen Kohlenhydratketten, die sich folglich als kreuzreagierende Kohlenhydratketten verhalten.

Bereits eine minimale Homologie von Kohlenhydratketten führt zu Kreuzreaktionen und somit zur Bezeichnung CCD eines Kohlenhydratepitops (137).

### **1.5.3 Zielsetzung der Studie**

Ziel der hier durchgeführten Studie war es, die Wertigkeit des Basophilenaktivierungstests bei Patienten mit Doppelsensitivität auf Bienen- und Wespengift zu eruieren und möglichst eine klinisch relevante von einer klinisch irrelevanten Doppelpositivität abzugrenzen, um somit eine Hyposensibilisierung mit beiden Giften nur in indizierten Fällen vornehmen zu können.

Im Mittelpunkt stand hierbei der mit fünf unterschiedlichen Konzentrationen kommerziell erhältlichen Bienen- und Wespengifts sowie mit Bromelain und Meerrettichperoxidase (HRP), ebenfalls in fünf unterschiedlichen Verdünnungen, durchgeführte und mittels Bestimmung der halbmaximalen Konzentration ausgewertete Basophilenaktivierungstest. Zusätzlich wurde das sIgE für Bromelain und die Meerrettichperoxidase (HRP) sowie für die rekombinanten Allergene rApi m 1 sowie rVes v 5 bei allen Patienten bestimmt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten und Kontrollen

An der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München untersuchten wir 28 Patienten mit positiver Anamnese auf eine Insektengiftallergie in Form einer Soforttypallergie mit systemischer Reaktion Grad I-IV (nach Ring und Messmer).

Einschlusskriterium war neben der oben erwähnten positiven Anamnese positives spezifisches IgE sowohl für Bienen- als auch für Wespengift. Weiterhin sollte die Indikation zur Hyposensibilisierung gestellt worden sein und der Beginn einer spezifischen Immuntherapie anstehen. 6 der 28 Studienteilnehmer konnten aufgrund nicht verwertbarer Ergebnisse im Basophilenaktivierungstest für Bienen- und Wespengift nicht in die Auswertung einbezogen werden (4 Non-Responder, 2 Patienten mit extrem hohen Negativkontrollen im BAT).

Die übrigen 22 Patienten (17 Männer, 5 Frauen) standen der weiteren Analyse zur Verfügung.

17 Patienten waren männlich, 5 Patienten weiblich, das Alter reichte von 15-75 Jahren (Durchschnittsalter aller Patienten: 51,5 Jahre; SD: 6,36; Durchschnittsalter Männer: 39,65 Jahre; SD: 15,91; Durchschnittsalter Frauen: 54 Jahre; SD: 4,95).

Die Kontrollgruppe beinhaltete 10 Personen im Alter von 24 bis 60 Jahren (Durchschnittsalter aller Kontrollen: 32,1 Jahre; SD: 22,6; Durchschnittsalter Männer: 26,3 Jahre; SD: 0,7; Durchschnittsalter Frauen: 34,6 Jahre; SD: 22,6) ohne anamnestisch aufgetretene allergische Reaktion nach Insektenstich. Des Weiteren zeigte die Bestimmung von sIgE für Bienen- und Wespengift sowie für MUX F3 von Bromelain und Meerrettichperoxidase negative Ergebnisse.

Eine Hauttestung wurde aufgrund der Möglichkeit einer Sensibilisierung gegen Bienen- und/ oder Wespengift aus ethischen Gründen nicht durchgeführt.

Die Durchführung der Studie erfolgte gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Technischen Universität München sowie mit vorherigem Einverständnis aller Studienteilnehmer.

## **2.2 Diagnostik**

### **2.2.1 Anamnese**

Die Anamnese erfolgte anhand eines standardisierten, an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München in der Allergiediagnostik routinemäßig angewandten Bogens. Art und Schwere vorangegangener Stichreaktionen standen hierbei im Fokus. Neben Zeitpunkt, Frage nach dem stechenden Insekt, Symptomatik und Behandlung, wurden hierbei auch individuelle Risikofaktoren wie Medikation, atopische Diathese und die Familienanamnese erhoben.

Im Anschluss erfolgte eine Einordnung des Anaphylaxiegrades nach Ring und Messmer I-IV. Eine Übersicht zur Einteilung der Anaphylaxie in Grad I-IV gibt Tabelle 1 in der Einleitung.

### **2.2.2 Hauttest**

Der Intrakutantest wurde mittels aufsteigender Konzentrationen von Bienen- und Wespengift (Venomil; Bencard, München, Deutschland) in Notfallbereitschaft in der Allergieabteilung der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München durchgeführt.

Nach dem Schema der Endpunkttitration wurden in 15-minütigem Abstand bis zum Auftreten einer Quaddel von mindestens 3 mm Größenunterschied zur Negativkontrolle (0,9% Kochsalzlösung Allergopharma, Reinbeck, Deutschland), 0,02 ml des oben genannten Insektengifts streng intrakutan an der volaren Seite des Unterarmes injiziert (beginnend mit 0,0001 µg/ml, gesteigert bis auf 0,001, 0,01 bis 0,1 µg/ml).

Als Positivkontrolle diente die subkutane Injektion von 0,1% Histaminlösung (Allergopharma, Reinbeck, Deutschland).

### **2.2.3 Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper**

Die Bestimmung des spezifischen IgE für Gesamt-IgE, Bienen- und Wespengift, rApi m 1 (Phospholipase A2), rVes v 5 (Antigen 5), MUXF-Glycan-Seitenkette von Bromelain und

Meerrettichperoxidase (HRP) erfolgte mittels UniCAP 250 (Phadia GmbH, Freiburg, Deutschland).

In diesem System wird das jeweilige Allergen mithilfe eines Trägers, einem Cellulosederivat, kovalent gebunden. Die Inkubation mit dem zu untersuchenden Patientenserum führt zu einer Komplexbildung von spezifischen IgE-Antikörpern mit den auf dem Cellulosederivat gebundenen Allergenen (i1: Bienengift, i3: Wespengift, O214: CCD, MUX F3 aus Bromelin, O400: Meerrettichperoxidase [HRP]). Durch anschließendes Waschen werden unspezifische Antikörper entfernt und Enzym-markierte Antikörper gegen humanes IgE hinzugegeben. Die nun folgende Bindung erfolgt ausschließlich an allergenfixierte IgE-Antikörper. Nach Inkubation und Abwaschen von überschüssigem ungebundenem Enzym-markierten-Anti-IgE, erfolgt der Zusatz einer Entwicklerreagenz. Dem Abstoppen des Vorganges schließt sich die Fluoreszenzmessung an und gibt Aufschluss über die Menge des in der Probe enthaltenen spezifischen IgEs (Tabelle 6; 126).

**Tabelle 6: Spezifische IgE-Klasseneinteilung gemäß UniCAP-System**

Spezifische IgE (kU/l)	Klasse	Immuno-CAP (Phadia)
Negativ		0 < 0,10 kU/L
Grenzwertig	0/1	0,10 – 0,34 kU/L
Sehr schwach positiv		1 0,35 – 0,69 kU/L
Schwach positiv		2 0,70 – 3,49 kU/L
Positiv		3 3,50 – 17,49 kU/L
Stark positiv		4 17,50 – 49,99 kU/L
Sehr stark positiv		5 50,00 – 99,99 kU/L
Sehr stark positiv		6 $\geq$ 100,0 kU/L

## 2.2.4 ELISA mit rekombinanten Insektengiftallergenen

Für den ELISA wurde das Reagenzienset B (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) verwendet. 96-well-Mikrotiterplatten (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Ulm, Germany) wurden mit jeweils 100 µl pro Vertiefung der aufgereinigten rekombinanten Proteine (rApi m 1 10 µg/ml, rApi m 2 20 µg/ml, Api m 3 5 µg/ml, rApi m 10 5 µg/ml, rVes v 1 10 µg/ml, rVes v 2 20 µg/ml, Ves v 3 5 µg/ml, Ves v 5 5 µg/ml) bzw. mit 10 µg/ml FcεRIa-IgY1-4 für die Standardkurve bei 4 °C über Nacht beschichtet. Die Vertiefungen wurden dreimal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen, dann wurde die Platte ausgeklopft. 100 µl Serum bzw. Human IgE Myeloma

(Calbiochem, jetzt Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) in den Konzentrationen 125 pg/ml, 250 pg/ml, 500 pg/ml, 1000 pg/ml, 2000 pg/ml, 4000 pg/ml 8000 pg/ml, 20000 pg/ml wurde in jede Vertiefung pipettiert und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Vertiefungen wurden 5-mal mit Waschpuffer gewaschen. Streptavidin HRP (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) wurde 1:1000 im mit Assay Diluent 1:250 verdünnten Biotin Mouse anti-human IgE (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) verdünnt. Davon wurden 100 µl pro Vertiefung pipettiert und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5-maligem Waschen erfolgte die Zugabe von 100 µl Substrat (aus dem Reagenzienset B von BD Pharmingen) in jede Vertiefung und die 15-minütige Inkubation im Dunkeln. 50 µl Stopplösung wurden pro Vertiefung hinzugegeben und die Absorption wurde bei 450/570 nm gemessen.

## **2.3 Basophilenaktivierungstest**

### **2.3.1 Reagenzien, Material und Geräte**

#### Reagenzien

Für die Analyse mit dem Durchflusszytometer wurde als Basophilenaktivierungstest der Flow2 CAST®, der Firma Böhler Mannheim Laboratories AG, Schönepfuhl, Schweiz, verwendet.

Ein Testkit beinhaltet:

- 1 Flasche lyophilisierten Stimulations-Puffer, Kalzium, Heparin und IL-3 enthaltend
- 1 Flasche lyophilisierte Stimulations-Kontrolle, anti-FcεRI mAK
- 1 Flasche lyophilisierte Stimulationskontrolle fMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin)
- 1 Flasche (2,2 ml) Färbe-Reagenz (anti-CD63-FITC und anti-CCR3-PE mAK)
- 1 Flasche (25 ml) 10 x konzentriertes Lyse-Reagenz
- 1 Flasche (100 ml) Waschpuffer

## -Material und Methoden-

Weitere verwandte Reagenzien waren:

- Lyophilisiertes Bienengift: Honey Bee Venom Check BAG2-I1CHK (Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz)
- Lyophilisiertes Wespengift: Yellow Jacket Venom Check BAG2-I3CHK (Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz)
- Lyophilisiertes Bromelain (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Lyophilisierte Meerretichperoxidase (HRP; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Deionisiertes, zweifach destilliertes Wasser zur Rekonstitution des Stimulations-Puffers und der Lyse-Reagenz (Klinikapotheke, Klinikum Rechts der Isar, München)
- Flüssigkeiten für die FACS-Analyse: FACSRinse (Reinigungslösung für Durchflusszytometer), BD FACSTflow™ (Kat. Nr. 342003), FACS Clean (Kat. Nr. 340345), BD (Becton-Dickinson) Biosciences GmbH, Heidelberg, Deutschland)

### Materialien

- Blutentnahme: EDTA KE/9 ml Monovette®, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
- Messröhrchen: 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube, 12 x 75 mm style, BD Falcon™, REF 352052, BD Biosciences GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Reagiergefäß 1,5 ml, REF 72.690.001, Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
- Pipetten: Eppendorf Reference autoclavable (2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl) Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland

## -Material und Methoden-

- Pipettenspitzen: 200 µl REF 70.760.002, 1000 µl REF 70762, Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
- Dispenserspitzen: Combitips plus 1,0 ml, Order no.: 0030 069.234, Combitips plus 50 ml, Order no.: 0030 069.277, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Laborglasflaschen: 100 ml, 200 ml, 1000 ml, Schott, Mainz, Deutschland
- Abdeckfolie: Parafilm "M", Pechiney Plastic Packaging, Chicago, Il., USA
- Styroporbox zur Inkubation

## Geräte

- Durchflusszytometer: FACScan mit Argonlaser, Becton-Dickinson Immunocytometry System, Heidelberg, Deutschland
- Computer: Apple Macintosh, Kalifornien, USA
- Software: Cellquest Software, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- Drucker: Epson AcuLaser C1100, Epson, Japan
- Zentrifuge: Universal 32, Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
- Vortexer: Vortex Genie 2™, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
- Brutschrank: Typ B 40, Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
- Kühlgerät: Bosch Cooler, Bosch GmbH, Gerlingen, Deutschland
- Schwenkmischer: BM 24, Kabe Labortechnik, Nümbrecht, Deutschland

Alle relevanten technischen Geräte waren geeicht und mit einer aktuellen Prüfplakette versehen.

### 2.3.2 Durchführung des Basophilenaktivierungstests

Der Flow2 CAST® der Firma Bühlamm Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz, ist ein Basophilenaktivierungstest, mithilfe dessen der In-vitro diagnostische quantitative Nachweis der Expression von CD63 (Aktivitätsmarker basophiler Granulozyten) gelingt und somit IgE-abhängige Reaktionen nachweisbar sind.

Vorbereitung:

- Entnahme von 9 ml venösem Blut in ein EDTA-Röhrchen und Mischung durch mehrmaliges Invertieren
- Rekonstitution des Stimulations-Puffers mittels 50 ml ultrareinem und pyrogenfreiem Wasser; im Anschluss Aliquotierung zu je 180 µl in Eppendorfcups und Lagerung bei -20° C
- Verdünnung der Stimulations-Kontrollen fMLP und anti-FcεRI $\alpha$ AK mittels je 1,5 ml Stimulations-Puffer
- Verdünnung der 10-fach konzentrierten Lyse-Reagenz mittels 225 ml deionisierten Wassers
- Vorbereitung der Hymenoptereingifte in Form von Herstellung je 5 unterschiedlicher Konzentrationen:
  1. Gabe von 250 µl Stimulations-Puffer zu Allergenen und Mischung (C1) → 284 ng/ml
  2. Mischung von 40 µl C1 mit 160 µl Stimulations-Puffer (C2) → 56,8 ng/ml
  3. Mischung von 40 µl C2 mit 160 µl Stimulations-Puffer (C3) → 11,4 ng/ml
  4. Mischung von 40 µl C3 mit 160 µl Stimulations-Puffer (C4) → 2,27 ng/ml
  5. Mischung von 40 µl C4 mit 160 µl Stimulations-Puffer (C5) → 0,45 ng/ml
- in gleicher Weise Herstellung je 5 unterschiedlicher Konzentrationen von Bromelain und Meerrettichperoxidase
- Beschriftung der Röhrchen: L1 & L2 (Background 1 & 2), K1 (Stimulationskontrolle 1-anti-FcεRI $\alpha$ AK), K2 (Stimulationskontrolle 2-fMLP), B1-5 (Bienengift in 5 unterschiedlichen Konzentrationen), W1-5 (Wespengift in 5 unterschiedlichen

-Material und Methoden-

Konzentrationen), B1-5 (Bromelain in 5 unterschiedlichen Konzentrationen), HRP1-5 (Meerrettichperoxidase in 5 unterschiedlichen Konzentrationen; Tabelle 7)

- Einschalten und Kalibrierung des Durchflusszytometers

**Tabelle 7: Übersicht der Kontrollen sowie getesteten Allergene/Kohlenhydratepitope in ihrer jeweiligen Konzentration**

<b>Beschriftung</b>	<b>Inhalt</b>
L 1	Background 1 (Negativkontrolle)
L 2	Background 2 (Negativkontrolle)
K 1	Stimulationskontrolle anti-FcεRI <sub>MAK</sub>
K 2	Stimulationskontrolle fMLP
B 1	284 ng/ml
B 2	56,8 ng/ml
B 3	11,4 ng/ml
B 4	2,27 ng/ml
B 5	0,45 ng/ml
W 1	284 ng/ml
W 2	56,8 ng/ml
W 3	11,4 ng/ml
W 4	2,27 ng/ml
W 5	0,45 ng/ml
Br 1	2841 ng/ml
Br 2	568 ng/ml
Br 3	114 ng/ml
Br 4	22,7 ng/ml
Br 5	4,5 ng/ml
HRP 1	2841 ng/ml
HRP 2	568 ng/ml
HRP 3	114 ng/ml
HRP 4	22,7 ng/ml
HRP 5	4,5 ng/ml

Während die Aliquots des Stimulationspuffers und der Stimulationskontrollen bei -20°C bis zu 6 Monate haltbar sind, wurden bei jedem Versuchsansatz frisch aufgelöste Allergene verwendet.

Die Lagerung der Testkits sowie der Allergene erfolgte bei 2-8°C.

Versuchsdurchführung (Abbildung 3):

Zunächst wurden 24 Röhrchen mit 50 µl des entsprechenden Stimulus (Leerwert, Stimulationskontrolle mit anti-FcεRI bzw. fMLP, je fünf unterschiedliche Konzentrationen von Bienen- und Wespengift, sowie von Bromelain und Meerrettichperoxidase) versetzt.

Zu jedem der 24 Röhrchen wurden nacheinander je 100 µl Stimulations-Puffer, 50 µl Patientenvollblut und 20 µl Farbe-Reagenz gegeben. Nach vorsichtiger Mischung und Abdeckung mittels einer adhäsiven Plastikfolie erfolgte eine 25-minütige Inkubation im Wärmeschrank. Durch Zugabe von je 2 ml vorgewärmter Lyse-Reagenz wurde ein Aktivierungsstopp erzielt und die Erythrozyten aufgelöst. Im Anschluss wurden die Röhrchen weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert sowie 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes Suspension der Zellen in jeweils 300 µl Waschpuffer. Bis zur Messung wurden die Röhrchen gekühlt und lichtgeschützt in einer Styroporbox aufbewahrt.

In der Regel erfolgte noch am selben Tag die Auswertung mithilfe des Durchflusszytometers und Cellquest Software.

Durch vorherige Farbmarkierung mittels anti-CCR3-PE mAK gelang die Selektion basophiler Granulozyten von den restlichen Lymphozyten.

Hierbei wurden bei jedem ausgewerteten Durchgang mindestens 300 Basophile mittels einer 488 nm Argonlaser-Diode erfasst. Der Prozentsatz der CD63 exprimierenden Basophilen, ebenfalls zuvor mittels Färbereagenz markiert, an allen erfassten Basophilen wurde bestimmt.

Das endgültige Ergebnis für das Vorliegen einer Positivität ergab sich anhand der Berechnung der an anderer Stelle erläuterten Ratio.

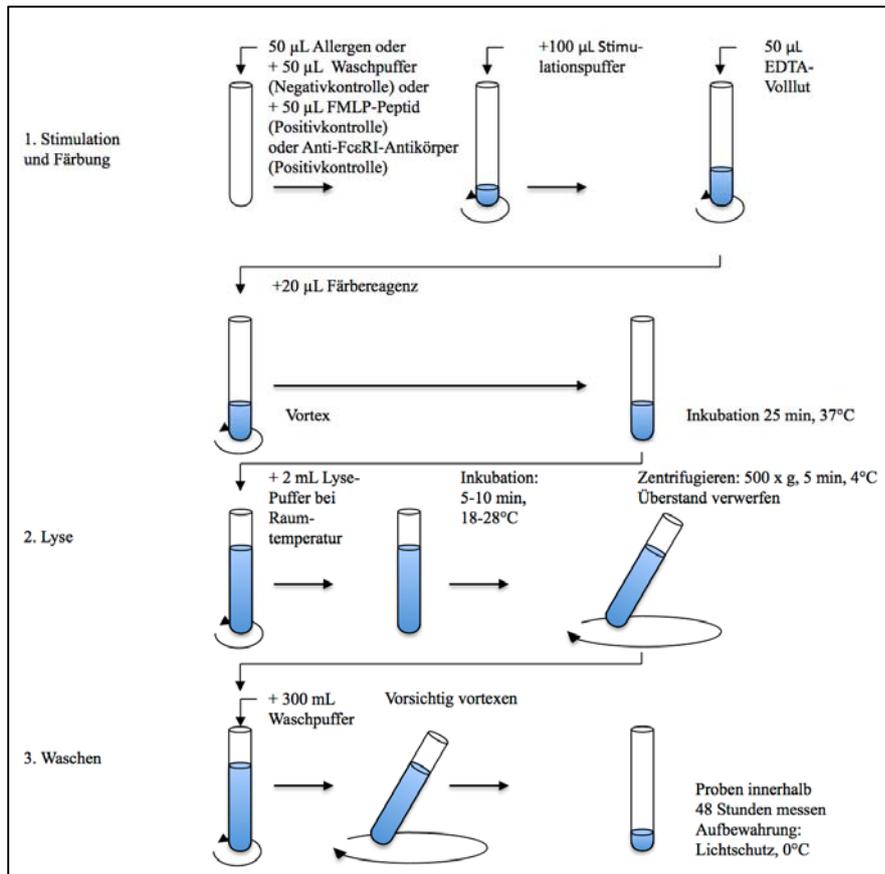


Abbildung 3: Durchführung des Basophilenaktivierungstests (24, 183)

### 2.3.3 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen, welche zuvor mit fluoreszierenden Farbstoffen behandelt wurden, an einem fokussierten Lichtstrahl vorbeigeführt.

Diese in Abhängigkeit ihrer Größe, Gestalt und spezifischen Anfärbung ausgesandten Lichtsignale, ermöglichen eine elektronische Weiterverarbeitung über ein optisches Detektionssystem. Bei Analyse vieler Zellen erhält man somit in überschaubarer Zeit repräsentative Informationen über eine Zellpopulation.

Ein Durchflusszytometer setzt sich aus einem Flüssigkeitssystem, der Optik und der Signalverarbeitung zusammen.

Das Prinzip des Flüssigkeitssystems besteht in der sogenannten hydrodynamischen Fokussierung. Dabei kommt es durch Erzeugung einer laminaren Strömung mittels Trägerflüssigkeit und einer

Querschnittsverringering in der Messküvette zu einer palisadenartigen Anordnung einzelner Zellen, die daraufhin einzeln hintereinander den Laserstrahl (488 nm, Argonlaser) passieren.

An diesem sogenannten Analysepunkt werden zwei Datenarten gemessen: zum einen Streulichtparameter und zum anderen Fluoreszenzparameter.

Aufgrund von Lichtstreuungseigenschaften werden Informationen über Zellgranularität und Zellgröße generiert. Hierbei kommt es je nach Einfallswinkel des Laserlichtes zu Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC, Einfallswinkel 1-10°) und zu Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC, Einfallswinkel 90°), welches in seiner Intensität deutlich schwächer ist. FSC generiert Informationen über die Zellgröße, während SSC eine Aussage über die Granularität und Zellkomplexität erlaubt, wobei die ausgesandten optischen Signale hierbei stark von der Vorbehandlung der Zellen sowie von der Optik der Durchflusszelle abhängen.

Ebenfalls im 90°-Winkel zum einfallenden Licht werden die Fluoreszenzen gemessen. In der Vorbereitung wurden die Zellen bereits mit Fluoreszenzfarbstoffen (anti-CD63-FITC und anti-CCR3-PE) versetzt.

Durch Farbteilerspiegel und Bandpassfilter werden die Fluoreszenzsignale spektral getrennt und über Photomultiplier (PMT) in elektrische Signale umgesetzt.

Unter Einsatz von blauem Licht eines Argon-Lasers mit der Wellenlänge 488 nm kommt es zu grüner Fluoreszenz von Fluoresceinisothiocyanat (FITC, FL1-Detektor) und orangener Fluoreszenz im FL2-Detektor durch Phycoerythrin (PE).

Die optischen Informationen von Lichtstreuung und Fluoreszenz werden in elektronische Signale umgewandelt und digitalisiert sowie an den angeschlossenen Computer übermittelt (Abbildung 4; 94, 143).

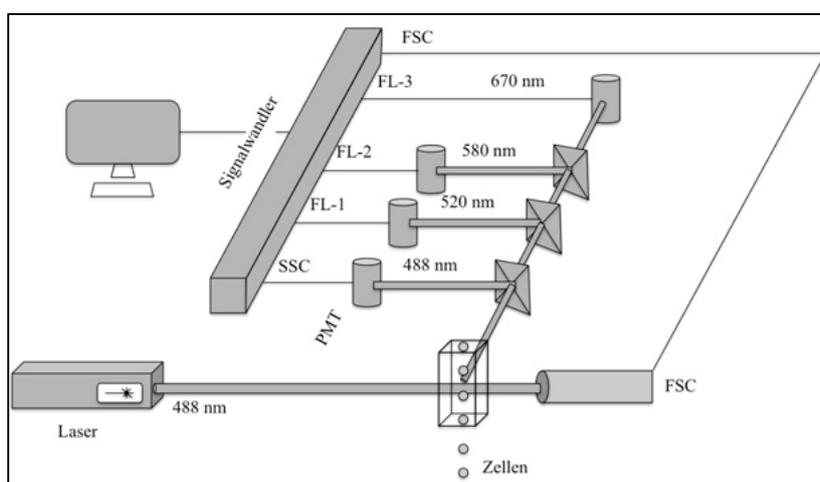


Abbildung 4: Aufbau eines Flowzytometers (143)

### 2.3.4 Prinzip der Datenanalyse

Hauptziel ist die Identifikation von Zellpopulationen sowie deren Charakteristik bezüglich Anzahl, Konzentration, Expressionsmuster und Heterogenität.

Dies gelingt in der Durchflusszytometrie mithilfe der Speicherung von Messdaten jeder einzelnen Zelle in standardisierter Datei-Form.

In der Regel wird nur ein Teil der Messereignisse zur Auswertung herangezogen, wobei diese Vorauswahl bezüglich bestimmter Eigenschaften als sog. „Gating“ bezeichnet wird. Dies beschreibt das Setzen eines Gates (Auswertefenster) um eine Zellpopulation, deren Fluoreszenz- bzw. Antigen-Eigenschaften untersucht werden sollen.

Die einfachste Darstellung von Verteilungsmustern ist das sogenannte Histogramm. Bei dieser eindimensionalen Form spiegelt die x-Achse die FITC-Fluoreszenzstärke und die y-Achse die Anzahl analysierter Zellen wider (Abbildung 5).

Unter Berücksichtigung der Negativ- sowie Positivkontrolle gelingt es, den prozentualen Anteil aktivierter Basophiler zu ermitteln.

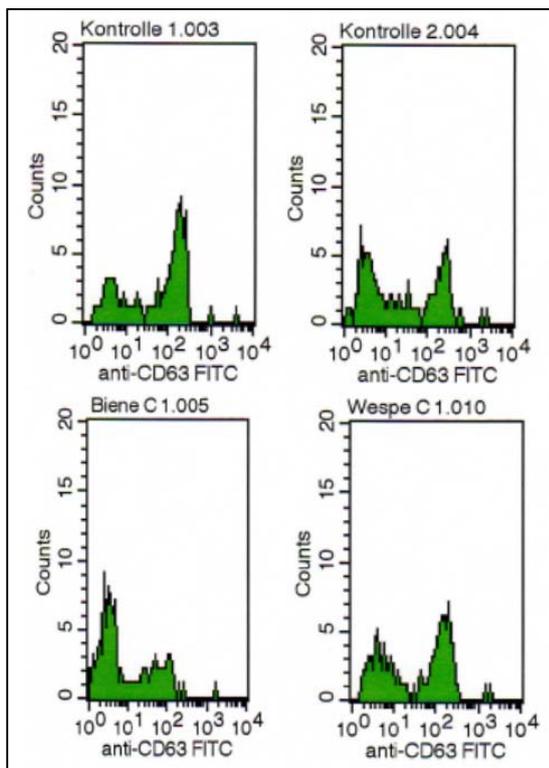


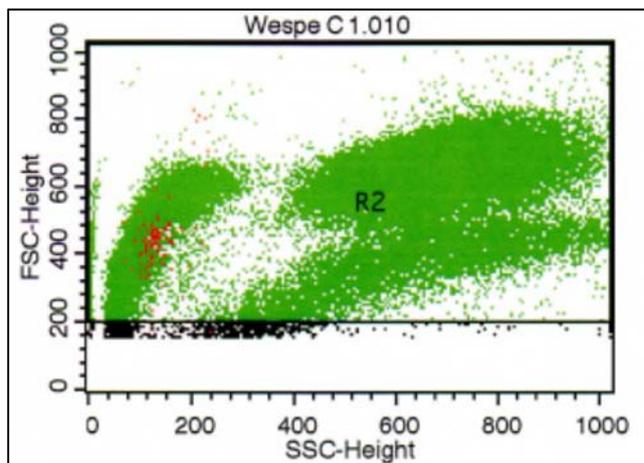
Abbildung 5: Darstellung basophiler Reaktivität mittels Histogramm

Mithilfe der im Gegensatz zum Histogramm 2-dimensionalen Darstellung mittels Dot-Plots (Punktwolkendarstellungen) ist die Intensitätsverteilung zweier Messparameter möglich. Hierbei

wird jede Zelle als einzelner Punkt aufgetragen. Für eine übersichtlichere Darstellung wird hierbei nur eine vorher festgelegte Stichprobe von Zellen für jeden Probenansatz gewählt, in unseren Untersuchungen entsprechen dieser 300 „gated events“.

Eine Methode zur Vermessung von Zellen in Dot-Plots ist die Quadrantenanalyse mittels polygoner Gates. Anhand der Negativ- bzw. Positivkontrolle wird ein Messfenster den basophilen Granulozyten angepasst, welches in allen Messungen konstant ist. Mit geeigneter Software ist die Ermittlung der Anzahl der in diesen Gates vorhandenen basophilen Granulozyten und deren Anzahl aktivierter Zellen möglich. Während in R1 ruhende basophile Granulozyten dargestellt werden, sind die in R2 aktiviert (Abbildung 6 A-C).

Anhand der so erhaltenen Gesamtzahl basophiler Granulozyten lässt sich der Prozentsatz der aktiven Basophilen bestimmen und erlaubt somit im Regelfall eine Aussage über das Vorliegen einer Positivität (143).



**Abbildung 6: Ordnung der Zellen (Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten) nach Größe und Granularität im Forward-Scatter- (FSC)/Side-Scatter-Diagramm (SSC)**

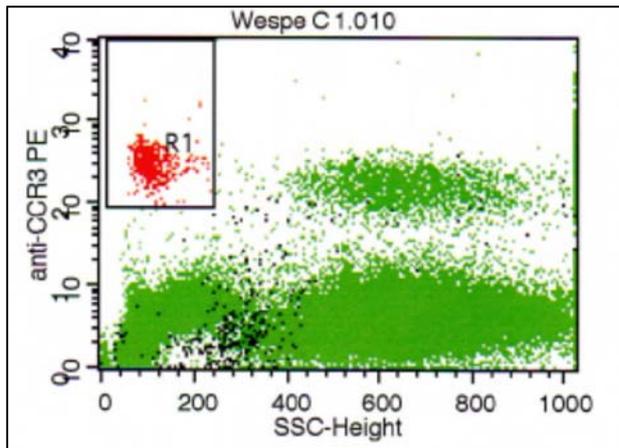


Abbildung 7: Setzen eines Auswertungsfensters R1 (Gate) um Zellen mit hoher anti-CCR3-PE-Expression (basophile Granulozyten)

Im Folgenden werden nur noch die im Gate enthaltenen Zellen dargestellt.

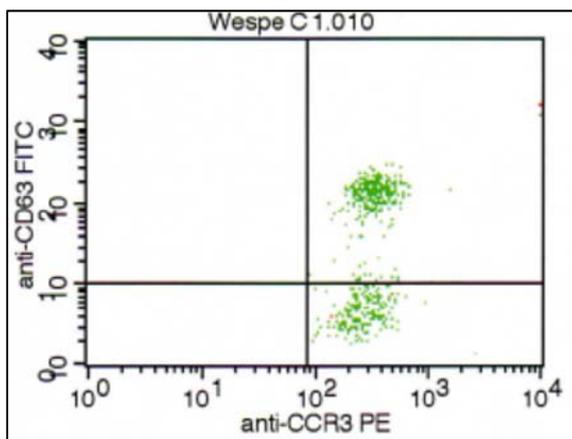


Abbildung 8: Aufzeichnung beider Identifizierungsmarker zueinander und Setzen von Quadranten in Dot-Plot-Ebene: Definition Fluorochrom-positiver Zellen und somit Detektion aktivierter basophiler Granulozyten im Upper-Right-Quadranten (prozentuale „Gated events“)

Abbildung 6-8: Schematische Auswertung eines BAT

### 2.3.5 Auswertung und Bestimmung der halbmaximalen Konzentration

Die Interpretation des Basophilenaktivierungstests beruht in der Regel auf einem vom Hersteller vorgegebenen, mittels ROC-Kurven ermittelten Cut-off-Wert für die in Prozent erhaltenen Ergebnisse.

Diese als ROC-Kurve oder auch als Grenzwertoptimierungskurve bezeichnete Darstellung, gilt als eine gängige Methode, um den bestmöglichen Schwellenwert eines Parameters, hier den Cut-off-Wert, zu eruieren und ist Ausdruck der Beziehung zwischen Sensitivität und Spezifität. Anwendung findet sie häufig bei neuen Testverfahren, wobei es gilt, möglichst hohe Werte für Sensitivität und Spezifität zu erhalten (199).

Im Falle des von uns angewandten Flow2 CAST® der Firma Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz, wurde ein Cut-off-Wert in der Routine für Bienen- und Wespengift von  $\geq 15\%$  verwendet.

Da die Durchführung des BAT mit kreuzreagierenden Kohlenhydratketten (CCDs) in unserer Studie experimentell angewandt wurde und somit keine bekannten Cut-off-Werte existierten, ermittelte diese freundlicherweise Herr Dr. M. Schneider von der Firma Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz, anhand von ROC-Kurven.

Somit ergab die Auswertung der unterschiedlichen Konzentrationen von Bromelain einen Cut-off-Wert von 4%, die beste Konzentration zur Durchführung des BAT mit Bromelain lag bei 568 ng/ml (C2). Für die Meerrettichperoxidase (HRP) errechnete sich ein Cut-off-Wert von 7% bei optimaler Konzentration von 4,5 ng/ml (C5).

Negative Positivkontrollen  $\leq 15\%$  sowie Leerwerte  $\geq 10\%$  führten zum Ausschluss aus der Studie, da bei diesen Patienten eine BAT-Auswertung nicht möglich war. Eine genaue Erläuterung hierzu ist im Kapitel Diskussion unter 4.2.8 BAT, Non-Responder, zu finden.

In unserer Studie lag der Fokus auf der Unterscheidung von klinisch relevanter zu irrelevanter Doppelpositivität, worüber der Basophilenaktivierungstest näheren Aufschluss geben sollte.

Nach Erhalt der Ergebnisse aus den jeweiligen Versuchsansätzen wurden die für Bienen- und Wespengift ausgewerteten Daten in Diagramme übertragen.

Die Koordinaten ergaben sich aus den im Basophilenaktivierungstest gewonnenen Werten der einzeln gemessenen Konzentrationen der Hymenopteregifte.

Auf der x-Achse wurden jeweils die fünf unterschiedlichen Allergenkonzentrationen in ng/ml, beginnend mit der geringsten und aufsteigend bis zur höchsten Konzentration aufgetragen. Die y-Achse zeigt den Aktivitätsmarker CD63 in Prozent (Dosis-Wirkungs-Kurve).

Die Bestimmung der Positivität für ein bzw. beide Gifte erfolgte anhand einer Ratio:  $C50_{\text{Biene}}/C50_{\text{Wespe}}$  ( $C50$  = halbmaximale Konzentration). Die dazu benötigte grafische und rechnerische Darstellung wurde uns freundlicherweise von Dr. M. Schneider, Firma Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz, zur Verfügung gestellt.

Die Abbildung 9 zeigt beispielhaft das Diagramm des Bienengift-BAT von Patient Nr. 22. Zur Ermittlung der halbmaximalen Konzentration wird am Maximum der CD63-Aktivität entweder bei der Positivkontrolle oder bei einer Konzentration des Insektengifts eine horizontale Linie gezogen. Eine Parallele auf Höhe der Hälfte dieses Wertes schneidet die Dosis-Wirkungs-Kurve am Punkt der halbmaximalen Stimulation, wo somit die halbmaximale Konzentration ( $C50$ ) auf der x-Achse ablesbar ist.

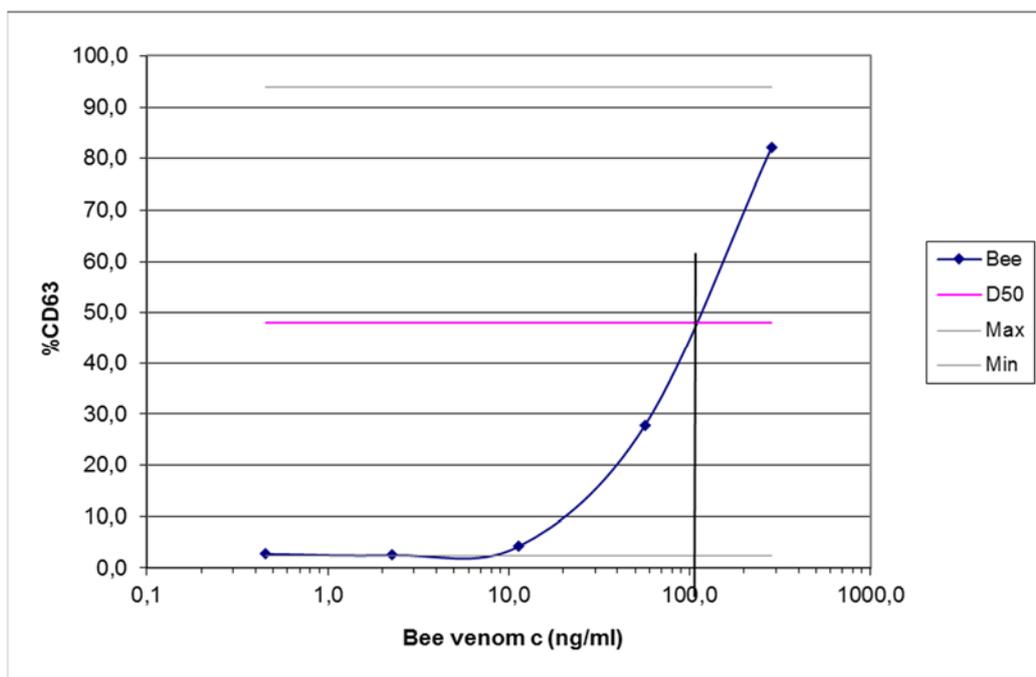


Abbildung 9: Bestimmung der halbmaximalen Konzentration mit Bienengift (Pat. Nr. 22)

Der Quotient aus  $C50$  des Bienengiftes durch  $C50$  des Wespengiftes ergibt die sogenannte Ratio. Sie kann weiteren Aufschluss über das eventuelle Vorliegen einer klinisch relevanten Doppelpositivität geben. Für Werte unter 0,1 wird eine vorherrschende Positivität für Bienengift angenommen, für Werte über 10 eine vorherrschende Positivität für Wespengift.

Dazwischenliegende Ergebnisse, also Werte zwischen 0,1 und 10, sprechen für das Vorliegen einer klinisch relevanten Doppelpositivität für Bienen- und Wespengift (Tabelle 8).

Die Diagramme und Ergebnisse der übrigen 21 Patienten sind im Anhang zu finden.

**Tabelle 8: Kriterien der Ratio**

Ratio	Positivität
< 0,1	Bienengift
> 10	Wespengift
0,1-10	Bienen- und Wespengift

### 2.3.5.1 Beispiel

- 27-Jähriger Patient S., J. (Pat. Nr. 6)
- Anamnestisch bekannte Reaktion Grad II auf Bienengift
- SIgE (CAP-Klasse): Biene: 3; Wespe: 2; rApi m 1: 2; rVes v 5: 2; CCD, MUX F 3 aus Bromelain: 0; HRP: 1
- Basophilenaktivierung:
  - anti-FcεRI: 70.4 % CD63;
  - fMLP: 21.1 % CD63
- Bienengift: C1: 83,6%; C2: 84,3%; C3: 74,3%; C4: 24,8%; C5: 2,5% (positiv, da  $\geq 15\%$ )
- Wespengift: C1: 63,3%; C2: 30,5%; C3: 7,6%; C4: 3,2%; C5: 2,5% (positiv, da  $\geq 15\%$ )
- Bromelain: C1: 2,1%; C2: 0,9%; C3: 1,5%; C4: 0,7%; C5: 2,1% (negativ, da  $< 4\%$ )
- Meerrettichperoxidase (HRP): C1:9,6%; C2:15%; C3:21,4%; C4:5%; C5: 3,5% (positiv, da  $>7\%$ )

Halbmaximale Konzentration:

- Bienengift 4 ng/ml
- Wespengift 70 ng/ml
- Ratio Biene/Wespe 0.057 → Biene positiv

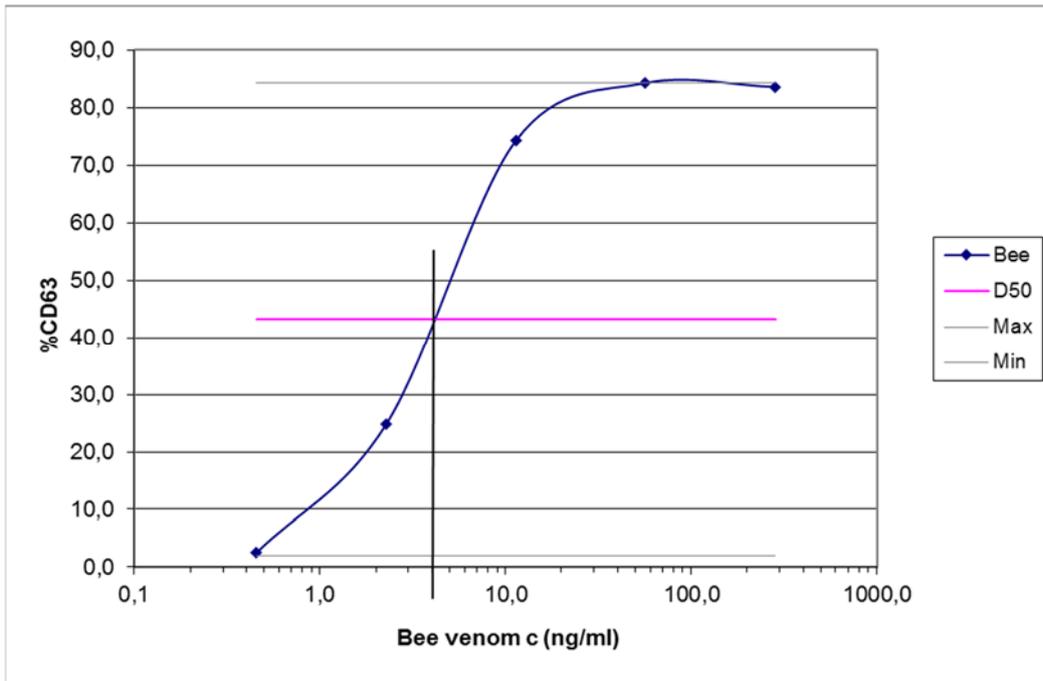


Abbildung 10: Bestimmung der halbmaximalen Konzentration mit Bienengift

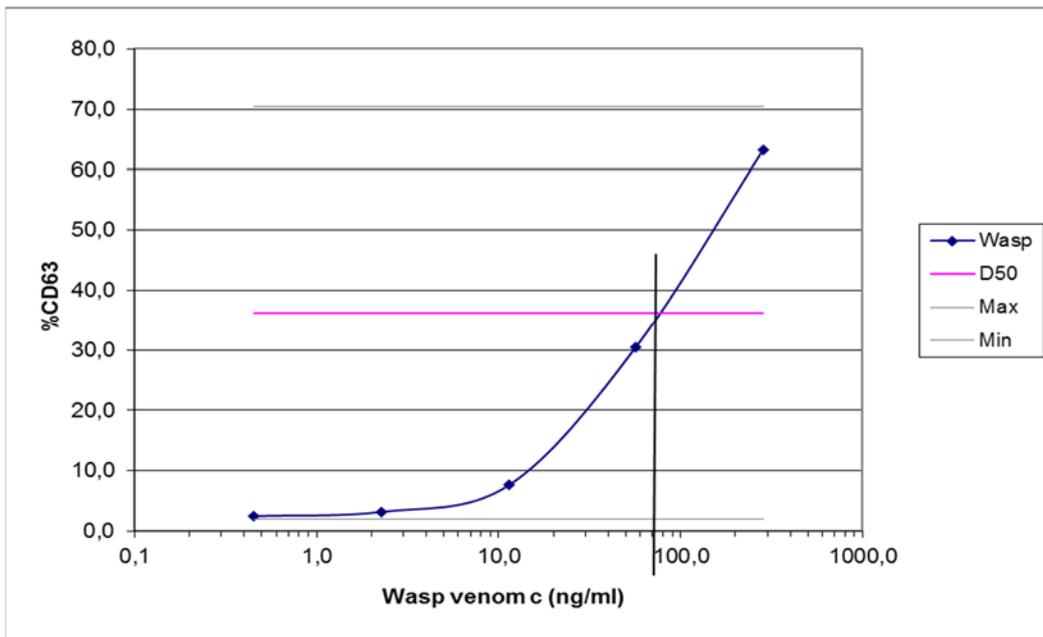


Abbildung 11: Bestimmung der halbmaximalen Konzentration mit Wespengift

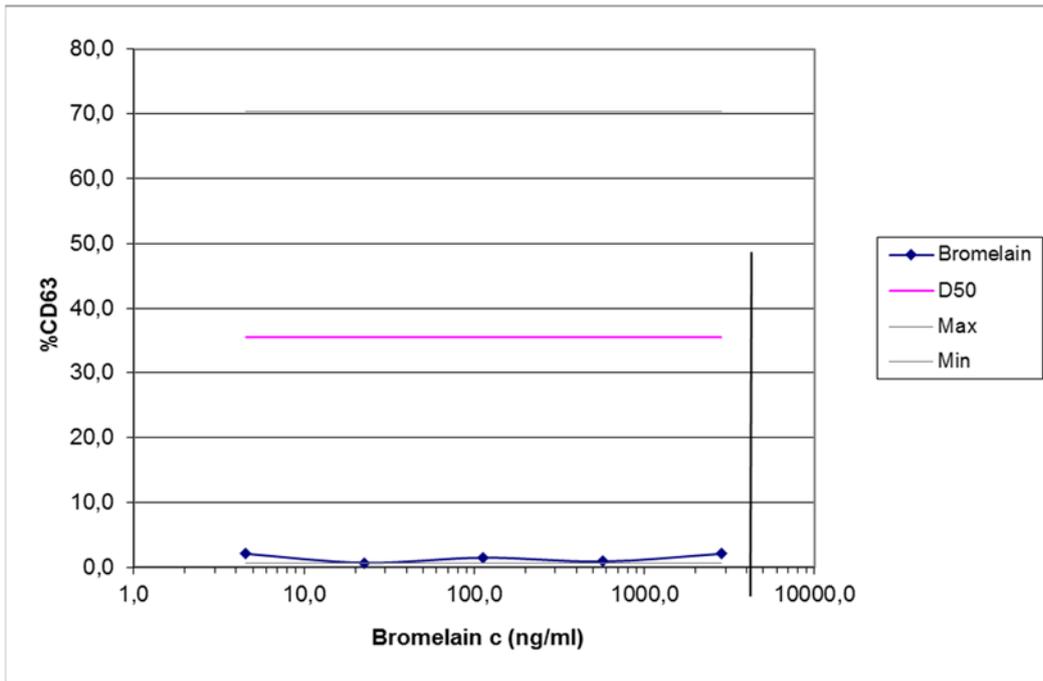


Abbildung 12: Basophilen-Aktivierungstest mit verschiedenen Konzentrationen von Bromelain

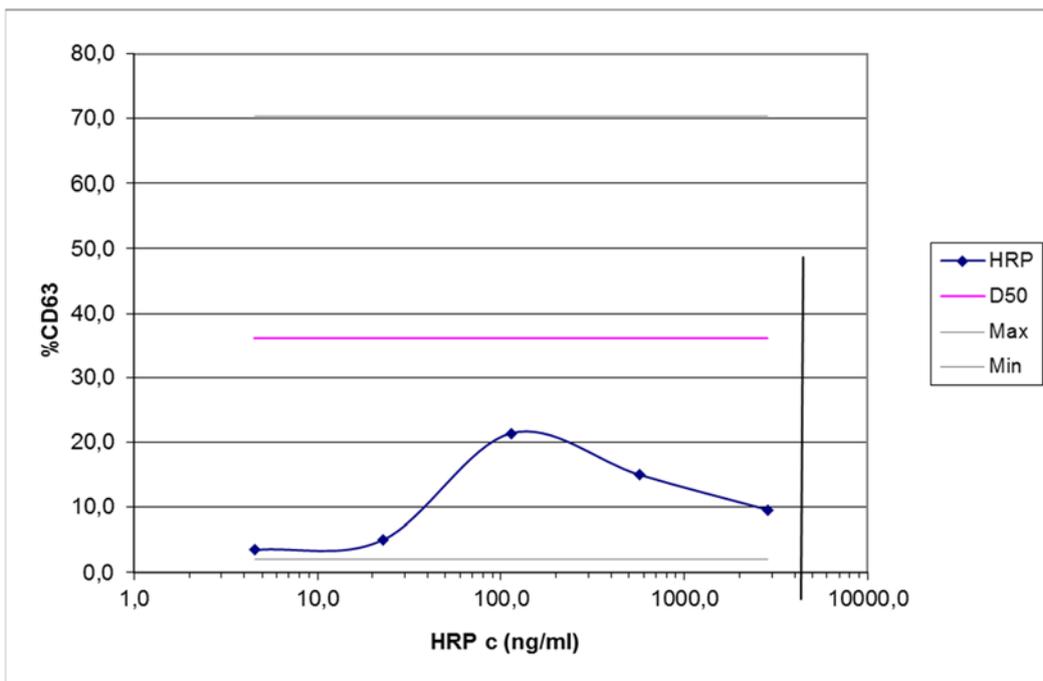


Abbildung 13: Basophilen-Aktivierungstest mit verschiedenen Konzentrationen von HRP

## 2.4 Statistik

### Sensitivität/Spezifität

Für die Beurteilung der Zuverlässigkeit eines Testverfahrens wurden die Sensitivität und Spezifität, sogenannte Validitätskriterien, herangezogen. Die Validität beschreibt das Ausmaß der Fähigkeit eines Tests, Erkrankte und Nichterkrankte zu unterscheiden. Diese „Trennschärfe“ ermöglicht in der medizinischen Wissenschaft den Vergleich einzelner Testmethoden.

Die Sensitivität trifft eine Aussage bezüglich der Wahrscheinlichkeit eines positiven Tests bei Erkrankten gemessen an allen Getesteten (Sensitivität = richtig Positive/[richtig Positive+falsch Negative]).

Die Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit eines Tests, Gesunde als tatsächlich gesund, das heißt mit einem negativen Testergebnis, zu erkennen (Spezifität=richtig Negative/[richtig Negative+falsch Positive]; 22).

### Prädiktiver Wert

Der prädiktive Wert oder auch die A-posteriori-Wahrscheinlichkeit ist der Vorhersagewert über das Vorliegen einer Erkrankung bei Kenntnis des Testergebnisses.

So beschreibt der positive prädiktive Wert die Wahrscheinlichkeit, dass bei positivem Testergebnis auch tatsächlich eine Erkrankung vorliegt.

Der negative prädiktive Wert hingegen macht eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit, dass bei negativem Testergebnis der Getestete tatsächlich gesund ist (22, 50).

### p-Wert

Der P-Wert beschreibt das „Maß der Verträglichkeit von Daten und Nullhypothese“.

Die Stärke der Abweichung wurde entsprechend der Literatur mittels „Signifikanz-Klassen“ angegeben ( $P > 0.05$  - nicht signifikant;  $0.05 \geq P > 0.01$  - schwach signifikant (\*);

$0.01 \geq P > 0.001$  – stark signifikant (\*\*);  $0.001 \geq P$  – sehr stark signifikant (\*\*\*) 171).

### **k-Koeffizient**

Der Kappa-Koeffizient ist definiert als ein Maß, um welches eine beobachtete Übereinstimmung die rein zufällige Übereinstimmung übersteigt. Die Angabe des Kappa-Wertes erfolgte zwischen 0 und 1, wobei 1 ein hohes Maß und 0 ein geringes Maß an Übereinstimmung ausdrückt (60).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Überblick

Den Basophilenaktivierungstest führten wir in oben genannter Weise bei insgesamt 28 Patienten mit positiver Stichanamnese sowie Nachweis von sIgE für Bienen- und Wespengift vor Beginn einer spezifischen Immuntherapie durch. Anamnestisch wiesen alle Personen mindestens eine positive Stichreaktion mit einer Anaphylaxie Grad I bis IV auf. Im Einzelnen waren dabei 8 Patienten einer Anaphylaxie Grad I zuzuordnen (Pat. Nr. 2, 11, 12, 14, 17, 18, 21, 28), 14/15 mal trat eine Anaphylaxie Grad II (Pat. Nr. 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27) auf, jeweils 3 Patienten wurden bei ausgeprägten Symptomen in Grad III (Pat. Nr. 7, 15, 19) und IV (Pat. Nr. 13, 16, 22) eingestuft. Patient Nummer 22 berichtete von zwei Stichereignissen, wobei einmal Symptome entsprechend Grad II und einmal entsprechend Grad IV auftraten.

Aufgrund zu hoher Leerwerte im BAT (per definitionem > 5%) wurden zwei der Probanden (Pat. Nr. 23, 24) von der Bewertung ausgeschlossen.

Vier weitere Patienten zeigten im Basophilenaktivierungstest negative IgE-abhängige Positivkontrollen (anti-FcεRI<sub>α</sub>AK < 15%) und wurden als sogenannte „Non-Responder“ aus der Wertung genommen (Pat. Nr. 25, 26, 27, 28). Der BAT zeigt in solchen Fällen negative Ergebnisse auf die untersuchten Allergene und gibt somit keinerlei Aufschluss über das Vorhandensein einer Sensibilisierung.

Die übrigen 22 Patienten wurden bezüglich Anamnese, spezifischem IgE für Bienen- und Wespengift sowie rApi m 1 und rVes v 5, Bromelain und Meerrettichperoxidase, Hauttestung und BAT-Werten weiter verglichen.

Die folgenden Tabellen zeigen eine Übersicht der Probanden und den diagnostisch durchgeführten Maßnahmen sowie eine Ergebnisübersicht der 10 Kontrollpersonen.

**Tabelle 9: Charakteristika der Patienten (Nr. 1-28) im Hinblick auf Anamnese, Hauttest und Bestimmung sIgE Antikörper auf Bienen- und Wespengift, rApi m 1, rVes v 5, Bromelain und HRP**

Nummer	Grad	Insekt	Haut B	Haut W	CAP B	sIgEB	CAP W	sIgEW	rApi m1	sIgE:Api m1	rVes v5	sIgE:Ves v5	ELISA	CAP Bro	CAP HRP	sIgE:CCD
VP 01	2	W	pos	pos	5	pos	4	pos	2	pos	2	pos	ND	3	3	pos
VP 02	1	W	ND	ND	3	pos	3	pos	0	neg	0	neg	Pos:mApi m 1,2,3,5; rVes v 5	0	0	neg
VP 03	2	B	pos	neg	3	pos	3	pos	1	pos	3	pos	ND	2	2	pos
VP 04	2	B	pos	pos	4	pos	4	pos	2	pos	3	pos	ND	0	0	pos
VP 05	2	?	neg	pos	3	pos	1	pos	0	neg	2	pos	pos: rApi m 2,10; rVes v 1	0	0	neg
VP 06	2	B	pos	pos	3	pos	2	pos	2	pos	2	pos	ND	0	1	pos
VP 07	3	B	pos	neg	4	pos	3	pos	2	pos	0	neg	neg: rVes v 1,2,3,5	2	3	pos
VP 08	2	B, W	pos	pos	3	pos	2	pos	2	pos	1	pos	ND	1	2	pos
VP 09	2	W	pos	pos	3	pos	3	pos	2	pos	2	pos	ND	3	4	pos
VP 10	2	B	pos	pos	3	pos	2	pos	1	pos	2	pos	ND	2	2	pos
VP 11	1	?	pos	pos	2	pos	2	pos	0	neg	2	pos	pos: rApi m 2,3	0	0	neg
VP 12	1	B	ND	ND	5	pos	3	pos	4	pos	3	pos	ND	3	3	pos
VP 13	4	B	pos	pos	3	pos	3	pos	2	pos	0	neg	pos: rVes v 1	2	3	pos
VP 14	1	?	pos	pos	1	pos	3	pos	0	neg	4	pos	pos: rApi m 3	0	0	neg
VP 15	3	B	pos	pos	3	pos	1	pos	1	pos	0	neg	pos: rVes v 1,2,3	2	2	neg
VP 16	4	W, B	pos	pos	4	pos	3	pos	3	pos	3	pos	ND	2	2	pos
VP 17	1	W	pos	pos	3	pos	3	pos	2	pos	3	pos	ND	0	0	neg
VP 18	1	W	ND	ND	1	pos	1	pos	0	neg	1	pos	pos: rApi m 10	0	0	neg
VP 19	3	W	pos	pos	1	pos	3	pos	0	neg	2	pos	pos: rApi m 1,2,3	1	1	pos
VP 20	2	W	pos	pos	2	pos	2	pos	0	neg	2	pos	pos: rApi m 10	0	0	neg
VP 21	1	B	pos	pos	5	pos	3	pos	1	pos	3	pos	ND	0	0	neg
VP 22	4, 2	H, ?	pos	pos	3	pos	4	pos	2	pos	3	pos	ND	0	2	pos
**VP 23	2	?	neg	pos	3	pos	1	pos	0	neg	2	pos	ND	0	0	neg
**VP 24	2	?	ND	ND	3	pos	3	pos	2	pos	4	pos	ND	0	0	neg
**VP 25	2	W	ND	ND	1	pos	2	pos	0	neg	0	neg	ND	0	0	neg
**VP 26	2	W, B	neg	neg	1	pos	3	pos	0	neg	3	pos	ND	0	2	pos
**VP 27	2	B	ND	ND	6	pos	3	pos	2	pos	2	pos	ND	6	6	pos
**VP 28	1	W	neg	neg	2	pos	2	pos	0	neg	2	pos	ND	1	1	pos

**Tabelle 10: Ergebnisse (% CD63) der Patienten im Basophilen-Aktivierungstest**

Nummer	Neg-Ko	PB1	PB2	anti-FcεRI	fMLP	B1	B2	B3	B4	B5	W1	W2	W3	W4	W5	Bro1	Bro2	Bro3	Bro4	Bro5	HRP1	HRP2	HRP3	HRP4	HRP5	
VP 01	1,4+1,2	1,4	1,2	26	32,3	14,1	1,7	1,6	8,7	1,5	2,8	0,6	1,3	0,7	2	27,9	4	0,9	0,7	1,1	46,8	32,7	40,1	37,2	14	
VP 02	0,63	0,63		35,3	24,15	30,56	29,29	24,38	20,59	0,83	44,33	25,16	11	0,64	2,48	1,24	0,83	1,24	1,27	0,62	1,05	1,05	2,45	1,86	1,91	2,72
VP 03	3,8+3,1	3,8	3,1	47,8	54,6	3,1	3,9	3,2	2,6	11,1	15,8	3,6	3,2	3,7	5,7	5,7	2,6	0,8	2,5	2,5	35,2	86,6	4,9	7,5	7,7	
VP 04	1,3+0,4	1,3	0,4	54,7	38,7	29,6	12,5	6,7	0,7	0,5	44,1	54,8	12,4	2,4	0,2	0,5	0,7	0	0,24	0,85	0	0,24	0,76	0,98		
VP 05	5,1+10,1	5,10	10,10	82,9	62,7	49,5	26,80	77,70	10	8,25	10,9	9,9	7,2	5,6	7,2	2,9	3,2	3,4	6,4	23,5	4	7,3	21,4	32,4	25,7	
VP 06	0,7+2,0	0,7	2	70,4	21,1	83,6	84,3	74,3	24,8	2,5	63,3	30,5	7,6	3,2	2,5	2,1	0,9	1,5	0,7	2,1	9,6	1,5	21,4	5	3,5	
VP 07	1,3+0	1,3	0	89,2	25,1	89,5	91,6	95,1	94,7	75,6	65,4	25,4	4,4	26,8	6,42	78,2	48,9	11,1	2,6	1,6	87,4	86,8	90,7	94,7	91,8	
VP 08	4,0+1,7	4	1,7	47,03	28,33	30	17,58	6,23	1,8	2,8	16,2	7,1	5,3	4,7	3	1,1	1,8	2,6	1,4	2,5	1,2	1,9	2,8	1,7	n.d.	
VP 09	2,3+32,4	2,3	32,4	81,4	91,1	78,9	87,1	28,6	62,8	86,7	22,5	32,9	40,4	46,8	29,5	65,1	32,2	13,8	72,2	89,5	51,3	86,7	61,25	67,37	51,9	
VP 10	3,55+1,8	13,70	1,80	51,9	94,40	37,30	10,80	8,80	3,80	3,90	22,00	8,40	5,10	3,10	2,30	1,60	1,60	1,40	1,80	4,60	17,90	20,30	9,50	4,70	2,04	
VP 11	1,5+2,2	1,5	2,2	65,5	23,7	14,3	16,4	9,5	2,2	1,3	43,3	49,1	18,2	4,5	2	4,5	3	2,2	2,2	2,4	6	4,7	3,7	1,9	3,1	
VP 12	0,5+0,7	0,5	0,7	63,3	25	47,4	49,04	19,7	1,9	1,6	2,7	1	2,8	1,8	2	1,5	2,9	3,2	0,5	1,5	20,8	77,7	81,3	65,9	60,7	
VP 13	6,0+2,1	6	2,1	73,6	13,9	69,3	65,9	78,7	85,3	68,7	33,9	40,2	14,7	2,3	1,4	5,7	1,7	1,9	2,4	1,9	22,9	23,6	22,5	39,9	28,4	
VP 14	1,7+0,6	1,7	0,6	51,7	13,8	28,3	19,9	6,2	1,4	1,3	46,8	70,8	88,7	18,2	1,6	0,6	1,9	1,3	1,5	3,6	4,4	2,3	3,3	0,5	1,1	
VP 15	2,2+0,6	2,20	0,60	68,7	38,3	81,8	79,2	85,7	63,5	15,80	31	19,21	4,20	1	1,6	1,40	1,30	0,40	1,50	1,30	2,10	1,60	1,00	1,50	0,70	
VP 16	1,9+0,4	1,90	0,40	82,5	7,30	59,20	70,04	81,20	53,3	12,50	75,05	83,2	50,1	5,90	0,90	34,30	4,40	1,30	1,20	2,04	57,70	74,10	84,40	76,1	53,30	
VP 17	2,4+2,2	2,40	2,20	85,52	15,11	54,59	92,95	88,32	82,28	4,37	78,67	53,46	75,65	24,64	3,86	2,04	1,95	2,85	3,09	4,2	5,22	8,44	1,73	5,04	2,11	
VP 18	1,9+2,1	1,9	2,1	78,7	53,54	26,75	3,63	1,63	2,2	0,6	62,78	56,11	42,59	7	1,82	5,51	2,21	2,99	1,41	2,01	61,05	73,66	74,63	66,45	25,36	
VP 19	1,2+2,3	1,20	2,30	93,93	33,33	82,14	27,88	4,21	2,52	2,75	91,3	91,42	63,16	9,11	2,9	78,71	33,58	1,7	2,44	1,93	83,18	69,63	73,22	85,4	79,82	
VP 20	2,8+4,4	2,81	4,42	79,6	38,29	54,14	30,57	9,09	6,84	6,67	77,27	76,41	63,53	24,95	7,69	9,02	7,55	8,42	8,48	7,89	40,44	20,73	10,55	7,66	5,24	
VP 21	0,2+0,5	0,24	0,47	86,09	46,95	88,97	91,43	88,56	87,56	74,48	75,00	88,28	50,91	12,97	6,60	27,03	0,24	0,00	8,06	0,24	41,22	35,57	29,23	13,92	2,02	
VP 22	1,3+0,0	1,31	0	83,38	2,22	73,33	72,79	58,15	5,5	1,28	69,47	88,06	72,07	13,83	0,65	52,15	4,39	1,5	0,61	0,45	56,13	17,53	47,95	53,51	66,28	
*VP 23	17,5+36,1	17,48	36,14	94,89	63,62	96,77	49,01	75,33	85,2	66,25	31,06	24,14	21,53	23,04	32,71	4,76	4,88	3,36	39,4	2,74	2,99	1,48	7,69	5,49	4,54	
*VP 24	37,6+32,2	37,57	32,22	29,55	37,54	39,85	36,53	25,61	18,9	6,74	44,35	29,64	38,36	33,42	20,63	12,9	5,18	4,65	5,25	6,51	12,53	11,48	11,05	16,09	10,51	
**VP 25	0,5+0,0	0,52	0	0,33	26,09	0,84	0,21	0	0,65	0,22	1,56	1,47	0,74	0,86	0,73	0	0,94	0,7	0,43	1,42	1,66	0	0,66	0,87	1,09	
**VP 26	2,6+0,7	2,64	0,7	14,4	72,53	1,87	2,01	0,48	0,23	0,97	14,83	15,86	2,56	2,54	2,36	0,66	0,75	0,48	1,42	0,76	2,6	2,51	2,27	1,07	1,29	
**VP 27	0,7+0,2	0,67	0,24	7,44	37,08	18,87	4,09	0,29	0	0,57	11,88	11,9	2,8	0,86	0,25	27,2	9,7	0,55	0,94	0,51	2,56	1,2	2,56	14,98	30,6	
**VP 28	1,9+2,4	1,86	2,39	10,81	21,21	1,33	1,44	1,6	1,73	1,19	1,96	1,64	1,44	2,67	1,05	2,12	1,94	1,49	1,21	0,43	2,02	1,02	8,24	11,54	12,35	

-Ergebnisse-

\*Legende zu Tabelle 9:

VP	Versuchsperson
B	Biene
W	Wespe
neg	negativ
pos	positiv
Haut	Hauttest
CAP	Carrier-Polymer-System
sIgE	spezifisches Immunglobulin E
rApi m1	Phospholipase A2 des Bienengifts
rVes v5	Antigen 5 des Wespengifts
Bro	MUXF-Glycan-Seitenkette von Bromelain
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
CCD	Cross-reactive Carbohydrate Determinant
ND	not done (nicht durchgeführt)
*VP	nicht zu werten aufgrund zu hoher Leerwerte
**VP	Non-Responder

\*Legende zu Tabelle 10:

VP	Versuchsperson
neg	negativ
pos	positive
C	Konzentration
B	Biene
W	Wespe
Bro	MUXF-Glycan-Seitenkette von Bromelain
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
B 1-5	Bienengift in 5 unterschiedlichen Konzentrationen
W 1-5	Wespengift in 5 unterschiedlichen Konzentrationen
Bro 1-5	Bromelain in 5 unterschiedlichen Konzentrationen
HRP 1-5	HRP (Meerrettichperoxidase) in 5 unterschiedlichen Konzentrationen

-Ergebnisse-

Neg-Ko	Negativkontrolle
PB	Background (Negativkontrolle)
Anti-FcεRI	hochaffiner IgE-Rezeptor (Positivkontrolle)
fMLP	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (Positivkontrolle)
NA	not available (nicht verfügbar)
*VP	nicht zu werten aufgrund zu hoher Leerwerte
**VP	Non-Responder
farblich unterlegt ≥ 7%)	positiver Cut-off-Wert (Biene und Wespe ≥ 15%, Bromelain ≥ 4%, HRP ≥ 7%)

Tabelle 11: Übersicht der Kontrollen

Kontroll Nr.	Neg-Ko	PB 1	PB 2	anti-FcERI	fMLP	B 1	B 2	B 3	B 4	B 5	W 1	W 2	W 3
Kontrolle 1	2,14±1,41	2,14	1,41	43,71	37,02	2,7	0,71	1,36	1,77	2,19	1,85	3,54	1,69
Kontrolle 2	0,41±0,6	0,41	0,6	65,56	23,51	8,08	1,78	1,44	1,02	2,04	1,41	1,24	1,04
Kontrolle 3	2,31±1,02	2,31	1,02	94,46	4,95	0,74	2,11	0,69	1,17	3,1	7,53	7,46	1,65
Kontrolle 4	1,08±0,45	1,08	0,45	86,74	28,57	1,49	2,58	2,77	4,38	4,15	2,8	1,4	0,53
Kontrolle 5	2,31±1,06	2,31	1,06	61,32	59,86	0,84	0,63	1,72	0,95	2,95	0	6,06	0
Kontrolle 6	0,2±0,61	0,2	0,61	40,26	30,7	0	0,2	0	0,21	0	0,2	0,2	0
Kontrolle 7	0,0±0,2	0	0,2	63,02	19,35	0,63	0	0,21	0,62	0	34,39	9,11	0,42
Kontrolle 8	1,55±1,43	1,55	1,43	66,48	57,32	3,75	7,53	6,84	2,68	9,52	0,46	2,89	1,66
Kontrolle 9	0,6±0,42	0,6	0,42	76,98	9,35	0,21	0,43	0,21	0,22	0,63	1,01	0	0,21
Kontrolle 10	0,22±0,88	0,22	0,88	76,91	9,41	8,37	1	0,61	1,2	0,64	1,02	0,89	0,41
Kontroll Nr.	W 4	W 5	Bro 1	Bro 2	Bro 3	Bro 4	Bro 5	HRP 1	HRP 2	HRP 3	HRP 4	HRP 5	
Kontrolle 1	1,13	1,68	2,81	0,76	1,78	2	0,33	0,34	0,64	0,71	0,7	0,69	
Kontrolle 2	0,67	0,22	0,79	0,2	0,77	0,6	0,21	0	1,84	1,43	1,2	1,05	
Kontrolle 3	1,99	1,18	1,48	0,76	2,07	2,02	1,66	2,89	3,23	2,81	0,73	2,2	
Kontrolle 4	1,11	3,24	2,26	1,75	1,26	4,52	1,07	0,89	2,53	1,3	3,44	3,7	
Kontrolle 5	0,64	0 ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Kontrolle 6	0,41	0,21	0,2	0,2	0	0	0	0,21	0	0	0,43	0,23	
Kontrolle 7	0,64	0	0,43	0,21	0,66	0,21	0,63	0,83	0,62	0,83	0	0,63	
Kontrolle 8	1,85	2,26	0,52	2,42	3,26	1,12	1,59	0,57	0	0,44	1,82	1,71	
Kontrolle 9	0	0,7	0,4	0,23	0,42	0,48	3,33	0,63	0,42	0,27	0,21	0	
Kontrolle 10	1,25	0,24	3,63	0,55	1,88	12,7	2,25	0,42	0,45	1,62	1,35	1,17	

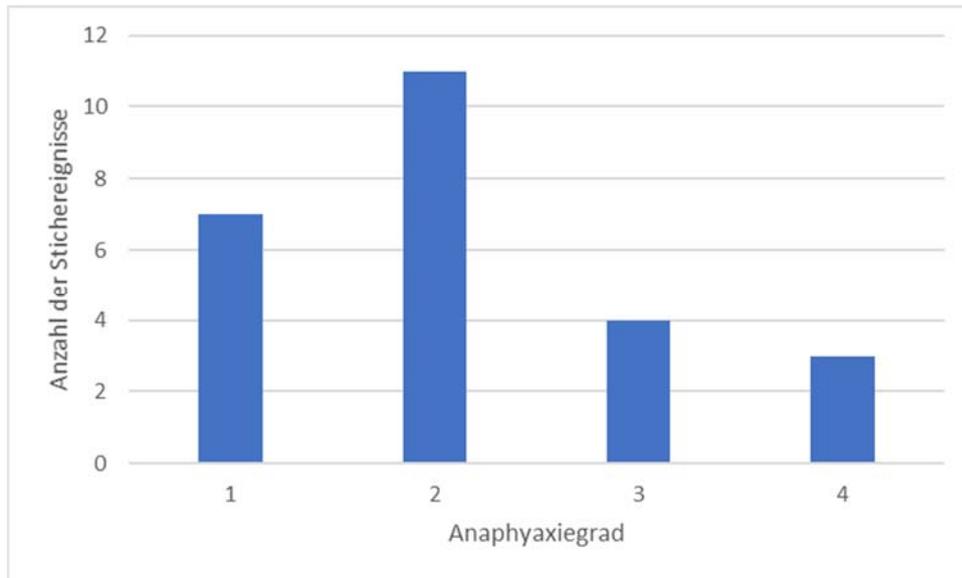
\*Legende zu Tabelle 11:

B	Biene
W	Wespe
Bro	MUXF-Glycan-Seitenkette von Bromelain
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
B 1-5	Bienengift in 5 unterschiedlichen Konzentrationen
W 1-5	Wespengift in 5 unterschiedlichen Konzentrationen
Bro 1-5	Bromelain in 5 unterschiedlichen Konzentrationen
HRP 1-5	HRP (Meerrettichperoxidase) in 5 unterschiedlichen Konzentrationen
Neg-Ko	Negativkontrolle
PB	Background (Negativkontrolle)
Anti-FcεRI	hochaffiner IgE-Rezeptor (Positivkontrolle)
fMLP	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (Positivkontrolle)
ND	not done (nicht durchgeführt)

### 3.1.1 Anamnese

Anamnestisch konnten bei 22 Patienten insgesamt 37 Stichereignisse erhoben werden. Bei 25 der 37 Stichereignisse lag eine Angabe zur Ausprägung der klinischen Symptomatik vor. Grad I sowie Grad II nach Ring und Messmer traten bei 7 Stichereignissen (Pat. Nr. 2, 11, 12, 14, 15/2, 17, 21) bzw. 11 Stichereignissen (Pat. Nr. 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 18, 20, 22/2) am häufigsten auf, Grad III und IV wurde 4 (Pat. Nr. 7, 15/1, 16/2, 19) bzw. 3 (Pat. Nr. 13, 16/1, 22/1) Fällen zugeordnet. Bei den übrigen 12 Stichereignissen existieren keine Angaben zum Anaphylaxiegrad (Abbildung 14).

## -Ergebnisse-



**Abbildung 14: Ausprägung des Anaphylaxiegrades nach Ring und Messmer**

Bei 18 der 22 Patienten (Pat. Nr. 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22) war eine Angabe zum stechenden Insekt bei mindestens einem Stichereignis möglich, 12-mal (Pat. Nr. 1, 2, 3, 4, 7, 12, 13, 15, 16, 20, 21, 22) wurde vom Vorkommen mindestens zweier Stiche berichtet. Von insgesamt 37 Stichereignissen bei 22 Patienten gelang neunmal keine Identifikation des stechenden Insekts (Pat. Nr. 2, 4, 5, 11, 14, 15 [2x], 17, 22). Wiederum neunmal stach eine Wespe (Pat. Nr. 1, 2, 8, 9, 16, 18, 19, 20 [2x]), 18-mal wurde eine Biene als Auslöser angeschuldigt (Pat. Nr. 1, 3 [2x], 4, 6, 7, [3x], 10, 12, [2x], 13 [3x], 15, 16, 21 [2x]) und einmal eine Hornisse (Pat. Nr. 22).

Im Einzelnen gaben 7 Patienten an, mindestens einmal von ausschließlich einer Biene gestochen worden zu sein (Pat. Nr. 3, 6, 7, 10, 12, 13, 21), 5 schuldigten nur eine Wespe an (Pat. Nr. 8, 9, 18, 19, 20). Bei 2 weiteren Patienten kam es anamnestisch zu einem Stichereignis mit beiden Insekten (Pat. Nr. 1, 16).

Keinerlei Unklarheiten in der Anamnese zeigten insgesamt 14 Patienten (Pat. Nr. 1, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 18, 19, 20, 21), weshalb sich die Berechnungen statistischer Angaben wie Sensitivität und Spezifität im Folgenden auf diese Patientengruppe beschränkt.

### **3.1.2 Hauttest**

Bei 19 der 22 Probanden wurde eine intrakutane Testung durchgeführt. Diese zeigte in 15 Fällen ein doppelpositives Ergebnis (Pat. Nr. 1, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 21, 22), bei

## -Ergebnisse-

jeweils zwei Patienten war eine Reaktion nur bei Bienen- (Pat. Nr. 3, 7) bzw. Wespengift (Pat. Nr. 5, 19) nachweisbar (Abbildung 15).

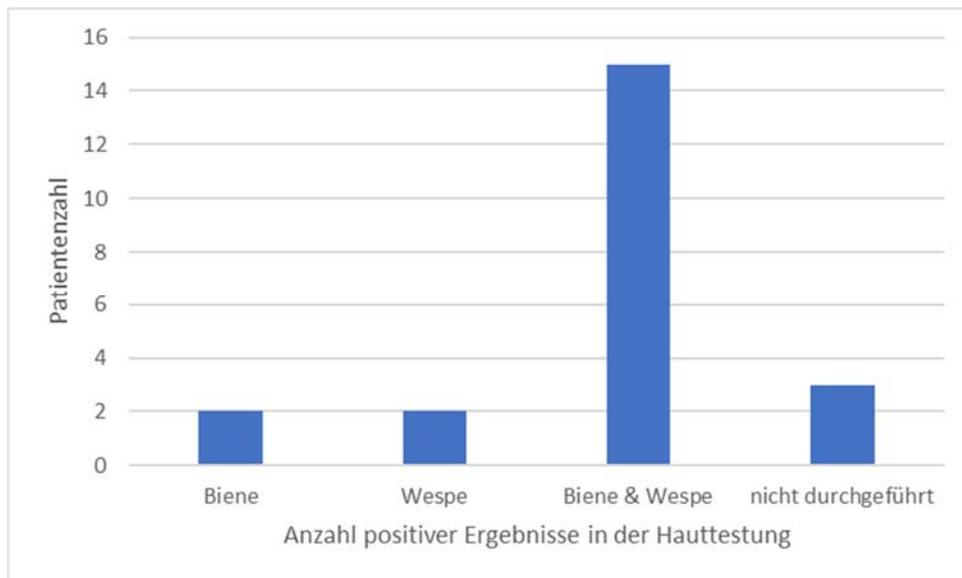


Abbildung 15: Anzahl positiver Ergebnisse in der Hauttestung

### 3.1.3 sIgE auf Bienen- und Wespengift

Bei allen 22 Patienten erfolgte vor Einschluss in vorliegende Studie die Bestimmung der sIgE auf Bienen- und Wespengift mittels des Immuno-CAP-Systems. Eine Einteilung erfolgte je nach Konzentration im Serum in Klasse 0 bis 6 (vgl. Tabelle 6 in „Material und Methoden“).

Bezüglich des Bienengifts wurden 3 Patienten Klasse 1, 2 Patienten Klasse 2, 11 Patienten Klasse 3, 3 Patienten Klasse 4 und weitere 3 Patienten Klasse 5 zugeordnet (Abbildung 16).

Die sIgE-Konzentration des Wespengifts entsprach bei 3 Patienten der Klasse 1, bei 5 Patienten der Klasse 2, bei 11 Patienten der Klasse 3 und bei 3 Patienten der Klasse 4 (Abbildung 17).

## -Ergebnisse-

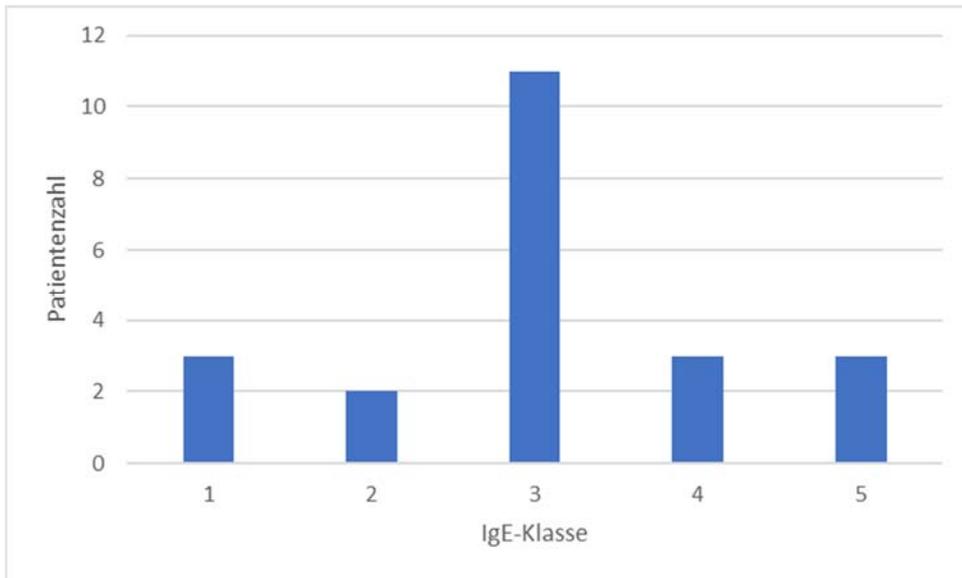


Abbildung 16: Übersicht sIgE-Klassen auf Bienengift

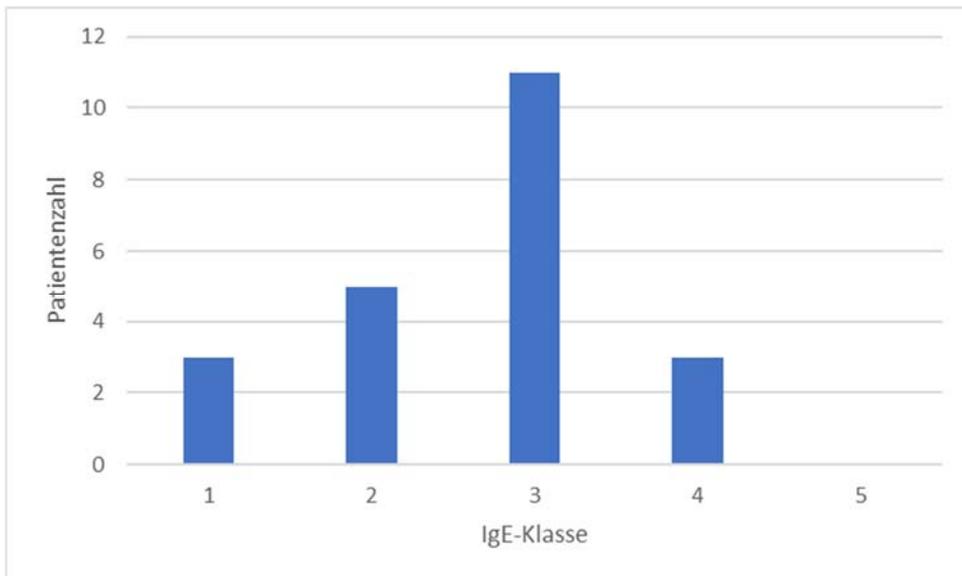


Abbildung 17: Übersicht sIgE-Klassen auf Wespengift

### 3.1.4 sIgE auf rekombinante Allergene

Insgesamt wiesen 21 Patienten sIgE auf mindestens ein rekombinantes Allergen rApi m 1 und/oder rVes v 5 auf, in 15 Fällen hiervon auf rApi m 1 (Pat. Nr. 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 21, 22), in 18 Fällen auf rVes v 5 (Pat. Nr. 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22).

## -Ergebnisse-

In 9 der 22 Fälle lag eine Monopositivität vor, bei 3 Patienten waren sIgE-Antikörper auf rApi m 1 nachzuweisen (Pat. Nr. 7, 13, 15), auf rVes v 5 waren es 6 Patienten (Pat. Nr. 5, 11, 14, 18, 19, 20). Bei 12 weiteren bestand eine Doppelpositivität auf rApi m 1 und rVes v 5 (Pat. Nr. 1, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 16, 17, 21, 22), bei einem Patienten fand sich hingegen kein sIgE auf ein rekombinantes Allergen (Pat. Nr. 2).

In Bezugnahme auf die erhobene Anamnese hinsichtlich des Verdachts auf eine Bienen- und Wespengiftallergie ergibt sich hieraus eine Sensitivität von 50%.

Die Kontrollen zeigten bezüglich der Bestimmung des sIgEs auf rApi m 1 und rVes v 5 allesamt negative Ergebnisse, die Spezifität dieser Methode ist somit mit 100% zu beziffern.

Bei 10 Patienten fand die Bestimmung von sIgE auf weitere rekombinante Allergene mittels ELISA statt (Pat. Nr. 2, 5, 7, 11, 13, 14, 15, 18, 19, 20). Hiermit ließ sich weiterhin sIgE auf rApi m 1 (Pat. Nr. 2), rApi m 2 (Pat. Nr. 2, 5, 11, 19), rApi m 3 (Pat. Nr. 2, 11, 14, 19), rApi m 5 (Pat. Nr. 2), rApi m 10 (Pat. Nr. 5, 18, 20) sowie rVes v 1 (Pat. Nr. 2, 5, 13, 15), rVes v 2 (Pat. Nr. 15) und rVes v 3 (Pat. Nr. 15) nachweisen.

Ein negatives Ergebnis für rVes v 1, rVes v 2, rVes v 3 und rVes v 5 im ELISA zeigte sich bei Patient Nr. 7.

Des Weiteren gelang mittels dieser Methode bei Patient Nummer 2 der Nachweis von sIgE auf rekombinante Allergene sowohl des Bienen- (rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3, rApi m 5) als auch des Wespengifts (rVes v 1), die Bestimmung sIgEs für rApi m 1 sowie rVes v 5 fiel hingegen negativ aus.

### **3.1.5 Basophilenaktivierungstest mit Bienen- und Wespengift**

#### **3.1.5.1 Auswertung mittels Cut-off von $\geq 15\%$**

Ausgehend von einem in der Routinediagnostik angewandten Cut-off von  $\geq 15\%$  wiesen 20 der 22 Patienten (Pat. Nr. 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22) eine Positivität für Bienengift und 19 Patienten (Pat. Nr. 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22) eine Positivität für Wespengift im BAT auf.

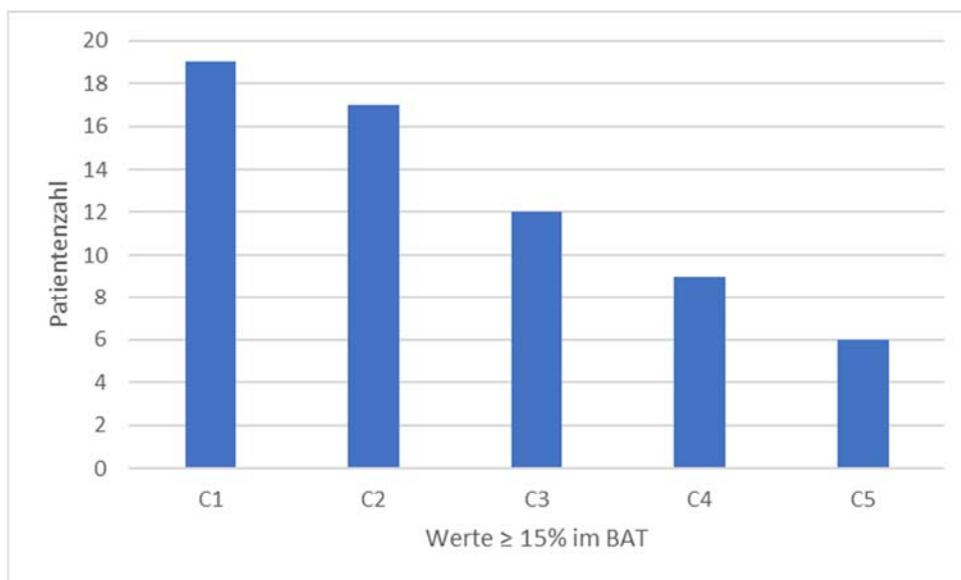
Insgesamt fanden sich bei 19 Patienten Werte  $\geq 15\%$  in der höchsten Konzentration (C1) des Bienengifts (Pat. Nr. 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22), 17 bei Konzentration 2 (Pat. Nr. 2, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22), 12 bei Konzentration 3 (Pat. Nr. 2, 5, 6, 7, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 21, 22), 9 bei Konzentration 4 (Pat. Nr.

## -Ergebnisse-

2, 6, 7, 9, 13, 15, 16, 17, 21) und 6 bei Konzentration 5 (Pat. Nr. 7, 9, 13, 15, 16, 21; Abbildung 18).

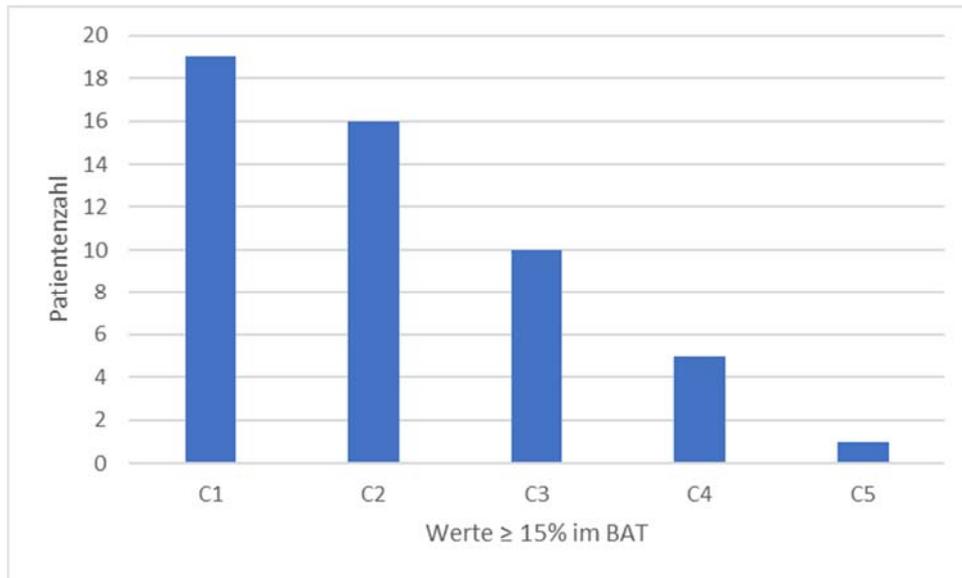
Beim BAT mit Wespengift zeigte sich ein ähnlicher Rückgang der Patientenzahl mit Werten  $\geq 15\%$  bei sinkender Konzentration. So zeigte der BAT bei 19 Patienten Positivität bezogen auf einen Cut-off von  $\geq 15\%$  bei Konzentration 1 (Pat. Nr. 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22), bei 16 bei Konzentration 2 (Pat. Nr. 2, 4, 6, 7, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22), bei 10 bei Konzentration 3 (Pat. Nr. 9, 11, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22), bei 5 bei Konzentration 4 (Pat. Nr. 7, 9, 14, 17, 20) und bei einem Patienten bei Konzentration 5 (Pat. Nr. 9; Abbildung 19).

In Annahme eines Cut-offs von  $\geq 15\%$  bedeutete dies eine Doppelpositivität in 18 Fällen (Pat. Nr. 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22) für Bienen- und Wespengift im BAT mit fünf unterschiedlichen Giftkonzentrationen.



**Abbildung 18: Anzahl der Patienten mit positivem Testergebnis im BAT auf die verschiedenen Konzentrationen von Bienengift (C1-C5)**

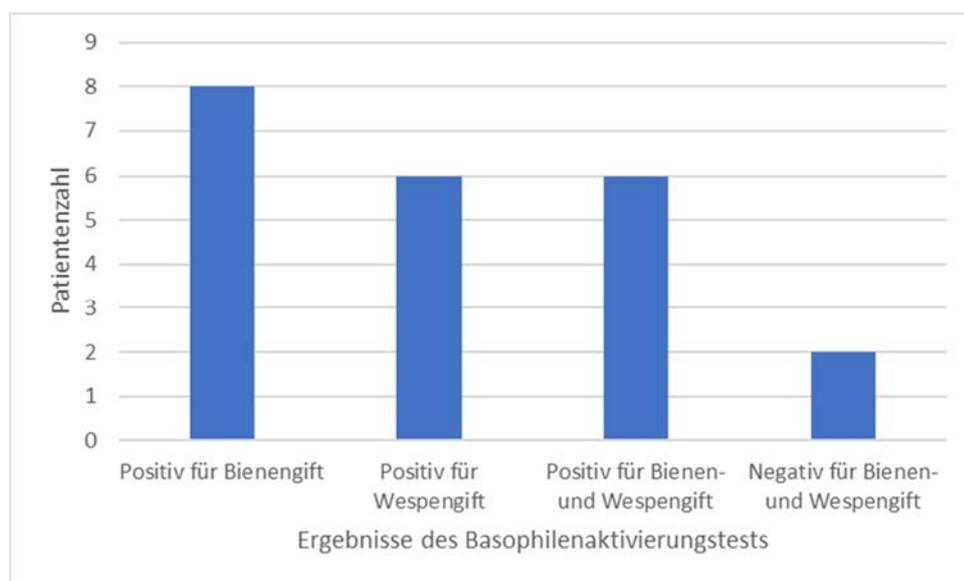
## -Ergebnisse-



**Abbildung 19: Anzahl der Patienten mit positivem Testergebnis im BAT auf die verschiedenen Konzentrationen von Wespengift (C1-C5)**

### 3.1.5.2 BAT und Auswertung mittels halbmaximaler Konzentration

Zur Unterscheidung von klinisch relevanter und klinisch irrelevanter Doppelpositivität verglichen wir in unserer Studie die unter 3.1.6.1 beschriebenen Ergebnisse mit denen nach Bestimmung der halbmaximalen Konzentration und Berechnung der Ratio im Basophilenaktivierungstest. Unter Anwendung der hierfür festgesetzten Kriterien zeigte dieser in 6 Fällen ein doppelpositives Ergebnis für Bienen- und Wespengift (Pat. Nr. 8, 10, 16, 17, 21, 22). In 6 weiteren Fällen waren Probanden nur auf Wespengift positiv (Pat. Nr. 4, 11, 14, 18, 19, 20), in 8 weiteren ausschließlich auf Bienengift (Pat. Nr. 2, 5, 6, 7, 9, 12, 13, 15). Bei 2 Patienten zeigte der BAT trotz positiven sIgEs ein doppelt negatives Ergebnis (Pat. Nr. 1, 3; Abbildung 20).



**Abbildung 20: Ergebnisse des Basophilenaktivierungstests nach Bestimmung der halbmaximalen Konzentration und Berechnung der Ratio C50 Bienengift/C50 Wespengift**

## 3.2 Konkordante und diskordante Ergebnisse

### 3.2.1 Anamnese und Basophilenaktivierungstest

In 12 Fällen stimmten Anamnese und Ergebnis der Ratio des Basophilenaktivierungstests überein (Pat. Nr. 6, 7, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 21), wobei sich 8-mal Bienengift (Pat. Nr. 6, 7, 10, 12, 13, 15, 16, 21) und 5-mal Wespengift (Pat. Nr. 8, 16, 18, 19, 20) im BAT mit der Anamnese konkordant waren. Die Patienten Nr. 8, 10, 16 und 21 waren in der Flowzytometrie doppelpositiv für beide Gifte, anamnestisch war in 3 Fällen bisher nur ein Insekt angeschuldigt worden (Pat. Nr. 8, 10, 21). Zwei Patienten mit Doppelpositivität im BAT (Pat. Nr. 17, 22) konnten bezüglich der Art des stechenden Insekts keine Angabe machen bzw. Patient Nr. 22, berichtete bei einem der beiden Stiche von einer Hornisse gestochen worden zu sein.

Im Einzelnen betrachtet ergab sich bezüglich einer eindeutigen Anamnese von 14 Patienten (Pat. Nr. 1, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 18, 19, 20, 21) für Bienen-/Wespengift im BAT eine Sensitivität von 57,1% (8/14). Dies bedeutete, dass in 57,1% der Bienen-/Wespengiftallergiker ein solcher im BAT identifiziert wird.

Eine Kontrollperson (Kontrolle Nr. 7) wies im BAT ein positives Ergebnis für Wespengift (C1: 34,39%) auf, die Spezifität ist folglich mit 90% anzugeben. Die Wahrscheinlichkeit, den Nicht-Bienen-/Wespengiftallergiker als solchen zu erkennen, lag somit bei 90%.

### **3.2.2 Hauttest und Basophilenaktivierungstest**

Bei 6 der 15 im Hauttest doppelpositiven Fälle zeigte sich auch im Basophilenaktivierungstest ein doppelpositives Ergebnis (Pat. Nr. 8, 10, 16, 17, 21, 22), in 8 Fällen war er nur für ein Hymenopterengift positiv (Biene Pat. Nr. 6, 9, 13, 15; Wespe Pat. Nr. 4, 11, 14, 20), in einem Fall für beide negativ (Pat. Nr. 1).

Bei einer der im Hauttest für Bienengift positiv getesteten Personen war der BAT sowohl für Bienen- als auch für Wespengift negativ (Pat. Nr. 3), in einem anderen Fall stimmte das positive Ergebnis für Bienengift im Hauttest mit einem positiven Ergebnis für Bienengift im BAT überein (Pat. Nr. 7).

Die im Hauttest nur für Wespengift positiv getesteten Patienten zeigten in einem Fall eine Übereinstimmung mit den Werten des BAT (Pat. Nr. 19), in einem anderen Fall war das Ergebnis im BAT diskordant und zeigte eine Sensibilisierung für Bienengift (Pat. Nr. 5).

Bei 3 Patienten (Pat. Nr. 2, 12, 18) erfolgte aus diversen Gründen (Synkope, Medikation) keine Intrakutantestung, ein weiterreichender Vergleich ist in diesen Fällen somit nicht möglich.

In der Gruppe der Kontrollpersonen wurde eine intrakutane Hauttestung aus ethischen Gründen unterlassen.

### **3.2.3 sIgE auf rekombinante Allergene im Vergleich zum BAT**

Alle 6 im Basophilenaktivierungstest nach Berechnung der Ratio doppelt positiven Patienten wiesen sIgE sowohl für rApi m 1 und rVes v 5 auf (Pat. Nr. 8, 10, 16, 17, 21, 22). In 8 Fällen, davon 3 mit Bienengiftallergie (Pat. Nr. 7, 13, 15) und 5 mit Wespengiftallergie (Pat. Nr. 11, 14, 18, 19, 20), fand sich eine mit dem Basophilenaktivierungstest konkordante Monopositivität für entweder rApi m 1 oder rVes v 5, in einem Fall waren die jeweiligen Ergebnisse diskordant (Pat. Nr. 5). Bei Patient Nr. 5 gelang der Nachweis von sIgE für rVes v 5, das Resultat nach flowzytometrischer Auswertung hingegen war positiv auf Bienengift.

## -Ergebnisse-

In 4 von 12 Fällen mit doppelpositiven rekombinanten Allergenen war der BAT nur für jeweils ein Gift positiv (Bienen Gift n=3 (Pat. Nr. 6, 9, 12), Wespengift n=1 (Pat. Nr. 4)), in 2 weiteren negativ (Pat. Nr. 1, 3).

Ein BAT zeigte bei negativem rApi m 1 und rVes v 5 ein positives Ergebnis für Bienen Gift, anamnestisch wurde eine Wespe angeschuldigt (Pat. Nr. 2).

Bei 10 der 22 Patienten (Pat. Nr. 2, 5, 7, 11, 13, 14, 15, 18, 19, 20) waren ergänzend sIgE auf Allergene des Bienen- und Wespengifts mittels ELISA bestimmt worden. Dieser Test detektierte diese Allergenermittlung bei Patient Nr. 2 das Vorhandensein sIgE auf die rekombinanten Allergene rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3, rApi m 5 und rVes v 1 bei Vorliegen einer Monopositivität von Bienen Gift im BAT.

In einem weiteren Fall bestätigte das Ergebnis des ELISA mit dem konkordanten Vorliegen sIgE auf rekombinante Allergene der jeweiligen Giftsorte die Ergebnisse des BAT. Hier zeigte die Bestimmung sIgEs auf rApi m 1 bei Patient Nr. 5 ein negatives Ergebnis, es ließen sich mittels der zusätzlichen Methode sIgE auf rApi m 2 und rApi m 10, beides Allergene des Bienen Gift, nachweisen. Damit standen diese Ergebnisse mit dem für Bienen Gift positiven BAT in Einklang. Bei Patient Nr. 7 unterstützte der fehlende Nachweis sIgEs auf weitere rekombinante Allergene des Wespengifts (rVes v 1, rVes v 2, rVes v 3, rVes v 5) das negative Ergebnis für sIgE auf rVes v 5 und somit das positive Ergebnis für eine Bienen Giftallergie im BAT.

Unterschiedliche Ergebnisse im Vorhandensein zusätzlicher mittels ELISA detektiertem sIgE auf rekombinante Allergene und dem Ergebnis des BAT waren bei den 7 übrigen Patienten (Pat. Nr. 11, 13, 14, 15, 18, 19, 20) zu beobachten. In zwei Fällen, in denen der BAT ein positives Resultat für Bienen Gift zeigte, erwies sich der Nachweis sIgE auf weitere rekombinante Allergene des Wespengifts bei Patient Nr. 13 (rVes v 1) und Patient Nr. 15 (rVes v 1, rVes v 2, rVes v 3) als positiv. Der BAT war bei Patient Nr. 11, 14, 18, 19 und 20 positiv für Wespengift, mittels ELISA ließen sich allerdings sIgE auf rekombinante Allergene des Bienen Gift nachweisen (Pat. Nr. 11: rApi m 2, rApi m 3; Pat. Nr. 14: rApi m 3; Pat. Nr. 18: rApi m 10; Pat. Nr. 19: rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3; Pat. Nr. 20: rApi m 10).

### **3.3 Kohlenhydratseitenketten**

#### **3.3.1 Spezifisches IgE auf CCDs (MUX F3 von Bromelain und Meerrettichperoxidase (HRP))**

Insgesamt waren bei 10 von 22 Patienten sIgE auf Bromelain (Pat. Nr. 1, 3, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 19) und bei 12 Patienten sIgE auf Meerrettichperoxidase (Pat. Nr. 1, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 19, 22) nachweisbar. Davon waren 10 auf beide Allergene positiv (Pat. Nr. 1, 3, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 19) und 2 für Meerrettichperoxidase monopositiv (Pat. Nr. 6 und 22). In 10 Fällen war sIgE weder für MUX F3 von Bromelain noch für HRP zu detektieren (Pat. Nr. 2, 4, 5, 11, 14, 15, 17, 18, 20, 21).

#### **3.3.2 Basophilenaktivierungstest mit Bromelain und Meerrettichperoxidase**

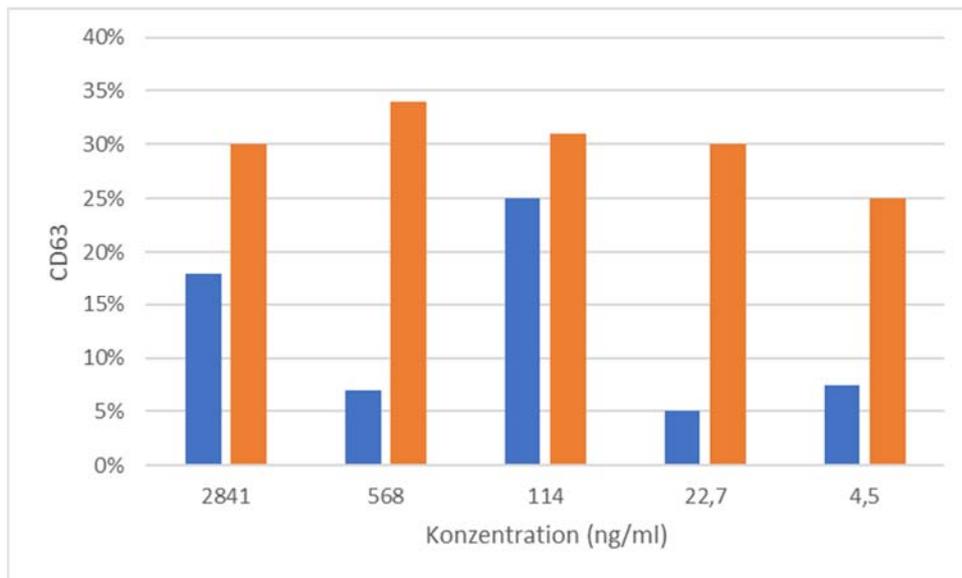
Anhand der ROC-Kurven wurde von Dr. M. Schneider, Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz, ein Cut-off von 4% für Bromelain ermittelt. Dies bedeutet, dass Werte  $\geq$  4% mit einer Sensitivität von 50% und einer Spezifität von 91% als positiv zu werten sind. Der für die Meerrettichperoxidase ermittelte Cut-off-Wert betrug 7% bei einer Sensitivität von 82% und einer Spezifität von 90% (bezogen auf die Ergebnisse bei Bestimmung des sIgE).

Doppelpositiv für Bromelain und Meerrettichperoxidase zeigte sich der Basophilenaktivierungstest gemäß oben erwähnter Positivkriterien in 9 Fällen (Nr. 1, 5, 7, 9, 16, 19, 20, 21, 22), in 6 weiteren lag ausschließlich eine Positivität für Meerrettichperoxidase vor (Pat. Nr. 3, 6, 10, 12, 13, 18).

Hierbei zeigte sich für Bromelain die ausgeprägteste CD63-Aktivierung (Mittelwerte) bei einer Konzentration von 2841 ng/ml (C1), gefolgt von 568 ng/ml (C2), 4,5 ng/ml (C5), 22,7 ng/ml (C4) und 114 ng/ml (C3). Bei der Meerrettichperoxidase (HRP) hingegen erfolgte im Durchschnitt die ausgeprägteste Basophilenaktivierung bei 568 ng/ml (C2), gefolgt von 114 ng/ml (C3), 22,7 ng/ml (C4), 2841 ng/ml (C1) und 4,5 ng/ml (C5; Abbildung 22).

Insgesamt zeichnete sich in allen Konzentrationen eine signifikant höhere Basophilenaktivierung durch die Meerrettichperoxidase als durch Bromelain ab (\*P < 0,05).

## -Ergebnisse-



**Abbildung 21: BAT mit unterschiedlichen Konzentrationen von Bromelain und HRP (Mittelwerte aller Patienten)**

### 3.3.3 Vergleich CAP und BAT

Bei insgesamt 16 der 22 Patienten zeigte die Bestimmung von CCDs in mindestens einem der durchgeführten Tests, CAP und/oder BAT, für Bromelain und/oder Meerrettichperoxidase ein positives Ergebnis (Pat. Nr. 1, 3, 5,6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 18, 19, 20, 21, 22).

Die übrigen 6 Patienten zeigten im Umkehrschluss sowohl im CAP, als auch im Basophilenaktivierungstest negative Ergebnisse für CCDs (Pat. Nr. 2, 4, 11, 14, 15, 17).

Von den 9 im BAT doppelpositiven Ergebnissen für Bromelain und HRP (Pat. Nr. 1, 5, 7, 9, 16, 19, 20, 21, 22) zeigten 5 ebenso doppelpositive sIgE-Werte (Pat. Nr. 1, 7, 9, 16, 19), während 3 Patienten negatives sIgE sowohl für Bromelain als auch für Meerrettichperoxidase aufwiesen (Pat. Nr. 5, 20, 21).

Ein Patient mit doppelpositivem BAT für CCDs zeigte sIgE ausschließlich für HRP (Pat. Nr. 22).

Ein weiterer Patient erbrachte im Basophilenaktivierungstest negative Ergebnisse sowohl für Bromelain als auch für HRP, die entsprechenden sIgEs hingegen waren positiv (Pat. Nr. 8).

Das Ergebnis des Basophilenaktivierungstests im Vergleich zum Ergebnis im CAP war für die Meerrettichperoxidase in 17 Fällen konkordant (in 11 Fällen positiv [Pat. Nr. 1, 3, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 16, 19, 22], in 6 Fällen negativ [Pat. Nr. 2, 4, 11, 14, 15, 17]).

## -Ergebnisse-

Im Falle des Bromelains stimmten die Ergebnisse von BAT und CAP nur bei 13 Probanden überein (in 5 Fällen positiv konkordante Ergebnisse [Pat. Nr. 1, 7, 9, 16, 19], in 8 Fällen negativ konkordante Ergebnisse [Pat. Nr. 2, 4, 6, 11, 14, 15, 17, 18]), in den restlichen 9 Fällen traten diskordante Ergebnisse auf (Pat. Nr. 3, 5, 8, 10, 12, 13, 20, 21, 22).

Alle 10 Kontrollen zeigten in der Bestimmung der sIgE für Bromelain und Meerrettichperoxidase negative Werte. Der bei 9/10 Kontrollen durchgeführte BAT mit CCDs zeigte bei Kontrolle Nr. 4 und bei Kontrolle Nr. 10 mit 4,52% (Kontrolle Nr. 4) bzw. 12,7% (Kontrolle Nr. 10) jeweils für Bromelain in der Konzentration 22,7 ng/ml schwach positive Werte.

Im Vergleich beider Testmethoden zur Detektion von CCDs, CAP und BAT, erhielten wir einen  $\kappa$ -Wert von  $\kappa.64$  für die Meerrettichperoxidase (HRP) als Maß guter Übereinstimmung der Testverfahren. Der  $\kappa$ -Wert für Bromelain fiel mit  $\kappa.45$  niedriger aus und zeigt somit, dass sich die Ergebnisse der Bestimmung von Bromelain je nach Testverfahren bei diesem Parameter häufiger unterscheiden.

Während alle 12 Patienten mit positivem sIgE für Bromelain und/oder HRP (Pat. Nr. 1, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 19, 22) auch sIgE für rApi m 1 und/oder rVes v 5 aufzeigten (Pat. Nr. 7 und 13: nur positiv für rApi m 1; Pat. Nr. 19: nur positiv für rVes v 5), waren diese rekombinanten Allergene in den 3 Fällen mit ergänzend durchgeführtem ELISA nicht nachweisbar. So bestätigte der ELISA bei Patient Nr. 7 zwar die Abwesenheit von rVes v 5 und stand somit im Einklang mit dem negativen Ergebnis des sIgEs für rVes v 5. Allerdings gelang bei Patient Nr. 13 der zusätzliche Nachweis von rVes v 1 und bei Patient Nr. 19 von rApi m 1, rApi m 2 sowie rApi m 3.

Bei 4 weiteren Patienten zeigte der BAT positive Ergebnisse für CCDs, das sIgE auf CCDs war dagegen negativ (Pat. Nr. 5, 18, 20, 21). In 3 dieser Fälle erbrachte der ELISA den Nachweis Bienengiftspezifischer rekombinanter Allergene bei negativem sIgE auf rApi m 1, sIgE auf rVes v 5 war hingegen bei allen 3 Patienten nachweisbar (Pat. Nr. 5, 18, 20). Patient Nr. 21 war positiv bei der Bestimmung der sIgE auf beide rekombinanten Allergene, ein ELISA wurde in diesem Fall nicht durchgeführt.

## 4 Diskussion

Jedes Jahr sterben laut statistischem Bundesamt in Deutschland immer noch geschätzt 20 Menschen durch den Kontakt mit Wespen, Bienen oder Hornissen (133).

Diese Zahl und die Mannigfaltigkeit potenzieller Symptome nach Hymenopterenstichen, von einer Lokalreaktion mit Rötung und Schwellung über Rhinitis und Larynxödem bis hin zum generellen Kreislaufversagen sowie die besondere Gefahr im Falle eines wiederholten Stichereignisses, machen in allergologischen Kliniken und Praxen die Durchführung einer akkuraten und suffizienten Diagnostik sowie eventueller Therapie in Form einer spezifischen Immuntherapie erforderlich (123, 133).

Das leitliniengerechte diagnostische Vorgehen stützt sich hierbei an erster Stelle auf die Anamnese, welche neben den aufgetretenen Symptomen, der Stichsituation und der Identifikation des Insekts auch eine individuelle Risikoeinschätzung für ein erneutes Stichereignis umfasst. Weiterhin ergänzt wird die Anamnese durch die Bestimmung des sIgE auf Insektengifte sowie einen Hauttest, im Optimalfall durchgeführt jeweils in der ersten Woche sowie erneut vier bis sechs Wochen nach dem Stichereignis (133).

Eine Doppelsensibilisierung für Bienen- und Wespengift stellt hierbei für den Behandelnden meist eine Herausforderung im Hinblick auf die richtige Interpretation und Indikationsstellung für die spezifische Immuntherapie dar (173, 174, 179).

Auch in unserer Studie standen Patienten mit einer Doppelpositivität von sIgE auf Bienen- und Wespengift, geknüpft an die Frage nach der Wahl des adäquaten Gifts für die spezifische Immuntherapie, im Mittelpunkt.

Zusätzlich zum diagnostischen Goldstandard (Anamnese, Hauttest, sIgE) bestimmten wir sIgE für rApi m 1 und rVes v 5, zwei kommerziell erhältliche rekombinante Allergene, und führten den BAT mit jeweils fünf Giftkonzentrationen durch. Außerdem erfolgte bei 10/22 Patienten die experimentelle Bestimmung von sIgE weiterer in Bienen- und Wespengift enthaltener rekombinanter Allergene mittels ELISA.

Des Weiteren untersuchten wir die Aktivierung Basophiler auf kreuzreagierende Kohlenhydratketten mittels BAT und im Serum sIgE auf MUX F3 aus Bromelain sowie auf die Meerrettichperoxidase (HRP).

Aus den Ergebnissen des Flow2 CAST® leiteten wir eine klinisch relevante Doppelpositivität für Bienen- und Wespengift in sechs von 22 Fällen ab (Pat. Nr. 8, 10, 16, 17, 21, 22), in welchen zu einer spezifischen Immuntherapie mit beiden Giften anzuraten war.

Vor allem zum Schutze des Patienten, aber auch zur Einsparung von Kosten ist es von großer Bedeutung, klinisch relevante doppelpositive Patienten anhand akkurater Befundung von Patienten mit klinisch irrelevanter Doppelpositivität zu unterscheiden.

#### **4.1 Doppelsensibilisierung**

Laut Literatur weisen ca. 20% bis 40,7% der Gesamtbevölkerung In-vitro-sIgE auf ein Hymenoptergift auf, wobei ein Anstieg in den ersten Wochen nach einem Stichereignis zu beobachten ist (59, 156, 181).

Eine mögliche Erklärung hierfür liefern Schäfer und Przybilla, die, veranlasst durch diese hohen Zahlen, 1996 eine Feldstudie in einem bayerischen Dorf durchführten, welche sie zur Hypothese veranlasste, eine Atopie-assoziierte Überreaktion des humoralen Immunsystems trage Schuld am häufigen Vorkommen sIgEs auf Hymenoptergifte in der Bevölkerung (156).

Ähnlich belegten Sturm et al. in einer Studie einen Zusammenhang zwischen einer asymptomatischen Sensibilisierung und dem Gesamt-IgE. Bei 66,7% eines gesunden Patientenlientels gelang der Nachweis von Hymenoptergift-IgE bei Vorliegen eines hohen Gesamt-IgE (181).

Derselbe Autor berichtete vom Vorkommen einer Doppelpositivität im CAP in 61,5% und 17,1% im BAT, die klinische Relevanz diesbezüglich wird aber infrage gestellt und vor einer Übertherapie sowie der Gefahr einer De-novo-Sensibilisierung bei diesen Patienten gewarnt (179). Seismann et al. sowie Hemmer sahen das Vorhandensein einer Doppelpositivität in 70-80% in einer Kreuzreaktivität einzelner Kohlenhydratketten ohne klinische Relevanz begründet (64, 122, 164).

Mögliche Gründe für das Vorhandensein sIgEs sowohl auf Bienen- als auch auf Wespengift waren in der Vergangenheit immer wieder Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion.

Diskutiert werden hierbei im Wesentlichen drei mögliche Ursachen:

Einigkeit besteht darin, dass dem Vorhandensein einer Doppelsensitivität bei Bestimmung sIgEs auf Bienen- und Wespengift in 70-80% kreuzreagierende Kohlenhydratketten, die sogenannten CCDs, zugrunde liegen (122). Diese auf Glykoproteinen des Insektengifts vorkommenden

Strukturen sind für die Bildung von Antikörpern mit vernachlässigbarer biologischer Aktivität verantwortlich (39, 69). Auch Hemmer et al. und Erzen et al. sahen das Auftreten positiver Routinetests bei Insektengiftallergikern vor allem im Vorhandensein kreuzreagierender Kohlenhydratepitope, den CCDs, begründet (47, 65).

Als weitere Ursachen für doppelpositive sIgE-Werte werden zum einen eine echte Sensibilisierung auf beide Gifte, zum anderen Sequenzhomologien von Einzelallergenen im Bienen- und Wespengift, beispielsweise der Hyaluronidase, angenommen (69).

Uneinigkeit besteht hingegen in der Vorgehensweise, klinisch relevante doppelpositive Patienten aus dem Pool der klinisch nicht relevanten doppelpositiven (sIgE für beide Gifte aufgrund kreuzreagierender Kohlenhydratketten oder Sequenzhomologien einzelner Enzyme und somit vernachlässigbarer klinischer Relevanz) herauszufiltern.

Ebo et al. wählten in einer 2004 veröffentlichten Studie über das Auftreten von CCDs als Ursache doppelpositiver sIgE-Werte bei Insektengiftallergikern Bromelain als Vertreter kreuzreagierender Kohlenhydratepitope, gaben aber die große Bandbreite an CCDs zu bedenken (39).

#### **4.1.1 Problematik für Arzt und Patient**

Das häufig beobachtete Auftreten spezifischer IgE sowohl auf Bienen- als auch auf Wespengift, im CAP bis zu 59% stellt den Allergologen vor die Herausforderung, das adäquate Gift zur Durchführung der spezifischen Immuntherapie auszuwählen (113, 174), da Systemreaktionen nur in 0,3% bis 7,5% auftreten. 2,4% bis 26,4% der von Hymenopteren Gestochenen berichteten von einer ausgeprägten Lokalreaktion, die allerdings nur in sehr ausgeprägten Fällen eine Indikation zur spezifischen Immuntherapie darstellt (12).

Die generelle Annahme einer klinisch relevanten Doppelpositivität würde zu einer Minderung der Lebensqualität führen, indem den Patienten Vermeidungsverhalten auferlegt oder sie gar einer unangebrachten spezifischen Immuntherapie inklusive aller potenzieller Risiken unterzogen würden (39).

So liegt es in der Verantwortung des Klinikers, klinisch relevante von klinisch irrelevanter Positivität abzugrenzen und letztlich im Zweifelsfall eine potenziell lebensrettende spezifische Immuntherapie mit beiden Hymenoptergiften durchzuführen.

Die zur Verfügung stehenden Diagnostikverfahren werden im folgenden Abschnitt näher auf ihre Wertigkeit untersucht.

## 4.2 Aspekte der Insektengiftallergiediagnostik

Allergische Reaktionen nach Bienen- und Wespenstichen sind in Mitteleuropa mit bis zu 7,5% in Form einer systemischen und bis zu 26,4% in Form einer lokalen Reaktion relativ häufig und können potenziell zum Tode führen (12). Kam es einmal zum Auftreten einer systemischen Reaktion, erhöht sich das Risiko erneut, eine solche zu erleiden mit zunehmender Schwere der vorangegangenen Symptomatik und mit steigendem Alter (59). Allerdings wird die Gefahr einer schweren systemischen Reaktion bei erneutem Sticheignis nach einer ausgeprägten Lokalreaktion in der Literatur nur mit unter 5% beziffert (107).

Die spezifische Immuntherapie gilt als die kausale Therapieform mit guten Erfolgsraten. Eine 2013 von der „European Academy of Allergy and Clinical Immunology Interest Group“ (EACCI) unter der Leitung von Ruëff et al. hierzu durchgeführte Studie an 335 Insektengiftallergikern ergab ein Therapieversagen in nur 6,2% bis 7,0% der Fälle. Weshalb hierbei der Anteil der Bienengiftallergiker etwas höher ist, lässt sich möglicherweise anhand der bei der Immuntherapie applizierten Giftdosis erklären. Werden bei einem Bienenstich etwa 50 bis 100 µg Gift übertragen, sind es bei einem Wespenstich nur ca. 3 bis 5 µg. Die in der Erhaltungsphase eingesetzte Giftdosis ist jedoch in beiden Fällen gleich, folglich erhalten Wespengiftallergiker verhältnismäßig mehr Gift und profitieren möglicherweise so von einem besseren Schutz (148).

Die spezifische Immuntherapie bei gefährdeten Patienten im Anschluss an eine adäquate Diagnostik unter Berücksichtigung von Kontraindikationen durchzuführen, ist also indiziert (Tabelle 5; 127, 148).

Routinemäßig stehen hierfür die Anamnese, der Hauttest sowie die allergenspezifische IgE-Bestimmung zur Verfügung. Definiert als Goldstandard der Insektengiftallergie-Diagnostik, gibt es jedoch auch bei diesen etablierten Methoden einige Unsicherheitsfaktoren und so sollten sie sich in der Praxis gegenseitig ergänzen (133, 144).

### 4.2.1 Anamnese

Bei der Anamnese wird ein meist subjektives Symptomempfinden abgefragt, da objektivierbare Symptome eher selten von ärztlicher Seite im Rahmen der Stichumstände dokumentiert werden. Auch die exakte Benennung des stechenden Insekts gelingt in einigen Fällen nicht. Dies belegt eine von Baker et al. durchgeführte Studie, der zufolge zwar immerhin 91,3% der Probanden eine Biene, dagegen aber gerade einmal 72,3% eine Wespe korrekt identifizierten (6).

In einer von Müller et al. 2012 veröffentlichten Studie war ein Drittel der 121 befragten Patienten nicht in der Lage, das stechende Insekt zu identifizieren oder hatten es nicht gesehen (108).

In unserer Studie wurden bei 22 Patienten insgesamt 37 Stichereignisse anamnestisch angegeben, wobei in 9 Fällen (24% der Fälle) keine Identifikation des Insekts gelang (Pat. Nr. 2, 4, 5, 11, 14, 15 [2 x], 17, 22). In 9 weiteren Fällen (24%) wurde eine Wespe (Pat. Nr. 1, 2, 8, 9, 16, 18, 19, 20 [2 x]), in 18 eine Biene (66 %) (Pat. Nr. 1, 3 [2 x], 4, 6, 7 [3 x], 10, 12 [2 x], 13 [3 x], 15, 16, 21 [2 x]) und in einem eine Hornisse (3 %; Pat. Nr. 22) angeschuldigt.

Die Anamnese ist folglich immer mit einem gewissen Unsicherheitsfaktor behaftet und lässt sich nicht unabhängig überprüfen. Angewiesen auf die individuelle Angabe des Patienten, aber auch abhängig von der Symptomklassifizierung des Befundenden scheint eine absolut sichere und objektive Einschätzung nicht möglich.

Des Weiteren schließt eine korrekte Identifikation des stechenden Insekts eine Sensibilisierung auf ein anderes Hymenoptergift nicht aus.

Dennoch beruhen die jeweiligen Angaben zu Sensitivität und Spezifität in unserer Studie wie allgemein üblich auf den anamnestischen Angaben der Patienten. Entsprechend den Empfehlungen aus der Literatur, die Anamnese als Basis jeglicher allergologischer Diagnostik heranzuziehen, sind diese eventuellen Unsicherheitsfaktoren zu berücksichtigen (63).

In unserer Studie war bei 9 von 37 Stichereignissen den Patienten keine Identifikation des stechenden Insekts möglich. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass in beinahe einem Viertel die Anamnese bezüglich des angeschuldigten Insekts diagnostischer Aussagekraft entbehrt und weitere Diagnoseverfahren heranzuziehen sind.

### 4.2.2 Intrakutantest

Legt man dem Intrakutantest eine Sensitivität von 95% und eine Spezifität von 80-90% bei Durchführung innerhalb eines Jahres nach Stichereignis zugrunde, so muss bedacht werden, dass nicht alle im Intrakutantest negativ getesteten Patienten zwangsläufig bei einem Stichereignis nicht systemisch reagieren (135). Golden et al. berichten von bis zu 33% Erwachsener mit negativem Hauttest bei positiver Anamnese (57, 138). Zu berücksichtigen ist daher bei dessen Durchführung zum einen der Zeitpunkt, für welchen ein Intervall von frühestens 4-6 Wochen und maximal ein Jahr nach dem Stichereignis anzustreben ist (56, 133). Medikamente wie Steroide, Antihistaminika oder auch zahlreiche Psychopharmaka, welche die Hauttestempfindlichkeit vermindern, sollen vor dem Hauttest abgesetzt werden. Darüber hinaus sollte eine adäquat hergestellte sowie aufbewahrte und angewandte Testlösung verwendet werden (57, 110).

Bei 19 unserer 22 Patienten (86%) erfolgte die Durchführung eines Intrakutantests (Pat. Nr. 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22), welcher in 15/19 (78%) Fällen eine Doppelpositivität aufwies (Pat. Nr. 1, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 21, 22). Verglichen mit den Ergebnissen des BAT, zeigten alle 6 Individuen mit Doppelpositivität für beide Hymenopterengifte im BAT auch einen doppelpositiven Intrakutantest (Pat. Nr. 8, 10, 16, 17, 21, 22). Bei einem von 15 Patienten (Pat. Nr. 1; 4,5%) hingegen fiel die Hauttestung sowohl für Bienen- als auch für Wespengift positiv aus, im BAT ließ sich jedoch keine Sensibilisierung nachweisen. Während bei 2 Patienten das monopositive Ergebnis des Hauttests mit dem Ergebnis des BAT konkordant war (Pat. Nr. 7: Bienengift; Pat. Nr. 19: Wespengift), konnte eine Sensibilisierung auf Bienengift im Hauttest bei Patient Nr. 3 im BAT nicht bestätigt werden. Patient Nr. 5 zeigte im Hauttest Positivität für Wespengift, im BAT hingegen für Bienengift. Aus ethischen Gründen und der Gefahr einer potenziellen Sensibilisierung wurde in der Gruppe der Kontrollen auf die Durchführung eines Intrakutantests verzichtet.

### 4.2.3 Spezifisches IgE

Die Bestimmung allergenspezifischer Antikörper gegen Bienen- und Wespengift als Gesamtextrakt und gegen Einzelallergene stellt die dritte Säule in der Routinediagnostik bei Hymenopterengiftallergie dar. Sie ist bis heute die am weitesten verbreitete In-vitro-Methode in der Allergiediagnostik. Anfang der 90er-Jahre hat die CAP-Methode den in den 60er-Jahren

eingeführten RAST (Radio-Allergo-Sorbent-Test) abgelöst. Trotz verbesserter Sensitivität und Spezifität weist auch das CAP-System eine diagnostische Lücke von 20-30% auf (70, 95, 107).

So ist für das Immuno-CAP-Verfahren, welches auch in unserer Studie Anwendung fand, eine Sensitivität von 95% für Bienengift und 90% für Wespengift ermittelt worden, die Spezifität bewegt sich bei 80% für beide Gifte (135).

Auch hier kann es zum Auftreten falsch negativer Titer kommen, welche das Vorhandensein einer Sensibilisierung nicht ausschließen. Einer der Gründe dafür kann, ebenso wie beim Hauttest, ein zu kurzes oder aber auch zu langes Zeitintervall zwischen Stichereignis und IgE-Testung sein (135, 138). Bei Patienten unter spezifischer Immuntherapie und Imkern kann das sIgE im Immuno-CAP oder anderen derartigen Verfahren aufgrund kompetitiver Hemmung verfügbarer Antigene negativ sein. Auch nach einer schweren allergischen Reaktion bei Patienten mit Mastozytose kann durch vollständige Adsorption der IgE-Antikörper an die zahlreich vorhandenen Gewebsmastzellen ein sIgE-Nachweis ausbleiben (110).

Über die Intensität einer klinischen Stichreaktion erlaubt die IgE-Bestimmung keine Aussage, sie weist allein auf das Vorhandensein einer Sensibilisierung für ein bestimmtes Allergen hin.

Das Auftreten klinisch irrelevanter sIgE-Titer für Bienen- und Wespengift ist Bestandteil der hier durchgeführten Studie. Kreuzreagierende Kohlenhydratketten sind die am häufigsten beobachtete Ursache für dieses Phänomen und werden an anderer Stelle genauer erläutert. Auch eine atopische Veranlagung bzw. das Vorliegen eines hohen Gesamt-IgE kann dieser vermeintlichen Positivität zugrunde liegen (64, 65, 69, 156, 174).

Sowohl die verschiedenen sIgE-Bestimmungsmethoden als auch der Hauttest haben ihre Vor- und Nachteile. Unterscheiden sich die Sensitivitäten beider Verfahren innerhalb der ersten Jahre nach einer systemischen Reaktion kaum, so bleibt die Empfindlichkeit des Hauttests im Gegensatz zur IgE-Bestimmung im Alter konstant (110, 156).

Die Intrakutantestung zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit sowie eine rasche Durchführung und Verfügbarkeit der Ergebnisse aus, die sIgE-Bestimmung hingegen ist für den Patienten risikofrei und unabhängig von Hautbeschaffenheit und Medikation durchführbar (110). Allerdings wird von Kritikern eine relativ geringe Reproduzierbarkeit beider Methoden beanstandet und auf die Gefahr einer Unter- oder Überbehandlung bei einmaliger Durchführung beider Methoden hingewiesen (61).

#### 4.2.4 Stichprovokation

Heutzutage ist die Stichprovokation in der Routinediagnostik der Bienen- und Wespengiftallergie nicht mehr zu finden. Abgesehen vom möglichen Risiko, dem unbehandelte potenziell sensibilisierte Patienten hierbei ausgesetzt sind, negatiert ein einzeln toleriertes Stichereignis nicht das Risiko, auf einen Hymenopterenstich erneut systemisch zu reagieren (107, 145).

Das Gift des stechenden Insekts lässt sich, wie beispielsweise in der Hauttestung, nicht stufenweise applizieren und die Gefahr einer De-novo-Sensibilisierung oder des Triggerns einer bereits bestehenden Sensibilisierung ist nicht auszuschließen.

Dennoch hat der gezielte Insektenstich unter Notfallbereitschaft in der Allergologie seine Daseinsberechtigung. So dient die Stichprovokation der Erfolgsüberprüfung nach Einleitung oder am Ende der spezifischen Immuntherapie und zieht im Bedarfsfall eine Steigerung der zu applizierenden Giftdosis nach sich (145). Nicht nur aufgrund einer exakten entomologischen Identifikation des entsprechenden Insekts, sondern auch angesichts der Möglichkeit eines umgehenden notfallmäßigen ärztlichen Einschreitens bei Auftreten einer allergischen Reaktion ist die Stichprovokation einem Feldstich vorzuziehen (146).

#### 4.2.5 Zelluläre Tests

Ergibt die Diagnostik anhand dieser Standardverfahren negative oder widersprüchliche Ergebnisse, bedarf es komplementärer Tests. In den letzten Jahren haben sich hier weitere In-vitro-Testverfahren etabliert, welche in unklaren Fällen eine sinnvolle Ergänzung darstellen können.

Der in den 70er-Jahren eingeführte Histaminreleasetest findet aufgrund hoher Kosten und des Zeitaufwandes nur noch selten Anwendung. Mit einer Sensitivität von 63% bis 82% für Bienengift bzw. 50% bis 68% für Wespengift und einer Spezifität von 44% bis 94% für Bienengift bzw. 60% bis 83% für Wespengift ist er für die Routinediagnostik ungeeignet (131, 135, 170).

Der sogenannte CAST oder Leukotrien-Freisetzungstest misst nach Stimulation mit Interleukin 3 und dem angeschuldigten Allergen die Mediatorfreisetzung aus den Leukozyten mittels ELISA-Technik. Mehrere Studien zeigten in der Anwendung bei Insektengiftallergikern hohe Sensitivitäten und Spezifitäten. So lag in einer 2008 von Scherer et al. veröffentlichten Arbeit die Sensitivität für Bienengift bei 94% bzw. für Wespengift bei 88,5%, die Spezifität erreichte einen Wert von 93,2% für Bienengift und 95,5% für Wespengift (157).

Auf die Bedeutung des Basophilenaktivierungstests, der in vorliegender Studie zum Einsatz kam, wird in Abschnitt 4.2.8 ausführlich eingegangen.

#### **4.2.6 sIgE auf rekombinante Allergene**

In den letzten Jahren wurden im Bereich der molekularen Allergencharakterisierung mittels Aufschlüsselung in einzelne Allergenbestandteile bedeutende Fortschritte erzielt (17, 108, 163, 164). Diese rekombinanten DNA-Techniken eröffnen dem Allergologen in der Diagnostik verschiedenster Typ-I-Reaktionen neue Perspektiven (CRD: component-resolved diagnosis). Die Anwendung dieser sogenannten rekombinanten Allergene konnte sich allerdings im Hauttest, erstmals 2001 von Schmid-Grendelmeier untersucht, bis dato in der Praxis noch nicht durchsetzen (160).

Dagegen hielt in jüngster Zeit die Bestimmung sIgEs für im Bienen- und Wespengift enthaltene Major-Allergene Einzug. Im Vordergrund standen hierbei die zum Zeitpunkt der Durchführung vorliegender Studie rApi m 1 für das Bienengift und rVes v 5 als Major-Allergen des Wespengifts (108). Der Fokus richtet sich im Besonderen auf die Abgrenzung von klinisch relevanter zu klinisch irrelevanter Doppelpositivität aufgrund kreuzreagierender Kohlenhydratketten. Diese Thematik gilt in der täglichen Praxis bezüglich der Frage einer spezifischen Immuntherapie mit beiden Insektengiften häufig als problematisch (174).

Vor diesem Hintergrund führten Müller et al. 2008 eine Studie an 200 Insektengiftallergikern mit der IgE-Bestimmung auf die rekombinanten Allergene rApi m 1 und rVes v 5 mittels der ADVIA-Centaur-Methode durch und erhielten eine Sensitivität von 97% für sIgE auf rApi m 1 des Bienengifts und 87% für sIgE auf rVes v 5 des Wespengifts (113). Vier Jahre später untersuchten erneut Müllet et al. die ImmunoCAP-Methode von Phadia für die IgE-Bestimmung bei 121 Patienten, davon 76 mit positivem sIgE, für beide Hymenopteregifte. Dieses Verfahren erlaubte zusätzlich die Bestimmung von sIgE auf rVes v 1, einem weiteren Major-Allergen des Wespengifts. Während für Wespengiftallergiker mit 100% eine hohe Sensitivität für sIgE auf die rekombinanten Allergene rVes v 1 und/oder rVes v 5 angegeben wurde, lag diese für rApi m 1 bei den Bienengiftallergikern mit 78,3% unter dem Ergebnis der ersten Studie. Die Autoren empfahlen deshalb die IgE-Bestimmung auf weitere Major-Allergene des Bienengifts in der Diagnostik zu etablieren. Dennoch befürworteten Müllet et al., beruhend auf ihren Ergebnissen, die IgE-Bestimmung auf rekombinante Allergene bei Patienten mit doppelpositiven Bienen- und

Wespen-IgE-Werten. Sie sahen darin ein nützliches komplementäres Diagnoseverfahren bei der Unterscheidung zwischen klinisch relevanter und klinisch irrelevanter Doppelpositivität, um bei der Frage nach einer spezifischen Immuntherapie mit beiden Hymenoptergiften sinnvoll zu entscheiden (108).

Die Arbeitsgruppe um Hofmann wandte bereits 2010 das ImmunoCAP-Verfahren (Phadia, Uppsala, Schweden) an und erklärte die niedrigeren Sensitivitäten (sIgE auf rApi m 1 79%, sIgE auf rVes v 5 90%) mit der unselektierten Patientengruppe. Um diese Aussagen zu stützen, forderten sie ebenfalls die Untersuchung sIgE auf weitere Major-Bienengiftallergene. Schlussfolgernd attestierten aber auch Hofmann et al. der IgE-Bestimmung auf die rekombinanten Allergene rApi m 1 und rVes v 5 einen großen diagnostischen Nutzen bei Patienten mit doppelpositivem sIgE für Bienen- und Wespengift, hinsichtlich der Entscheidung über das therapeutische Prozedere (68).

Sturm et al. hingegen übten Kritik am Vorgehen, die Entscheidung über ein Vorliegen einer Bienen- und/oder Wespengiftallergie allein anhand eines jeweils positiven Hauttests und dem Vorhandensein von sIgE auf rApi m 1 und/oder rVes v 5 zu treffen. Die mit 79% eher mäßige Sensitivität für rApi m 1 sahen sie in zwei weiteren österreichischen Studien bestätigt, eine weitere, ebenfalls an einem unselektierten Patientenkollektiv durchgeführte Untersuchung, ergab sogar einen noch geringeren Wert für diesen Parameter. Hier zeigten sich regionale Unterschiede der Sensitivität für sIgE auf rApi m 1 mit dem höchsten Wert in Salzburg (Sensitivität 82%) gefolgt von einer Sensitivität von 78% in Wien und 63% in Graz (178).

In Bezugnahme auf eine von Korošec et al. durchgeführte Arbeit über negative Hauttests und sIgE bei gleichzeitigem Auftreten schwerer allergischer Reaktionen, wiesen Sturm et al. auf die mögliche Gefahr hin, diese Patienten zu übersehen (85). Des Weiteren war die sIgE-Bestimmung auf ausschließlich rApi m 1 und rVes v 5 ihrer Ansicht nach unzureichend und es bedurfte unbedingt der sIgE-Bestimmung auf weitere komplementäre Major-Allergene wie Api m 3, 4, 5, 6 und 10, da eine Sensibilisierung gegen eines dieser Allergene ebenfalls das Vorliegen einer Hymenoptergiftallergie mit all ihren potenziellen schwerwiegenden Folgen implizieren könnte (178).

Auch in unserer Studie fand die sIgE-Bestimmung auf rApi m 1 und rVes v 5 im Zuge einer möglichen Differenzierung zwischen klinisch relevanter und klinisch irrelevanter Doppelpositivität aufgrund kreuzreagierender Kohlenhydratketten Anwendung. So wiesen 41%, das heißt 9 von 22 Patienten, sIgE auf ein kommerziell erhältliches rekombinantes Allergen, entweder auf Bienen- (rApi m 1) oder Wespengift (rVes v 5) auf (rApi m 1 Pat. Nr. 7, 13, 15; rVes

v 5 Pat. Nr. 5, 11, 14, 18, 19, 20). In diesen Fällen konnte die Bestimmung des sIgE auf einzelne Major-Allergene einen entscheidenden Hinweis für die Wahl des Insektengifts im Rahmen der spezifischen Immuntherapie bringen. In 8 von 9 (88 %) dieser Fälle (Pat. Nr. 7, 11, 13, 14, 15, 18, 19, 20) bestätigte das Ergebnis des Basophilenaktivierungstests die jeweilige Sensibilisierung für ein Gift.

Bei insgesamt 12 von 22 Fällen (55%) zeigten sich sowohl sIgE auf rApi m 1 als auch sIgE auf rVes v 5 im Immuno-CAP-Verfahren positiv und erforderten somit weitere diagnostische Maßnahmen (Pat. Nr. 1, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 16, 17, 21, 22). Allerdings waren nur 6 dieser 12 Probanden konkordant doppelpositiv mit den Ergebnissen im Basophilenaktivierungstest (Pat. Nr. 8, 10, 16, 17, 21, 22). Im Umkehrschluss bedeutet dies jedoch, dass letztlich nur 50% der Patienten mit doppelpositiven sIgE-Ergebnissen auf die rekombinanten Allergene rApi m 1 und rVes v 5 auch einer Immuntherapie mit beiden Giften bedürfen, wenn man die Ergebnisse des BAT als klinisch relevant ansieht.

Bei einem Studienteilnehmer fiel die Testung auf sIgE von rApi m 1 und rVes v 5 negativ aus (Pat. Nr. 2), eine Hauttestung war in diesem Fall nicht durchgeführt worden. Allerdings zeigte sich in diesem Fall neben sIgE für Bienen- und Wespengift eine Positivität im Basophilenaktivierungstest für Bienengift, welcher somit bei der Entscheidungsfindung der Giftauswahl für eine Hyposensibilisierung wesentlich beitrug.

Ein in diesem Fall komplementär durchgeführter ELISA detektierte das Vorhandensein sIgE auf die bienengiftspezifischen rekombinanten Allergene nApi m 1, rApi m 2, rApi m 3 sowie rApi m 5 und lieferte somit einen weiteren Hinweis für das Vorliegen einer Bienengiftallergie.

Die Bestimmung sIgEs auf rApi m 1 und rVes v 5 in der Gruppe der Kontrollpersonen zeigte in allen 10 Fällen ein negatives Ergebnis für beide rekombinanten Allergene, die Spezifität ist folglich mit 100% als erstklassig zu beziffern.

Eine eindeutig richtungsweisende Entscheidungshilfe stellte die sIgE-Bestimmung auf die jeweiligen bis dato kommerziell erhältlichen rekombinanten Allergene dennoch nur in 8 von 22 (36,4%) der Fälle dar.

Diese Tatsache und eine für die Methode erhaltene mäßige Sensitivität von 50% stützt Sturms Forderung, weitere rekombinante Komponenten des Bienen- und Wespengifts zur Diagnostik heranzuziehen. So gelang seiner Arbeitsgruppe die Identifikation 6 weiterer Bienengiftallergiker durch sIgE-Bestimmung auf rApi m 2 (Hyaluronidase) und nApi m 4 (Melittin). 65 % der Patienten wiesen positives sIgE für rApi m 1, 52,2% für rApi m 2 und 42,5% für nApi m 4 auf (178).

2012 verglichen Sturm et al. weitere in Europa, unter anderem zwei in Italien, durchgeführte Studien über sIgE auf rApi m 1. In Anbetracht der Tatsache einer abnehmenden Sensitivität von Nord- nach Südeuropa wurde über regionale Unterschiede der Giftzusammensetzung spekuliert (177). Auch diese Tatsache unterstreicht die Notwendigkeit, weitere rekombinante Allergene in die Routinediagnostik einzuführen.

Bereits 1983 maßen King et al. der Phospholipase A1 (Ves v 1), der Hyaluronidase (Ves v 2) und Antigen 5 (Ves v 5) die größte Bedeutung in der Wespengiftallergie zu (80).

Seismann et al. gelang 2010 erstmals die Herstellung der rekombinanten Phospholipase A1 (rVes v 1) in Form eines löslichen und enzymatisch aktiven Moleküls. In einer Studie attestierten die Autoren der Bestimmung sIgEs auf rVes v 5 in Kombination mit der Bestimmung sIgEs auf rVes v 1 eine diagnostische Sensitivität von 80%. Dagegen brachte die alleinige Bestimmung sIgEs auf Ves v 5 nur eine Sensitivität von 50%, entsprechend des von uns erhaltenen Wertes. Weiterhin sahen Seismann et al. in der fehlenden Glykosylierung beider rekombinanten Allergene rVes v 1 und rVes v 5 einen entscheidenden Vorteil (164).

Auch Korošec et al. untersuchten 2012 die Wertigkeit der IgE-Bestimmung auf die mittlerweile kommerziell erhältlichen rekombinanten Allergene rVes v 1 und rVes v 5 des Wespengifts. Es gelang durch Hinzuziehen von rVes v 1 (Phospholipase A1) eine Steigerung der Sensitivität um 8%, die zusätzliche Bestimmung von rVes v 2b erhöhte die Sensitivität dagegen nur gering (87). SIgE auf die Dipeptidylpeptidase des Wespengifts, Ves v 3, ließ sich in einer Studie von Blank et al. in beinahe 50% von 54 getesteten Wespengiftallergikern nachweisen und könnte in Zukunft in Form der sIgE-Bestimmung auf die rekombinante Form (rVes v 3) eine durchaus entscheidende Rolle in der Diagnostik der Wespengiftallergie spielen (17, 87).

Frick et al. hingegen berichteten von einer Kreuzreaktivität von rVes v 2 und rVes v 5 des Wespengifts mit rApi m 2 und rApi m 5 des Bienengifts. Weiterhin kritisierten auch sie die niedrigen Sensitivitäten von 58-80% von sIgE auf rApi m 1 und legten in der Diagnostik der Bienengiftallergie besonderes Augenmerk auf die Kombination der sIgE-Bestimmung auf die rekombinanten Allergene rApi m 3, rApi m 4 und rApi m 10. Diese gelten, in rekombinaner Form, als CCD-frei, und die IgE-Bestimmung auf diese Allergene scheint somit als zuverlässiger Marker für die Detektion von Bienengiftallergien geeignet zu sein. In ihrer 2015 veröffentlichten Studie gelang ihnen durch Hinzuziehen der rekombinanten Allergene rApi m 3 und rApi m 10 zu rApi m 1 sowie unter sIgE-Bestimmung auf rVes v 5 und rVes v 1, eine Steigerung des Nachweises doppelpositiver Patienten um 22% auf 65,9% in einer ersten Gruppe mit unklarer Stichenamnese bzw. um 10,8% auf 54,2% in einer zweiten Gruppe mit Bienenstichenamnese (53).

Auch Köhler et al. sahen in Api m 10 großes Potenzial. In der Vergangenheit als Minor-Allergen des Bienengifts identifiziert, wiesen sie in ihrer Studie 2014 ein Vorhandensein sIgEs bei 61,8% der Bienengiftallergiker nach, womit Api m 10 den Major-Allergenen zuzuordnen wäre (83, 124). Unterstützt werden sie von Blank et al., die, aufgrund des Nachweises in annähernd 50%, ebenfalls in rApi m10 ein Schlüsselement für die rekombinante Diagnostik sehen (18).

Weiterhin von besonderer Bedeutung für die zukünftige Diagnostik scheinen die von Blank et al. 2013 identifizierten Allergene Api m 12 des Bienengifts und Ves v 6 des Wespengifts zu sein, da bei ihren rekombinanten Formen Kreuzreaktivität aufgrund des Fehlens von CCDs ausbleibt (19). Michel et al. propagierten in einer 2012 veröffentlichten Studie die Bedeutung von Api m 6 (Proteaseinhibitor). Von Kettner et al. 2001 erstmals als Minor-Allergen charakterisiert, sahen es Michel et al. aufgrund des möglichen IgE-Nachweises als relevant und als wichtigen Vertreter der niedermolekularen Allergene an (75, 105).

Diese vielversprechenden Ergebnisse und Beobachtungen unterstreichen die Dringlichkeit weiterer wissenschaftlicher Bemühungen bei der Herstellung und Routineeinführung rekombinanter Allergene. Komplementär zur Standarddiagnostik angewandt, könnten sie dem Diagnostiker in Zukunft zielführend in der Frage nach einer klinisch relevanten Sensibilisierung für ein Gift dienen.

Die Tabelle 3 im Kapitel Einleitung zeigt eine Übersicht der einzelnen Hymenoptergiftallergene und deren Vorhandensein in rekombinanter Form.

#### **4.2.7 CCDs (Cross-reactive carbohydrate determinants)**

Weiterhin häufig diskutiert und Bestandteil der vorliegenden Studie ist die Bedeutung kreuzreagierender Kohlenhydratketten (CCDs) auf der Allergenoberfläche. Diese, von Aalbrese et al. Anfang der 80er-Jahre erstmals nachgewiesenen, ubiquitär vorkommenden Zuckerketten, stehen seit Langem im Verdacht, Ursache einer sIgE-Doppelpositivität auf Bienen- und Wespengift zu sein (1, 39, 69). In Säugern normalerweise nicht auftretend, führt der Kontakt mit Insektengift zur Bildung dieser CCD-Antikörper und somit zu sIgE ohne bekannte biologische Aktivität (2, 192).

Die Prävalenz vorhandener CCDs wird in der Literatur für Wespengiftallergiker mit 11%, für Bienengiftallergiker mit etwa 23% bis 25% beziffert (82, 184). Die Angaben für das Vorkommen von CCDs bei doppelpositiven Patienten rangieren hingegen zwischen 47% bis 80% (64, 82, 164).

Bei Nicht-Allergikern treten sIgEs für CCDs in ca. 5% auf (102). Die Kontrollen in unserer Studie zeigten in 2 von 9 Fällen schwach positive Werte für Bromelain im BAT und liegen folglich mit 22,2% weit über den Angaben der Literatur. Dafür sind zwei mögliche Ursachen in Betracht zu ziehen. Zum einen wurde bei unseren Kontrollpersonen lediglich eine Insektengiftallergie, nicht aber andere Allergien ausgeschlossen. Zum anderen ist der BAT mit CCDs ein hochsensitives Verfahren, welches erst in neuerer Zeit in der Wissenschaft Einzug hielt.

Mithilfe des Immuno-CAP-Verfahrens lassen sich sIgE auf MUX F3 aus Bromelain sowie auf die Meerrettichperoxidase (HRP) bestimmen. Diese bekanntermaßen Kohlenhydratketten enthaltenden Allergene erlauben eine Aussage über das Vorhandensein von sIgE auf CCDs (1). Die Bestimmung dieser sIgEs im Patientenserum ergab in unserer Studie das Vorhandensein von sIgE auf MUX F3 für Bromelain in 10/22 Fällen (45%); Pat. Nr. 1, 3, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 19), bei 12/22 (54 %) lag sIgE auf die Meerrettichperoxidase (HRP) vor (Pat. Nr. 1, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 19, 22). Hierbei wiesen alle für Bromelain positiven Patienten auch sIgE für HRP auf. Bei den übrigen 10 Patienten gelang kein sIgE-Nachweis auf eine der beiden Komponenten (Pat. Nr. 2, 4, 5, 11, 14, 15, 17, 18, 20, 21). Ein Vergleich des Vorkommens der CCD-sIgEs mit den Ergebnissen des BAT mit Bienen- und Wespengift zeigte, dass in 8/12 Fällen (66%; Pat. Nr. 1, 3, 6, 7, 9, 12, 13, 14) keine klinisch relevante Doppelpositivität vorlag. Bei 2 der 12 Patienten (16%) war im Flow2 CAST® keine Allergensensibilisierung nachweisbar (Pat. Nr. 1, 3), 6 weitere wiesen eine Monopositivität für ein Gift auf (Bienengift Pat. Nr. 6, 7, 9, 12, 13; Wespengift Pat. Nr. 19). Eine Doppelpositivität im BAT und ein Vorhandensein von CCD-IgEs war in 4 Fällen zu beobachten (Pat. Nr. 8, 10, 16, 22). Diese Ergebnisse erlauben die Annahme, dass für das Vorhandensein sIgEs für Bienen- und Wespengift in 8 Fällen kreuzreagierende Kohlenhydratketten verantwortlich waren. Mit 36,4% fiel dieses Ergebnis jedoch deutlich niedriger als in der Literatur beschrieben aus, die im Vorhandensein von CCDs den Hauptgrund doppelpositiver Routinetests sieht (65, 164).

Mit 54,5% CCD-IgE-Prävalenz lagen unsere Ergebnisse etwas über den Werten von Kochuyt et al., die diese bei doppelpositiven Patienten mit 47% bezifferten (82).

Jappe et al. untersuchten in einer Studie 147 Patienten mit sIgEs sowohl auf Bienen- als auch auf Wespengift im Patientenserum. Bei nur 36 dieser 147 Patienten (24,5%) fand sich kein Nachweis von CCD-sIgE, bei 6 von 36 handelte sich um eine klinisch relevante Doppelpositivität.

Mit 75,5% gelangen Jappe et al. in einer Kohorte von Patienten mit doppelpositivem Hymenopteren-IgE durch Hinzuziehen eines zusätzlichen Tests („reciprocal Inhibition“) deutlich häufiger der Nachweis kreuzreagierender Kohlenhydratketten. In 98 der verbleibenden 111 Fälle (89%) war sowohl sIgE für Bromelain als auch für HRP nachweisbar, was einem Anteil von 67% an der Gesamtzahl entspricht (69).

Auch wir entschieden uns zur Anwendung eines komplementären Verfahrens zur Detektion einer potentiell vorhandenen Sensibilisierung auf CCDs und führten den BAT mit jeweils fünf unterschiedlichen Konzentrationen von Bromelain und Meerrettichperoxidase (HRP) bei allen 22 Patienten durch. Mithilfe der Flowzytometrie wiesen wir – im Vergleich zur Bestimmung von CCD-sIgE - in 4 weiteren Fällen (Pat. Nr. 5, 18, 20, 21) das Vorhandensein einer Sensibilisierung auf kreuzreagierende Kohlenhydratketten nach, sodass letztendlich bei 16/22 Patienten (72,7 %; Pat. Nr. 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 18, 19, 20, 21, 22) eine Sensibilisierung auf CCDs (sIgE und/oder BAT) nachweisbar war. Dieses Ergebnis geht mit den oben erwähnten Werten Jappes et al. konform.

In der Gruppe der im BAT für Bienen- und Wespengift doppelpositiven Patienten (n=6), erbrachten wir bei 5 (Pat. Nr. 8, 10, 16, 21, 22) den Nachweis einer Sensibilisierung auf CCDs, entweder mittels sIgE-Bestimmung und/oder mittels des BAT.

Letztendlich wiesen wir dadurch ein Vorhandensein einer klinisch irrelevanten Doppelpositivität aufgrund einer Sensibilisierung auf kreuzreagierende Kohlenhydratketten bei 11 von 22 Patienten (Pat. Nr. 1, 3, 5, 6, 7, 9, 12, 13, 18, 19, 20) nach.

Begründen Seismann et al. sowie Hemmer et al. das Vorliegen einer Doppelpositivität im Vorhandensein von sIgE auf CCDs in 60% bis 80 % der Fälle, liegen wir in Anbetracht der von uns erhaltenen 50% deutlich unter diesen Ergebnissen (65, 164).

#### **4.2.8 BAT**

Mit dem Mitte der 90er-Jahre eingeführten Basophilenaktivierungstest ist dem Allergologen ein weiteres wertvolles und vielseitig einsetzbares Diagnostikum in die Hand gegeben worden. Nicht nur bei Hymenopterengiftallergie, sondern ebenso bei Nahrungsmittelallergie sowie Latex- und Medikamentenallergie, findet dieses Verfahren heutzutage Anwendung (43, 54, 153, 154, 168).

In der Routinediagnostik hat sich der BAT allerdings aufgrund der Kosten und des höheren Aufwandes bis dato nicht etabliert und bleibt somit unklaren Fällen vorbehalten.

Sainte-Laudy et al. verglichen in einer im Jahre 2000 erschienenen Studie die Wertigkeiten aller oben aufgeführten zellulären Testverfahren (Histaminrelease, Leukotrienmessung, BAT) bei Patienten mit Hymenopteregiftallergie und ermittelten für den Leukotrien-Freisetzungstest und den Basophilenaktivierungstest mit jeweils 100% die höchste Sensitivität. Ebenfalls herausragend war mit 100% die Spezifität des BAT (149).

Letzteres Testverfahren ermöglicht eine exakte Charakterisierung vieler einzelner Zellen in relativ kurzer Zeit unter Zuhilfenahme der Durchflusszytometrie und Fluoreszenz. Da es sich um ein In-vitro-Testverfahren handelt, besteht keine Gefahr für den Patienten im Sinne einer allergischen Reaktion und ist somit im Gegensatz zum Hauttest eine Methode, welche auch nach dem Auftreten einer lebensbedrohlichen Anaphylaxie bedenkenlos angewandt werden kann (23). In der Vergangenheit attestierten mehrere Studien dem Basophilenaktivierungstest eine hohe Sensitivität in der Diagnostik der Hymenopteregiftallergie (35, 45, 125, 149, 198). Besonders bei negativen bzw. kontroversen Testergebnissen sowie bei der Frage nach klinischer Relevanz, dient er dem Allergologen als sinnvolle komplementäre Maßnahme zur Diagnostik und somit zur Festlegung des weiteren therapeutischen Prozedere (40, 125).

Doch nicht nur die Sicherheit des Patienten und die hohen Sensitivitäten sprechen für den Basophilenaktivierungstest. Er ermöglicht die simultane Testung mehrerer angeschuldigter Allergene anhand einer geringen Menge Patientenblut, welches, wenn auch mit einem gewissen Rückgang der Sensitivität behaftet, noch nach 24 Stunden verwertbar ist. Mit einer Verfügbarkeit der Ergebnisse innerhalb von ca. drei Stunden zeichnet sich der BAT im Sinne einer Zusatztestung als schnell zugängliches Verfahren aus (41, 175, 176).

Ein weiteres Argument für den Basophilenaktivierungstest liefert die Tatsache, dass er aufgrund messbarer Sensibilisierung in Form aktivierter Basophiler (in Prozent), eine Aussage über die klinische Relevanz des entsprechenden Insekts zu treffen vermag (67, 86).

Als Aktivitätsmarker stehen für den Basophilenaktivierungstest kommerziell CD63 und CD203c zur Verfügung. Generelle Empfehlungen zur Wahl des Aktivitätsmarkers gibt es nicht, allerdings hat sich das Oberflächenantigen CD63 vor allem in der Diagnostik der Insektengiftallergie bewährt (34, 35, 40, 125, 149).

Eine Studie von Eberlein-König et al. verglich beide Marker im Rahmen der Durchführung des Basophilenaktivierungstests bei Insektengiftallergikern. Es fand sich insgesamt für CD63 mit 89% zwar eine geringere Sensitivität (CD203c-Sensitivität 97%), dafür aber mit 100% eine höhere Spezifität als für CD203c (Spezifität 89%; 36).

Andere Untersuchungen von Eberlein-König et al. sowie von Erdmann et al. erreichten in Bezugnahme auf positive Ergebnisse in der Hauttestung eine Sensitivität von 100% im BAT mit CD63 (35, 45).

In Anbetracht weiterer Studien gilt die Anwendung von CD63 als Aktivitätsmarker für den Basophilenaktivierungstest in der Insektengiftallergie als etabliert und umfangreich in seiner Sensitivität bestätigt. Deshalb verwendeten auch wir dieses Oberflächenantigen als Aktivitätsmarker bei der Durchführung des BAT (35, 104, 125, 175).

### **Non-Responder**

Für die korrekte Auswertung des Basophilenaktivierungstests sind bei jeder Versuchsreihe sowohl Positivkontrollen (IgE-abhängige und IgE-unabhängige) als auch eine Negativkontrolle notwendig. Fällt die IgE-abhängige Positivkontrolle negativ aus, ist eine Auswertung des durchgeführten BAT nicht möglich, man spricht von sogenannten „Non-Respondern“.

Laut Literatur bleibt bei ca. 15-20% der Gesamtbevölkerung eine Expression von CD63 oder CD203c nach IgE-abhängiger Aktivierung der Basophilen aus (116).

Auch Erdmann et al. berichteten in ihrer Studie über Wespengiftallergiker vom Vorkommen dieser Non-Responder. Bei diesen kam es auch zu einem Ausbleiben der Mediatorausschüttung (Histamin, Leukotriene) basophiler Granulozyten nach Stimulation mit jeglichem IgE-Antikörper. Die IgE-unabhängige Positivkontrolle mit fMLP (formyl-methionine-containing-peptide) dagegen, zeigte positive Werte über 5% und bestätigte die korrekte Durchführung des Tests. Somit kann der Anteil der Untersuchten, bei denen die Auswertung des Basophilenaktivierungstests nicht möglich ist, ermittelt werden (45).

Als Ursache wird ein Defekt in der frühen Signalübertragung mit Beeinflussung des Kalzium-Einstroms bzw. ein vermindertes Proteinlevel der Tyrosinkinase Syk (Protein-Tyrosin-Kinase) vermutet (74, 116).

Eine Präinkubation mit Interleukin-3 führte zur Expression der FcεRI-assoziierten Protein-Tyrosin-Kinase Syk und somit zu einer verstärkten IgE-vermittelten Basophilenaktivierung (45). Durch dieses Priming mit IL-3 versprachen sich einige Autoren eine verstärkte Reaktion auf 10- bis 100-fach geringere Allergenkonzentrationen und ein Senken der „Non-Responder-Rate“ auf ca. 5% (37). Auch der Stimulationspuffer des in vorliegender Studie angewandten Flow2 CASTs® enthielt neben Kalzium und Heparin IL-3.

Allerdings sahen Schroeder et al. sowie Chirumbolo in diesem Vorgehen das eigentliche Problem im Umgang und der Auswertung des BAT. Die Fähigkeit der Basophilen selbst IL-3 zu produzieren, führe laut Autoren zu autokrinem Priming (25, 161).

In unserer Studie zeigten 4 von ursprünglich 28 Patienten eine negative Positivkontrolle mit Werten  $\leq 15\%$  (Pat. Nr. 25: 0,33%; Pat. Nr. 26: 14,4%; Pat. Nr. 27: 7,44%; Pat. Nr. 28: 10,81%). Sie wurden nach klinikinternen Richtlinien als Non-Responder deklariert und folglich von der Wertung ausgenommen. Mit 14,3% entspricht diese Anzahl in etwa der Literatur. In diesen Fällen ist ein alternatives diagnostisches Vorgehen notwendig.

Wahlweise empfohlen Ebo et al. bei möglichen Non-Respondern eine erneute Durchführung des Basophilenaktivierungstests sechs Wochen bis zwölf Monate nach Stichereignis, in der Annahme einer Refraktärzeit der Basophilen oder aber eines vorübergehenden Abfalls von zirkulierendem und membrangebundenem IgE (37). Allerdings berichteten diesbezüglich Kvedariene et al. in einer Studie über Muskelrelaxantien-Allergie einen Sensitivitätsabfall und empfahlen daher die Abklärung mittels BAT umgehend nach dem allergischen Ereignis (92).

Da unsere Studienteilnehmer unmittelbar vor Beginn einer spezifischen Immuntherapie standen und nach deren Beginn eine Verfälschung des Tests nicht 100-prozentig auszuschließen gewesen wäre, erübrigte sich die Alternative einer erneuten BAT-Durchführung in unserem Fall.

Die Testergebnisse von zwei weiteren Patienten konnten aufgrund zu hoher Werte ( $>10\%$ ) in der Negativkontrolle (Pat. Nr. 23: NK 1: 14,48%, NK2: 36,14%; Pat. Nr. 24: NK1: 37,57%, NK2: 32,22%) nicht in die Auswertung mit einfließen. Gründe hierfür könnten beispielsweise eine bereits begonnene spezifische Immuntherapie oder eine kürzlich stattgefundene Allergenexposition sein. Aber auch mit Pyrogenen und Endotoxinen verunreinigtes Wasser oder technisches Equipment könnten zu einer Erhöhung der Basalwerte führen (155). Erstrebenswerte Werte der Negativkontrolle werden vom Hersteller mit  $< 10\%$  angegeben, womit sich die Anzahl der zu wertenden Patienten folglich erneut um zwei Probanden reduzierte. Letztlich wurden in unserer Studie 22 von ursprünglich 28 Patienten in die Auswertung eingeschlossen.

## **4.3 BAT in vorliegender Studie**

### **4.3.1 BAT mit Bienen- und Wespengift**

Abweichend vom Routinestandard führten wir den BAT mit jeweils 5 unterschiedlichen Konzentrationen von Bienen- und Wespengift durch.

Dies ermöglichte uns die Bestimmung der Allergenkonzentration am Punkt der halbmaximalen Stimulation (C50) und erlaubte uns somit die Berechnung einer Ratio C50 Bienengift/C50 Wespengift, welche uns Aufschluss über eine klinisch relevante Sensibilisierung auf das Allergieauslösende Gift geben sollte.

Mit dieser Methode erhielten wir in 6 Fällen eine Ratio zwischen 0,1 und 10 und somit eine klinisch relevante Doppelpositivität für Bienen- und Wespengift. Bei 8 Probanden errechnete sich eine Ratio  $<0,1$  und folglich eine Positivität für Bienengift, bei 6 weiteren war die Ratio mit  $>10$  positiv für Wespengift. Alle 6 doppelpositiven Fälle zeigten weiterhin positive Ergebnisse sowohl für sIgE als auch für die giftspezifischen rekombinanten Allergene rApi m 1 und rVes v 5 sowie für beide Gifte im Hauttest.

Bei 4 dieser 6 Patienten (Pat. Nr. 8, 10, 16, 22) ließen sich im Serum sIgE für MUX F3 aus Bromelain und die Meerrettichperoxidase nachweisen, wobei in 3 von 4 Fällen (Pat. Nr. 10, 16, 22) der BAT das Vorhandensein einer Sensibilisierung auf mindestens eines der CCD-haltigen Allergene bestätigte (s. S. 82).

Ein weiterer Patient (Pat. Nr. 21) zeigte für CCD-IgEs negative Werte, jedoch gelang mittels des BAT der Nachweis für das Vorhandensein einer Sensibilisierung auf beide CCD-Vertreter (Bromelain und HRP).

### **4.3.2 Konsequenz aus BAT-Ergebnissen**

Bei den 6 im BAT doppelpositiven Patienten (Pat. Nr. 8, 10, 16, 17, 21, 22) empfahlen wir die Durchführung der spezifischen Immuntherapie sowohl mit Bienen- als auch mit Wespengift.

In zwei Fällen war der BAT für Bienen- und/oder Wespengift negativ (Pat. Nr. 1, 3). Anamnestischen Angaben zufolge reagierte ein Patient (Pat. Nr. 1) sowohl nach Bienen- als auch nach Wespenstich mit einer allergischen Reaktion Grad II nach Ring und Messmer (141), ebenso zeigte sich die Hauttestung für beide Gifte positiv.

Im anderen Fall (Pat. Nr. 3) war wiederholt eine systemische Reaktion Grad II nach Ring und Messmer nach einem Bienenstich aufgetreten, die Intrakutantestung zeigte in diesem Fall ebenfalls nur eine Monopositivität für Bienengift.

In Anbetracht der in Einklang stehenden Ergebnisse von Anamnese und Hauttestung empfahl sich, trotz negativen BAT, in diesen beiden gesonderten Fällen zum Schutze der Patienten, die Durchführung einer spezifischen Immuntherapie mit beiden Giften bei Patienten Nr. 1 sowie mit Bienengift bei Patienten Nr. 3. Die Ursache des negativen BAT blieb in diesen Fällen unklar.

Bei 4 weiteren Patienten zeigten sich ebenfalls Diskrepanzen bezüglich der Ergebnisse in der Flowzytometrie, der Anamnese und/oder im Hauttest. Patienten Nr. 2 und 9 waren im BAT positiv für Bienengift, gaben aber an, von einer Wespe gestochen worden zu sein. Eine Intrakutantestung wurde bei Patienten Nr. 2 aufgrund der Einnahme von  $\beta$ -Blockern nicht durchgeführt, bei Patienten Nr. 9 war sie doppelpositiv. Während das sIgE auf die rekombinanten Allergene bei Patienten Nr. 2 doppelnegativ war, ließen sich mittels ELISA nApi m 1, rApi m 2, rApi m 3, rApi m 5 sowie rVes v 1 nachweisen. Patient Nr. 9 hingegen zeigte Positivität für sIgE auf beide rekombinanten Allergene, ein ELISA wurde in diesem Fall nicht durchgeführt. Dennoch wäre unsere Empfehlung, auch eine Therapie mit Bienengift durchzuführen sowie die Umstände des Sticheignisses und somit die anamnestischen Angaben zu überprüfen, welche bei diesem Patienten neben dem positiven Hauttest den einzigen Hinweis auf eine Wespengiftallergie darstellte und bekanntermaßen einen gewissen Unsicherheitsfaktor aufweist.

Bei Patienten Nr. 4 zeigte sich der BAT für Wespengift positiv, die Hauttestung war doppelpositiv für beide Gifte ebenso wie das sIgE für beide rekombinanten Allergene. Anamnestisch wurde neben einer Biene weiterhin ein unklares Insekt angeschuldigt. Deswegen würden wir in diesem Fall auch zu einer spezifischen Immuntherapie mit Wespengift raten.

Während die Hauttestung bei Patienten Nr. 5 ein monopositives Ergebnis für Wespengift zeigte, war der BAT für Bienengift positiv, eine klare anamnestische Angabe bezüglich des auslösenden Insekts konnte nicht gemacht werden. Auch die Betrachtung des sIgE auf die rekombinanten Allergene (sIgE positiv auf rVes v 5, mittels ELISA sIgE-Nachweis auf rApi m 2, rApi m 10 und rVes v 1) war hier nicht zielführend. Deshalb wäre bei diesem Patienten nach Durchführung einer spezifischen Immuntherapie mit Bienengift eine solche auch mit Wespengift zu erwägen.

In 10 Fällen (Pat. Nr. 6, 7, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20) zeigten sich die Ergebnisse des BAT konkordant mit der Anamnese und/oder mit der Hauttestung, folglich ergab sich eine klare Indikation zur Hyposensibilisierung mit dem jeweiligen Gift.

### 4.3.3 BAT mit Bromelain und Meerrettichperoxidase (HRP)

Sturm et al. beurteilten in einer 2011 veröffentlichten Studie die Bestimmung sIgEs auf MUX F3 aus Bromelain mittels Immuno-CAP im Rahmen der Untersuchung doppelpositiver Patienten als ungeeignet. Über die Hälfte aller klinisch relevanten doppelpositiven Patienten wiesen ein gleichzeitiges Vorhandensein von sIgE auf CCDs auf, wodurch die Autoren zeigten, dass ein sIgE-Nachweis auf CCDs eine klinisch relevante Doppelpositivität nicht auszuschließen vermag (179). Wir entschieden uns zusätzlich zur sIgE-Bestimmung auf MUX F3 aus Bromelain und HRP für eine zusätzliche Testmethode und führten den Basophilenaktivierungstest mit jeweils 5 unterschiedlichen Konzentrationen von Bromelain und Meerrettichperoxidase (HRP) durch.

Die Ergebnisauswertung dieser Testreihe erfolgte im Gegensatz zum Hymenopterengift nicht mittels einer Ratio, sondern anhand eines durch ROC-Kurven von der Fa. Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz, errechneten Cut-offs. Dieser betrug für Bromelain 4%, die optimalen Werte für Sensitivität und Spezifität lagen bei der Meerrettichperoxidase (HRP) bei einem Cut-off von 7%.

Da eine Sensibilisierung auf kreuzreagierende Kohlenhydratketten dem bisherigen Kenntnisstand nach wahrscheinlich klinisch irrelevant ist (4, 100, 179), nicht mit allergischen Symptomen korreliert und damit nicht mittels einer Anamnese zu erfassen ist, ermöglichte uns dieses Vorgehen nicht nur die Angabe einer Sensitivität und Spezifität im Basophilenaktivierungstest für Bromelain und HRP in Bezugnahme auf die bei der Bestimmung von CCD-IgE erhaltenen Werte, sondern zeigte zusätzlich in 4 weiteren Fällen eine Sensibilisierung auf CCDs auf.

Insgesamt erbrachte der BAT mit Bromelain und HRP in 15 der 22 Fälle (68%) ein positives Ergebnis auf mindestens ein Allergen (Bromelain und HRP bei Pat. Nr. 1, 5, 7, 9, 16, 19, 20, 21, 22; HRP bei Pat. Nr. 3, 6, 10, 12, 13, 18).

Anhand der Ergebnisse der Durchflusszytometrie mit beiden Hymenopterengiften und Berechnung der Ratio ermittelten wir 14 monopositive Patienten (Bienengift: Pat. Nr. 2, 5, 6, 7, 9, 12, 13, 15; Wespengift: Pat. Nr. 4, 11, 14, 18, 19, 20).

In 6 dieser Fälle (Pat. Nr. 6, 7, 9, 12, 13, 19) bestätigten sowohl die Bestimmung der sIgE auf CCDs im Serum als auch der BAT ein Vorhandensein einer Sensibilisierung auf CCDs. Bei 3 weiteren monopositiven Patienten konnte mittels Durchflusszytometrie ein Vorhandensein einer Sensibilisierung auf CCDs eruiert werden, CCD-IgE im Serum war in diesen Fällen (Pat. Nr. 5, 18, 20) nicht nachweisbar.

Die zwei Patienten mit doppelnegativem Flow2 CAST® für Insektengift, wiesen in beiden Verfahren zur Detektion einer Sensibilisierung auf CCDs positive Ergebnisse auf (Pat. Nr. 1, 3), wobei die Ergebnisse in der Flowzytometrie bei Patient Nr. 3 nur für die Meerrettichperoxidase (HRP) Positivität zeigten.

In diesen insgesamt 11 Fällen (Pat. Nr. 1, 3, 5, 6, 7, 9, 12, 13, 18, 19, 20) ist eine augenscheinliche Doppelpositivität bezüglich sIgEs auf Bienen- und Wespengift aufgrund kreuzreagierender Kohlenhydratketten anzunehmen.

Gemessen an der Gesamtzahl der zu wertenden 22 Studienteilnehmer lässt sich somit in 50% (11/22) das Vorhandensein sIgEs auf Bienen- und Wespengift mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Vorhandensein von CCDs zurückführen.

Bei 5 weiteren Probanden (Pat. Nr. 2, 4, 11, 14, 15) erbrachte der BAT für Hymenoptereingift ein monopositives Ergebnis, eine Sensibilisierung auf CCDs war in diesen Fällen weder mittels Nachweis sIgEs noch im BAT nachweisbar. Der Grund für eine klinisch irrelevante Doppelpositivität bei den hymenoptereingiftspezifischen IgEs, ist in diesen 5 Fällen möglicherweise in einer Sequenzhomologie von Giftenzymen, beispielsweise der Hyaluronidase zu suchen (77).

Verglichen mit den Ergebnissen der Studie von Jappe et al., in welcher sIgE für CCDs bestimmt und ein Inhibitionstest durchgeführt wurden, stehen unsere Ergebnisse mit 72,7% (16/22 Patienten) auf CCD-sensibilisierten Patienten durchaus im Einklang mit den 75,5% (111/147 Patienten) in ihrer Untersuchung (69). Auch Jappes Empfehlung bezüglich der Bestimmung von sIgE auf HRP zur Detektion einer Sensibilisierung auf CCDs schließen wir uns in Anbetracht einer von uns erhaltenen Sensitivität für die Sensibilisierung auf Meerrettichperoxidase von 82% und einer Spezifität von 91%, an. Mit Werten von 50% für die Sensitivität und 91% für die Spezifität scheint der Nachweis einer Sensibilisierung auf Bromelain zum Nachweis dieser auf kreuzreagierende Kohlenhydratketten insgesamt weniger geeignet.

In Bezugnahme auf die klinisch relevanten doppelpositiven Patienten waren nur in einem Fall in beiden Testverfahren (CAP und BAT) zum Nachweis einer Sensibilisierung auf CCDs diese nicht nachweisbar (Pat. Nr. 17).

Insgesamt wiesen fünf Patienten neben einer klinisch relevanten Doppelpositivität für Bienen- und Wespengift auch eine Sensibilisierung auf CCDs auf, entweder in Form von CCD-IgEs im Serum (Pat. Nr. 8, 10, 16, 22) und/oder im BAT (Pat. Nr. 10, 16, 21, 22). So ließ sich bei den Patienten

Nr. 10, 16, 21 und 22 eine positive Reaktion auf HRP im BAT aufzeigen, bei drei davon war das sIgE auf die Meerrettichperoxidase (HRP) auch im Serum positiv (Pat. Nr. 10, 16, 22).

Bei einem Patienten (Pat. Nr. 8) widersprach das negative Ergebnis auf Bromelain und HRP des BAT dem Vorhandensein CCD-IgEs im Serum, im BAT für die Insektengifte zeigte sich dagegen eine Doppelpositivität.

Diese Ergebnisse zeigten, dass das Vorhandensein einer Sensibilisierung auf CCDs eine klinisch relevante Doppelpositivität auf Bienen- und Wespengift nicht ausschließt, da es sich um unabhängig voneinander entstandene Sensibilisierungen handeln kann.

Zum gleichen Ergebnis kamen diesbezüglich auch Sturm et al. in einer 2011 veröffentlichten Arbeit und warnten ausdrücklich davor, eine klinisch relevante Doppelsensibilisierung aufgrund einer vorhandenen Sensibilisierung auf CCDs zu übersehen (179).

Die Durchführung des BAT mit Bienen- und Wespengift war insbesondere in diesen fünf Fällen gerechtfertigt. Vor einem zu schmalspurigen diagnostischen Vorgehen ist daher auch aufgrund der Daten der vorliegenden Studie zu warnen.

Durch Hinzuziehen des BAT bei der Detektion einer Sensibilisierung auf CCDs wiesen wir bei insgesamt 4 weiteren Patienten das Vorhandensein einer Sensibilisierung auf kreuzreagierende Kohlenhydratketten nach, bei denen die CCD-IgE-Bestimmung negativ ausgefallen war (Pat. Nr. 5, 18, 20, 21).

Dies bestätigte das Vorhandensein einer Sensibilisierung auf diese Kohlenhydratketten allein durch die Ergebnisse im BAT und unterstreicht die Wichtigkeit dieses Testverfahrens. Allerdings ließ sich in einem Fall (Pat. Nr. 8) mittels Flowzytometrie keine Sensibilisierung auf CCDs ermitteln obwohl das sIgE sowohl auf MUX F3 aus Bromelain als auch auf HRP positiv war.

Hinsichtlich einer Einführung der Bestimmung von sIgE auf CCDs in der Routinediagnostik schließen wir uns der Empfehlung Jappes an, dieses Testverfahren komplementär anzuwenden und hierbei die Bestimmung von sIgE auf die Meerrettichperoxidase oder auf Bromelain als Repräsentant kreuzreagierender Kohlenhydratketten vorzuziehen.

In Anbetracht einer sowohl durch den Hauttest als auch durch die sIgE-Bestimmung auf die rekombinanten Allergene belegten klinisch relevanten Doppelpositivität im Basophilenaktivierungstest bei 5 Probanden mit sIgE auf CCDs im Serum, ist die diagnostische Bedeutung jedoch als fragwürdig anzusehen. Diese Ansicht unterstützten auch Sturm et al. in ihrer bereits mehrfach zitierten Studie „Inconsistent results of diagnostic tools hamper the differentiation between bee and vespine venom allergy“ (179).

Auch die Annahme, eine Sensibilisierung auf kreuzreagierende Kohlenhydratketten träte nach erstmalig stattgehabtem Hymenopterenstichereignis auf, schließt das Vorhandensein einer klinisch relevanten Doppelpositivität mit unter Umständen lebensbedrohlichen Symptomen nicht mit Sicherheit aus (2, 179).

Unseren Beobachtungen zufolge genügt der alleinige Nachweis einer Sensibilisierung auf CCDs nicht, um eine Doppelpositivität zu erklären, und erfordert ein weiterreichendes Vorgehen zur Identifikation klinisch relevanter doppelpositiver Insektengiftallergiker.

In vorliegender Studie richteten wir das Hauptaugenmerk auf Patienten mit doppelpositivem sIgE auf Bienen- und Wespengift. Mit einem Anteil von 59% stellten diese unter den Hymenoptereingiftallergikern mehr als die Hälfte dar (113, 137).

Die Entwicklung von Diagnoseverfahren, welche zur Detektion klinisch relevanter doppelpositiver Patienten geeignet sind, ist daher äußerst wichtig.

Die bis dato existierenden Testverfahren sind wie in unserem Fall gezeigt ergänzend angewandt, in vielen Fällen bei der Frage nach dem Vorliegen einer klinisch relevanten Doppelpositivität weiterführend.

Der BAT, wie er in vorliegender Studie mittels der Berechnung der Ratio angewandt wurde, trägt unserer Meinung nach zur Entscheidungsfindung in der Frage nach dem für die spezifische Immuntherapie einzusetzenden Gift unterstützend bei.

Von Sturm et al. geforderte Studien, mittels Stichprovokation an akkurate negativ prädiktive Werte für den BAT und die sIgE-Bestimmung auf rekombinante Allergene zu gelangen und somit einen Goldstandard in der Diagnostik doppelsensibilisierter Patienten zu etablieren, sind ethisch diskutabel (42, 180). Rückschlüsse auf die klinische Relevanz der im BAT gewonnenen Ergebnisse lassen aber auch Daten zur Basophilenreaktion vor, während und nach Abschluss der Immuntherapie zu (siehe Kapitel 4.4).

#### **4.4 Spezifische Immuntherapie bei Patienten mit sIgE auf Bienen- und Wespengift**

Die in der Wissenschaft lange Zeit als umstritten geltende Annahme, die spezifische Immuntherapie ziehe eine Veränderung der Basophilenaktivierung nach sich, ließ sich in neueren dazu durchgeführten Untersuchungen zunehmend bestätigen. 2004 veröffentlichten Erdmann et al. eine Studie, in welcher neben der diagnostischen Wertigkeit des BAT auch die Frage nach

einem möglichen Monitoring der spezifischen Immuntherapie bei Wespengiftallergie unter Zuhilfenahme der Flowzytometrie als Ersatz für die Stichprovokation untersucht wurde. Die Durchführung des BAT mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen Wespengift (0,1 µg/ml und 1 µg/ml) jeweils fünf Tage und sechs Monate nach Beginn der Immuntherapie, lieferte zwar eine hervorragende Sensitivität von 92%, in Kombination mit sIgE sogar 96%, und eine zufriedenstellende Spezifität von 80% als diagnostisches Verfahren. Einen Benefit gegenüber der Stichprovokation bezüglich eines potenziellen Monitorings der spezifischen Immuntherapie, konnte Erdmann jedoch nicht entdecken, da zu keinem Zeitpunkt eine Abnahme der Basophilenaktivierung zu beobachten war (45).

Eine zwei Jahre später von Ebo et al. durchgeführte Untersuchung bei Wespengiftallergikern kam hingegen zu einem anderen Ergebnis. Der Wert für die Sensitivität, war in dieser Studie mit 83,8% aufgrund von Non-Respondern im Vergleich zu Erdmann deutlich niedriger, die Spezifität hingegen war mit 100% hervorragend.

Ebenfalls angespornt, eine Alternative zur ethisch bedenklichen und risikobehafteten Stichprovokation aufzuzeigen, erfolgte die Durchführung des BAT nach fünf Tagen, nach sechs Monaten und, an einer gesonderten Patientenklientel nach drei Jahren spezifischer Immuntherapie. Ebo wählte im Unterschied zu Erdmann et al., Wespengiftkonzentrationen von 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 10 µg/ml. Während nach fünf Tagen bei problemlos tolerierter Hyposensibilisierung keine signifikante Veränderung basophiler CD63-Expression festzustellen war, zeigten sich nach sechs Monaten bei submaximaler Stimulation mit 0,01 µg/ml verglichen mit dem Ausgangswert signifikant niedrigere CD63-Werte. Nach drei Jahren spezifischer Immuntherapie zeigten 60% der untersuchten Patienten mit Wespengift in den Konzentrationen 0,01 µg/ml und 0,1 µg/ml eine signifikante Hemmung der Aktivierung basophiler Granulozyten in der Flowzytometrie. Auch wenn diese rückläufige Expression möglicherweise einem IgE-Rückgang oder aber der Induktion hemmender IgG-Antikörper zuzuschreiben war, werteten Ebo et al. den BAT als potenzielle In-vitro-Methode zur Überprüfung eines Therapieerfolges nach spezifischer Immuntherapie (42).

Kucera et al. beobachteten 2010 bei der Untersuchung von Bienengiftallergikern unter spezifischer Immuntherapie und wiederholter BAT-Kontrolle Ähnliches und entdeckten eine Korrelation zwischen Abnahme basophiler Sensitivität und gut tolerierter Stichprovokation. Die Ergebnisse ihrer Studie veranlassten auch sie zur Annahme, die Durchführung eines BAT nach mindestens 3,1 Jahren andauernder spezifischer Immuntherapie beinhalte ein gewisses Potenzial für ein Monitoring (88).

2012 beobachteten Erzen et al. bei Insektengiftallergikern einen Rückgang basophiler Aktivierung im CD63-BAT bei submaximaler Giftkonzentration mit 0,1 µg/ml auf nahezu ein Viertel des Ausgangswertes von 41% auf 13% ein Jahr nach beendeter spezifischer Immuntherapie. Auch 2,5 bis 6 Monate nach der im Anschluss durchgeführten Stichprovokation rangierten die Werte der Patienten, die diese toleriert hatten, in der Flowzytometrie bei 12% für das jeweilige Insektengift. Eine signifikante Veränderung im BAT mit maximaler Giftkonzentration von 1 µg/ml war hingegen nicht zu detektieren. Weiterhin zeigte eine Patientin, welche auf die spezifische Immuntherapie nicht angesprochen hatte und systemisch auf ein erneutes Stichereignis reagierte, keine messbaren Veränderungen im BAT. Giftspezifische IgE-Antikörper waren bei mehr als 50% aller Patienten nach beendeter Immuntherapie nachweisbar und sogar 2,5 bis 6 Monate nach Stichprovokation wieder erhöht (46).

Eine Studie von Zitnik et al. zu einem möglichen Monitoring der spezifischen Immuntherapie bei Kindern mit Bienengiftallergie ergab ähnliche Werte bezüglich des Rückgangs der basophilen Aktivierung bei einer Giftkonzentration von 0,1 µl/ml und stützte somit die Ergebnisse von Erzen et al. (198).

Verglichen mit Beobachtungen eines Rückgangs des sIgEs im Rahmen der Immuntherapie, lieferte der BAT in dieser Hinsicht deutlich bessere Ergebnisse. Van Halteren et al. berichteten von einem negativen IgE nach Beendigung der spezifischen Immuntherapie bei gerade einmal ca. 10% ihrer Patienten (191).

Andere Quellen widerlegen ebenfalls einen Nutzen von Hauttest, sIgE oder IgG4-Bestimmung beim Monitoring zum Verlauf bzw. Erfolg der spezifischen Immuntherapie (16, 190).

In Anbetracht oben genannter Studien verdichten sich die Hinweise, der Basophilenaktivierungstest stelle zum heutigen wissenschaftlichen Standpunkt die In-vitro-Methode mit dem größten Potenzial für ein Monitoring der spezifischen Immuntherapie dar und könne somit in Zukunft als ethisch vertretbare Alternative zur risikobehafteten Stichprovokation herangezogen werden.

Die spezifische Immuntherapie mit Bienen- und/oder Wespengift gilt bei Insektengiftallergikern als die kausale Behandlungsform und verspricht mit einem Therapieversagen in Form einer erneuten allergischen Reaktion in nur ca. 6,5% der Fälle sehr gute Erfolgsraten (148).

Häufig diskutiert und Gegenstand sämtlicher Studien ist das Prozedere bei Patienten mit doppelpositiven Ergebnissen in den Routinetests wie Hauttestung und Bestimmung sIgE-Antikörper, aber unklarer oder nur für ein Insekt positiver Anamnese.

Aufgrund klinisch irrelevanter Sensibilisierung oder Sensibilisierung auf kreuzreagierende Kohlenhydratketten (CCDs) in mehr als 50%, lässt sich die Durchführung einer spezifischen Immuntherapie mit beiden Hymenopteregiften in Anbetracht der eher selten vorkommenden „echten“, klinisch relevanten Doppelpositivität in vielen Fällen nicht rechtfertigen (65, 113).

Zum Wohle des Patienten und im Hinblick auf die Kosten für das Gesundheitssystem ist, vor einer Hyposensibilisierung mit beiden Giften diese Indikation individuell abzuwägen und jedmögliches zielführendes Diagnostikverfahren zur Problemlösung heranzuziehen (174).

So warnen Wissenschaftler bei Außerachtlassen der klinischen Relevanz bzw. bei nicht stattgehabter Symptomatik vor dem Risiko einer Übertherapie oder einer De-novo-Sensibilisierung bei Patienten mit unspezifischen oder durch Sensibilisierung auf kreuzreagierende Kohlenhydratketten hervorgerufene doppelpositive Testergebnisse (179).

Im Falle einer, in der Praxis eher seltenen, eindeutig klinisch relevanten Doppelsensibilisierung mit schwerer allergischer Reaktion auf beide Gifte, ist eine spezifische Immuntherapie mit Bienen- und Wespengift allerdings absolut indiziert.

Stoevesandt et al. kritisierten 2013 fehlende Leitlinien bezüglich des Vorgehens bei dieser Patientenklientel. In der bisher größten Singlecenter-Studie über den Langzeiteffekt der spezifischen Immuntherapie erfassten sie retrospektiv über einen Zeitraum von 20 Jahren 635 leitliniengerecht mit einem Insektengift für mindestens drei Jahre hyposensibilisierte Patienten. 351 (55,3%) der Probanden zeigten eine Doppelsensibilisierung auf Bienen- und Wespengift, wovon 107 doppelpositives sIgE, 84 einen doppelpositiven Hauttest und 160 Patienten doppelpositive Werte in beiden Testverfahren aufwiesen.

In Anbetracht des Wiederauftretens allergologischer Symptome nach einem Insektenstich in nur 7,8% der doppelsensibilisierten Patienten, sahen Stoevesandt et al. keinen signifikanten Zusammenhang zwischen einer Doppelpositivität und dem Auftreten einer Anaphylaxie bei erneutem Stichereignis. Daraus schlossen sie, dass eine spezifische Immuntherapie mit nur einem Hymenopteregift in der Mehrzahl dieser gesonderten Patientenklientel ausreiche und nur bei klinisch relevanter und bekannter Doppelsensibilisierung mit beiden Giften durchzuführen sei. Ein auf Anamnese, Hauttest und sIgE aufbauender Algorithmus sollte in Zukunft in der Fragestellung der adäquaten Giftauswahl behilflich sein (173).

Allerdings birgt dieser Algorithmus in mehrerlei Hinsicht Gefahren. Der Hauttest spielt in diesem eine zentrale Rolle und soll in Abhängigkeit von der klinischen Ausprägung zusammen mit dem sIgE für das therapierelevante Hymenopteregift richtungsweisend sein. Laut Literatur aber kann das Testergebnis bei positiver Klinik negativ oder aber falsch positiv ausfallen (138). So erhielten

Sturm et al. in einer Untersuchung doppelpositive Ergebnisse im Hauttest in 69% der bei der Bestimmung von sIgE doppelsensibilisierten Patienten. Die Autoren vermuteten hierbei falsch-positive Reaktionen aufgrund von Histaminausschüttung, toxischer Giftreaktion oder aber Mastzellaktivierung durch kreuzreagierende Kohlenhydratketten (179). Zu bedenken ist außerdem, dass in besonderen Fällen aufgrund gegebener Kontraindikationen eine Intrakutantestung nicht durchführbar und somit der Algorithmus nicht anwendbar ist (10).

Ein weiterer Kritikpunkt an dem Verfahren ist das völlige Außerachtlassen jeglicher zellulärer In-vitro-Verfahren.

Wären wir in unserer Studie Stoevesandts Algorithmus gefolgt, wäre in vier Fällen (Pat. Nr. 8, 10, 16, 21), in welchen uns der Basophilenaktivierungstest ein doppelpositives Ergebnis zeigte, die spezifische Immuntherapie mit nur einem Gift durchgeführt worden und hätte den Patienten folglich bei erneutem Stichereignis durch das jeweils andere Insekt, möglicherweise dem Risiko einer Anaphylaxie ausgesetzt. In 3 weiteren Fällen wurde aus diversen Gründen keine Hauttestung durchgeführt. Hier wäre der Algorithmus nicht anwendbar gewesen.

Mittels des BAT und der berechneten Ratio konnten wir die Anzahl der zu doppelhyposensibilisierenden Patienten von ursprünglich 22 auf 6 reduzieren.

Mit diesen 27%, lagen wir deutlich unter dem in der Literatur zitierten Wert für das Vorliegen einer klinisch relevanten Doppelpositivität von 32-67% (159, 174).

Auch Frick et al., die mittels des IgE-Nachweises auf die rekombinanten Allergene rApi m 1, rApi m 3 und rApi m 10 des Bienengifts sowie rVes v 5 und rVes v 1 Werte für eine Doppelpositivität auf beide Gifte von 65,9% bzw. 54,2% ermittelten, lagen damit deutlich über unseren Ergebnissen (53).

Seismann et al. hingegen sahen das Vorliegen einer Doppelpositivität in 70-80% in einer Kreuzreaktivität ohne klinische Relevanz begründet. Damit stimmen ihre Werte mit unseren Werten im Hinblick auf eine behandlungsbedürftige Doppelpositivität weitgehendst überein (163). In unseren 6 Fällen sahen wir, gestützt auf die doppelpositiven Ergebnissen im BAT, im Hauttest, bei der Bestimmung sIgEs auf die rekombinanten Allergene rApi m 1 und rVes v 5 sowie des insektengiftspezifischen IgEs die Indikation zur Durchführung der spezifischen Immuntherapie mit Bienen- und Wespengift eindeutig als gegeben an.

Studien unterstrichen die diagnostische Wertigkeit nicht nur bei Insektengiftallergie, sondern auch bei anderen Allergien vom Soforttyp wie beispielsweise der Arzneimittelallergie und der Nahrungsmittelallergie (3, 76, 121, 127, 186). Hohe Sensitivitäten und Spezifitäten zeichneten den

Basophilenaktivierungstest als wertvolle Ergänzung der Diagnostik bei problematischen und unklaren Fällen allergologischer Patienten aus (40, 149).

Trotz vieler erfolgreicher Studien beanstandeten Kritiker die hohen Kosten und den Zeitaufwand sowie die nicht allgegenwärtige Verfügbarkeit des BAT (26, 38).

Chirumbolo warnte in seinem 2012 veröffentlichten Update über den BAT vor einer Diagnosestellung, singularär beruhend auf einer prozentualen Angabe von exprimiertem CD63. Vielmehr forderte er eine Zusammenschau aller allergologischer Parameter und verwies auf den Goldstandard von Hauttest und Bestimmung von sIgE. Des Weiteren forderte er eine Mindestanzahl von 250 erfassten Basophilen in der Auswertung sowie die Einführung weiterer Aktivitätsmarker (26).

Die zur Verfügung stehenden Tests zum Nachweis sIgEs auf die rekombinanten Allergene rApi m 1, rVes v 5 und rVes v 1 zeigten in den bisherigen Studien, besonders hinsichtlich rApi m 1, nur mäßige Sensitivitäten (86, 117, 178). Folglich bedarf es vor allem für das Bienengift dringend einer Ergänzung der Bandbreite kommerziell erhältlicher Tests zum Nachweis sIgEs auf weitere rekombinante Allergene durch weitere ambitionierte Forschung.

Ebenfalls zu dieser Ansicht gelangten Neis et al. in einer Untersuchung an CCD-positiven Insektengiftallergikern. Auch wenn sie das Potenzial komponentenaufgelöster Diagnostik nicht bestritten, sahen sie die sIgE-Bestimmung auf rApi m 1 und rVes v5 als unzureichend an. Bis zur Einführung weiterer IgE-Nachweisverfahren auf rekombinante Allergene aus Insektengiften, hielten sie die zusätzliche Durchführung komplementärer In-vitro-Verfahren, wie beispielsweise des Basophilenaktivierungstests, für unverzichtbar (115).

Weitere Unterstützung unserer Erkenntnisse erfahren wir von Korošec et al.. 2013 veröffentlichten sie eine Studie über Patienten mit negativem insektengiftspezifischem IgE bei glaubhafter positiver Anaphylaxieanamnese. Das sIgE auf rApi m 1, rVes v 5 und rVes v 1 war lediglich bei 3 von 21 Patienten nachweisbar (3-mal rVes v 5-IgE) und ergab somit nur eine niedrige Sensitivität von 14% für rVes v 5-sIgE. Der Intrakutantest zeigte immerhin in 12 von 21 Fällen ein positives Ergebnis, allerdings war er bei 4 von 12 Patienten doppelpositiv. Entscheidendes Diagnostikum war auch in dieser Studie der Basophilenaktivierungstest mit einer Sensitivität von 81% und einer Spezifität von 85% (86).

In Anbetracht dieser Ergebnisse überzeugt die Flowzytometrie auch in der Anwendung bei Patienten mit negativem sIgE für Insektengift als unverzichtbares Werkzeug für den Kliniker und scheint den bisher kommerziell verfügbaren IgE-Nachweisverfahren auf rekombinante Allergene teilweise in dieser Fragestellung überlegen.

## 5 Zusammenfassung

Allergien auf Stiche von Bienen und Wespen stellen in Europa mit einer Prävalenz von 0,8-5% keine Seltenheit dar. Das klinische Bild reicht hierbei von einer Lokalreaktion mit Rötung und Schwellung bis hin zur potenziell letalen Anaphylaxie. Eine spezifische Immuntherapie mit Hymenopterengift kann im Falle einer Re-Exposition lebensrettend sein und stellt mit Erfolgsraten von bis zu 100% die wichtigste Therapieform bei der Insektengiftallergie dar. Der zur Verfügung stehende Goldstandard zur Diagnostik einer Insektengiftallergie, bestehend aus Anamnese, Hauttest und sIgE-Bestimmung auf Gesamtextrakte von Bienen- und Wespengift, wurde in neuerer Zeit durch die Bestimmung sIgEs auf einzelne Allergenkomponenten, sogenannte rekombinante Allergene, ergänzt.

Wir widmeten uns in der vorliegenden Studie einer Patientenklientel mit einer Sensibilisierung auf beide Insektenarten aufgrund des Nachweises von sIgE sowohl auf Bienen- als auch auf Wespengift, da die Entscheidung für das relevante Gift für die spezifische Immuntherapie in solchen Fällen mit Unsicherheiten einhergeht.

Die Frage nach der Wertigkeit des Basophilenaktivierungstests (BAT) sowie der Bestimmung sIgEs auf verfügbare rekombinante Allergene und auf kreuzreagierende Kohlenhydratketten (CCDs) bei Patienten mit doppelpositivem sIgE für Bienen- und Wespengift stand hierbei im Vordergrund.

22 Patienten mit sIgE auf Bienen- und Wespengift und einem oder mehreren vorangegangenen anaphylaktischen Stichereignissen wurden in die Untersuchung einbezogen, zehn weitere Personen mit negativem IgE auf Hymenopterengifte dienten als Kontrollen.

Wir bestimmten das spezifische IgE auf die Allergenkomponenten rApi m 1 des Bienen- sowie rVes v 5 des Wespengifts sowie auf MUX F3 aus Bromelain und auf die Meerrettichperoxidase (HRP) als Marker für die CCDs. Des Weiteren erfolgte die Durchführung des BAT (Flow2 CAST®, Fa. Bühlmann Laboratories AG, Schweiz) mit 5 unterschiedlichen Konzentrationen kommerziell erhältlichen Bienen- als auch Wespengifts sowie des Bromelains und der Meerrettichperoxidase. In 10 Fällen erfolgte zusätzlich die Antikörper-Bestimmung auf ausgewählte weitere rekombinante Allergene beider Hymenopterengifte (nApi m 1, rApi m 2, rApi m 3, rApi m 5, rApi m 10, rVes v 1, rVes v 2, rVes v 3, rVes v 5) mittels ELISA.

Anstatt eines üblicherweise angewandten prozentualen Cut-off-Wertes, erfolgte die Auswertung der BAT-Ergebnisse mittels einer Ratio, in die die Konzentration bei halbmaximaler Stimulation durch beide Gifte einging (C50 Biene/C50 Wespe). Werte  $< 0,1$  sprachen für eine klinisch relevante Sensibilisierung auf Bienengift, Werte zwischen 0,1 und 10 für eine klinisch relevante Doppelsensibilisierung auf Bienen- und Wespengift und Werte  $> 10$  für eine klinisch relevante Sensibilisierung auf Wespengift.

Die Interpretation der Ergebnisse der Flowzytometrie mit Bromelain und Meerrettichperoxidase erfolgte hingegen mittels von der FA. Bühlmann AG, Schönenbuch, Schweiz, festgesetzten Cut-off-Werte. Werte  $> 4\%$  für Bromelain bzw.  $> 7\%$  für die Meerrettichperoxidase galten als positiv.

Doppelt positive, doppelt negative bzw. einfach positive Ergebnisse bei der Bestimmung des sIgEs auf rApi m 1 und rVes v 5 fanden sich in 12, 1 bzw. 9 der 22 Fälle. Die sIgE-Bestimmung auf weitere rekombinante Allergene mittels ELISA zeigte bei den letzteren Fällen auf das andere Insektengift eine positive Reaktion bis auf einen Fall.

Anhand der Testergebnisse im BAT ergab sich eine klinisch relevante Monopositivität in 14 der 22 Fälle, in welchen wir eine spezifische Immuntherapie mit dem jeweiligen Hymenopterengift (8 Fälle mit Bienengift, 6 Fälle mit Wespengift) für indiziert hielten. Das anamnestisch angeschuldigte Insekt stand nur in einem Fall in Widerspruch zu diesen Ergebnissen. Eine Doppelpositivität im BAT ergab sich in 6 Fällen, eine Doppelnegativität in 2 Fällen, wobei anamnestisch nur 2 Patienten sicher auf beide Insektengifte reagiert hatten. Mittels sIgE-Bestimmung auf MUX F3 aus Bromelain und Meerrettichperoxidase (HRP) bzw. mittels BAT gelang bei 12 bzw. 16 der 22 Patienten der Nachweis einer Sensibilisierung auf kreuzreagierende Kohlenhydratketten (CCDs). Der BAT mit Bromelain bzw. Meerrettichperoxidase zeigte eine Sensitivität von 50% bzw. 81% und eine Spezifität von 91% bzw. 90%, bezogen auf die Ergebnisse der sIgE-Bestimmung.

Die sIgE-Bestimmung auf die zum Zeitpunkt der Studiendurchführung kommerziell erhältlichen sowie auf weitere rekombinante Allergene ergab in 21 der 22 Fälle eine genuine Doppelsensibilisierung auf Bienen- und Wespengiftallergene unabhängig von einer Sensibilisierung auf CCDs, wobei, beruhend auf den Ergebnissen des Basophilenaktivierungstests, nur 6 davon als klinisch relevant zu betrachten waren. Eine diagnostische Stichprovokation zur Überprüfung dieser Werte wurde aus ethischen Gründen allerdings nicht durchgeführt.

Auch die Bestimmung von sIgE auf CCDs im Patientenserum war für die Diagnostik einer klinisch relevanten Doppelpositivität nicht weiterführend, da ein Vorhandensein einer Sensibilisierung auf kreuzreagierende Kohlenhydratketten das Vorliegen einer Allergie gegen beide Hymenoptergifte nicht ausschloss. Darüber hinaus konnten mit dem BAT mehr Sensibilisierungen auf CCDs detektiert werden als mit der Bestimmung der sIgEs.

Als nicht invasives und somit für den Patienten ungefährliches Testverfahren mit hohen Sensitivitäten sowie mit der Möglichkeit einer Simultantestung mehrerer Allergene stellt der Basophilenaktivierungstest ein wertvolles und weiterführendes Diagnostikum dar. In Anbetracht von Aufwand und Kosten bleibt er bis dato schwierigen Fragestellungen vorbehalten und sollte ergänzend zu den Standardverfahren (Anamnese, sIgE, Hauttest) angewandt werden.

Die Erkenntnisse der hier durchgeführten Studie unterstützen den Kliniker in der Festlegung des therapeutischen Prozedere und in der Wahl des klinisch relevanten Gifts zur Hyposensibilisierung bei Patienten mit spezifischem IgE sowohl für Bienen- als auch für Wespengiftallergene. Dennoch wird die klinische Relevanz einer Doppelpositivität bei Insektengiftallergikern weiterhin wissenschaftlich detaillierter untersucht werden müssen.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Taxonomie der Hymenopteren (110).....	2
Abbildung 2: IgE-vermittelte allergische Reaktion (Typ I; 91).....	9
Abbildung 2: Durchführung des Basophilenaktivierungstests (24, 183).....	38
Abbildung 3: Aufbau eines Flowzytometers (143).....	39
Abbildung 4: Darstellung basophiler Reaktivität mittels Histogramm.....	40
Abbildung 5: Ordnung der Zellen (Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten) nach Größe und Granularität im Forward-Scatter- (FSC)/Side-Scatter-Diagramm (SSC) .....	41
Abbildung 6: Setzen eines Auswertungsfensters R1 (Gate) um Zellen mit hoher anti-CCR3-PE-Expression (basophile Granulozyten) .....	42
Abbildung 7: Aufzeichnung beider Identifizierungsmarker zueinander und Setzen von Quadranten in Dot-Plot-Ebene: Definition Fluorochrom-positiver Zellen und somit Detektion aktivierter basophiler Granulozyten im Upper-Right-Quadranten (prozentuale „Gated events“) .....	42
Abbildung 8: Bestimmung der halbmaximalen Konzentration mit Bienengift (Pat. Nr. 22) .....	44
Abbildung 9: Bestimmung der halbmaximalen Konzentration mit Bienengift .....	46
Abbildung 10: Bestimmung der halbmaximalen Konzentration mit Wespengift.....	46
Abbildung 11: Basophilen-Aktivierungstest mit verschiedenen Konzentrationen von Bromelain .....	47
Abbildung 12: Basophilen-Aktivierungstest mit verschiedenen Konzentrationen von HRP .....	47
Abbildung 13: Ausprägung des Anaphylaxiegrades nach Ring und Messmer .....	57
Abbildung 14: Anzahl positiver Ergebnisse in der Hauttestung.....	58
Abbildung 15: Übersicht sIgE-Klassen auf Bienengift.....	59
Abbildung 16: Übersicht sIgE-Klassen auf Wespengift .....	59
Abbildung 17: Anzahl der Patienten mit positivem Testergebnis im BAT auf die verschiedenen Konzentrationen von Bienengift (C1-C5).....	61
Abbildung 18: Anzahl der Patienten mit positivem Testergebnis im BAT auf die verschiedenen Konzentrationen von Wespengift (C1-C5) .....	62
Abbildung 19: Ergebnisse des Basophilenaktivierungstests nach Bestimmung der halbmaximalen Konzentration und Berechnung der Ratio C50 Bienengift/C50 Wespengift.....	63
Abbildung 20: BAT mit unterschiedlichen Konzentrationen von Bromelain und HRP (Mittelwerte aller Patienten).....	67

## 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des Bienen- und Wespengifts .....	6
Tabelle 2: Übersicht einzelner Hymenoptereingifte (108, 117, 122, 169, 185).....	6
Tabelle 3: Schweregradskala zur Klassifizierung der Anaphylaxie nach Ring und Messmer (141) .....	11
Tabelle 4: Wirkungsweise der Medikation bei anaphylaktischer Reaktion (140, 183) .....	20
Tabelle 5: Kontraindikationen spezifischer Immuntherapie (128) .....	22
Tabelle 6: Spezifische IgE-Klasseneinteilung gemäß UniCAP-System .....	31
Tabelle 7: Übersicht der Kontrollen sowie getesteten Allergene/Kohlenhydratepitope in ihrer jeweiligen Konzentration .....	36
Tabelle 8: Kriterien der Ratio.....	45
Tabelle 9: Charakteristika der Patienten (Nr. 1-28) im Hinblick auf Anamnese, Hauttest und Bestimmung sIgE Antikörper auf Bienen- und Wespengift, rApi m 1, rVes v 5, Bromelain und HRP .....	51
Tabelle 10: Ergebnisse (% CD63) der Patienten im Basophilen-Aktivierungstest.....	52
Tabelle 11: Übersicht der Kontrollen.....	55

## 1 Literaturverzeichnis

1. Aalberse, R.C., Koshte, V., Clemens, J.G.J.  
Immunoglobulin E antibodies that crossreact with vegetable foods, pollen, and Hymenoptera venom.  
*J Allergy Clin Immunol* 68 (1981) 356–364
2. Aalberse, R.C., Van Ree, R.  
Crossreactive carbohydrate determinants.  
*Clin Rev Allergy Immunol* 15 (1997) 375–387
3. Abuaf, N., Rajoely, B., Ghazouani, E., Levy, D.A., Pecquet, C., Chabane, H., Leynadier, F.  
Validation of a flow cytometric assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of muscle relaxant allergy.  
*J Allergy Clin Immunol* 104 (1999) 411–418
4. Altmann, F.  
The role of protein glycosylation in allergy.  
*Int Arch Allergy Immunol* 142 (2007) 99–115
5. Antonicelli, L., Bilò, M.B., Bonifazi, F.  
Epidemiology of Hymenoptera allergy.  
*Curr Opin Allergy Clin Immunology* 2 (2002) 341–346
6. Baker, T.W., Forester, J.P., Johnson, M.L., Stolfi, A., Stahl, M.C.  
The HIT study: Hymenoptera Identification Test—how accurate are people at identifying stinging insects?  
*Ann Allergy Asthma Immunol* 113 (2014) 267–70
7. Barnard, J.H.  
Studies of 400 Hymenoptera sting deaths in the United States.  
*J Allergy Clin Immunol* 52 (1973) 259–264
8. Bellinghausen, I., Metz, G., Enk, A.H., Christmann, S., Knop, J., Saloga, J.  
Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects.  
*Eur J Immunol* 27 (1997) 1131–1139

9. Benson, R.L., Semenov, H.  
Allergy in its relation to bee sting.  
*J Allergy* 1 (1930) 105–116
10. Bergmann, K.-C., Müsken, H.  
Durchführung und Bewertung des Intrakutantests.  
*Allergo J* 2 (1992) 55
11. Bergmann, K.-C., Müsken, H.  
Durchführung und Bewertung des Pricktests.  
*Allergo J* 1 (1992) 56–60
12. Bilo, B.M., Rueff, F., Mosbech, H., Bonifazi, F., Oude-Elberink, J.N.G., Birnbaum, J.,  
Bucher, C., Forster, J., Hemmer, W., Incorvia, C., Kontou Fili, K., Gawlik, R., Müller,  
U., Fernandez, J., Jarish, R., Jutel, M., Wüthrich, B.  
Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. EACCI Position Paper.  
*Allergy* 60 (2005) 1339–1349
13. Bilò, M.B., Bonifazi, F.  
The natural history and epidemiology of insect venom allergy: clinical implications.  
*Clin Exp Allergy* 39 (2009) 1467–1476
14. Bilò, M.B.  
Anaphylaxis caused by Hymenoptera stings: from epidemiology to treatment: Insect  
sting anaphylaxis.  
*Allergy* 66 (2011) 35–37
15. Blaauw, P.J., Smithuis, O.L., Elbers, A.R.  
The value of an in-hospital insect sting challenge as a criterion for application or  
omission of venom immunotherapy.  
*J Allergy Clin Immunol* 98 (1996) 39–47
16. Blaauw, P.J., Smithuis, L.O.M.J.  
The evaluation of the common diagnostic methods of hypersensitivity for bee and  
yellow jacket venom by means of an in-hospital insect sting.  
*J Allergy Clin Immunol* 75 (1985) 556–562
17. Blank, S., Seismann, H., Bockisch, B., Braren, I., Cifuentes, L., McIntyre, M., Ruhl, D.,  
Ring, J., Bredehorst, R., Ollert, M.W., Grunwald, T., Spillner, E.  
Identification, recombinant expression, and characterization of the 100 kDa high

- molecular weight hymenoptera venom allergens Api m 5 and Ves v 3.  
J Immunol 184 (2010) 5403–5413
18. Blank, S., Seismann, H., Michel, Y., McIntyre, M., Cifuentes, L., Braren, I., Grunwald, T., Darsow, U., Ring, J., Bredehorst, R., Ollert, M., Spillner, E.  
Api m 10, a genuine *A. mellifera* venom allergen, is clinically relevant but underrepresented in therapeutic extracts.  
Allergy 66 (2011) 1322–1329
19. Blank, S., Seismann, H., McIntyre, M., Ollert, M., Wolf, S., Bantleon, F.I., Spillner, E.  
Vitellogenins are new high molecular weight components and allergens (Api m 12 and Ves v 6) of *Apis mellifera* and *Vespula vulgaris* venom.  
PLoS ONE 8 (2013) e62009
20. Bochner, B.S.  
Systemic activation of basophils and eosinophils: Markers and consequences.  
J Allergy Clin Immunol 106 (2000) 292–302
21. Bonifazi, F., Jutel, M., Bilo, B.M., Birnbaum, J., Müller, U., the EAACI Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity  
Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice.  
Allergy 60 (2005) 1459–1470
22. Bonita, R., Beaglehole, R., Kjellström, T.  
Einführung in die Epidemiologie.  
Verlag Hans Huber, Hogrefe AG, Bern, 2008, 2. vollständig überarbeitete Auflage
23. Boumiza, R., Debard, A.-L., Monneret, G.  
The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives.  
Clin Mol Allergy 3 (2005) 9
24. Bühlmann Laboratories AG  
Flow2 CAST® Basophil Activation Test (BAT) Flow Cytometry. Arbeitsanweisung.  
Schönenbuch, Schweiz, 2008
25. Chirumbolo, S.  
The use of IL-3 in basophil activation tests is the real pitfall.  
Cytometry B Clin Cytom 80 (2011) 137–138

26. Chirumbolo, S.  
Basophil activation test in allergy: Time for an update?  
*Int Arch Allergy Immunol* 158 (2012) 99–114
27. Czech, W., Romacker, J., Diepgen, T., Schöpf, E., Kapp, A.  
Der Einfluß der Hyposensibilisierungstherapie mit Insektengift auf das Immunsystem -  
Parameter der zellulären Aktivierung.  
*Allergo J* 2 (1993) 113–117
28. de Graaf, D.C., Aerts, M., Danneels, E., Devreese, B.  
Bee, wasp and ant venomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting  
allergy.  
*J Proteomics* 72 (2009) 145–154
29. 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 diagnosis.  
*Allergy Clin Immunol News* 5 (1993) 9–14
30. Dreschler, K., Bratke, K., Petermann, S., Bier, A., Thamm, P., Kuepper, M., Virchow,  
J.C., Lommatzsch, M.  
Impact of immunotherapy on blood dendritic cells in patients with Hymenoptera venom  
allergy.  
*J Allergy Clin Immunol* 127 (2011) 487–494
31. Dudler, T., Chen, W.-Q., Wang, S., Schneider, T., Annand, R.R., Dempcy, R.O.,  
Cramer, R., Gmachl, M., Suter, M., Gelb, M.  
High-level expression in *Escherichia coli* and rapid purification of enzymatically active  
honey bee venom phospholipase A 2.  
*BBA LIPID MET* 1165 (1992) 201–210
32. Dvorak, A.M.  
A role for vesicles in human basophil secretion.  
*Cell Tissue Res* 293 (1998) 1–22
33. Eberlein-König, B., Przybilla, B.  
Mediatorfreisetzung nach Stichprovokation bei Insektengift-Allergie.  
*Allergo J* 2 (1993) 75–?
34. Eberlein-König, B., Rakoski, J., Behrendt, H., Ring, J.  
Use of CD63 expression as marker of in vitro basophil activation in identifying the

- culprit insect venom allergy.  
J Investig Allergol Clin Immunol 14 (2004) 10–16
35. Eberlein-König, B., Schmidt-Leidescher, C., Rakoski, J., Behrendt, H., Ring, J.  
In vitro basophil activation using CD63 expression in patients with bee and wasp venom allergy.  
J Investig Allergol Clin Immunol 16 (2006)
36. 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) 1084–1085
37. 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 B Clin Cytom 74B (2008) 201–210
38. Ebo, D.G., Faber, M., Sabato, V., Leysen, J., Bridts, C.H., De Clerck, L.S.  
Component-resolved diagnosis of wasp (yellow jacket) venom allergy.  
Clin Exp Allergy 43 (2013) 255–261
39. Ebo, D.G., Hagendorens, M.M., Bridts, C.H., De Clerck, L.S., Stevens, W.J.  
Sensitization to cross-reactive carbohydrate determinants and the ubiquitous protein film: mimickers of allergy.  
Clin Exp Allergy 34 (2004) 137–144
40. Ebo, D.G., Hagendorens, M.M., Bridts, C.H., De Clerck, L.S., Stevens, W.J.  
Hymenoptera venom allergy: taking the sting out of difficult cases.  
J Investig Allergol Clin Immunol 17 (2007) 357
41. Ebo, D.G., Hagendorens, M.M., Bridts, C.H., Schuerwegh, A.J., Stevens, W.J., De Clerck, L.S.  
In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow?  
Clin Exp Allergy 34 (2004) 332–339
42. Ebo, D.G., Hagendorens, M.M., Schuerwegh, A.J., Beirens, L.M.-N., Bridts, C.H., De Clerck, L.S., Stevens, W.J.  
Flow-assisted quantification of in vitro activated basophils in the diagnosis of wasp venom allergy and follow-up of wasp venom immunotherapy.  
Cytometry B Clin Cytom 72B (2007) 196–203

43. Ebo, D.G., Lechkar, B., Schuerwegh, A.J., Bridts, C.H., De Clerck, L.S., Stevens, W.J.  
Validation of a two-color flow cytometric assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of IgE-mediated natural rubber latex allergy.  
*Allergy* 57 (2002) 706–712
44. Egner, W., Ward, C., Brown, D.L., Ewan, P.W.  
The frequency and clinical significance of specific IgE to both wasp (*Vespula*) and honey-bee (*Apis*) venoms in the same patient.  
*Clin Exp Allergy* 28 (1998) 26–34
45. Erdmann, S.M., Sachs, B., Kwiecien, R., Moll-Slodowy, S., Sauer, I., Merk, H.F.  
The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy.  
*Allergy* 59 (2004) 1102–1109
46. Eržen, R., Košnik, M., Šilar, M., Korošec, P.  
Basophil response and the induction of a tolerance in venom immunotherapy: a long-term sting challenge study.  
*Allergy* 67 (2012) 822–830
47. Eržen, R., Korošec, P., Šilar, M., Mušič, E., Košnik, M.  
Carbohydrate epitopes as a cause of cross-reactivity in patients allergic to Hymenoptera venom.  
*Wien Klin Wochensh* 121 (2009) 349–352
48. Falcone, F.H., Haas, H., Gibbs, B.F.  
The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses.  
*Blood* 96 (2000) 4028–4038
49. Fischer, P., Külzer, R.  
Zur Prävalenz von Insektengift-Allergie in Deutschland.  
*Allergo J* 2 (1993) 53–56
50. Fletcher, R.H., Fletcher, S.W.  
Klinische Epidemiologie; Grundlagen und Anwendung.  
Verlag Hans Huber, Hogrefe AG, Bern, 2007, 2. Auflage
51. Fötisch, K., Vieths, S.  
N- and O-linked oligosaccharides of allergenic glycoproteins.  
*Glycoconj Journal* 18 (2001) 373–390

52. Freeman, T.M.  
Hypersensitivity to hymenoptera stings.  
N Engl J Med 351 (2004) 1978–1984
53. Frick, M., Müller, S., Bantleon, F., Huss-Marp, J., Lidholm, J., Spillner, E., Jakob, T.  
rApi m 3 and rApi m 10 improve detection of honey bee sensitization in Hymenoptera  
venom-allergic patients with double sensitization to honey bee and yellow jacket  
venom.  
Allergy 70 (2015) 1665–1668
54. Gamboa, P., Sanz, M.L., Caballero, M.R., Urrutia, I., Antepara, I., Esparza, R., de  
Weck, A.L.  
The flow-cytometric determination of basophil activation induced by aspirin and other  
non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is useful for in vitro diagnosis of the  
NSAID hypersensitivity syndrome.  
Clin Exp Allergy 34 (2004) 1448–1457
55. Ghannadan, M., Hauswirth, A.W., Scherthaner, G.-H., Müller, M.R., Klepetko, W.,  
Schatzl, G., Sperr, W., Bühring, H.J., Valent, P.  
Detection of novel CD antigens on the surface of human mast cells and basophils.  
Int Arch Allergy Immunol 127 (2002) 299–307
56. Goldberg, A., Confino-Cohen, R.  
Timing of venom skin tests and IgE determinations after insect sting anaphylaxis.  
J Allergy Clin Immunol 100 (1997) 182–184
57. Golden, D.B.K., Kagey-Sobotka, A., Norman, P.S., Hamilton, R.G., Lichtenstein, L.M.  
Insect sting allergy with negative venom skin test responses.  
J Allergy Clin Immunol 107 (2001) 897–901
58. Golden, D.B.  
Insect sting anaphylaxis.  
Immunol Allergy Clin North Am 27 (2007) 261–272
59. Golden, D.B.K.  
Advances in diagnosis and management of insect sting allergy.  
Ann Allergy Asthma Immunol 111 (2013) 84–89
60. Gordis, L.  
Epidemiologie.  
Kilian, Marburg, 2001, Dt. Erstausgabe

61. Graif, Y., Confino-Cohen, R., Goldberg, A.  
Reproducibility of skin testing and serum venom specific IgE in Hymenoptera venom allergy.  
*Ann Allergy Asthma Immunol* 96 (2006) 24–29
62. Habermann, E.  
Bee and wasp venoms.  
*Science* 177 (1972) 314–322
63. Hamilton, R.G.  
Diagnosis of hymenoptera venom sensitivity.  
*Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2 (2002) 347–351
64. Hemmer, W.  
Kreuzreaktivität auf Bienen- und Wespengift.  
*Hautarzt*. 59 (2008) 194–199
65. Hemmer, W., Focke, M., Kolarich, D., Wilson, I.B.H., Altmann, F., Wöhrl, S., Götz, M., Jarisch, R.  
Antibody binding to venom carbohydrates is a frequent cause for double positivity to honeybee and yellow jacket venom in patients with stinging-insect allergy.  
*J Allergy Clin Immunol* 108 (2001) 1045–1052
66. Hider, R.C.  
Honeybee venom: A rich source of pharmacologically active peptides.  
*Endeavour* 12 (1988) 60–65
67. Hoffmann, H.J., Santos, A.F., Mayorga, C., Nopp, A., Eberlein, B., Ferrer, M., Rouzair, P., Ebo, D.G., Sabato, V., Sanz, M.L., Pecaric-Petkovic, T., Patil, S.U., Hausmann, O.V., Shreffler, W.G., Korosec, P., Knol, E.F.  
The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease.  
*Allergy* 70 (2015) 1393–1405
68. Hofmann, S.C., Pfender, N., Weckesser, S., Huss-Marp, J., Jakob, T.  
Added value of IgE detection to rApi m 1 and rVes v 5 in patients with Hymenoptera venom allergy.  
*J Allergy Clin Immunol* 127 (2011) 265–267
69. Jappe, U., Raulf-Heimsoth, M., Hoffmann, M., Burow, G., Hubsch-Müller, C., Enk, A.  
In vitro hymenoptera venom allergy diagnosis: improved by screening for cross-reactive

- carbohydrate determinants and reciprocal inhibition.  
Allergy 61 (2006) 1220–1229
70. Jeep, S., Kirchhof, E., O'Connor, A., Kunkel, G.  
Comparison of the Phadebas RAST with the Pharmacia CAP system for insect venom.  
Allergy 47 (1992) 212–217
71. Jentsch, J.  
Bienengift-Zusammensetzung und Wirkung.  
Biologie in unserer Zeit 8 (1978) 75–81
72. Jeßberger, B., Rakoski, J., Karl, S., Bübl, R., Borelli, S.  
Hyposensibilisierung mit Insektengiften trotz bestehender Kontraindikation.  
Allergo J 2 (1993) 84–89
73. Kampelmacher, M.J., Zwan, J.  
Provocation test with a living insect as a diagnostic tool in systemic reactions to bee and wasp venom: a prospective study with emphasis on the clinical aspects.  
Clin Exp Allergy 17 (1987) 317–327
74. Kepley, C.L., Youssef, L., Andrews, R.P., Wilson, B.S., Oliver, J.M.  
Syk deficiency in nonreleaser basophils.  
J Allergy Clin Immunol 104 (1999) 279–284
75. Kettner, A., Hughes, G.J., Frutiger, S., Astori, M., Roggero, M., Spertini, F., Corradin, G.  
Api m 6: A new bee venom allergen.  
J Allergy Clin Immunol 107 (2001) 914–920
76. Kim, M.S., Cho, Y.J.  
Flow cytometry-assisted basophil activation test as a safe diagnostic tool for Aspirin/NSAID hypersensitivity.  
Allergy Asthma Immunol Res 4 (2012) 137
77. King, T.P., Lu, G., Gonzalez, M., Qian, N., Soldatova, L.  
Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: Sequence similarity and antigenetic cross-reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy.  
J Allergy Clin Immunol 98 (1996) 588–600

78. King, T.P., Sobotka, A.K., Kochoumian, L., Lichtenstein, L.M.  
Allergens of honey bee venom.  
Arch Biochem Biophys 172 (1976) 661–671
79. King, T.P., Spangfort, M.D.  
Structure and biology of stinging insect venom allergens.  
Int Arch Allergy Immunol 123 (2000) 99–106
80. King, T.P., Alagon, A.C., Kuan, J., Sobotka, A.K., Lichtenstein, L.M.  
Immunochemical studies of yellowjacket venom proteins.  
Mol Immunol 20 (1983) 297–308
81. Knol, E.F., Mul, F.P., Jansen, H., Calafat, J., Roos, D.  
Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435.  
J Allergy Clin Immunol 88 (1991) 328–338
82. Kochuyt, A.-M., Van Hoeyveld, E.M., Stevens, E.A.M.  
Prevalence and clinical relevance of specific immunoglobulin E to pollen caused by sting- induced specific immunoglobulin E to cross-reacting carbohydrate determinants in Hymenoptera venoms.  
Clin Exp Allergy 35 (2005) 441–447
83. Köhler, J., Blank, S., Müller, S., Bantleon, F., Frick, M., Huss-Marp, J., Lidholm, J., Spillner, E., Jakob, T.  
Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy.  
J Allergy Clin Immunol 133 (2014) 1383–1389
84. Kolarich, D., Leonard, R., Hemmer, W., Altmann, F.  
The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespula vulgaris*.  
FEBS J 272 (2005) 5182–5190
85. Korošec, P., Erzen, R., Silar, M., Bajrovic, N., Kopac, P., Košnik, M.  
Basophil responsiveness in patients with insect sting allergies and negative venom-specific immunoglobulin E and skin prick test results.  
Clin Exp Allergy 39 (2009) 1730–1737
86. Korošec, P., Silar, M., Eržen, R., Celesnik, N., Bajrovic, N., Zidarn, M., Košnik, M.  
Clinical routine utility of basophil activation testing for diagnosis of Hymenoptera-

- allergic patients with emphasis on individuals with negative venom-specific IgE antibodies.  
Int Arch Allergy Immunol 161 (2013) 363–368
87. Korošec, P., Valenta, R., Mittermann, I., Celesnik, N., Silar, M., Zidarn, M., Košnik, M.  
High sensitivity of CAP-FEIA rVes v 5 and rVes v 1 for diagnosis of *Vespula* venom allergy.  
J Allergy Clin Immunol 129 (2012) 1406–1408
88. Kucera, P., Cvackova, M., Hulikova, K., Juzova, O., Pachl, J.  
3 Basophil activation can predict clinical sensitivity in patients after venom immunotherapy.  
J Investig Allergol Clin Immunol 20 (2010) 110
89. Kucharewicz, I., Bodzenta-Lukaszyk, A., Szymanski, W., Mroczko, B., Szmitkowski, M.  
Basal serum tryptase level correlates with severity of hymenoptera sting and age.  
J Investig Allergol Clin Immunol 17 (2007) 65
90. Kuchler, K., Gmachl, M., Sippl, M.J., Kreil, G.  
Analysis of the cDNA for phospholipase A2 from honeybee venom glands.  
Eur J Biochem 184 (1989) 249–254
91. Kumar, S., Kumar Verna, A., Das, M., Dwivedi, P.D.  
Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy.  
Int Immunopharmacol 13 (2012) 432–439
92. Kvedariene, V., Kamey, S., Ryckwaert, Y., Rongier, M., Bousquet, J., Demoly, P., Arnoux, B.  
Diagnosis of neuromuscular blocking agent hypersensitivity reactions using cytofluorimetric analysis of basophils.  
Allergy 61 (2006) 311–315
93. Larsen, J.N., Lowenstein, H.  
Allergen nomenclature.  
J Allergy Clin Immunol 97 (1996) 577–578
94. Lee, J.A., Spidlen, J., Boyce, K., Cai, J., Crosbie, N., Dalphin, M., Furlong, J., Gasparetto, M., Goldberg, M., Goralczyk, E.M., Hyun, B., Jansen, K., Kollmann, T., Kong, M., Leif, R., McWeeney, S., Moloshok, T.D., Moore, W., Nolan, G., Nolan, J., Nikolich-Zugich, J., Parrish, D., Purcell, B., Quian, Y., Selvaraj, B., Smith, C.,

- Tchuvatkina, O., Wertheimer, A., Wilkinson, P., Wilson, C., Wood, J., Zigon, R., The International Society for Advancement of Cytometry Data Standards Task Force, Scheuermann, R.H., Brinkman, R.R.  
MIFlowCyt: the minimum information about a Flow Cytometry Experiment.  
*Cytometry A* 73 (2008) 926–930
95. Leimgruber, A., Mosimann, B., Claeys, M., Seppey, M., Jaccard, Y., Aubert, V., Peitrequin, R., Nisoli, M.-P., Pecoud, A.  
Clinical evaluation of a new in-vitro assay for specific IgE, the immuno CAP system.  
*Clin Exp Allergy* 21 (1991) 127–131
96. Lichtenstein, L.M., Valentine, M.D., Sobotka, A.K.  
Insect allergy: The state of the art.  
*J Allergy Clin Immunol* 64 (1979) 5–12
97. Lieberman, P.L.  
Recognition and first-line treatment of anaphylaxis.  
*Am J Med* 127 (2014) 6–11
98. Light, W.C., Reisman, R.E., Rosario, N.A., Arbesman, C.E.  
Comparison of the allergenic properties of bee venom and whole bee body extract.  
*Clin Exp Allergy* 6 (1976) 293-300
99. Malandain, H.  
IgE-reactive carbohydrate epitopes-Classification, cross-reactivity, and clinical impact.  
*Eur Ann Allergy Clin Immunol* 37 (2005) 122–128
100. Malandain, H.  
IgE-reactive carbohydrate epitopes-Classification, cross-reactivity, and clinical impact (2nd Part).  
*Eur Ann Allergy Clin Immunol* 37 (2005) 247–256
101. Malling, H.-J.  
Immunotherapy.  
*Allergy* 43 (1988) 9–33
102. Mari, A.  
IgE to cross-reactive carbohydrate determinants: Analysis of the distribution and appraisal of the in vivo and in vitro reactivity.  
*Int Arch Allergy Immunol* 129 (2002) 286–295

103. Matysiak, J., Matysiak, J., Breborowicz, A., Kokot, Z.J.  
Diagnosis of hymenoptera venom allergy-with special emphasis on honeybee (*Apis mellifera*) venom allergy.  
*Ann Agric Environ Med* 20 (2013) 875–879
104. McGowan, E.C., Saini, S.  
Update on the performance and application of basophil activation tests.  
*Curr Allergy Asthma Rep* 13 (2013) 101–109
105. Michel, Y., McIntyre, M., Ginglinger, H., Ollert, M., Cifuentes, L., Blank, S., Spillner, E.  
2 The putative serine protease inhibitor Api m 6 from *Apis mellifera* venom: Recombinant and structural evaluation.  
*J Investig Allergology Clin Immunol* 22 (2012) 476
106. Mittermann, I., Zidarn, M., Silar, M., Markovic-Housley, Z., Aberer, W., Korošec P, Košnik, M., Valenta, R.  
Recombinant allergen-based IgE testing to distinguish bee and wasp allergy.  
*J Allergy Clin Immunol* 125 (2010) 1300–1307
107. Müller, U., Mosbech, H.  
Position Paper: Immunotherapy with Hymenoptera venoms.  
*Allergy* 48 (1993) 37–46
108. Müller, U., Schmid-Grendelmeier, P., Hausmann, O., Helbling, A.  
IgE to recombinant allergens Api m 1, Ves v 1, and Ves v 5 distinguish double sensitization from crossreaction in venom allergy.  
*Allergy* 67 (2012) 1069–1073
109. Müller, U., Helbling, A., Berchtold, E.  
Immunotherapy with honeybee venom and yellow jacket venom is different regarding efficacy and safety.  
*J Allergy Clin Immunol* 89 (1992) 529–535
110. Müller, U.R.  
„Insektenstichallergie: Klinik, Diagnostik und Therapie“  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 1988
111. Müller, U.R.  
New developments in the diagnosis and treatment of hymenoptera venom allergy.  
*Int Arch Allergy Immunol* 124 (2001) 447–453

112. Müller, U.R.  
Insect venoms.  
In: “Anaphylaxis. Chem Immunol Allergy”, Ring, J. (Hrsg.)  
Karger, Basel, 2010, 141-156
113. Müller, U.R., Johansen, N., Petersen, A.B., Fromberg-Nielsen, J., Haeberli, G.  
Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and *Vespula* venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m1 and Ves v5.  
*Allergy* 64 (2009) 543–548
114. Müller, U.R.  
Recombinant Hymenoptera venom allergens.  
*Allergy* 57 (2002) 570–576
115. Neis, M.M., Merk, H.F.  
Value of component based diagnostics in IgE-mediated hymenoptera sting reactions.  
*Cutan Ocul Toxicol* 31 (2012) 117–123
116. Nguyen, K.-L., Gillis, S., MacGlashan Jr., D.W.  
A comparative study of releasing and nonreleasing human basophils: nonreleasing basophils lack an early component of the signal transduction pathway that follows IgE cross-linking.  
*J Allergy Clin Immunol* 85 (1990) 1020–1029
117. Ollert, M., Blank, S.  
Anaphylaxis to insect venom allergens: Role of molecular diagnostics.  
*Curr Allergy Asthma Rep* 15 (2015) 1-11
118. Ott, H., Baron, J., Merk, H.F.  
In-vitro-Testungen in der Allergologie.  
*Hautarzt* 57 (2006) 502–508
119. Ott, H., Wosnitza, M., Merk, H.F.  
Immunologische Verlaufsparemeter unter spezifischer Immuntherapie.  
*Hautarzt* 59 (2008) 551–556
120. Ozdemir, C., Kucuksezer, U.C., Akdis, M., Akdis, C.A.  
Mechanisms of immunotherapy to wasp and bee venom: Mechanisms in venom immunotherapy.  
*Clin Exp Allergy* 41 (2011) 1226–1234

121. Patil, S.U, Shreffler, W.G.  
BATting above average: Basophil activation testing for peanut allergy.  
J Allergy Clin Immunol 134 (2014) 653–654
122. Perez-Riverol, A., Justo-Jacomini, D., Zollner, R., Brochetto-Braga, M.  
Facing Hymenoptera venom allergy: From natural to recombinant allergens.  
Toxins 7 (2015) 2551–2570
123. Pesek, R.D., Lockey, R.F.  
Treatment of Hymenoptera venom allergy: an update.  
Curr Opin Allergy Clin Immunol 14 (2014) 340–346
124. Pesek, R.D., Lockey, R.F.  
Management of insect sting hypersensitivity: An update.  
Allergy Asthma Immunol Res 5 (2013) 129-137
125. Peternelj, A., Silar, M., Bajrovic, N., Adamic, K., Music, E., Košnik, M, Korošec, P.  
Diagnostic value of the basophil activation test in evaluating Hymenoptera venom sensitization.  
Wien Klin Wochenschr 121 (2009) 344–348
126. Phadia: Testprinzip ImmunoCAP Spezifisches IgE unter:  
[www.phadia.com/de/4/Produkte/Tests/1/Testprinzip-ImmunoCAP-Spezifisch-IgE/](http://www.phadia.com/de/4/Produkte/Tests/1/Testprinzip-ImmunoCAP-Spezifisch-IgE/)  
(Stand: 11.03.2017)
127. Pignatti, P., Yacoub, M.-R., Testoni, C., Pala, G., Corsetti, M., Colombo, G., Meriggi, A., Moscato, G.  
Evaluation of basophil activation test in suspected food hypersensitivity.  
Cytometry B Clin Cytom 2015
128. Pitsios, C., Demoly, P., Bilò, M.B., Gerth van Wijk, R., Pfaar, O., Sturm, G.J., Rodriguez del Rio, P., Tsoumani, M., Gawlik, R., Paraskevopoulos, G., Ruëff, F., Valovirta, E., Papadopoulos, N.G., Calderón, M.A.  
Clinical contraindications to allergen immunotherapy: an EAACI position paper.  
Allergy 70 (2015) 897–909
129. Plewig, G., Landthaler, M., Burgdorf, W.H.C., Hertl, M., Ruzicka, T.  
Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie (Band 1 & 2).  
Springer, Berlin Heidelberg, 2012, 6. Auflage

130. Przybilla, B., Ring, J., Ruëff, F.  
Anaphylaxie: Klinisches Bild und Diagnose.  
Hautarzt 58 (2007) 1025–1031
131. Przybilla, B., Ring, J., Wielgosch, J.  
Der Basophilen-Histamin-Freisetzungstest als diagnostische Methode bei  
Hymenoptereingift-Allergie.  
Hautarzt 39 (1988) 662–670
132. Przybilla, B.  
Hymenoptereingiftallergie: Lebensbedrohlich, aber heilbar.  
Hautarzt 59 (2008) 182–183
133. Przybilla, B., Ruëff, F., Walker, A., Rawer, H.-C., Aberer, W., Bauer, C.P., Berdel, D.,  
Biedermann, T., Brockow, K., Forster, J., Fuchs, T., Hamelmann, E., Jakob, T., Jarisch,  
R., Merk, H.F., Muller, U., Ott, H., Sitter, W., Urbanek, R., Wedi, B.  
Diagnose und Therapie der Bienen- und Wespengiftallergie.  
Allergo J 20 (2011) 318–339
134. Przybilla, B., Ruëff, F.  
Hymenoptera venom allergy.  
JDDG: J Dtsch Dermatol Ges 8 (2010) 114-129
135. Reimers, A., Muller, U.  
Labordiagnostik bei der Insektengiftallergie.  
J Lab Med 26 (2002) 115–119
136. Reimers, A., Muller, U.  
Bienen- und Wespengiftallergie.  
Schweiz Med Forum 4 (2004) 661–665
137. Reisman, R.E., Muller, U.R., Wypych, J.I., Lazell, M.I.  
Studies of coexisting honeybee and vespidae-venom sensitivity.  
J Allergy Clin Immunol 73 (1984) 246–252
138. Reisman, R.E.  
Insect sting allergy: The dilemma of the negative skin test reactor.  
J Allergy Clin Immunol 107 (2001) 781–782
139. Rieger-Ziegler, V., Rieger, E., Kranke, B., Aberer, W.  
Hymenoptera venom allergy: time course of specific IgE concentrations during the first

- weeks after a sting.  
Int Arch Allergy Immunol 120 (1999) 166–168
140. Ring J, Beyer K, Biedermann T, Bircher A, Duda D, Fischer J, Friedrichs, F., Fuchs, T., Gieler, U., Jakob, T., Klimek, L., Lange, L., Merk, H.F., Niggemann, B., Pfaar, O., Przybilla, B., Ruëff, F., Rietschel, E., Schnadt, S., Seifert, R., Sitter, H., Varga, E.-M., Worm, M., Brockow, K.  
Guideline for acute therapy and management of anaphylaxis: S2 Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI), the Association of German Allergologists (AeDA), the Society of Pediatric Allergy and Environmental Medicine (GPA), the German Academy of Allergology and Environmental Medicine (DAAU), the German Professional Association of Pediatricians (BVKJ), the Austrian Society for Allergology and Immunology (ÖGAI), the Swiss Society for Allergy and Immunology (SGAI), the German Society of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine (DGAI), the German Society of Pharmacology (DGP), the German Society for Psychosomatic Medicine (DGPM), the German Working Group of Anaphylaxis Training and Education (AGATE) and the patient organization German Allergy and Asthma Association (DAAB).  
Allergo J Int 23 (2014) 96–112
141. Ring, J., Messmer, K.  
Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes.  
Lancet 1 (1977) 466–469
142. Ring, J.  
Angewandte Allergologie.  
Urban & Vogel, München, 2007, 3., neu bearbeitete Auflage. München
143. Rothe, G.  
Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie.  
In: „Zelluläre Diagnostik“ Karger Publishers (2006) 27-70
144. Ruëff, F., Jappe, U., Przybilla, B.  
Standards und Fallstricke der In-vitro-Diagnostik der Insektengiftallergie.  
Hautarzt 61 (2010) 938–945
145. Ruëff, F., Przybilla, B., Müller, U., Mosbech, H.  
The sting challenge test in Hymenoptera venom allergy: Position paper of the subcommittee on insect venom allergy of the European Academy of Allergology and

- Clinical Immunology.  
Allergy 51 (1996) 216–225
146. Ruëff, F., Przybilla, B.  
Stichprovokation: Indikation und Durchführung.  
Hautarzt 65 (2014) 796–801
147. Ruëff, F., Przybilla, B., Biló, M.B., Müller, U., Scheipl, F., Aberer, W., Birnbaum, J., Bodzenta-Lukaszyk, A., Bonifazi, F., Bucher, C., Campi, P., Darsow, U., Egger, C., Haeberli, G., Hawranek, T., Körner, M., Kucharewicz, I., Küchenhoff, H., Lang, R., Quercia, O., Reider, N., Severino, M., Sticherling, M., Sturm, G.J., Wüthrich, B.  
Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: Importance of baseline serum tryptase—a study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity.  
J Allergy Clin Immunol 124 (2009) 1047–1054
148. Ruëff, F., Przybilla, B., Biló, M.B., Müller, U., Scheipl, F., Seitz, M.J., Aberer, W., Bodzenta-Lukaszyk, A., Bonifazi, F., Campi, P., Darsow, U., Haeberli, G., Hawranek, T., Küchenhoff, H., Lang, R., Quercia, O., Reider, N., Schmid-Grendelmeier, P., Severino, M., Sturm, G.J., Treudler, R., Wüthrich, B.  
Clinical effectiveness of Hymenoptera venom immunotherapy: A prospective observational multicenter study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity.  
PLoS ONE 8 (2013) e63233
149. Sainté-Laudy, J., Sabbah, A., Drouet, M., Lauret, M.G., Loiry, M.  
Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release.  
Clin Exp Allergy 30 (2000) 1166–1171
150. Sainté-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
151. Saloga, J., Klimek, L., Buhl, R., Mann, W., Knop, J., Grabbe, S.  
Allergologie-Handbuch; Grundlagen und klinische Praxis.  
Schattauer, Stuttgart, Germany, 2012, 2. Auflage

152. Sampson, H.A., Muñoz-Furlong, A., Campbell, R.L., Adkinson, N.F., Allan Bock, S., Branum, A., Brown, S.G.A., Camargo Jr., C.A., Cydulka, R., Gruchella, R.S., Harlor, A.D., Hepner, D.L., Lewis, L.M., Liebermann, P.L., Metcalfe, D.D., O'Connor, R., Muraro, A., Rudman, A., Schmitt, C., Scherrer, D., Simons, F.E., Thomas, S., Wood, J.P., Decker, W.W.  
Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: Summary report—Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network Symposium.  
*Ann Emerg Med* 47 (2006) 373–380
153. Santos, A.F., Douiri, A., Bécares, N., Wu, S.-Y., Stephens, A., Radulovic, S., Chan, S.M.H., Fox, A.T., Du Toit, G., Turcanu, V., Lack, G.,  
Basophil activation test discriminates between allergy and tolerance in peanut-sensitized children.  
*J Allergy Clin Immunol* 134 (2014) 645–652
154. Sanz, M.L., Gamboa, P.M., García-Avilés, C., Vila, L., Diéguez, I., Antépara, I., de Weck, A.L.  
Flow-cytometric cellular allergen stimulation test in latex allergy.  
*Int Arch Allergy Immunol* 130 (2003) 33–39
155. Sanz, M.L., Gamboa, P.M., de Weck, A.L.  
In vitro tests: basophil activation tests  
In: „Drug Hypersensitivity”, Pichler, W.J. (Hrsg.) Karger, Basel, 2007, 391–402
156. Schäfer, T., Przybilla, B.  
IgE antibodies to Hymenoptera venoms in the serum are common in the general population and are related to indications of atopy.  
*Allergy* 51 (1996) 372–377
157. Scherer, K., Weber, J.M., Jermann, T.M., Krautheim, A., Tas, E., Ueberschlag, E.V., Cammarata, M., Bircher, A.J.  
Cellular in vitro assays in the diagnosis of hymenoptera venom allergy.  
*Int Arch Allergy Immunol* 146 (2008) 122–132
158. Scheurer, S.  
Improvement of the diagnosis of allergy by using purified allergens.  
*Clin Exp Allergy* 36 (2006) 1483–1486

159. Schlenvoigt, G., Müller, M., Jäger, L., Wenz, W.  
In-vitro-Untersuchungen zum Auftreten von Doppelsensibilisierungen und ihre  
Charakterisierung bei Insektengiftallergikern.  
*Allergologie* 19 (1996) 461–464
160. Schmid-Grendelmeier, P., Cramer, R.  
Recombinant allergens for skin testing.  
*Int Arch Allergy Immunol* 125 (2001) 96–111
161. Schroeder, J.T., Chichester, K.L., Bieneman, A.P.  
Human basophils secrete IL-3: Evidence of autocrine priming for phenotypic and  
functional responses in allergic disease.  
*J Immunol* 182 (2009) 2432–2438
162. Schwartz, H.J., Sutheimer, C., Gauerke, M.B., Yunginger, J.W.  
Hymenoptera venom-specific IgE antibodies in post-mortem sera from victims of  
sudden, unexpected death.  
*Clin Exp Allergy* 18 (1988) 461–468
163. Seismann, H., Blank, S., Braren, I., Greunke, K., Cifuentes, L., Grunwald, T.,  
Bredehorst, R., Ollert, M., Spillner, E.  
Dissecting cross-reactivity in hymenoptera venom allergy by circumvention of  $\alpha$ -1,3-  
core fucosylation.  
*Mol Immunol* 47 (2010) 799–808
164. Seismann, H., Blank, S., Cifuentes, L., Braren, I., Bredehorst, R., Grunwald, T., Ollert,  
M., Spillner, E.  
Recombinant phospholipase A1 (Ves v 1) from yellow jacket venom for improved  
diagnosis of hymenoptera venom hypersensitivity.  
*Clin Mol Allergy* 8 (2010) 1
165. Shin, Y.S., Liu, J.N., Hur, G.-Y., Hwang, E.-K., Nam, Y.H., Jin, H.J., Lee, S.M., Ye,  
Y.M., Nahm, D.-H., Park, H.S.  
Clinical features and the diagnostic value of component allergen-specific IgE in  
Hymenoptera venom allergy.  
*Allergy Asthma Immunol Res* 4 (2012) 284
166. Smith, P., Kagey-Sobotka, A., Bleecker, E.R., Traystman, R., Kaplan, A.P., Gralinck,  
H., Valent, P., Permutt, S., Lichtenstein, L.M.

- Physiologic manifestations of human anaphylaxis.  
J Clin Invest 66 (1980) 1072–1080
167. Solley, G.O., Vanderwoude, C., Knight, G.K.  
Anaphylaxis due to Red Imported Fire Ant sting.  
Med J Aust 176 (2002) 521–523
168. Song, W.-J., Chang, Y.-S.  
Recent applications of basophil activation tests in the diagnosis of drug hypersensitivity.  
Asia Pac Allergy 3 (2013) 266
169. Spillner, E., Blank, S., Jakob, T.  
Hymenoptera allergens: From venom to “venome”.  
Front Immunol 5 (2014) 77
170. Spornraft-Ragaller, P., Schill, W.-B.  
Erfahrungen mit der In-vitro-Histaminfreisetzung in der Diagnostik Insektengift-  
allergischer Reaktionen.  
Allergo J 2 (1993) 62–67
171. Stahel, W.A.  
Statistische Datenanalyse.  
Friedr. Vieweg & Sohn Verlag, Wiesbaden, 2008, 5. überarbeitete Auflage
172. Stoevesandt, J., Hain, J., Kerstan, A., Trautmann, A.  
Over- and underestimated parameters in severe Hymenoptera venom-induced  
anaphylaxis: Cardiovascular medication and absence of urticaria/angioedema.  
J Allergy Clin Immunol 30 (2012) 698–704
173. Stoevesandt, J., Hofmann, B., Hain, J., Kerstan, A., Trautmann, A.  
Single venom-based immunotherapy effectively protects patients with double positive  
tests to honey bee and *Vespula* venom.  
Allergy Asthma Clin Immunol 9 (2013) 1
174. Straumann, F., Bucher, C., Wüthrich, B.  
Double sensitization to honeybee and wasp venom: immunotherapy with one or with  
both venoms?  
Int Arch Allergy Immunol 123 (2000) 268–274
175. 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

176. Sturm, G.J., Kranzelbinder, B., Sturm, E.M., Heinemann, A., Groselj-Strele, A., Aberer, W.  
The basophil activation test in the diagnosis of allergy: technical issues and critical factors.  
*Allergy* 64 (2009) 1319–1326
177. Sturm, G.J., Biló, M.B., Bonadonna, P., Hemmer, W., Caruso, B., Bokanovic, D., Aberer, W.  
Ves v 5 can establish the diagnosis in patients without detectable specific IgE to wasp venom and a possible north-south difference in Api m 1 sensitization in Europe.  
*J Allergy Clin Immunol* 130 (2012) 817
178. Sturm, G.J., Hemmer, W., Hawranek, T., Lang, R., Ollert, M., Spillner, E., Blank, S., Bokanovic, D., Aberer, W.  
Detection of IgE to recombinant Api m 1 and rVes v 5 is valuable but not sufficient to distinguish bee from wasp venom allergy.  
*J Allergy Clin Immunol* 128 (2011) 247–248
179. Sturm, G.J., Jin, C., Kranzelbinder, B., Hemmer, W., Sturm, E.M., Griesbacher, A., Heinemann, A., Vollmann, J., Altmann, F., Crailsheim, K., Focke, M., Aberer, W.  
Inconsistent results of diagnostic tools hamper the differentiation between bee and vespine venom allergy.  
*PLoS ONE* 6 (2011) e20842
180. Sturm, G.J., Kranzelbinder, B., Schuster, C., Sturm, E.M., Bokanovic, D., Vollmann, J., Crailsheim, K., Hemmer, W., Aberer, W.  
Sensitization to Hymenoptera venoms is common, but systemic sting reactions are rare.  
*J Allergy Clin Immunol* 133 (2014) 1635–1643
181. Sturm, G.J., Schuster, C., Kranzelbinder, B., Wiednig, M., Groselj-Strele, A., Aberer, W.  
Asymptomatic sensitization to Hymenoptera venom is related to total immunoglobulin E levels.  
*Int Arch Allergy Immunol* 148 (2009) 261–264
182. Terwilliger, T.C., Eisenberg, D.  
The structure of melittin. II. Interpretation of the structure.  
*J Biol Chem* 257 (1982) 6016–6022

183. Trautmann, A., Kleine-Tebbe, J.  
Allergologie in Klinik und Praxis; Allergene-Diagnostik-Therapie.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 2013, 2. Auflage
184. Tretter, V., Altmann, F., Kubelka, V., Marz, L., Becker, W.  
Fucose alpha 1,3-linked to the core region of glycoprotein N-glycans creates an important epitope for IgE from honeybee venom allergic individuals.  
Int Arch Allergy Immunol 102 (1993) 259–266
185. Treudler, R.  
in-vitro-Allergiediagnostik aktuell.  
J Dtsch Dermatol Ges 10 (2012) 89–100
186. Uyttebroek, A.P., Sabato, V., Leysen, J., Bridts, C.H., De Clerck, L.S., Ebo, D.G.  
Flowcytometric diagnosis of atracurium-induced anaphylaxis.  
Allergy 69 (2014) 1324–1332
187. Valent, P., Scherthaner, G.-H., Sperr, W.R., Fritsch, G., Agis, H., Willheim, M., Bühring, H.-J., Orfao, A., Escribano, L.  
Variable expression of activation-linked surface antigens on human mast cells in health and disease.  
Immunol Rev 179 (2001) 74–81
188. Valent, P., Bettelheim, P.  
The human basophil.  
Crit Rev Oncol Hematol 10 (1990) 327–352
189. van Anrooij, B., van der Veer, E., de Monchy, J.G.R., van der Heide, S., Kluijn-Nelemans, J.C., van Voorst Vader, P.C., van Doormaal, J.J., Oude Elberink, J.N.G.  
Higher mast cell load decreases the risk of Hymenoptera venom-induced anaphylaxis in patients with mastocytosis.  
J Allergy Clin Immunol 132 (2013) 125–130
190. van der Linden, P.-W.G., Hack, C.E.  
Clinical aspects of allergic disease.  
J Allergy Clin Immunol 94 (1994) 151–159
191. van Halteren, H.K., van der Linden, P.-W.G., Burgers, J.A., Bartelink, A.K.  
Discontinuation of yellow jacket venom immunotherapy: follow-up of 75 patients by means of deliberate sting challenge.  
J Allergy Clin Immunol 100 (1997) 767–770

192. van Ree, R.  
Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases.  
*Int Arch Allergy Immunol* 129 (2002) 189–197
193. Varga, E.-M., Francis, J.N., Zach, M.S., Klunker, S., Aberer, W., Durham, S.R.  
Time course of serum inhibitory activity for facilitated allergen-IgE binding during bee venom immunotherapy in children.  
*Clin Exp Allergy* 39 (2009) 1353–1357
194. Vetter, R.S., Visscher, P.K.  
Bites and stings of medically important venomous arthropods.  
*Int J Dermatol* 37 (1998) 481–496
195. Warpinski, J.R., Bush, R.K.  
Stinging insect allergy.  
*J Wilderness Med* 1 (1990) 249–257
196. Wedi, B., Kapp, A.  
Spezifische Immuntherapie.  
*Hautarzt* 55 (2004) 399–409
197. Wypych, J.I., Abeyounis, C.J., Reisman, R.E.  
Analysis of differing patterns of cross-reactivity of honeybee and yellow jacket venom-specific IgE: Use of purified venom fractions.  
*Int Arch Allergy Appl Immunol* 89 (1989) 60–66
198. Žitnik, S.E.K., Vesel, T., Avčín, T., Šilar, M., Košnik, M., Korošec, P.  
Monitoring honeybee venom immunotherapy in children with the basophil activation test: Monitoring of children VIT with BAT.  
*Pediatr Allergy Immunol* 23 (2012) 167–172
199. Zweig, M.H., Campbell, G.  
Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine.  
*Clin Chem* 39 (1993) 561–577

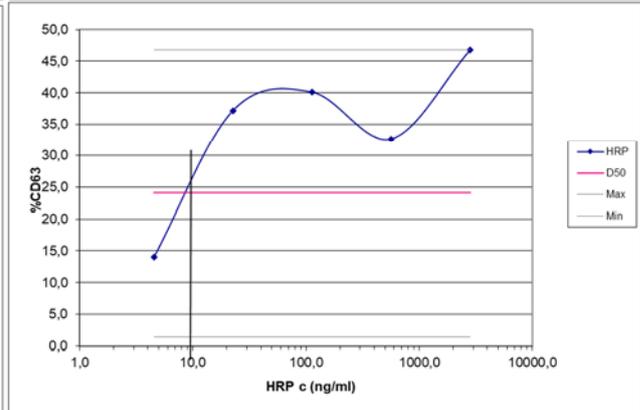
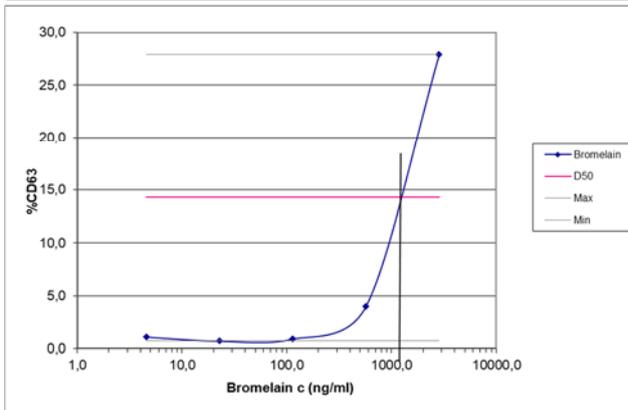
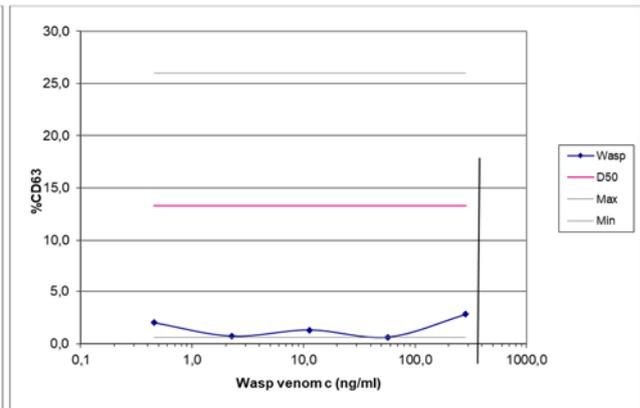
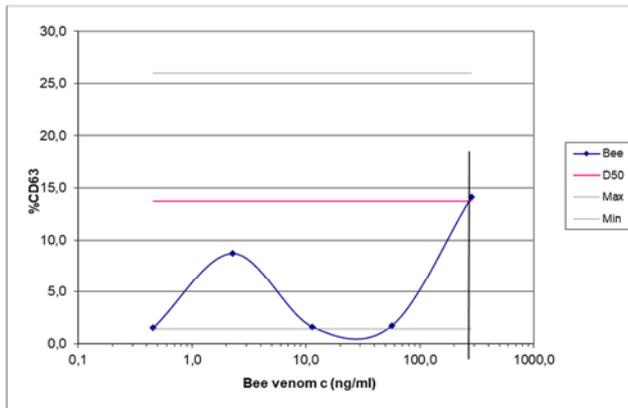
## 2 Anhang

### Werte VP 01

Evaluation Dose Response BAT			
	C50 (ng/ml)		
Bee Venom	280	Bee neg	
Wasp Venom	285	Wasp neg	
Ratio B/W	0,982	n.a.	
Bromelain	1100	pos	
HRP	8	pos	

Kriterien	
Ratio < 0.1	Ratio > 10
Bee Pos	Wasp pos

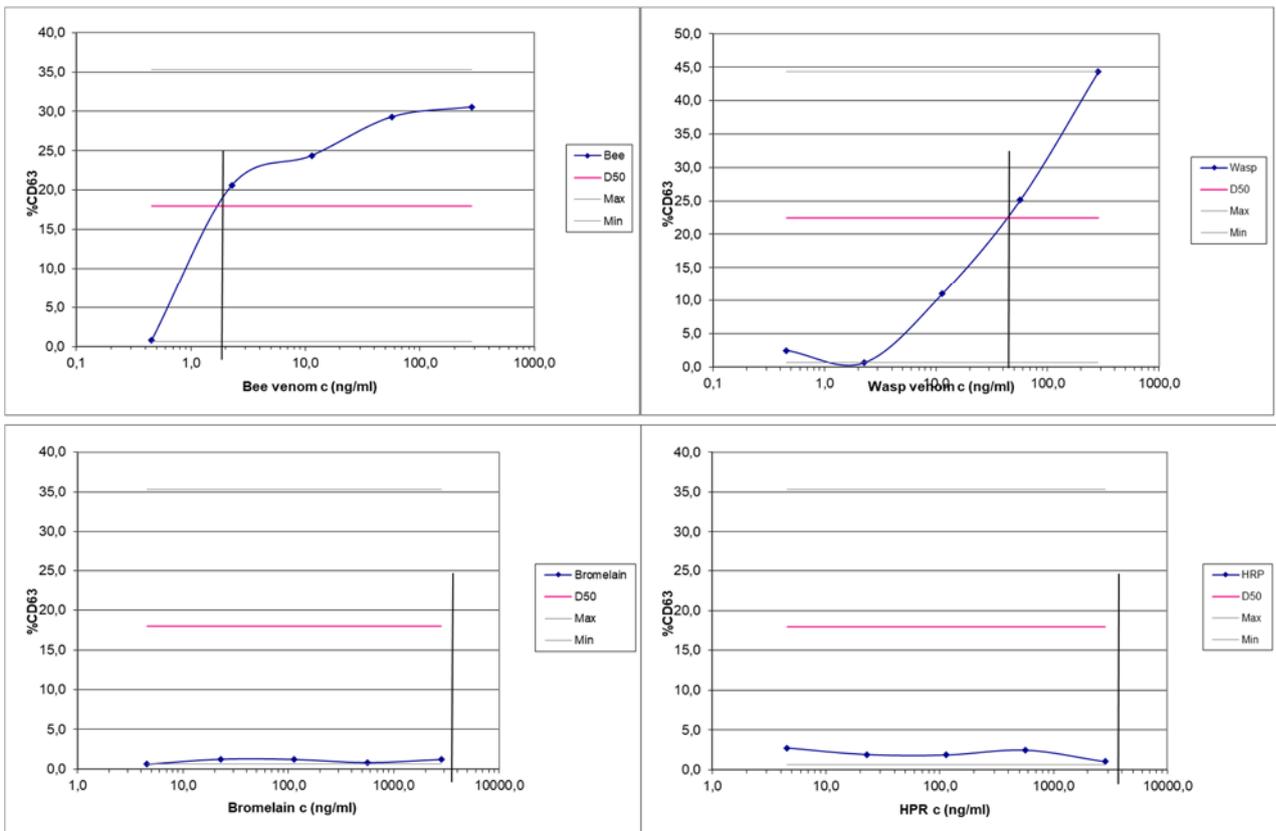


Werte VP 02

Evaluation Dose Response BAT			
	C50 (ng/ml)		
Bee Venom	1,7		
Wasp Venom	41		
Ratio B/W	0,041	Bee pos	
Bromelain	>2850	neg	
HRP	>2850	neg	

Kriterien	
Ratio < 0.1	Ratio > 10
Bee Pos	Wasp pos

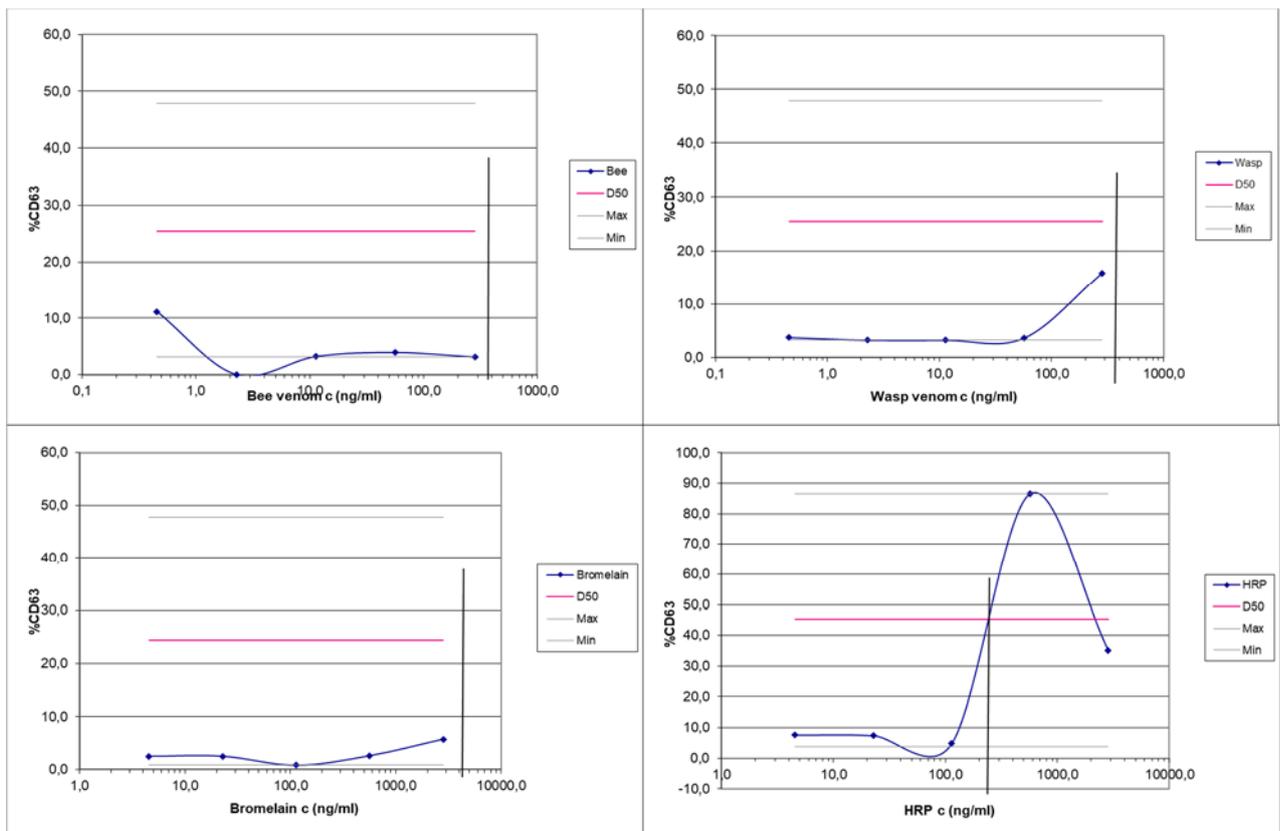


**Werte VP 03**

Evaluation Dose Response BAT			
	C50 (ng/ml)		
Bee Venom	285	Bee neg	
Wasp Venom	285	Wasp neg	
Ratio B/W	1,000	n.a.	
Bromelain	>2850	neg	
HRP	200	pos	

Kriterien	
Ratio < 0.1	Ratio > 10
Bee Pos	Wasp pos

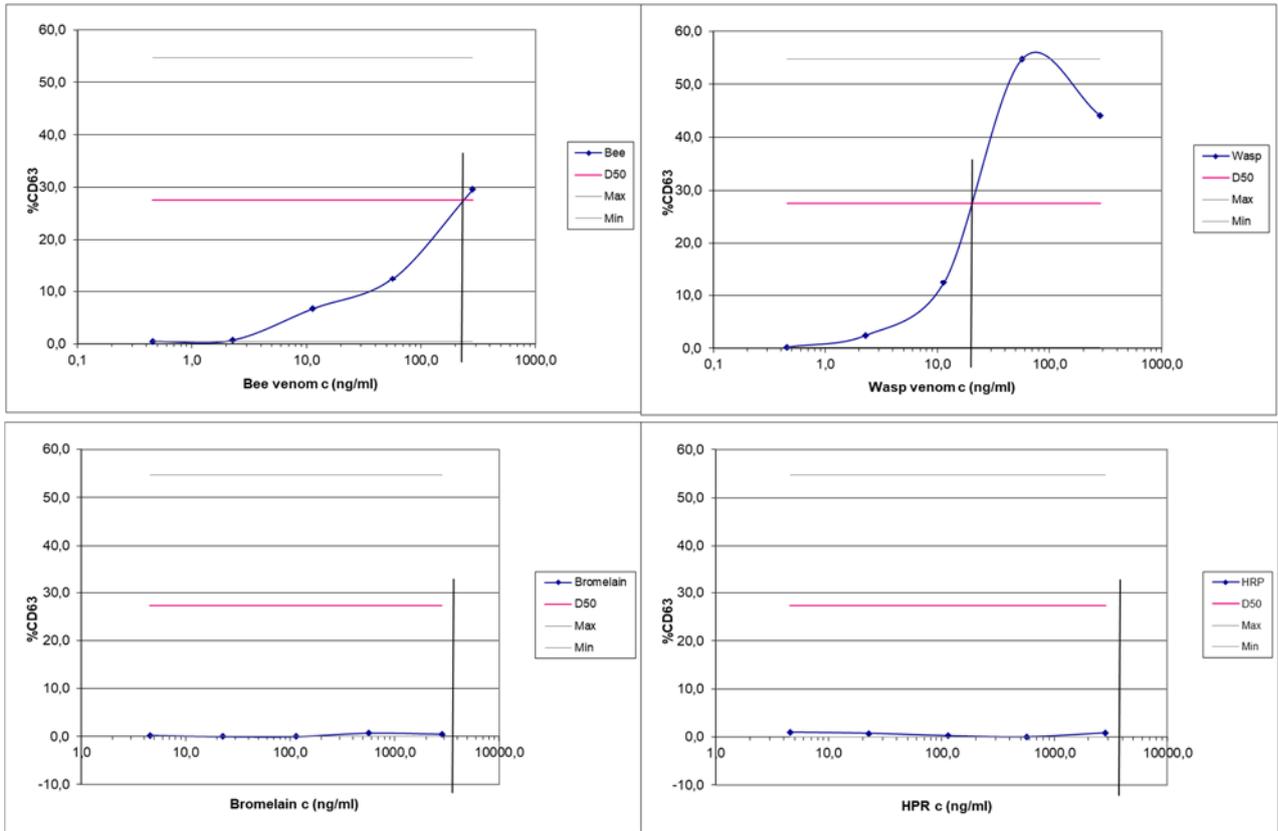


**Werte VP 04**

Evaluation Dose Response BAT			
	C50 (ng/ml)		
Bee Venom	210		
Wasp Venom	20		
Ratio B/W	10,500	Wasp pos	
Bromelain	>2850	neg	
HRP	>2850	neg	

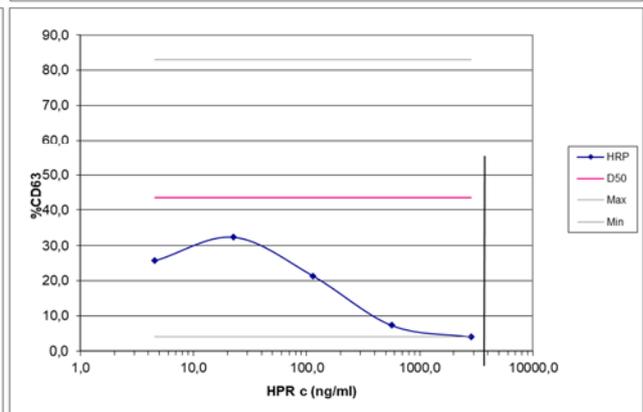
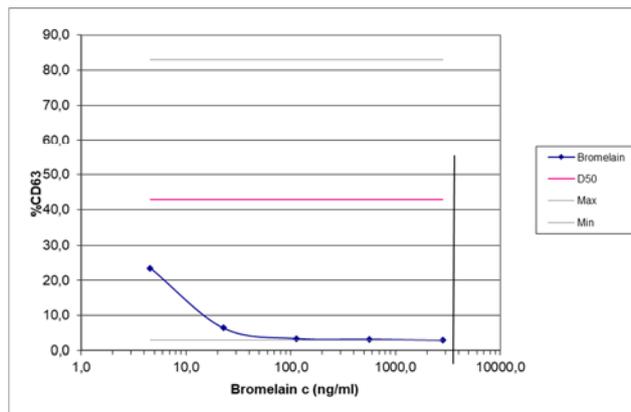
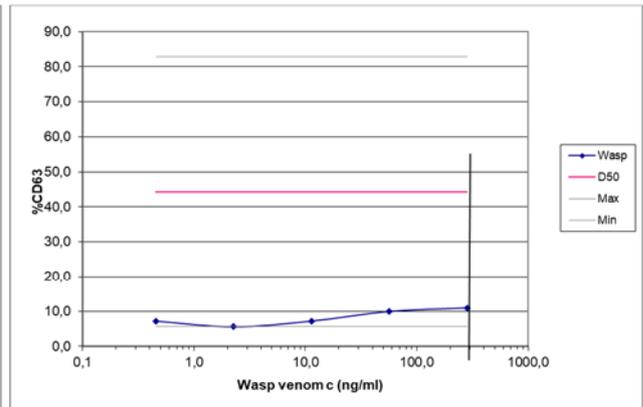
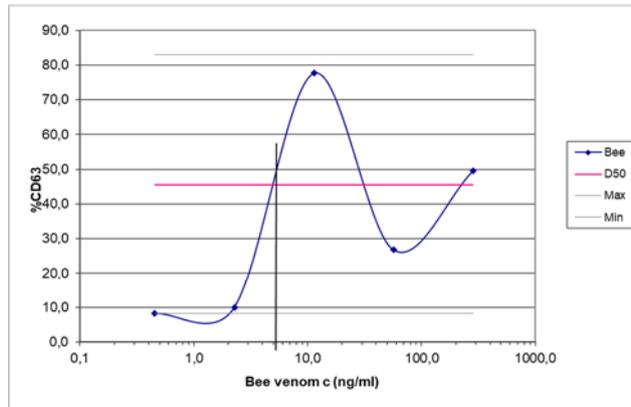
  

Kriterien	
Ratio < 0.1	Ratio > 10
Bee Pos	Wasp pos



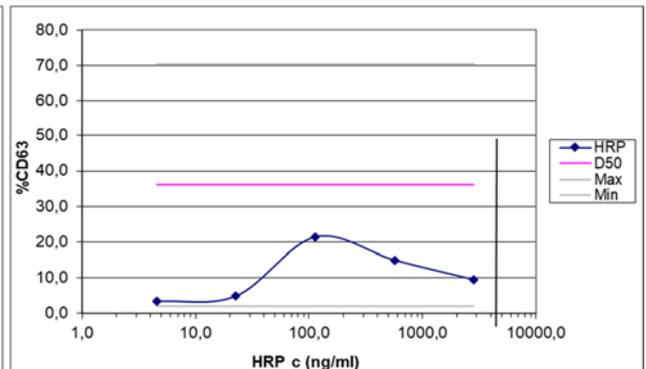
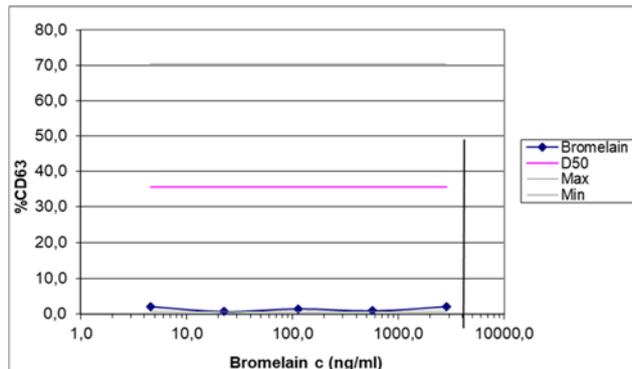
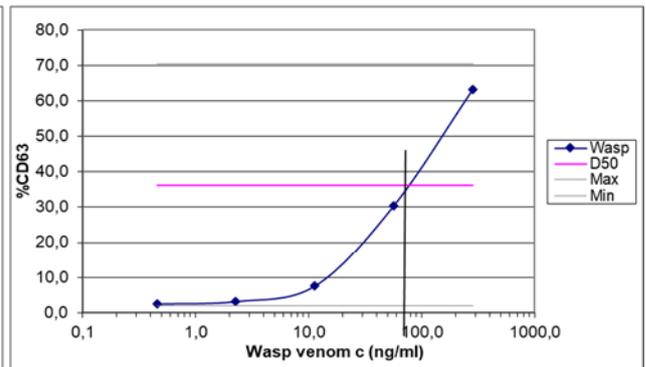
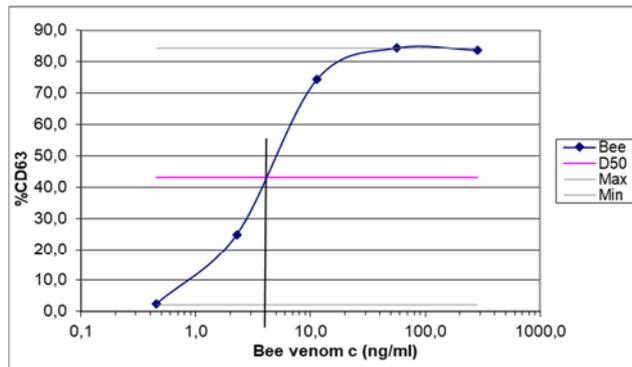
**Werte VP 05**

Evaluation Dose Response BAT									
	C50 (ng/ml)								
Bee Venom	5								
Wasp Venom	285								
Ratio B/W	0,018	Bee pos							
Bromelain	>2850	neg							
HRP	>2850	neg							
			<table border="1"> <tr> <th colspan="2">Kriterien</th> </tr> <tr> <td>Ratio &lt; 0.1</td> <td>Ratio &gt; 10</td> </tr> <tr> <td>Bee Pos</td> <td>Wasp pos</td> </tr> </table>	Kriterien		Ratio < 0.1	Ratio > 10	Bee Pos	Wasp pos
Kriterien									
Ratio < 0.1	Ratio > 10								
Bee Pos	Wasp pos								



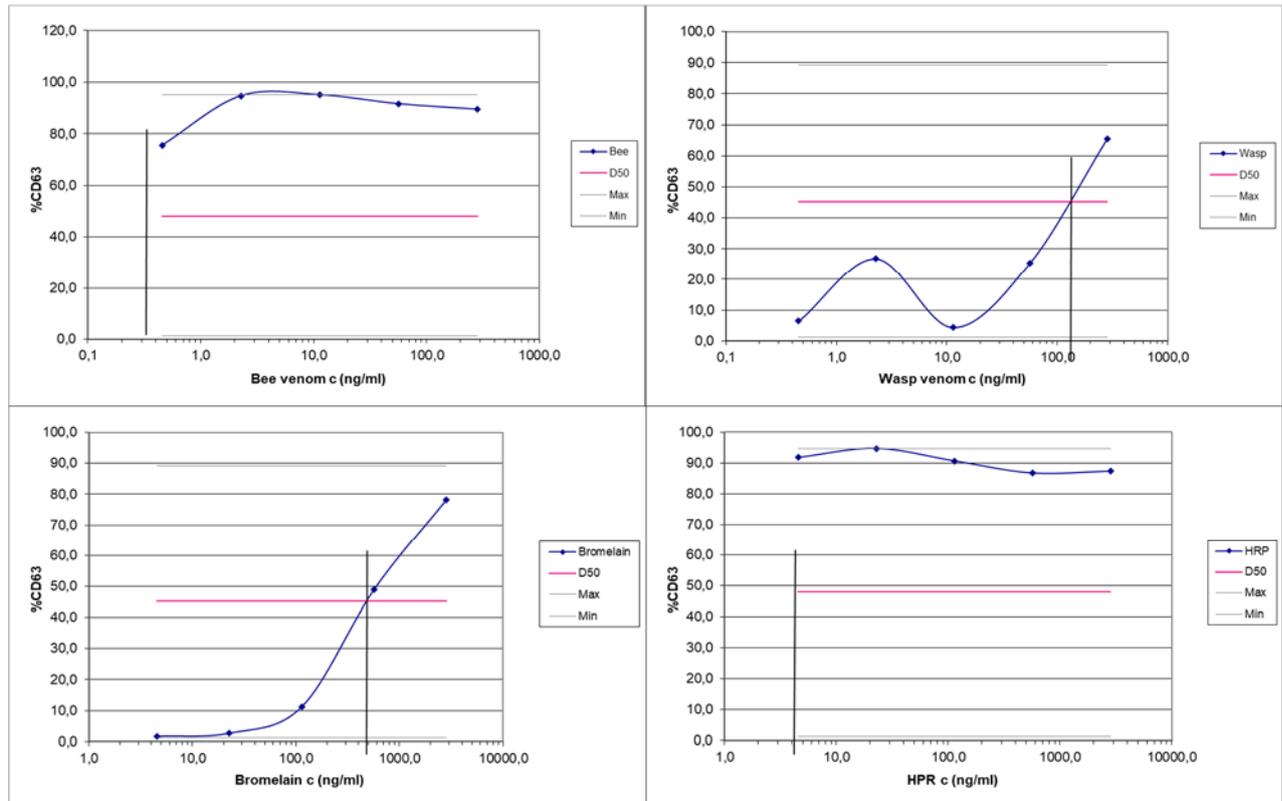
**Werte VP 06**

Evaluation Dose Response BAT			
	C50 (ng/ml)		
Bee Venom	4		
Wasp Venom	70		
Ratio B/W	0,057	Bee pos	
Bromelain	>2850	neg	
HRP	>2850	neg	
		Kriterien	
	Ratio < 0.1	Ratio > 10	
	Bee Pos	Wasp pos	



**Werte VP 07**

Evaluation Dose Response BAT									
	C50 (ng/ml)								
Bee Venom	0,45								
Wasp Venom	120								
Ratio B/W	0,004	Bee pos							
Bromelain	500	pos							
HRP	4,5	pos							
			<table border="1"> <tr> <th align="left" colspan="2">Kriterien</th> </tr> <tr> <td>Ratio &lt; 0.1</td> <td>Ratio &gt; 10</td> </tr> <tr> <td>Bee Pos</td> <td>Wasp pos</td> </tr> </table>	Kriterien		Ratio < 0.1	Ratio > 10	Bee Pos	Wasp pos
Kriterien									
Ratio < 0.1	Ratio > 10								
Bee Pos	Wasp pos								

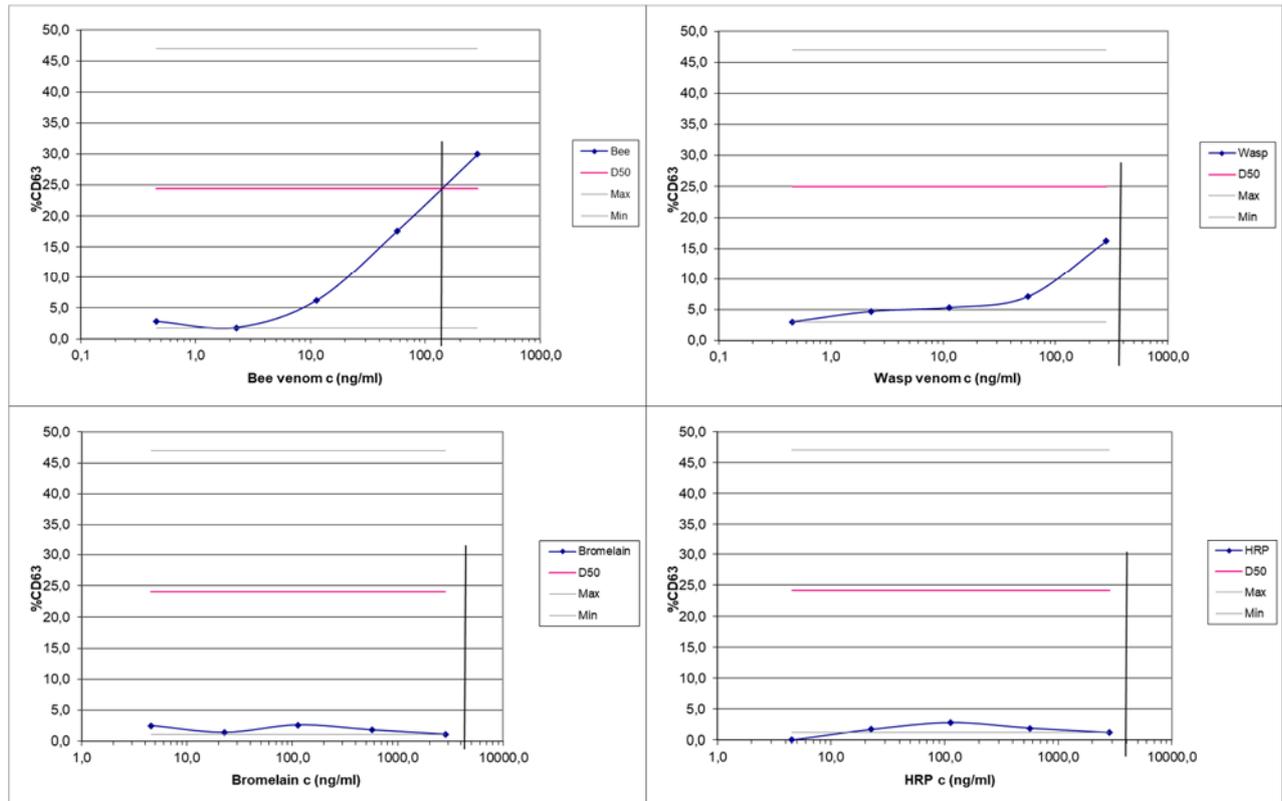


**Werte VP 08**

Evaluation Dose Response BAT			
	C50 (ng/ml)		
Bee Venom	140	Bee pos	
Wasp Venom	285		
Ratio B/W	0,491	n.a.	
Bromelain	>2850	neg	
HRP	>2850	neg	

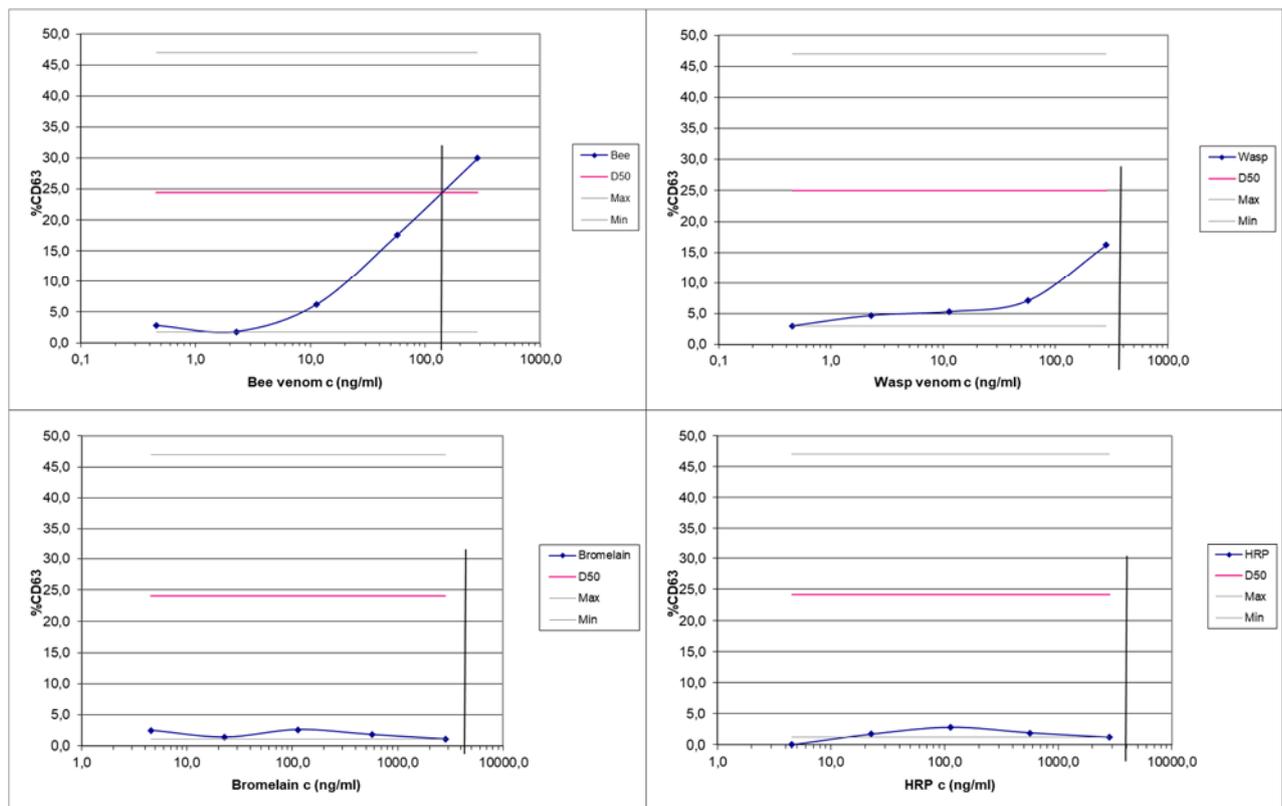
  

Kriterien	
Ratio < 0.1	Ratio > 10
Bee Pos	Wasp pos



Werte VP 09

Evaluation Dose Response BAT									
	C50 (ng/ml)								
Bee Venom	140	Bee pos							
Wasp Venom	285								
Ratio B/W	0,491	n.a.							
			<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Kriterien</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ratio &lt; 0.1</td> <td>Ratio &gt; 10</td> </tr> <tr> <td>Bee Pos</td> <td>Wasp pos</td> </tr> </tbody> </table>	Kriterien		Ratio < 0.1	Ratio > 10	Bee Pos	Wasp pos
Kriterien									
Ratio < 0.1	Ratio > 10								
Bee Pos	Wasp pos								
Bromelain	>2850	neg							
HRP	>2850	neg							

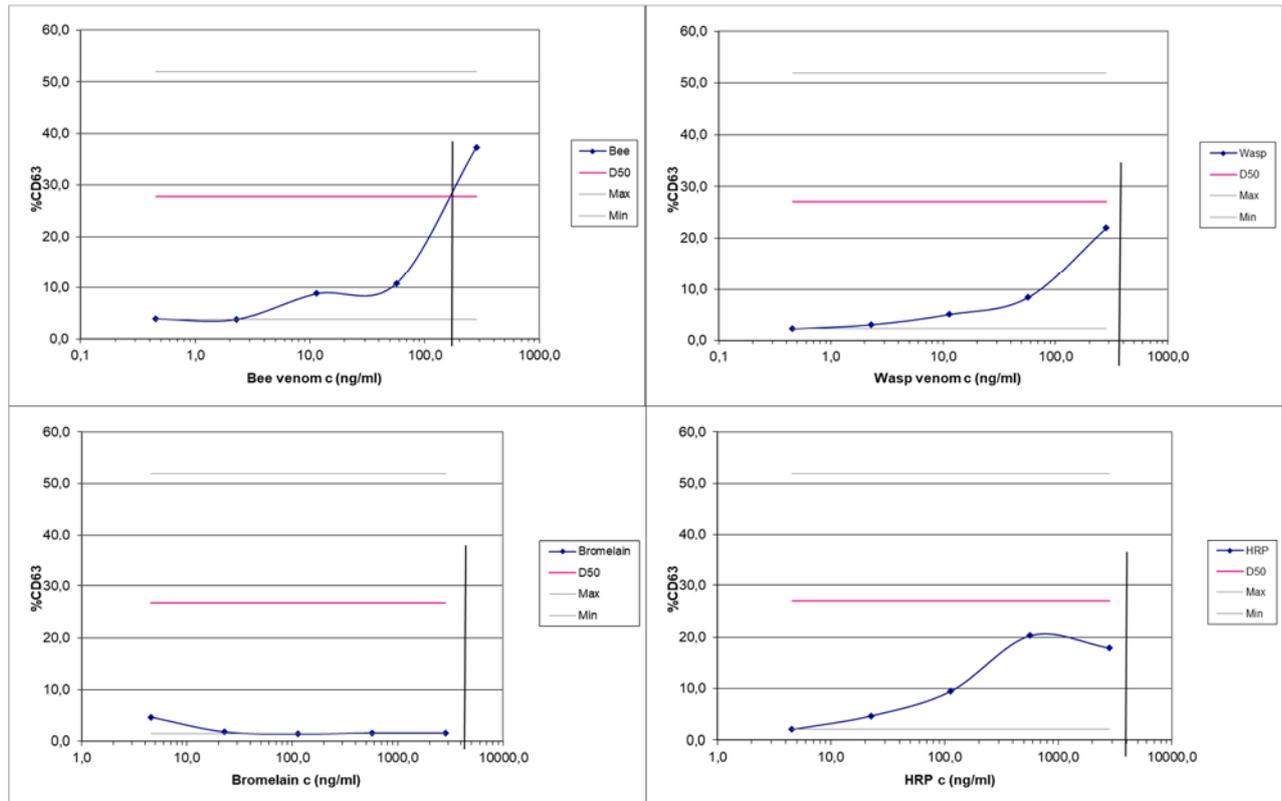


**Werte VP 10**

Evaluation Dose Response BAT			
	C50 (ng/ml)		
Bee Venom	180	Bee pos	
Wasp Venom	285	Wasp pos?	
Ratio B/W	0,632	Doppel positiv?	
Bromelain	>2850	neg	
HRP	>2850	neg	

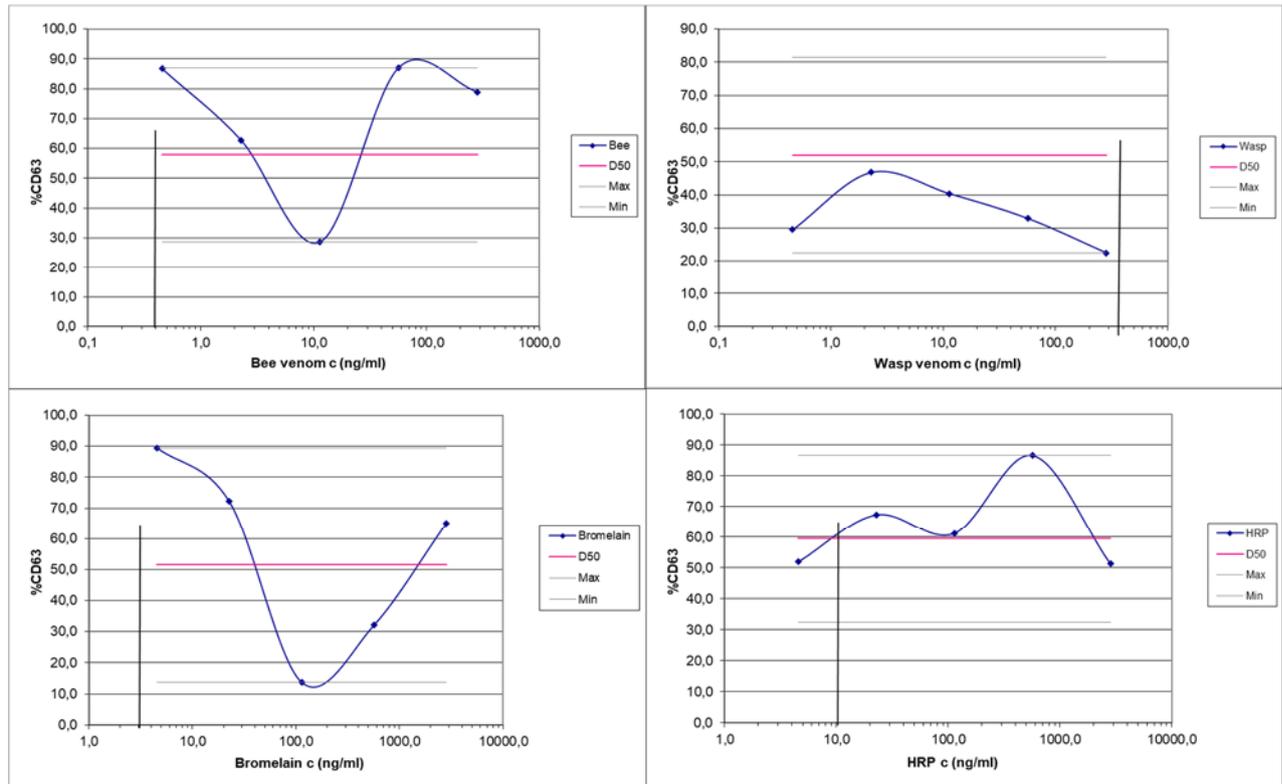
  

Kriterien	
Ratio < 0.1	Ratio > 10
Bee Pos	Wasp pos



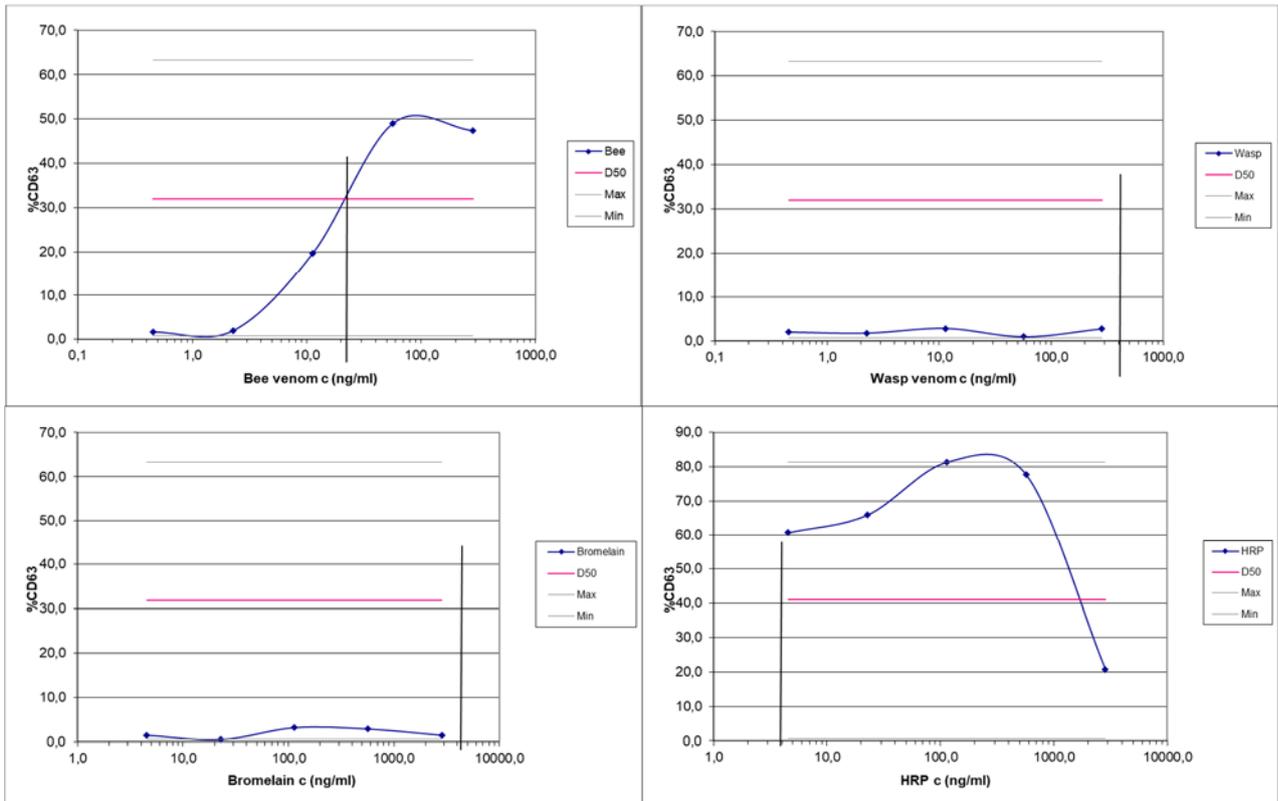
**Werte VP 11**

Evaluation Dose Response BAT									
	C50 (ng/ml)								
Bee Venom	0,45								
Wasp Venom	285								
Ratio B/W	0,002	Bee pos							
Bromelain	4,5	pos							
HRP	9	pos							
			<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Kriterien</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ratio &lt; 0.1</td> <td>Ratio &gt; 10</td> </tr> <tr> <td>Bee Pos</td> <td>Wasp pos</td> </tr> </tbody> </table>	Kriterien		Ratio < 0.1	Ratio > 10	Bee Pos	Wasp pos
Kriterien									
Ratio < 0.1	Ratio > 10								
Bee Pos	Wasp pos								



**Werte VP 12**

Evaluation Dose Response BAT									
	C50 (ng/ml)								
Bee Venom	20								
Wasp Venom	285								
Ratio B/W	0,070	Bee pos							
Bromelain	>2850	neg							
HRP	4,5	pos							
			<table border="1"> <tr> <th colspan="2">Kriterien</th> </tr> <tr> <td>Ratio &lt; 0.1</td> <td>Ratio &gt; 10</td> </tr> <tr> <td>Bee Pos</td> <td>Wasp pos</td> </tr> </table>	Kriterien		Ratio < 0.1	Ratio > 10	Bee Pos	Wasp pos
Kriterien									
Ratio < 0.1	Ratio > 10								
Bee Pos	Wasp pos								

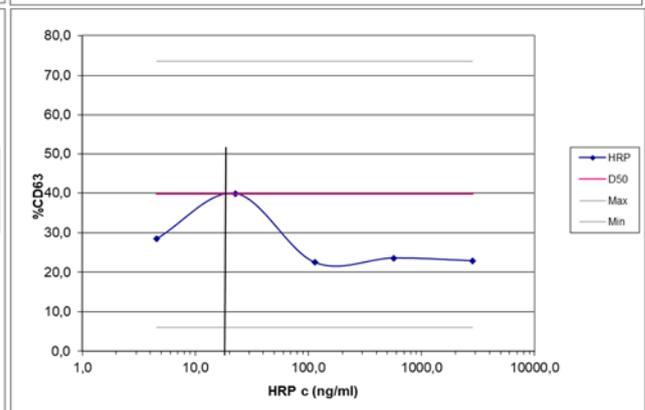
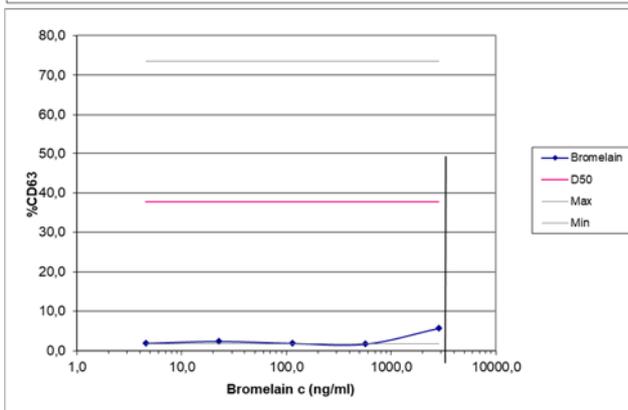
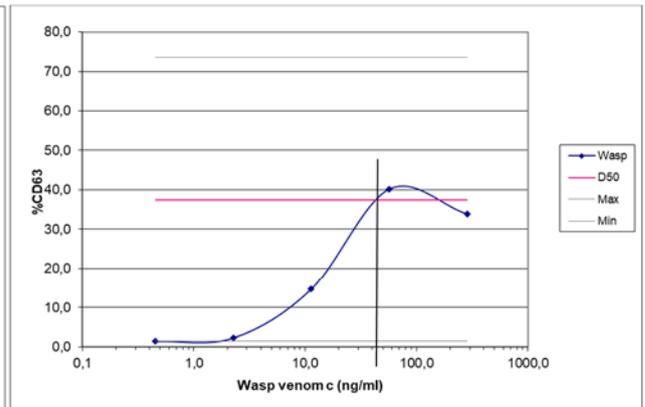
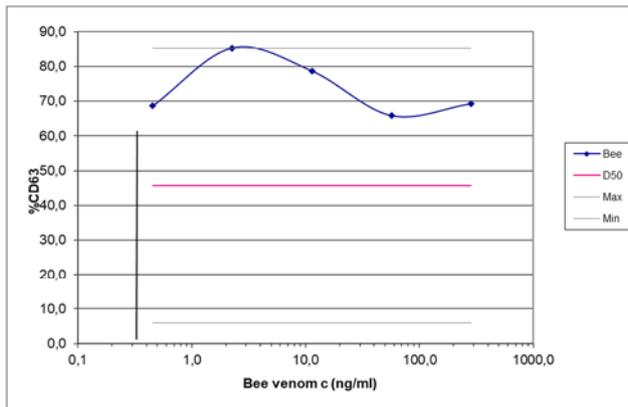


**Werte VP 13**

Evaluation Dose Response BAT			
	C50 (ng/ml)		
Bee Venom	0,45		
Wasp Venom	40		
Ratio B/W	0,011	Bee pos	
Bromelain	>2850	neg	
HRP	15	pos	

Kriterien	
Ratio < 0.1	Ratio > 10
Bee Pos	Wasp pos

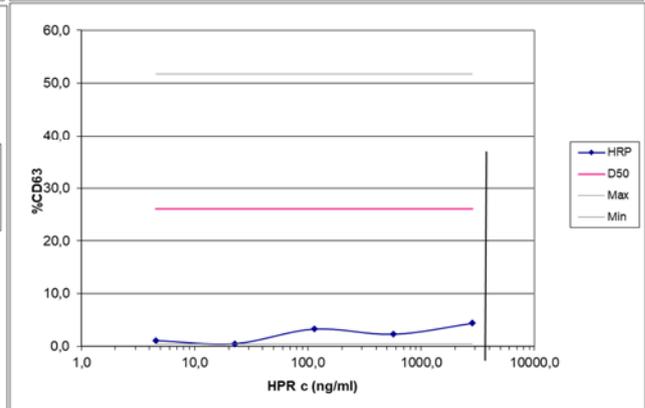
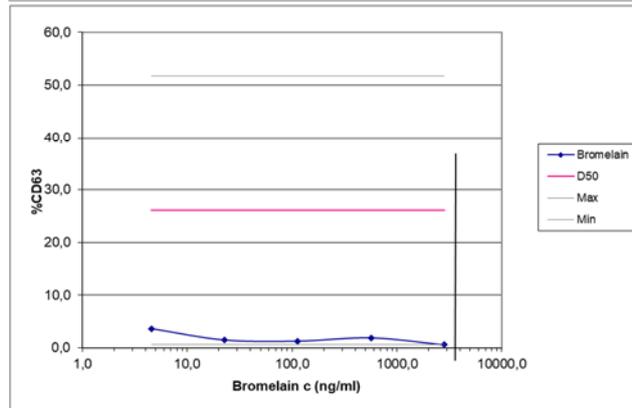
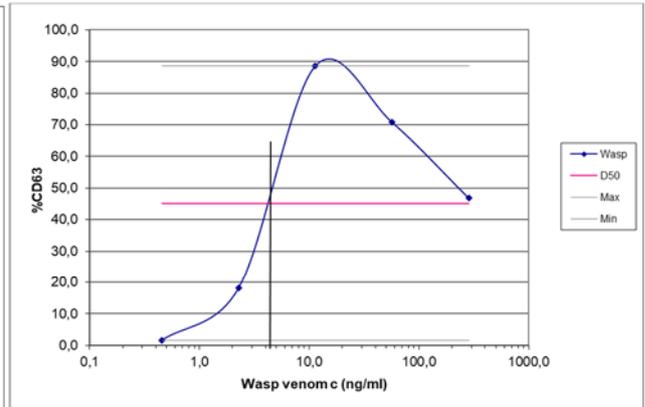
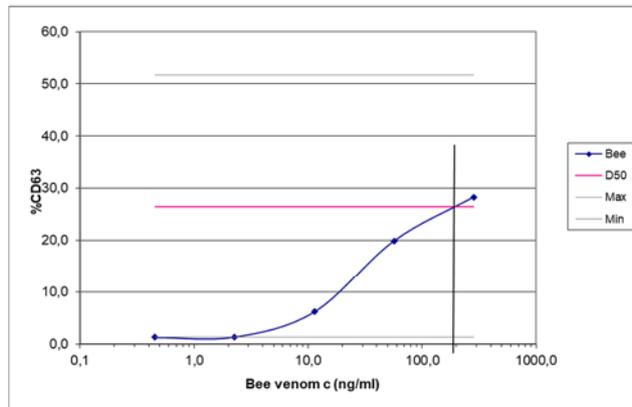


**Werte VP 14**

Evaluation Dose Response BAT			
	C50 (ng/ml)		
Bee Venom	200		
Wasp Venom	4		
Ratio B/W	50,000	Wasp pos	
Bromelain	>2850	neg	
HRP	>2850	neg	

Kriterien	
Ratio < 0.1	Ratio > 10
Bee Pos	Wasp pos

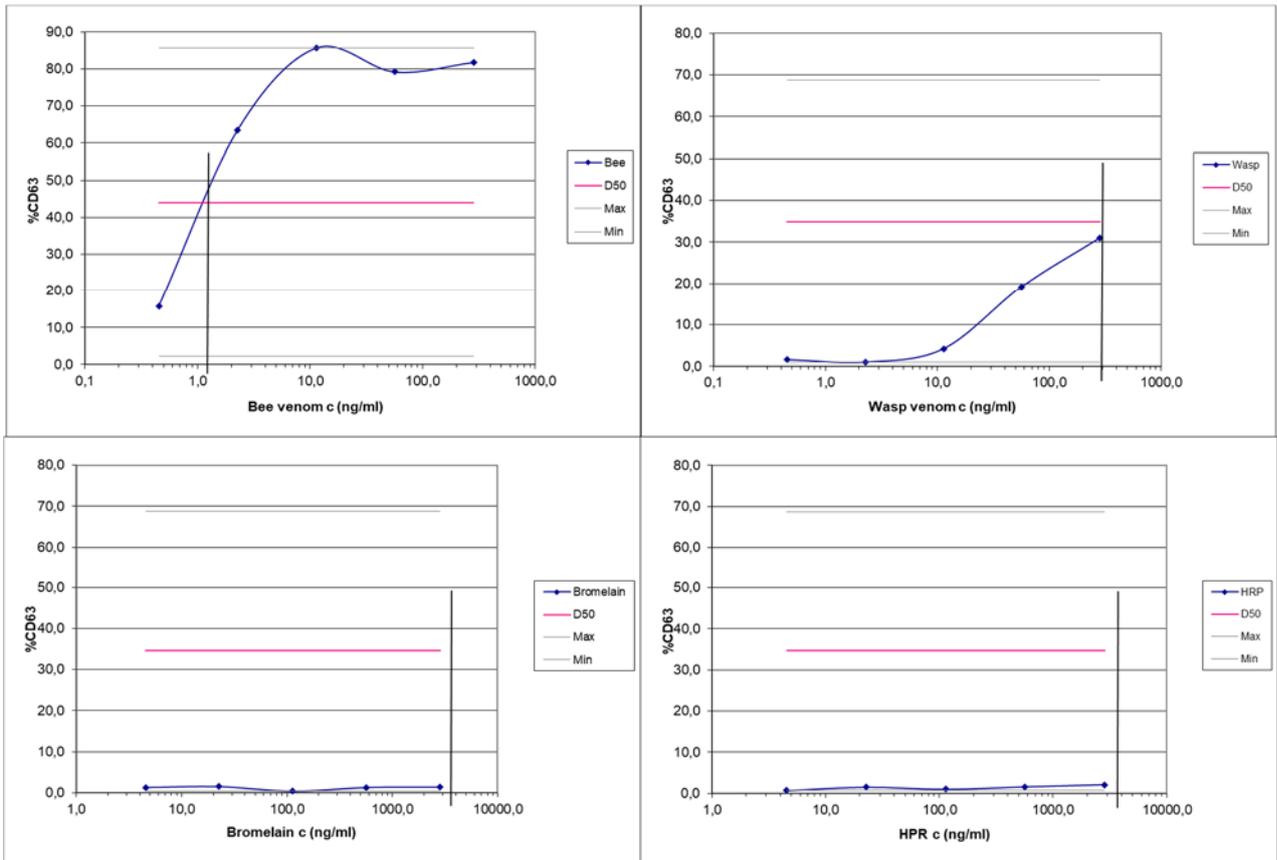


**Werte VP 15**

Evaluation Dose Response BAT			
	C50 (ng/ml)		
Bee Venom	1		
Wasp Venom	285		
Ratio B/W	0,004	Bee pos	
Bromelain	>2850	neg	
HRP	>2850	neg	

Kriterien	
Ratio < 0.1	Ratio > 10
Bee Pos	Wasp pos

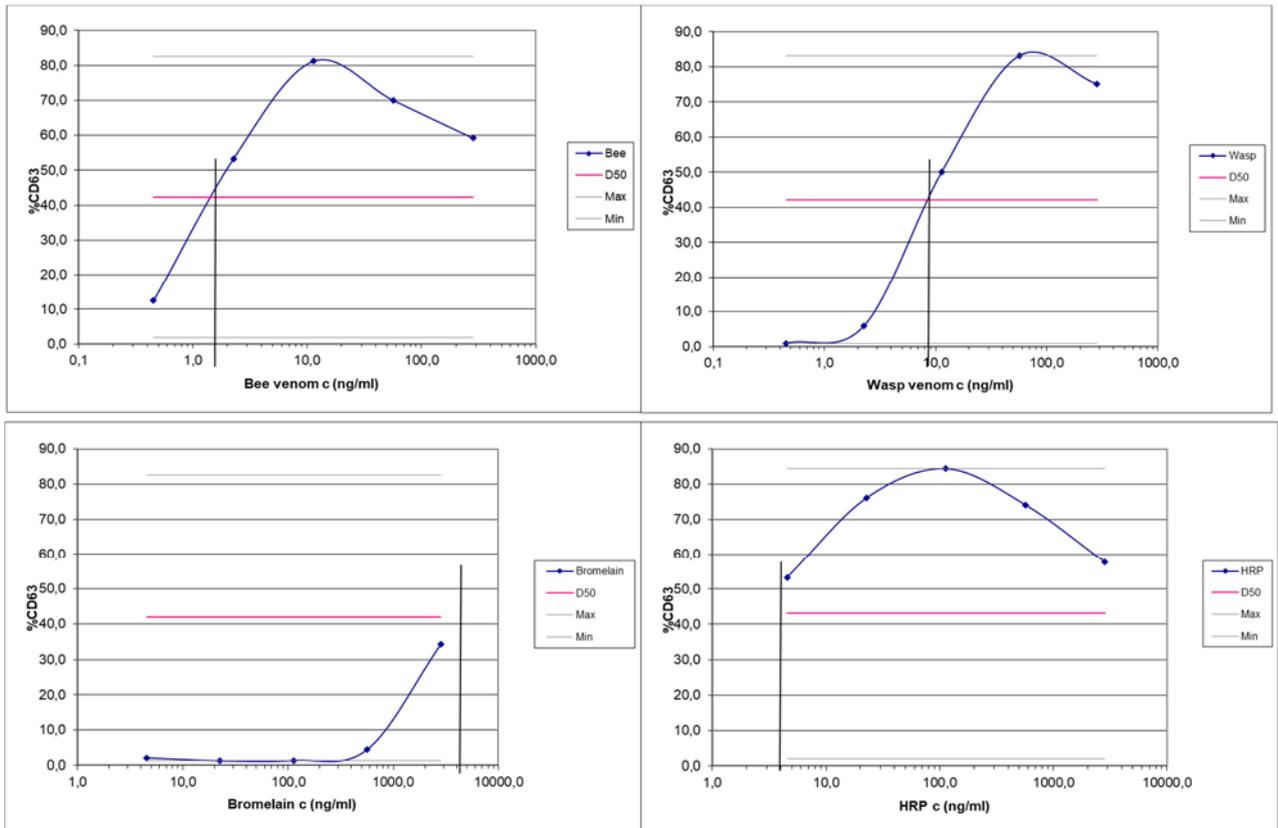


**Werte VP 16**

Evaluation Dose Response BAT			
	C50 (ng/ml)		
Bee Venom	1,4		
Wasp Venom	8		
Ratio B/W	0,175	Doppel positiv!	
Bromelain	>2850	neg	
HRP	4,5	pos	

Kriterien	
Ratio < 0.1	Ratio > 10
Bee Pos	Wasp pos

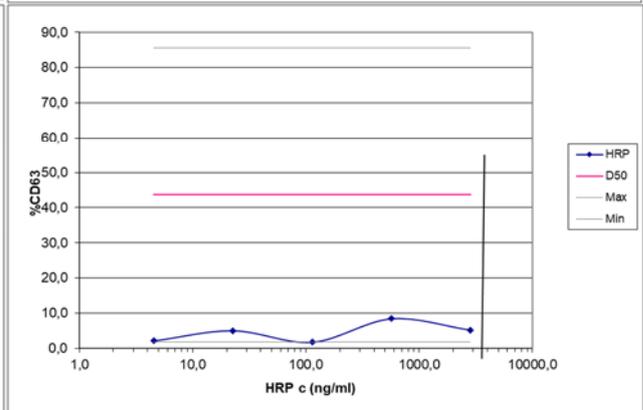
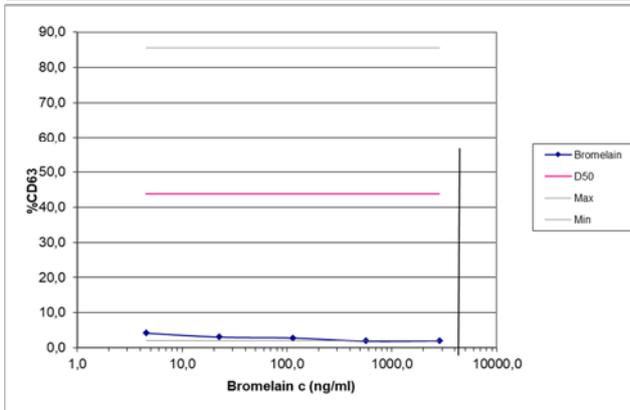
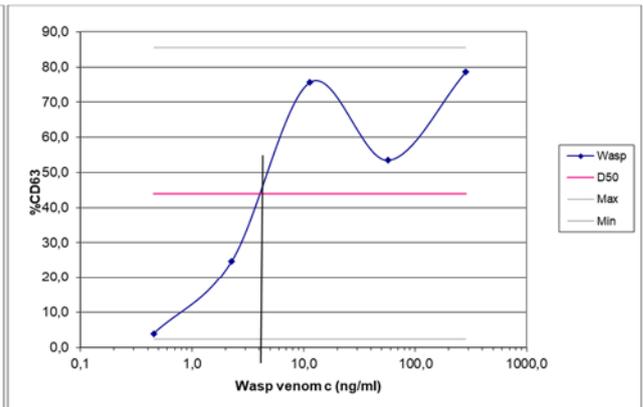


**Werte VP 17**

Evaluation Dose Response BAT			
	C50 (ng/ml)		
Bee Venom	1		
Wasp Venom	4		
Ratio B/W	0,250	Doppel positiv!	
Bromelain	>2850	neg	
HRP	>2850	neg	

Kriterien	
Ratio < 0.1	Ratio > 10
Bee Pos	Wasp pos

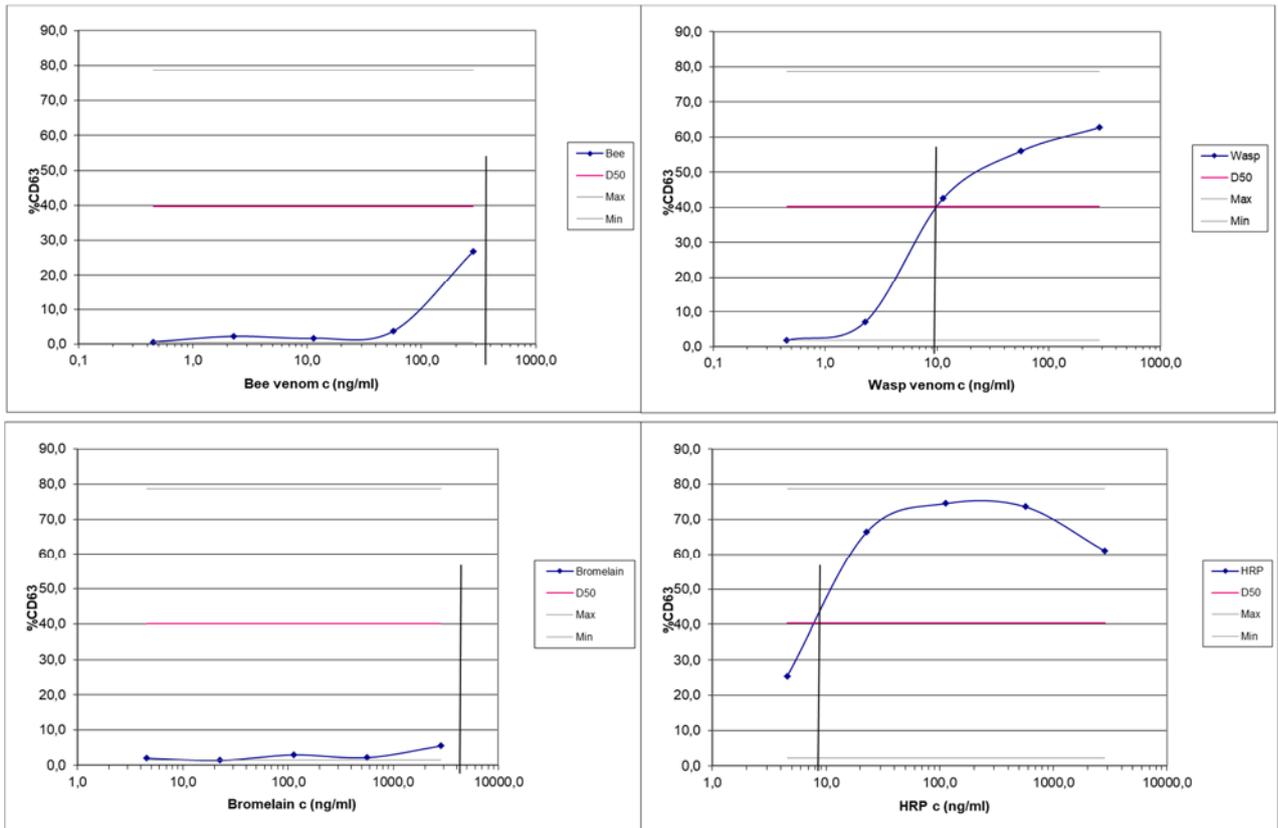


**Werte VP 18**

Evaluation Dose Response BAT			
	C50 (ng/ml)		
Bee Venom	285		
Wasp Venom	9		
Ratio B/W	31,667	Wasp pos	
Bromelain	>2850	neg	
HRP	7	pos	

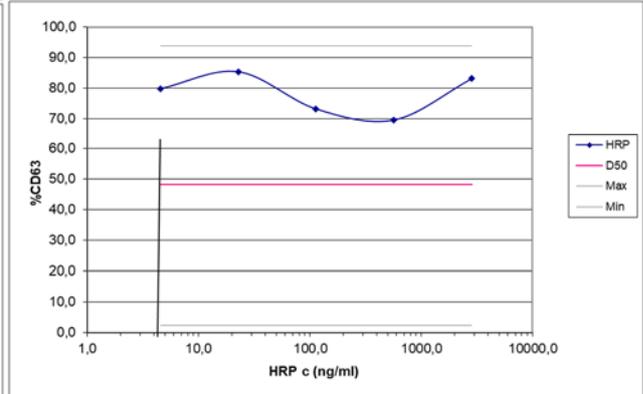
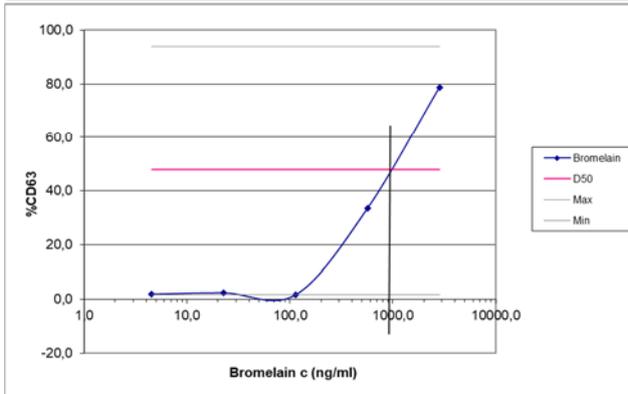
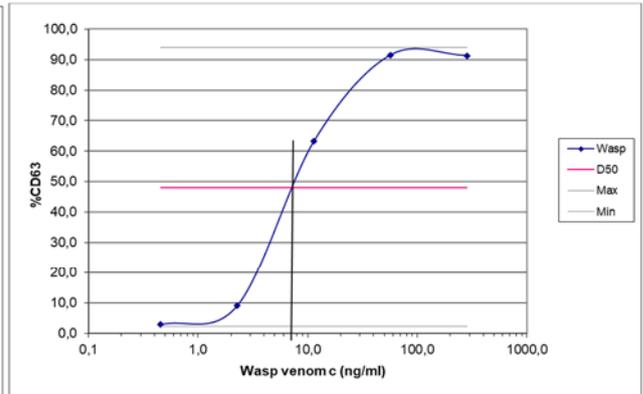
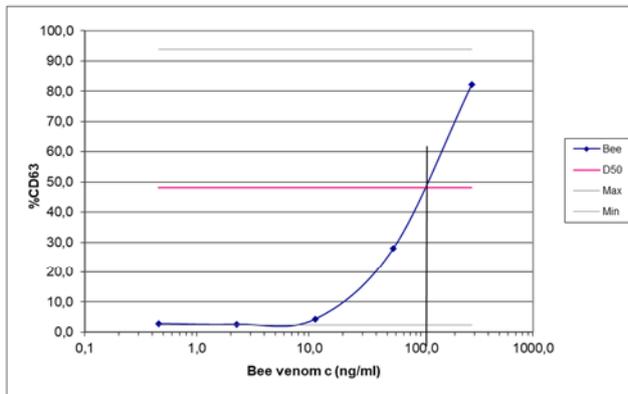
  

Kriterien	
Ratio < 0.1	Ratio > 10
Bee Pos	Wasp pos



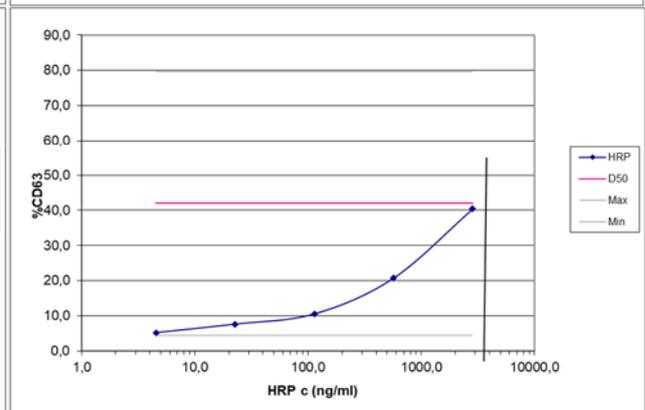
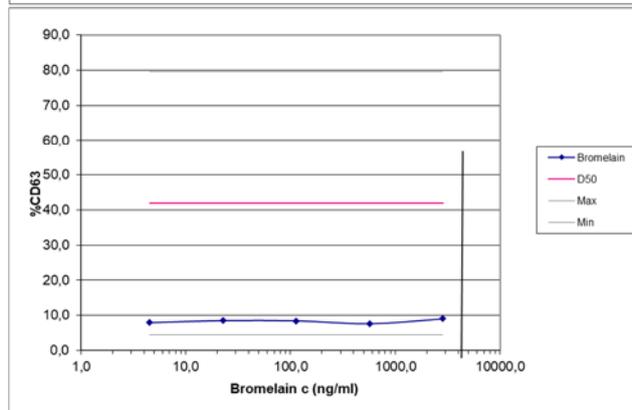
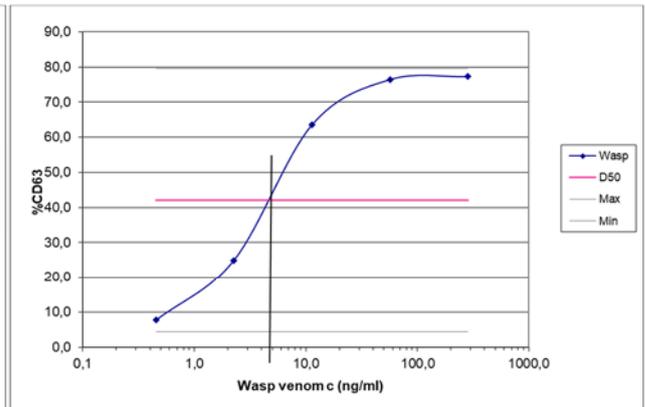
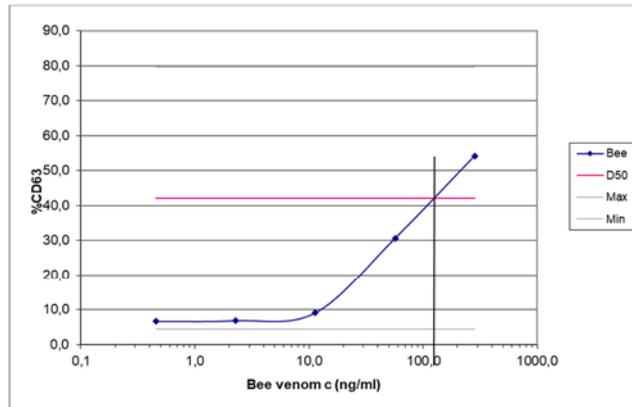
**Werte VP 19**

Evaluation Dose Response BAT									
	C50 (ng/ml)								
Bee Venom	100								
Wasp Venom	7								
Ratio B/W	14,286	Wasp pos							
Bromelain	900	pos							
HRP	4,5	pos							
			<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Kriterien</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ratio &lt; 0.1</td> <td>Ratio &gt; 10</td> </tr> <tr> <td>Bee Pos</td> <td>Wasp pos</td> </tr> </tbody> </table>	Kriterien		Ratio < 0.1	Ratio > 10	Bee Pos	Wasp pos
Kriterien									
Ratio < 0.1	Ratio > 10								
Bee Pos	Wasp pos								



Werte VP 20

Evaluation Dose Response BAT									
	C50 (ng/ml)								
Bee Venom	130								
Wasp Venom	4								
Ratio B/W	32,500	Wespe positiv							
Bromelain	0								
HRP	0								
		<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Kriterien</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ratio &lt; 0.1</td> <td>Ratio &gt; 10</td> </tr> <tr> <td>Bee Pos</td> <td>Wasp pos</td> </tr> </tbody> </table>		Kriterien		Ratio < 0.1	Ratio > 10	Bee Pos	Wasp pos
Kriterien									
Ratio < 0.1	Ratio > 10								
Bee Pos	Wasp pos								

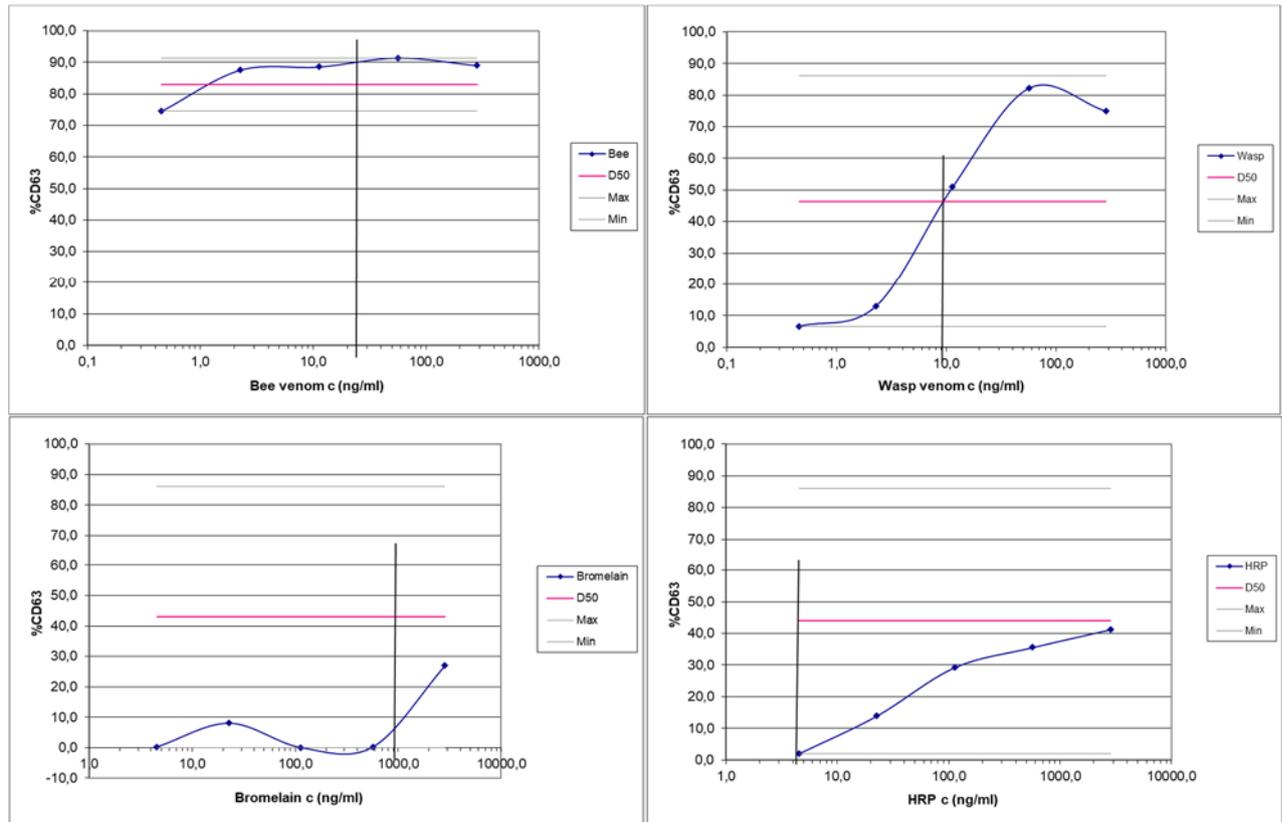


**Werte VP 21**

Evaluation Dose Response BAT			
	C50 (ng/ml)		
Bee Venom	22		
Wasp Venom	8		
Ratio B/W	2,750	Doppel positiv!	
Bromelain	0		
HRP	0		

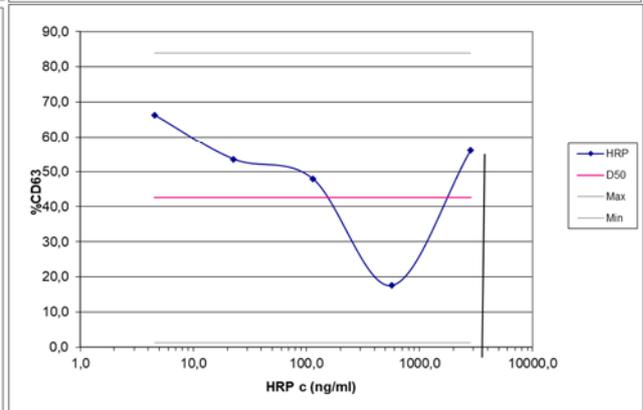
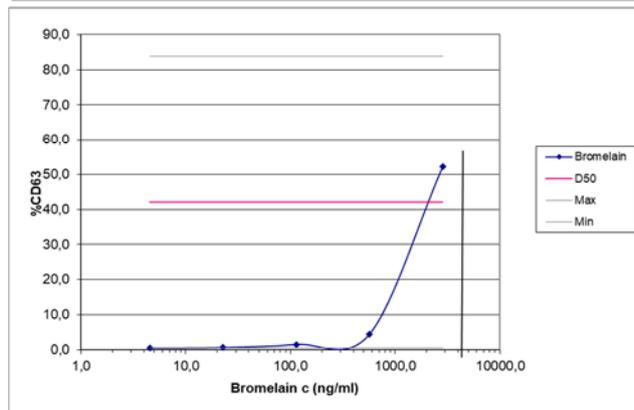
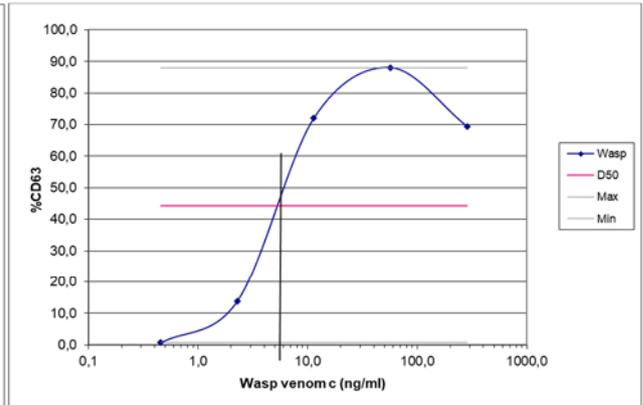
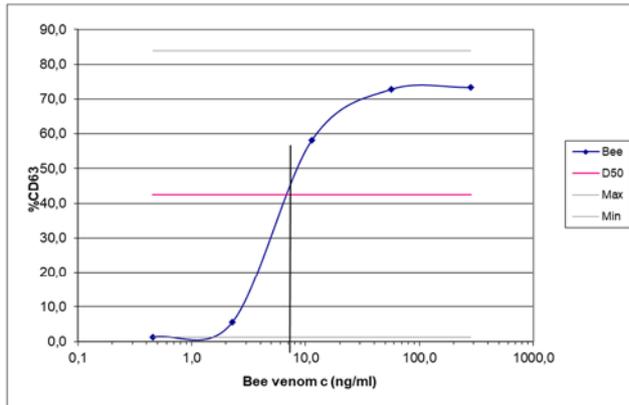
  

Kriterien	
Ratio < 0.1	Ratio > 10
Bee Pos	Wasp pos



**Werte VP 22**

Evaluation Dose Response BAT			
	C50 (ng/ml)		
Bee Venom	7		
Wasp Venom	5		
Ratio B/W	1,400	Doppel positiv!	
Bromelain	0		
HRP	2		
Kriterien			
Ratio < 0.1	Ratio > 10		
Bee Pos	Wasp pos		



### 3 Lebenslauf

<b>Name</b>	Lilian Felicitas Krischan
<b>Geburtsdatum/-ort</b>	9. Juni 1982 in Heidelberg
<b>Schulbildung</b>	1988-1992 Grundschule, Weissach im Tal 1992-2001 Kolleg St. Blasien, staatlich anerkanntes Jesuitengymnasium, St. Blasien
<b>Studium</b>	2002-2005 Georg-August Universität, Göttingen (Vorklinik) 2005-2006 Christian-Albrechts Universität, Kiel 2006-2008 Eberhardt-Karls Universität, Tübingen 2008-2009 Technische Universität, München
<b>Hochschulabschluss</b>	11/2009 Zweite Ärztliche Prüfung (Staatsexamen)
<b>Approbation</b>	12/2009
<b>Berufliche Tätigkeit</b>	2011-2016 Artemed Fachklinik, München 2016-2018 Klinikum Stuttgart-Krankenhaus Bad Cannstatt 2018-2019 Praxis Dres. med. Wilde/Tepe, Gilching seit 2019 MediCorium Dr. med. Greiner, Oberursel

## 4 Danksagung

Für die Möglichkeit, an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München meine Promotion absolvieren zu dürfen, bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. Johannes Ring (Emeritus) sowie bei Herrn Prof. Dr. med. Tilo Biedermann.

Mein aufrichtiger und herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Bernadette Eberlein für die Vergabe des Themas, die stets konstruktive Hilfe bei der Dissertation und ihre unermüdliche Geduld. Ohne ihre akademische Anleitung und Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Weiterhin danke ich Frau Christa Hettrich für ihre technische Anleitung und Einführung in die FACS-Analyse sowie allen weiteren Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein, welche mich bei meiner Arbeit unterstützten. Ebenso danke ich allen Patienten und Kontrollpersonen, welche durch bereitwillige Blutspenden zu dieser Studie beitrugen.

Herrn Dr. M. Schneider und Frau Dr. U. Sonnenschein sei für die Bereitstellung der Auswertungsformeln sowie für jegliche Unterstützung im Rahmen der Studie herzlich gedankt.

Meiner Familie, besonders meinem Vater, gebührt der größte Dank. Durch ihr Vertrauen, ihre Unterstützung und ihren Zuspruch haben sie mir diese Arbeit überhaupt ermöglicht und wesentlich zum Gelingen beigetragen.